

PRISCILA DOS SANTOS BURY

**Análise estrutural de enzimas chave para biossíntese de gentamicina e
sisomicina**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas Da Universidade de São Paulo, para Obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2019

PRISCILA DOS SANTOS BURY

**Análise estrutural de enzimas chave para biossíntese de gentamicina e
sisomicina**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas Da Universidade de São Paulo, para Obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Pós-graduação em Microbiologia.

Orientador: Prof. Doutor Márcio Vinicius Bertacine Dias.

Versão Original.

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos Bury, Priscila

Análise estrutural de enzimas chave para
biossíntese de gentamicina e sisomicina / Priscila
dos Santos Bury; orientador Marcio Vinicius
Bertacine Dias. -- São Paulo, 2019.

130 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Aminoglicosídeos. 2. Metiltransferases. 3.
Enzimas-PLP-dependentes. I. Vinicius Bertacine
Dias, Marcio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Priscila dos Santos Bury

Título da Tese: Análise estrutural de enzimas chave para biossíntese de gentamicina e sisomicina

Orientador: Prof. Dr Marcio Vinicius Bertacine Dias

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado/ Tese de Doutorado em sessão pública realizada a / /, considerou a candidata:

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

Examinado(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinado(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinado(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

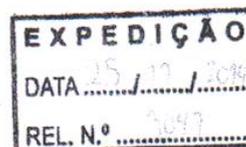
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 700/14 referente ao projeto intitulado: "*Análise estrutural de enzimas chaves para biossíntese de gentamicina e sisomicina*" sob a responsabilidade de **Priscila dos Santos Bury**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

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

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



Andei pela escuridão, porém nunca sozinha. Por
Isso dedico esse trabalho a minha querida mãe,
que sempre me acolheu em seus braços.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Márcio Vinicius Bertacine Dias pelo ensinamentos, pela dedicação, por acreditar no meu potencial e por ser um exemplo de perseverança.

À Pesquisadora Fanglu Huang que além de ter sido uma “mãe” na pesquisa foi um anjo que me ajudou em momentos muito difíceis. Serei eternamente grata!

Ao professor Peter Leadlay pelo aporte científico e pela maravilhosa recepção em seu grupo.

À minha família científica Tabata, Fernanda, Larissa, Xiba, Peppers, Natália, Catarina, Gerardo, Jademilson, Laura e Bruno que sempre me apoiaram e me proporcionaram momentos inesquecíveis de diversão e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Andreza, Paula, Nicolas e Gustavo sou grata por ter conhecido vocês que me incentivaram e me alegraram nessa reta final.

Ao Marcelinho que me alimentou e proporcionou diálogos que me impulsionaram a seguir em frente.

À minha família Tia Elza, Tio Dei, Adriana, Karen, Livia, Tia Dina, Tio Cosmo e Nicolas por serem meu porto seguro.

À minha mãe Ivone e ao meu pai Nezas por serem a razão da minha batalha.

Aos meus amigos maravilhosos Laís, Léo, Aureliano, Gabriel, Telyane e Daniel pelas conversas divertidas que nesses últimos meses foram minha descontração e motivo para levar uma vida mais leve.

As minhas amigas Débora, Glace, Carol e Érica que apesar da distância me sinto apoiada e amada por vocês.

Ao meu companheiro Fernando pela amizade, lealdade e cumplicidade nesse período. Que esse amor perdure em nossas memórias pelo resto da vida.

À Fapesp pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de doutorado. Projeto:
2014/07843-6;

Por fim e principalmente a Deus, por ter me privilegiado com a minha vida, minha família e amigos e por ter me guiado.

RESUMO

BURY, P. D. S. **Análise estrutural de enzimas chave para biossíntese de gentamicina e sisomicina.** 2019. 115p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Aminoglicosídeos é uma classe de antibióticos caracterizado por conter açúcares aaminados unidos por ligações glicosídicas a um anel aminociclitol central. Esses antibióticos são usados primariamente para tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbicas gram-negativas. Sua ação consiste na inibição da síntese proteica, através da ligação na subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Porém, infelizmente, clinicamente o uso dessas moléculas é limitado devido a ototoxicidade e nefrotoxicidade. Os aminoglicosídeos incluem tobramicinas, amicacinas, canamicinas, estreptomicinas, paromicinas, neomicinas, gentamicinas e sisomicinas. A sisomicina e gentamicina possuem como anel central o 2-deoxistreptamina (2-DOS) e são altamente aaminados e metilados. Assim, a rota biossintética dessas moléculas apresentam diversas enzimas que realizam tais decorações nos anéis, e que podem ser possíveis alvos em biotecnologia a fim de se obter novos derivados de aminoglicosídeos. Entretanto, para alcançar este propósito, é necessário primeiro decifrar os mecanismos moleculares das enzimas através da resolução de suas estruturas tridimensionais. Assim, os objetivos deste trabalho foi realizar a dissecação das enzimas específicas envolvidas na biossíntese dos antibióticos sisomicina e gentamicina. Para isso, foi utilizado métodos de expressão heteróloga de proteínas, cromatografia por afinidade e exclusão molecular e Cristalografia de Raio-X para determinação estrutural das proteínas alvo do projeto. Assim, foi obtido estruturas cristalinas das enzimas dependentes de piridoxal-5'-fosfato: Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4 em complexo binário com seus cofatores e complexo ternário com intermediários de biossíntese. Através dessas estruturas foi revelado detalhes a respeito da natureza das enzimas. Além das peculiaridades de cada uma que as possibilitam realizar diferentes modificações nos substratos. Adicionalmente, para a metiltransferase GenN foram obtidos complexos com seu substrato e outros análogos ou substratos alternativos. Esses complexos demonstraram a capacidade da enzima de metilar outros aminoglicosídeos, produzindo Canamicina metilada e Tobramicina metilada, gerando “produtos naturais não naturais”. Com a obtenção da estrutura tridimensional dessas enzimas e uma profunda análise estrutural foi possível realizar um estudo mais detalhado sobre mecanismo de catálise e a promiscuidade de tais enzimas, demonstrando seu potencial uso em biologia sintética para produção de derivados de aminoglicosídeos.

Palavras-chave: Aminoglicosídeos. Metiltransferases. Enzimas-PLP-dependentes.

ABSTRACT

BURY, P. D. S. **Structural analysis of key enzymes for gentamicin and sisomicin biosynthesis**. 2019. 115p. Ph. D. these (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Aminoglycoside is a class of antibiotics characterized to contain amino sugars linked through glycosidic linkage to a central aminocyclitol ring. These antibiotics are primarily used to treat infections caused by gram-negative aerobic bacteria. Its action mechanism consists in the inhibition of protein synthesis binding to the 30S subunit of the bacterial ribosome. Unfortunately, however, clinical use of these molecules is limited due to ototoxicity and nephrotoxicity. Aminoglycosides include tobramycin, amikacin, kanamycin, streptomycin, paromycin, neomycin, gentamicin and sisomicin. Sisomicin and gentamicin have the 2-deoxystreptamine as the central ring and are highly aminated and methylated molecules. Thus, the biosynthetic route of these molecules have several enzymes that perform such decorations on their rings, and that are biotechnological targets to produce new aminoglycoside derivatives. In this work, we used heterologous expression methods of proteins, affinity chromatography and molecular exclusion, and X-ray crystallography for structural determination of enzymes involved in the biosynthesis of gentamicin and sisomicin. Thus, the crystal structures of the following pyridoxal-5'-phosphate dependent enzymes were obtained: Sis5, GenB2, GenB3 and GenB4 in binary complex with their cofactors and ternary complex with biosynthesis intermediates. Using these structures, details were revealed regarding the shape and mechanism of the enzymes. Besides the peculiarities of each one, which allow them to make different modifications in the substrates. In addition, we have obtained structure of the methyltransferase GenN in complex with its substrate and other analogues or alternative substrates. These protein-ligand complexes demonstrated the ability of this enzyme to methylate other aminoglycosides, producing methylated kanamycin and tobramycin, which lack such natural modification, producing "non-natural natural products". By obtaining the three-dimensional structures of these enzymes and a deep structural analysis it was possible to carry out a detailed study on the mechanism of catalysis and the promiscuity of such enzymes, demonstrating their potential use in synthetic biology to produce aminoglycoside derivatives.

Keywords: Aminoglycosides. Methyltransferases. PLP-dependent-enzymes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diversidade química de produtos naturais.	17
FIGURA 2. Diversidade química de aminoglicosídeos.	23
FIGURA 3. Formação do intermediário de biossíntese paromamina a partir da glicose 6'-fosfato.	24
FIGURA 4. Sítio de ligação do aminoglicosídeos no RNAr 16S.	28
FIGURA 5. Gentamicina e Sisomicina	31
FIGURA 6. Agrupamento gênico da gentamicina e sisomicina.	31
FIGURA 7. Proposta para a via de biossíntese da sisomicina. Nas setas as enzimas decoradoras e em azul as modificações.	33
FIGURA 8. Biossíntese da gentamicina A2.....	35
FIGURA 9. Formação do intermediário de biossíntese gentamicina X2.	36
FIGURA 10. Formação do complexo da gentamicina.	39
FIGURA 11. Dois estados do cofator S-adenosil-metionina.	40
FIGURA 12. Vitamina B6 em sua forma inativa: Piridoxina e Piridoxal; forma ativa: piridoxal-5'-fosfato e piridoxamina-5'-fosfato.	43
FIGURA 13. Fases da reação de transaminação.....	46
FIGURA 14. Esquema ilustrando o uso da biossíntese combinatorial. Enzimas decoradas são inseridas ao agrupamento gênico de uma bactéria hospedeira, gerando uma diversidade química no antibiótico.....	49
FIGURA 15. Cromatogramas gerados pelo program Unicorn (GE Healthcare) das cromatografias por exclusão molecular das proteínas GenN, Sis5, GenB2, GenB2 K227A, GenB3 e GenB4. E seus respectivos géis de poliacrilamida desnaturante. Marcador: Precision Plus Protein Dual color 250 kDa (Bio-rad).	60
FIGURA 16. Cristais obtidos após otimização manual pelo método de gota pendurada.	63
FIGURA 17. Intermediários de biossíntese da sisomicina.....	65
FIGURA 18. Representações da estrutura cristalográfica da enzima Sis5.....	66
FIGURA 19. Piridoxal 5'-fosfato ancorado ao sítio ativo da enzima Sis5.....	67
FIGURA 20. Sobreposição da enzima Sis5 com PLP (azul) e Sis5 com PMP (azul claro) no sítio ativo.	68
FIGURA 21. Intermediário de biossíntese da gentamicina G418 ancorando ao sítio ativo da enzima Sis5.	69

FIGURA 22. Modo de interação dos ligantes nos sítios ativos da GenB1 e Sis5.	71
FIGURA 23. Componentes do complexo gentamicina.	72
FIGURA 24. a) Monômero em <i>cartoon</i> da proteína GenB2: em roxo o domínio do N-terminal; em azul o domínio do C-terminal; em bege o domínio de ligação do PLP/PMP. B) Superfície eletrostática da GenB2 mostrando a cavidade do sítio ativo carregada negativamente.....	73
FIGURA 25. Sítio ativo da GenB2:	74
FIGURA 26. Análise <i>in vitro</i> da atividade das aminotransferases.....	75
FIGURA 27. Mecanismo de racemização catalisado pelo cofator PLP e a estrutura do sítio ativo de alanina racemase com ligação PPL-l-Ala (base de Schiff reduzida). ...	76
FIGURA 28: Estrutura química dos intermediários de biossíntese da gentamicina. .	77
FIGURA 29. Sítio ativo da enzima GenB2.....	78
FIGURA 30. Sítio ativo das enzimas Sis5 e GenB2:PMP:Gentamicina X2.	79
FIGURA 31. Comparação da enzima GenB2 selvagem e GenB2 K227A	80
FIGURA 32. Representações da estrutura cristalográfica da GenB4	81
FIGURA 33. Possível catálise da enzima Genb4.	82
FIGURA 34. Estrutura da GenB4 em complexo com a sisomicina.....	83
FIGURA 35. Estrutura química do intermediário de biossíntese JI-20A fosforilado que é o possível substrato da enzima GenB3.	84
FIGURA 36. Demonstrações do Dímero da GenB3.	85
FIGURA 37. Alinhamento das proteínas GenB3 e GenB4.	86
FIGURA 38. Modelo da posição do substrato JI-20A fosforilado no sítio ativo da enzima GenB3, obtido a partir com complexo GenB4:sisomicina.....	87
FIGURA 39. Sítio ativo das enzimas GenB3 e GenB4	88
FIGURA 40. Alinhamento das proteínas Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4. No retângulo verde os resíduos conservados que interagem com o cofator e estão envolvidos na catálise.....	89
FIGURA 41. Sobreposição estrutural das enzimas Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4.	89
FIGURA 42. Superfície eletrostática das enzimas	90
FIGURA 43. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura cristalográfica da enzima GenN	91
FIGURA 44. Sobreposição da enzima MJ0882 em amarelo e a GenN em azul, no círculo azul o domínio N-terminal ausente na MJ0882.	92
FIGURA 45. Superfície eletrostática da enzima GenN.....	94

FIGURA 46. Interações do S-adenosilhomocisteína (branco) com resíduos do sítio ativo (azul).	95
FIGURA 47. Aminoglicosídeos e ou precursores de biossíntese obtidos em complexo com a GenN.	96
FIGURA 48. Interações do G418 resíduos e águas do sítio ativo da GenN.	97
FIGURA 49. Interações da tobramicina no sítio ativo da GenN.	98
FIGURA 50. Interações do DAA2 no sítio ativo da GenN.	99
FIGURA 51. Interações da Canamicina B no sítio ativo da GenN	100
FIGURA 52. Mecanismo catalítico da enzima GenN.	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Uso terapêutico dos aminoglicosídeos aprovado pelo FDA	26
TABELA 2. Condições de cristalização das enzimas após otimização.	62
TABELA 3. Relação das estruturas cristalinas de enzimas PLP dependentes.	64
TABELA 4. Relação dos complexos obtidos com a enzima GenN.	96

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA	Food and Drug Administration
HTS	High Throughput Screening (Triagem de alto rendimento)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CG	Citocina Guanina
2-DOS	2-deoxiestreptamina
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA ^t	Ácido ribonucleico transportador
RNA ^r	Ácido ribonucleico ribossômico
AME	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
AACs	Acetiltransferases
ANTs	Nucleotídeo transferases
APHs	Fosfo transferases
ORF	Open reading frame (Fase de leitura aberta)
kb	Kilobase
Glc-6-P	Glicose 6'-fosfato
SAM	S-adenosil-metionina
SAH	S-adenosil-homocisteína
G418	Geneticin
C α	Carbono α
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PMP	Piridoxamina 5'-fosfato
LB	Luria Bertani

rpm	Rotações por minuto
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
M9	Meio mínimo
mM	Milimolar (10^{-3} M)
NaCl	Cloreto de sódio
DNAse	Deoxyribonuclease I
IMAC	Cromatografia por íons metálicos imobilizados
mL	Mililitro (10^{-3} L)
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
mg	Miligrama (10^{-3} g)
g	Gramma
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Hcl	Ácido clorídrico
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
V	Volt
LN BIO	Laboratório Nacional de Biociências
CNPEM	Centro Nacional de pesquisa em energia e materiais
SAD	Single anomalous dispersion
μ L	Microlitro (10^{-6} M)
MAD	Multi-wavelength anomalous diffraction
SLS	Swiss Light Source
PDB	Protein Data Bank
MR	Molecular Replacement
kDa	Kilodalton

GE	General Eletrics
°C	Grau Celsius
PEG	Polietilenoglicol
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
RMSD	Desvio médio dos átomos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Produtos Naturais	17
1.2	Actinomicetos: uma farmácia natural	19
1.3	Aminoglicosídeos	21
1.3.1	Uma breve história sobre os Aminoglicosídeos	21
1.3.2	Classificação	21
1.3.3	Indicações	24
1.3.4	Espectro de atividade	27
1.3.5	Modo de ação	27
1.3.6	Resistência	29
1.3.7	Gentamicina e sisomicina	30
1.4	Metiltransferases	40
1.4.1	<i>N</i> -Metiltransferases	41
1.4.2	Metiltransferases envolvidas na biossíntese de gentamicina	42
1.5	Enzimas dependentes de PLP	42
1.5.1	Transaminases	45
1.5.2	Racemases	46
1.5.3	Decarboxilases	47
1.5.4	Reações de substituições e eliminações γ e β	47
1.5.5	Enzimas PLP dependentes na biossíntese de deoxi-açúcares	47
1.6	Justificativa do trabalho	48
2	OBJETIVOS	51
3	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1	Expressão e purificação das enzimas GenN, Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4	52
3.2	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
3.3	Coleta e processamento de dados de difração de raios x	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Expressão e purificação	59
4.2	Cristalização	61
4.3	Coleta e análise dos dados de difração em raios X	63
4.4	Análise da estrutural das enzimas dependentes de PLP	64

4.4.1	Estrutura cristalina da transaminase Sis5	64
4.4.2	Análise da estrutura tridimensional da proteína GenB2.....	72
4.4.3	GenB2 em complexo com Gentamicina X2	76
4.4.4	Análise da estrutura tridimensional da proteína GenB3.....	83
4.4.5	Comparação entre Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4.....	88
4.5	Análise da estrutura tridimensional da proteína GenN.....	90
4.5.1	GenN e seu cofator SAM/SAH	94
4.5.2	GenN em complexo com G418, Canamicina B, Tobramicina e o intermediário de biossíntese DAA2.....	95
4.5.3	Mecanismo de catálise da enzima GenN	100
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
6	REFERÊNCIAS.....	106
	APÊNDICE A - Tabela Cristalográfica GenN	110
	APÊNDICE B - Tabela Cristalográfica Sis5.....	111
	APÊNDICE C - Tabela Cristalográfica GenB2, GenB3 e GenB4.....	112
	APÊNDICE D – Artigo: Structural Basis of the Selectivity of GenN, an Aminoglycoside N-Methyltransferase Involved in Gentamicin Biosynthesis..	113
	APÊNDICE E – Artigo: Crystal Structure of GenD2, an NAD-Dependent Oxidoreductase Involved in the Biosynthesis of Gentamicin.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

A capacidade dos organismos em produzir moléculas revolucionou a medicina reduzindo a mortalidade e impactou vários campos do conhecimento científico, avanços técnicos e atividade econômica. (ZHANG, LIXIN, DEMAINE, 2005). Os produtos naturais são provenientes do metabolismo primário e principalmente secundário de diferentes organismos, incluem moléculas pequenas, como a ureia, e estruturas complexas, como o Taxol (ABREU; BRANCO, 2003). Em resposta a estímulos, vias metabólicas secundárias são ativadas e produzem os produtos naturais. Estas vias estão em plantas, animais, bactérias, fungos e evoluíram na natureza em respostas as necessidades e desafios do meio ambiente. As bactérias, que são uma das principais produtoras de metabólitos secundários, habitam a terra por mais 3 bilhões de anos. Durante esse tempo esses microrganismos evoluíram de acordo com as mudanças do ambiente e as modificações genéticas permitiram que esse processo acontecesse. Assim, a natureza pratica uma química combinatorial muito mais sofisticada do que qualquer laboratório de química orgânica ou medicinal, gerando estruturas exóticas ricas em estereoquímicas, anéis concatenados e grupos funcionais reativos (ZHANG, LIXIN, DEMAINE, 2005) (Figura 1).

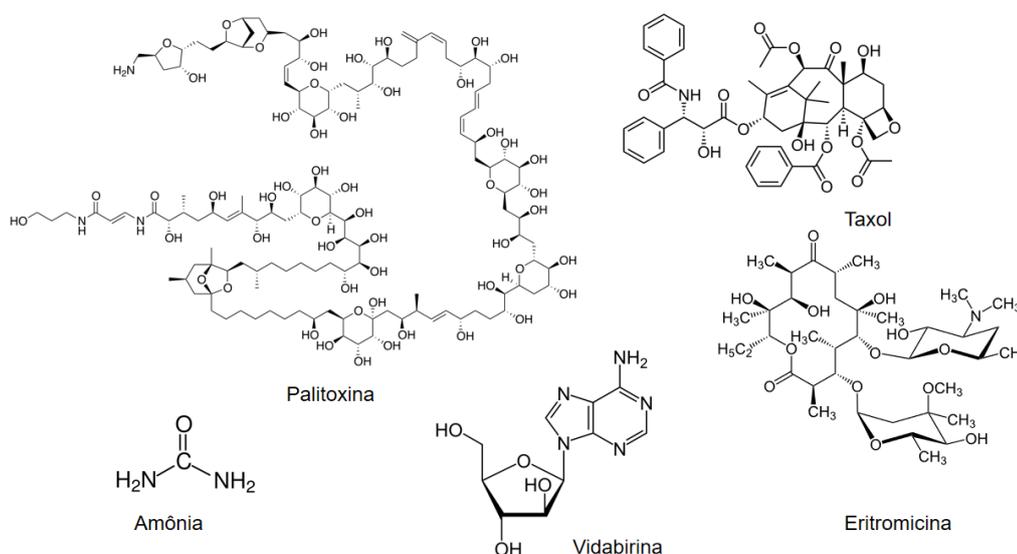


FIGURA 1. Diversidade química de produtos naturais.

Uma análise detalhada dos novos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) entre 1981 e 2010 revela que 34% dos medicamentos baseados em pequenas moléculas eram produtos naturais ou derivados direto, incluindo as estatinas, drogas anticancerígenas de ligação a tubulina e imunossupressores (CRAGG; NEWMAN, 2013). Historicamente, a humanidade buscou por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas, que talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Um dos marcos para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais foi o descobrimento dos salicilatos isolado a partir da planta *Salix alba* em 1957. Mais tarde foram descobertas as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta e somente 100 anos depois a Bayer lançou no mercado a Aspirina®. Esse medicamento continua sendo um dos líderes de mercado na atuação como analgésico e antiinflamatório e sendo alvo de inúmeras pesquisas (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Assim, diversas moléculas a partir de produtos naturais foram isoladas e suas propriedades desvendadas, como o Acyclovir® usado contra o herpes vírus isolado a partir de uma esponja ou mesmo medicamentos contra a hipertensão e insuficiência cardíaca que são químicos baseados em peptídeos isolados do veneno de cobra (ZHANG, LIXIN, DEMAIN, 2005).

Apesar da impressionante contribuição dos produtos naturais para medicina, houve um declínio no interesse das empresas farmacêuticas por essas moléculas devido a estratégias de desenvolvimento de fármacos baseado em estruturas. Além de disso, algumas preocupações em relações a moléculas naturais, como efeitos tóxicos, da dificuldade no isolamento e o uso em abordagens de descoberta de fármacos baseadas em triagem de alto rendimento (HTS) direcionadas a alvos moleculares contribuíram para redução da pesquisa nesta área (CRAGG; NEWMAN, 2013). Porém, atualmente, uma revitalização vem ocorrendo pela necessidade de se produzir novas moléculas e pela dificuldade encontrada em geração de novas moléculas baseado em estruturas. Entretanto, como os patógenos estão em evolução, nossos medicamentos precisam acompanhar essas mudanças ou se tornam rapidamente obsoletos. Com avanços na ciência básica, hoje compreendemos muitos produtos naturais e seus produtos químicos através de análises por purificações, caracterização estrutural, funções, farmacologia química e metabólica (MONCIARDINI et al., 2014).

O futuro do desenvolvimento de medicamentos baseado em produtos naturais está ligado a grande diversidade de microrganismos produtores de metabólitos secundários. Estima-se que de 95-99% dos microrganismos existentes na natureza ainda não foram isolados, na maioria bactérias e fungos, na qual seus metabólitos secundários ainda não foram analisados e não sabemos suas propriedades. No solo onde é estimado que a cada 1g contenha 1000 a 10000 espécies de procariotos desconhecidos (ZHANG, LIXIN, DEMAINE, 2005). E é justamente no solo onde encontramos a maior parte dos microrganismos produtores de antimicrobianos e esses merecem a atenção, pois além de metabólitos ainda desconhecidos, as moléculas nas quais já são utilizadas podem ser alvos de modificações e serem ferramentas na busca por novos medicamentos (MONCIARDINI et al., 2014).

1.2 Actinomicetos: uma farmácia natural

No solo é onde encontramos incontáveis microrganismos responsáveis pela produção de uma diversidade de medicamentos que são usados contra infecções bacterianas e fúngicas, drogas anticâncer, compostos antiparasitários e muitas outras (HOPWOOD, 2007). O filo dos Actinomicetos é o mais abundante nesses habitats e são os maiores produtores de metabólitos secundários. Actinobacteria representa um dos maiores filios do atualmente reconhecidos dentro do domínio Bacteria: tem 6 classes, 18 ordens, 14 subordens, 63 famílias e 374 gêneros registrados até outubro de 2016 (SUBRAMANI; SIPKEMA, 2019). Consistem em um grupo diverso de bactérias que produzem filamentos multicelulares ou micélios, ou alguns podem ser unicelulares como *Micrococcus* (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014).

Os *Streptomyces* é o principal gênero de Actinobacteria micelial, consiste em um grupo de bactérias gram-positivas que crescem em diversos ambientes, principalmente no solo e produzem micélios aéreos semelhantes aos fungos (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014) As diferenças entre as espécies são baseadas na morfologia dos esporos e em diferenças fisiológicas, especialmente na produção de antibióticos. Aproximadamente 60% dos antibióticos conhecidos foram isolados de actinomicetos entre 1950 e 1970, exclusivamente do gênero *Streptomyces* (SUBRAMANI; SIPKEMA, 2019). A morfologia dos *Streptomyces* envolve a formação de uma camada de hifas que podem se diferenciar em uma cadeia de esporos. Esse processo exige um metabolismo especializado e coordenado. A propriedade mais

interessante dos *Streptomyces* é a capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos, como antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos e, principalmente, antibacterianos e imunossupressores. É intrigante como os *Streptomyces* produzem uma diversidade de moléculas com atividade antimicrobiana para inibição de competidores enquanto colonizam o solo (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014)& (ENSIGN et al., 1993). Outro processo importante que envolve a produção de antibióticos é a simbiose entre *Streptomyces* e plantas, pois neste caso, o antibiótico protege a planta contra patógenos, e exsudatos de plantas permitem o desenvolvimento desses microrganismos (DE LIMA PROCÓPIO et al., 2012).

Geneticamente, os *Streptomyces* pertencem a um grupo de Gram-positivos cujo material genético (DNA) é rico em GC (70%), quando comparado com outras bactérias como *Escherichia coli* (50%). A espécie *Streptomyces coelicolor* é a mais estudada geneticamente dentro dessa família. Esse microrganismo possui um cromossomo linear de 8.667.507 pares de bases e 7.825 genes, sendo um dos maiores genomas entre as bactérias (OHNISHI et al., 2008). Diferentes genes estão inseridos em mais de 20 agrupamentos gênicos que codificam metabólitos primários e secundários. De acordo Bentley (2002), *Streptomyces* adquiriram a capacidade de se replicar de forma linear e se expandiram pela aquisição lateral e duplicação interna do DNA. Essas características lhes forneceram uma abundância de enzimas metabólicas envolvidas na biossíntese de produtos naturais.

Na produção de metabólitos secundários, o gênero *Micromonospora* contribui significativamente na biossíntese de moléculas bioativas. Esses microrganismos recebem esse nome devido ao tamanho reduzido de seus esporos (HOPWOOD, 2007). Pertencem a família *Micromonosporaceae* dentro dos Actinomicetos e abrangem mais de 60 espécies (VEYISOGLU et al., 2016). Consistem de bactérias gram-positivas e aeróbicas, nas quais um único esporo em hifas de substratos ramificados e produzem misturas complexas de menaquinonas, açúcares e ácidos graxos saturados e de cadeia ramificada. As espécies são caracterizadas pela combinação quimiotaxonômica, morfológica e propriedades fenotípicas. Estão distribuídos em diversos habitats, preferencialmente em solos ricos em húmus (VEYISOGLU et al., 2016). Entre 1958 e 1960 foram isoladas mais de 300 cepas de *Micromonospora* a partir de amostras do solo. Dessas cepas foram identificadas 15 moléculas com ação antibióticas. Dentre os antibióticos isolados, uma classe foi de

grande importância para a indústria farmacêutica para época: os aminoglicosídeos. Desde a descoberta do primeiro aminoglicosídeo, a estreptomicina, por Selman Abraham Waksman em 1943, isolada a partir de cepas de *Streptomyces griseus*, uma diversidade de moléculas dessa classe foram exploradas e proveram a indústria farmacêutica o ganho de muito milhões de dólares. Os actinomicetos sintetizam essas moléculas biológicas de modo complexo e ainda não totalmente conhecido (HOPWOOD, 2007).

1.3 Aminoglicosídeos

1.3.1 Uma breve história sobre os Aminoglicosídeos

O primeiro aminoglicosídeo a ser descoberto foi a estreptomicina em 1944 por Selman Waksman, a partir de amostras de solo isolado de *Streptomyces griseus*. Sua descoberta foi um marco na história, sendo a primeira droga terapêutica eficaz contra a tuberculose, uma doença que aterrorizou e ainda aterroriza a humanidade. Waksman ganhou o Prêmio Nobel em 1952 pela descoberta da estreptomicina, juntamente com seu aluno Albert Schatz, que acabou sendo reconhecido como co-descobridor. Desde então, vários aminoglicosídeos foram descobertos como produtos do grupo *Streptomyces* (aminoglicosídeos terminados em “mycina”, por exemplo, neomicina, canamicina, tobramicina) ou do grupo *Micromonospora* (com terminação em “micina” exemplos: gentamicina e sisomicina), ou desenvolvidos através de modificações químicas nos aminoglicosídeos existentes gerando moléculas semisintéticas (por exemplo, amicacina, netilmicina, arbecacina, plazomicina) (SERIO et al., 2018).

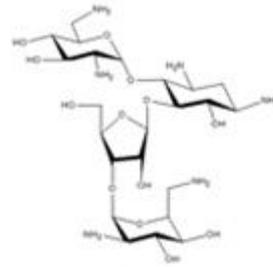
1.3.2 Classificação

Estruturalmente os antibióticos aminoglicosídeos são moléculas similares, possuindo um núcleo central que é um aminociclitol com vários outros açúcares não usuais, incluindo deoxiaçúcares (KUDO; EGUCHI, 2009). Os aminoglicosídeos são divididos em duas principais categorias: aqueles que apresentam um amino ciclitol modificado para mio-inositol (como a estreptomicina, fortimicina e bluessomicina). A segunda categoria são os antibióticos que contêm o grupo 2- deoxiestreptamina (2-DOS), que inclui as neomicinas, canamicinas e gentamicinas (Figura 2) (PARK et al., 2013) (Figura 2).

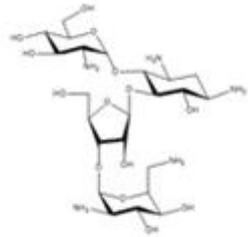
a)



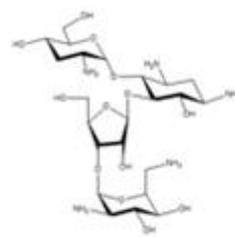
Butirosina B



Neomicina B

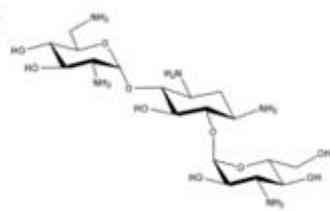


Paromomicina

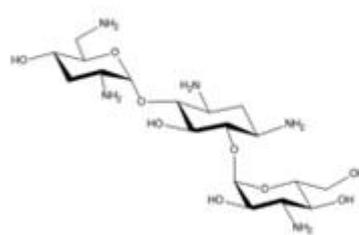


Lividomicina

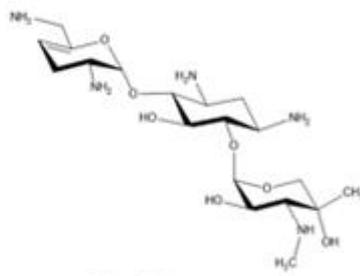
b)



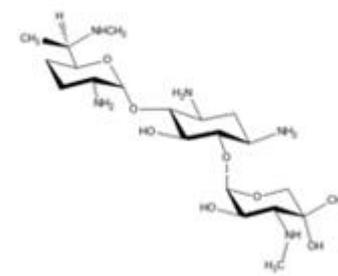
Canamicina B



Tobramicina

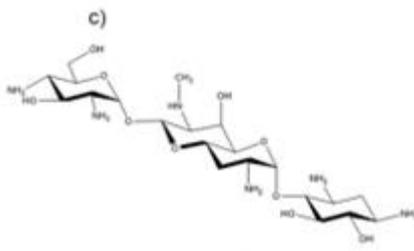


Sisomicina

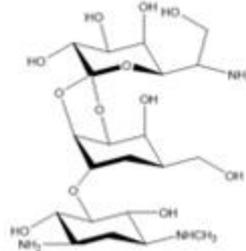


Gentamicina

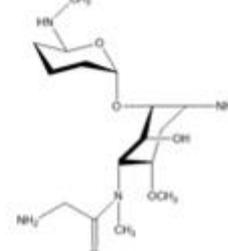
c)



Apramicina



Higromicina



Istamicina

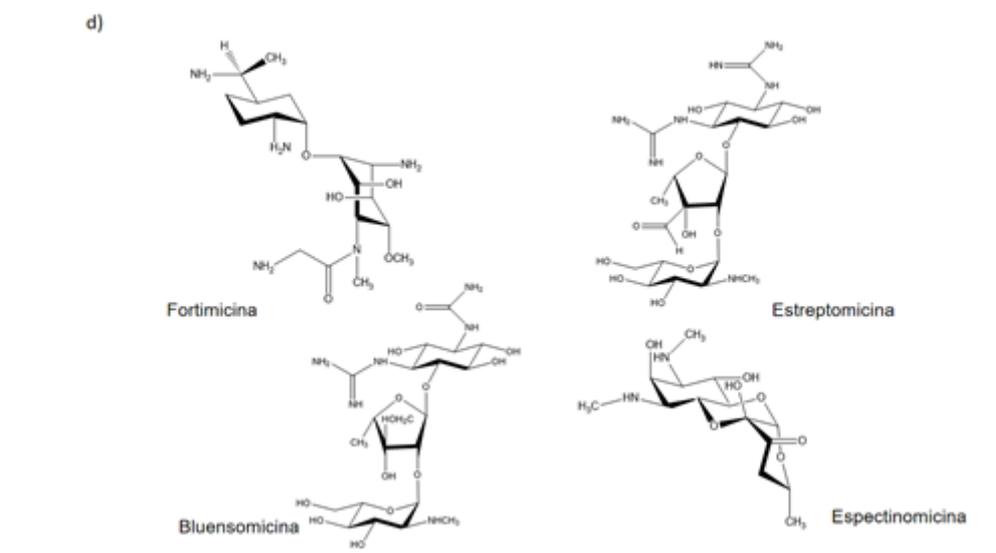


FIGURA 2. Diversidade química de aminoglicosídeos.

a) Aminoglicosídeos contendo como aminociclitol 2-deoxistreptamina 4,5-disubstituídos b) Aminoglicosídeos contendo como aminociclitol 2-deoxistreptamina 4,6-disubstituídos. c) aminoglicosídeos 2-deoxistreptamina monosubstituídos. d) Aminoglicosídeos contendo modificação do aminociclitol para mio-inositol.

Adaptado: Kudo; Eguchi (2009)

Os aminoglicosídeos compostos pelo anel 2-deoxistreptamina (2-DOS) podem ser subdivididos de acordo com a posição das ligações com os açúcares que decoram essas moléculas, podendo ser monosubstituídos (apramicina, higromicina, istamicina); 4,6-disubstituídos (gentamicinas e tobromicinas) ou 4,5-disubstituídos (butirosinas e neomicinas) (BUSSCHER; RUTJES; VAN DELFT, 2005; PARK et al., 2013). Os aminoglicosídeos 4,5-dissubstituídos, representados por neomicina e paromomicina, são usados topicamente e contra parasitas intestinais, respectivamente. Por outro lado, aminoglicosídeos 4-6 dissubstituídos representados pela gentamicina, tobramicina, e a amicacina tem sido usados para o tratamento de infecções oportunistas graves por bactérias Gram-negativas (PARK et al., 2013) (Figura 2).

1.3.2.1 Biossíntese 2-Deoxistreptamina

Os aminoglicosídeos que contém o anel 2-deoxistreptamina (2-DOS) são os mais utilizados clinicamente. Estudos mostraram que o 2-DOS é derivado a partir de D-glicose (LLEWELLYN; SPENCER, 2006), que é fosforilada por enzimas da via glicolítica para formar D-glicose-6-fosfato, que é convertida em 2-desoxi-scilo-inosamina (2DOIA). Em seguida uma desidrogenase NAD dependente catalisa a

desidrogenação do C-1 do 2DOIA convertendo-a em 3,2-amino-2,3- dideoxi-sciloinosose (amino-DOI). Amino-DOI é convertido em 2-DOS por uma aminotransferase de dupla funcionalidade (PARK et al., 2008). Posteriormente, uma glicosiltransferase adiciona um *N*-acetilglucosamina ao 2-DOS gerando *N*-acetilparomamina, cujo grupo acetil é removido por uma desacetilase convertendo-a em paromamina, que é o intermediário comum para os aminoglicosídeos relacionados à neomicina, canamicina, gentamicina e sisomicina (PARK et al., 2008; KUDO; EGUCHI, 2009); (KUDO; EGUCHI, 2009) (Figura 3).

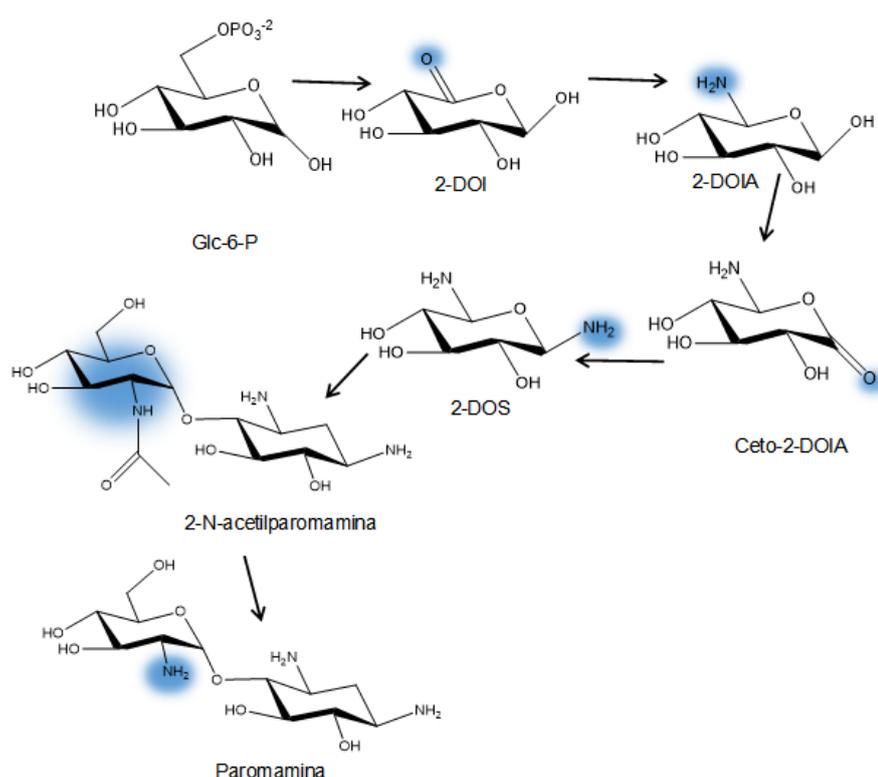


FIGURA 3. Formação do intermediário de biossíntese paromamina a partir da glicose 6'-fosfato.

Em azul as modificações nos anéis catalisadas por enzimas que são comuns em 4,6-disubstituídos.

Adaptado: Park et al. (2008).

1.3.3 Indicações

Os aminoglicosídeos possuem uma longa e controversa história como antimicrobiano. Com o sucesso dos antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro (penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos), foi observado

uma redução na administração de aminoglicosídeos de forma prolongada. Isso ocorreu devido a segurança dos padrões farmacocinéticos melhorados destes novos agentes (AVENT et al., 2011). Mesmo com todo avanço biotecnológico, os aminoglicosídeos ainda possuem vasta indicações, devido ao seu amplo espectro. Esses têm sido usados para tratar uma variedade de infecções graves e potencialmente fatais e são comumente utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, sepse e pneumonia. Amicacina e gentamicina são indicações específicas administradas por via intravenosa contra infecções causadas por microrganismos gram-negativos. Contra sepse neonatal é utilizada a terapia empírica combinando gentamicina e ampicilina. A tobramicina é utilizada de forma inalatória no tratamento de pneumonia e infecções crônicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes portadores de fibrose cística, enquanto a tobramicina parental é utilizada para infecções do trato respiratório inferior, osteomielite e infecções do trato urinário (AVENT et al., 2011; XIE; TALASKA; SCHACHT, 2011; SERIO et al., 2018).

Usos adicionais incluem neomicina tópica ou oral para infecções da pele, paromomicina oral para infecções amebianas e parasitárias, espetinomicina administrada por via intramuscular para o tratamento de gonorreia. Estreptomicina, canamicina e amicacina administrada por via intravenosa ou intramuscular é usada na quimioterapêutica de segunda linha para tuberculose (Tabela 1). Em geral, a estreptomicina, a canamicina e a netilmicina são pouco utilizadas devido à resistência clínica (AVENT et al., 2011; XIE; TALASKA; SCHACHT, 2011; SERIO et al., 2018);

TABELA 1. Uso terapêutico dos aminoglicosídeos aprovado pelo FDA

Aminoglicosídeos	Terapia específica (FDA -aprovado e indicações do rótulo)
Estreptomicina	Tuberculose, brucelose, tularemia, pneumonia, septicemia, peste negra causada por <i>Yersinia pestis</i>
Neomicina	Aplicação tópica em infecções de pele, uso oral como um adjunto para encefalopatia Hepática ou hipercolesterolemia
Canamicina	Aplicação intraperitoneal para pós-operatório, tuberculose, gonorreia, enterocolite em feto ou recém nascidos ou encefalopatia hepática
Paromomicina	Uso oral para infecções por amebiose, tênias, giardias, leishmania, trichomonas, e encefalopatia hepática
Gentamicina	Meningite, pneumônia, infecções causadas por <i>Pseudomonas</i> , septicemia, infecções por <i>E. coli</i> , por <i>Staphylococcus</i> listeria, tularemia, brucelose, endocardite infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário, infecções no osso diverticulite, neutropenia, sepse, enterocolite em recém nascido Oral ou intraperitoneal tratamento para peritonite, tratamentos contra infecções de pele, infecções oftalmológicas, contra síndrome de Meniere
Tobramicina	Infecções respiratórias, osteomielites, infecções do trato urinário e abdominal, meningite, infecções de pele e osso, fibrose cística.
Amicacina	Usado para organismos altamente resistentes a drogas, meningite e complicações do trato urinário
Netilmicina	Infecções causadas por <i>Pseudomonas</i> , pele, osso, infecções abdominais, gonorreia, infecções do trato respiratório e urinário
Espectinomicina	Gonorreia

Adaptado: Xie; Talaska; Schacht (2011).

1.3.4 Espectro de atividade

Os aminoglicosídeos são antibióticos de amplo espectro e possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Não possuem atividade contra bactérias anaeróbias, pois o transporte ativo de elétrons é necessário para a absorção de aminoglicosídeos nas células (KRAUSE et al., 2016). São moléculas particularmente potentes contra membros da família Enterobacteriaceae incluindo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, *Providencia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., e *Serratia* spp.. A classe tem atividade efetiva contra *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis*, os agentes causadores de peste e tularemia, respectivamente. Também são eficazes contra infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, incluindo isolados resistentes à metilina e resistentes e intermediários à vancomicina (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999). Como já descrito, os aminoglicosídeos são eficazes contra *M. tuberculosis* (KRAUSE et al., 2016). Essa classe é muito eficaz quando seu uso é sinérgico com outro tratamento antimicrobiano, como por exemplo com β -lactâmicos, que é eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (XIE; TALASKA; SCHACHT, 2011).

1.3.5 Modo de ação

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos é bem descrito, sabe-se que essas moléculas inibem a síntese proteica por meio de uma ligação de alta afinidade ao sítio A no RNA ribossomal 16S do ribossomo 30S, que altera sua conformação (KRAUSE et al., 2016). Porém, o que rege a ação de cada membro dessa classe é a especificidade por diferentes regiões do sítio A ribossômico (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Essa interação, faz com que o antibiótico promova uma tradução com a leitura errônea dos códons na entrega do aminoácido pelo RNA de transferência. Como resultado ocorre um erro na síntese proteica, seguida pelo posicionamento incorreto dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, que é liberada na célula causando danos a membrana e outros locais. Aminoglicosídeos 2-DOS ligam-se no sítio A na hélice 44 do RNA ribossomal 16s na proximidade com o códon- anticódon do aminoacil do RNA transportador. Ocorre uma interação que prejudica a dinâmica de duas adeninas ¹⁴⁰⁸⁻¹⁴⁹³ funcionais no sítio A (Figura 4). Através da ligação do 2-DOS, essas duas adeninas são invertidas na cadeia, causando erros de codificação pela interação do RNAt. Os aminoglicosídeos 2-DOS também interagem com a hélice 69

do RNAr 23s na subunidade maior. Alguns aminoglicosídeos 2-DOS, como a neomicina B, gentamicina e paromomicina, podem também ligar a um segundo sítio na hélice 69 do RNAr 23S na subunidade 50S. A ligação neste sítio alostérico afeta a mobilidade das subunidades ribossômicas, o que interfere na tradução e recuperação conformacional do ribossomo (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

Alguns aminoglicosídeos 2-DOS também afetam a translocação dos RNAt e rotação das subunidades. Devido sua natureza policatiônica, os aminoglicosídeos possuem alta afinidade pelos fosfatos carregados dos ácidos nucleicos (HOUGHTON et al., 2010) Eles também podem se ligar à uma variedade de RNAs, incluindo ribossomos humano, em especial as mitocôndrias, cujo a estrutura secundária é semelhante ao ribossomo bacteriano (LIN et al., 2010). A dupla fita do RNAr contém 22 pares de bases das quais existem 2 sítios simétricos de ligação de aminoglicosídeos. Essa ligação ocorre através do anel 2-DOS devido à natureza eletroquímica e pela interação hidrofóbica do tipo *stacking-pi* do anel do aminoglicosídeo com a guanina (HOUGHTON et al., 2010).

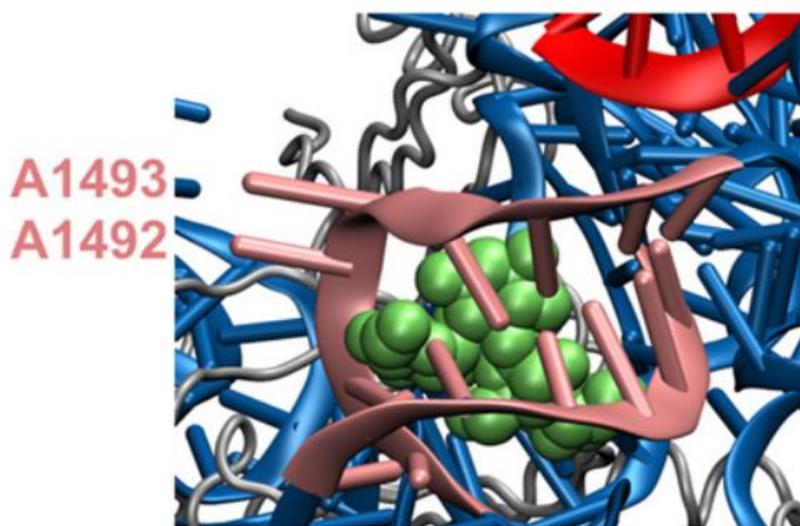


FIGURA 4. Sítio de ligação do aminoglicosídeos no RNAr 16S. Em verde o aminoglicosídeo. Em rosa as bases invertidas para ligação do aminoglicosídeo que causa erros de leitura na tradução.

Adaptado: Trylska; Kulik (2016).

O pH é essencial para a ligação dos aminoglicosídeos, sendo que em um pH acima de 5,5 ocorre a absorção de prótons pelos grupos amina. (TRYLSKA; KULIK, 2016) (2016) verificaram por dinâmica molecular a presença de moléculas de água em vários complexos entre aminoglicosídeos e ribossomo. Essas moléculas parecem

ser essenciais para estabilidade da interação do aminoglicosídeo com o RNA. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstram por métodos computacionais que outros anéis diferentes do 2-DOS são essenciais para a formação do complexo, como para a paromomicina e neomicina B.

A descoberta de como os aminoglicosídeos se ligam ao ribossomo e seu mecanismo de ação, possibilitou e ainda possibilitará modificações em produtos naturais ou semi-sintético, podendo ajudar a superar a resistência bacteriana e problemas de toxicidade. Isso pode ocorrer, aumentando sua especificidade ao ribossomo bacteriano e inibição ou redução na atividade de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, que é um dos principais fatores da resistência a essas moléculas (CASHMAN; RIFE; KELLOGG, 2001).

1.3.6 Resistência

O fenômeno da resistência bacteriana é um grande problema de saúde pública mundial. Apesar dos aminoglicosídeos contribuírem clinicamente contra diversas doenças, desde sua descoberta com a estreptomicina, cepas resistentes foram identificadas (ARYA, 2007). Hoje, em alguns casos, os níveis de resistência atingiram tal ponto que alguns medicamentos dessa classe se tornaram inutilizáveis (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2017).

A resistência a antibióticos pode ser classificados em três principais categorias: 1) resistência intrínseca, como exemplo a parede celular bacteriana que é um limitante para absorção dos antibióticos; 2) adaptativa que é resultado de uma resposta ambiental; 3) adquirida que ocorre pela incorporação de material genético exógeno. Nesse último caso, pode ser um plasmídeo portador de múltiplos genes de resistência ou genes mutantes que podem ser transferidos horizontalmente de uma bactéria para outra. Essa última estratégia bacteriana é a maior causa de disseminação de genes de resistência a diversos antibióticos. Os mecanismos de resistência podem ser não específicos, como a membrana celular impermeável a muitas pequenas moléculas tóxicas ou específicas como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) que modificam apenas substratos particulares (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorre por diversos mecanismos e podem co-existir na mesma célula, sendo eles: (1) modificação enzimática e inativação dos aminoglicosídeos, mediada por acetiltransferases de aminoglicosídeos,

nucleotiltransferases, fosfotransferases (2) Bomba do efluxo; (3) permeabilidade diminuída; e (4) modificações de subunidade ribossomal 30S que interfere com a ligação dos aminoglicosídeos (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2017).

O mecanismo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos mais comum é a inativação por enzimas, conhecidas como AME (enzimas modificadoras de aminoglicosídeos). São enzimas que catalisam modificações nos grupos -OH ou -NH₂ do anel 2-deoxistreptamina ou de outros açúcares, podem ser acetiltransferases (AACs), nucleotidiltransferases (ANTs) ou fosfotransferases (APHs) (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

Modificações ribossomais também é um mecanismo de resistência bacteriano cada vez mais comum, ocorre por metiltransferases que modificam o ribossomo para evitar a ligação do aminoglicosídeo (WILSON, 2014).

A parede celular bacteriana, ainda pode servir como uma barreira intrínseca, e sua impermeabilidade pode ser aumentada por modificações lipídicas adquiridas o ocasionam na repulsão dos aminoglicosídeos. As bombas de efluxo por expulsão ativa mantêm a baixa concentração de aminoglicosídeos no interior da célula (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

1.3.7 Gentamicina e sisomicina

A gentamicina e a sisomicina são aminoglicosídeo que contém como aminociclitol o anel 2-DOS, nesse trabalho é chamado de anel I unido ao açúcar garosamina (anel III) pelo carbono 4 e ao açúcar purporosamina (anel II) pela posição 6, portanto são classificados como um 2-DOS 4,6 disubstituídos. Em seu uso clínico, a gentamicina é composta por uma mistura de intermediários de biossíntese gentamicina C1a, C2a, C2, C2b e C1. A gentamicina foi descoberta em 1963 por Marvin J. Weisten enquanto trabalha com amostras de solo. Ele a definiu como “uma nova mistura antibiótica básica, de amplo espectro, solúvel em água, que foi isolada de duas espécies não descritas de microrganismos pertencentes ao gênero *Micromonospora*” (WEISTEN, 1963). Mas somente em 1971 passou a ser usada como medicamento de uso tópico e posteriormente contra sepse. Em 1970, também por Marvin J. Weisten, foi isolada a sisomicina a partir da bactéria *Micromonospora inyoensis*. Sisomicina contém um diamino-açúcar insaturado que não foi encontrado anteriormente entre os antibióticos aminoglicosídeos (ou aminociclitol) (SANDERS, 1980)(Figura 5).

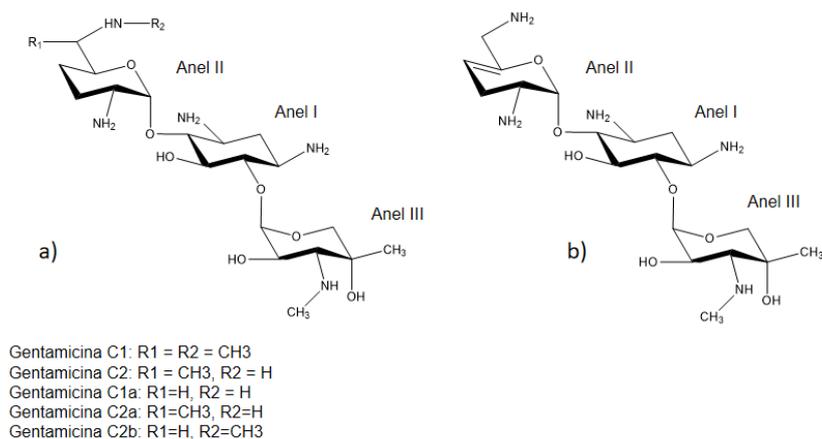


FIGURA 5. Gentamicina e Sisomicina

a) Estrutura química da gentamicina e seus respectivos grupos químicos que caracterizam os compostos do complexo gentamicina. b) Estrutura química da sisomicina.

1.3.7.1 Agrupamento gênico e biossíntese da Gentamicina e Sisomicina

De acordo com Hong et al (2009), o agrupamento gênico da biossíntese de sisomicina abrange 47 kb que contém 37 ORFs (quadro de leitura aberta) codificando várias proteínas para biossíntese, regulação, resistência e transporte. Por outro lado, o agrupamento gênico para gentamicina possui 63.1 kb e também incluem genes de regulação, resistência e transporte e biossíntese (HONG et al., 2009) (Figura 6).

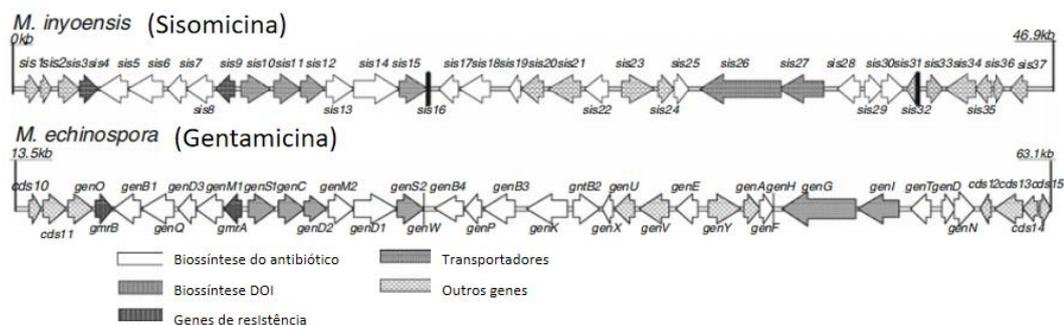


FIGURA 6. Agrupamento gênico da gentamicina e sisomicina.

Adaptado: Hong et al. (2009)

O número de genes para a biossíntese de gentamicina é maior e existem proteínas alfaíates (do inglês *tailoring enzymes*) decoradoras suplementares que são

ausentes para a sisomicina. Nem todas os genes da biossíntese da gentamicina foram descritos, e sabe-se que os genes da biossíntese da sisomicina apresentam similaridade sequencial com os genes da biossíntese da gentamicina, porém algumas proteínas são relatadas para gentamicina nas quais não tem sua função totalmente esclarecidas (LI et al., 2018).

Hong et al, (2009) descreveu que os genes de resistência a antibióticos são agrupados com os genes biossintéticos. Três genes de resistência a aminoglicosídeos (*sis4*, *sis9* e *sis17*) foram encontrados no agrupamento de genes biossintéticos da sisomicina, sendo eles *sis4*, *sis9* e *sis17*, que apresentam alta similaridade com *gmrB*, *gmra* e *genP* da biossíntese de gentamicina, respectivamente.

Os genes *sis10*, *sis11*, *sis12* e *sis15* provavelmente participam da biossíntese do 2-DOS. O gene *sis11* codifica a 2-desoxililo-inosose sintase que catalisa uma reação chave na biossíntese do 2-DOS. A enzima Sis11 apresenta alta similaridade de 92,7% com a GenC uma DOI sintase da gentamicina. Sis12 é uma desidrogenase que catalisa a oxido-redução da scilo-inosose na presença de NAD⁺ e apresenta similaridade com a GenD2 da gentamicina. Sis15 apresenta proximidade sequencial com GenS2 (94% de identidade) que são aminotransferases dependentes de L-glutamina envolvidas na transaminação do 2-DOS. Além dessa aminotransferase, a sisomicina possui mais quatro enzimas que realizam transaminação Sis5, Sis10, Sis15 e Sis18 que apresentam alta similaridade com as aminotransferases da biossíntese da gentamicina GenB1, GenS1, GenB2 e GenB3, respetivamente (Guo et al, 2014). As enzimas Sis8 apresenta função de glicosiltransferases e são responsáveis pela ligação do anel II ao 2-DOS na posição C-6. Enquanto a Sis13 que também é uma glicosiltransferase adiciona o anel III ao anel central 2-DOS. Sis29 retira o grupo acetil do anel II, convertendo 2-*N*-acetilparomamina em paromamina. Sis5 adiciona um grupo amina ao anel II, onde previamente houve uma retirada de um hidrogênio pela enzima Sis6. Sis17 apresenta similaridade com a fosfotransferase GenP e catalisa adição de um fosfato ao anel II. Para que possivelmente a enzima GenB3 catalise a retirada de duas hidroxilas do anel II (HONG et al., 2009) (Figura 7).

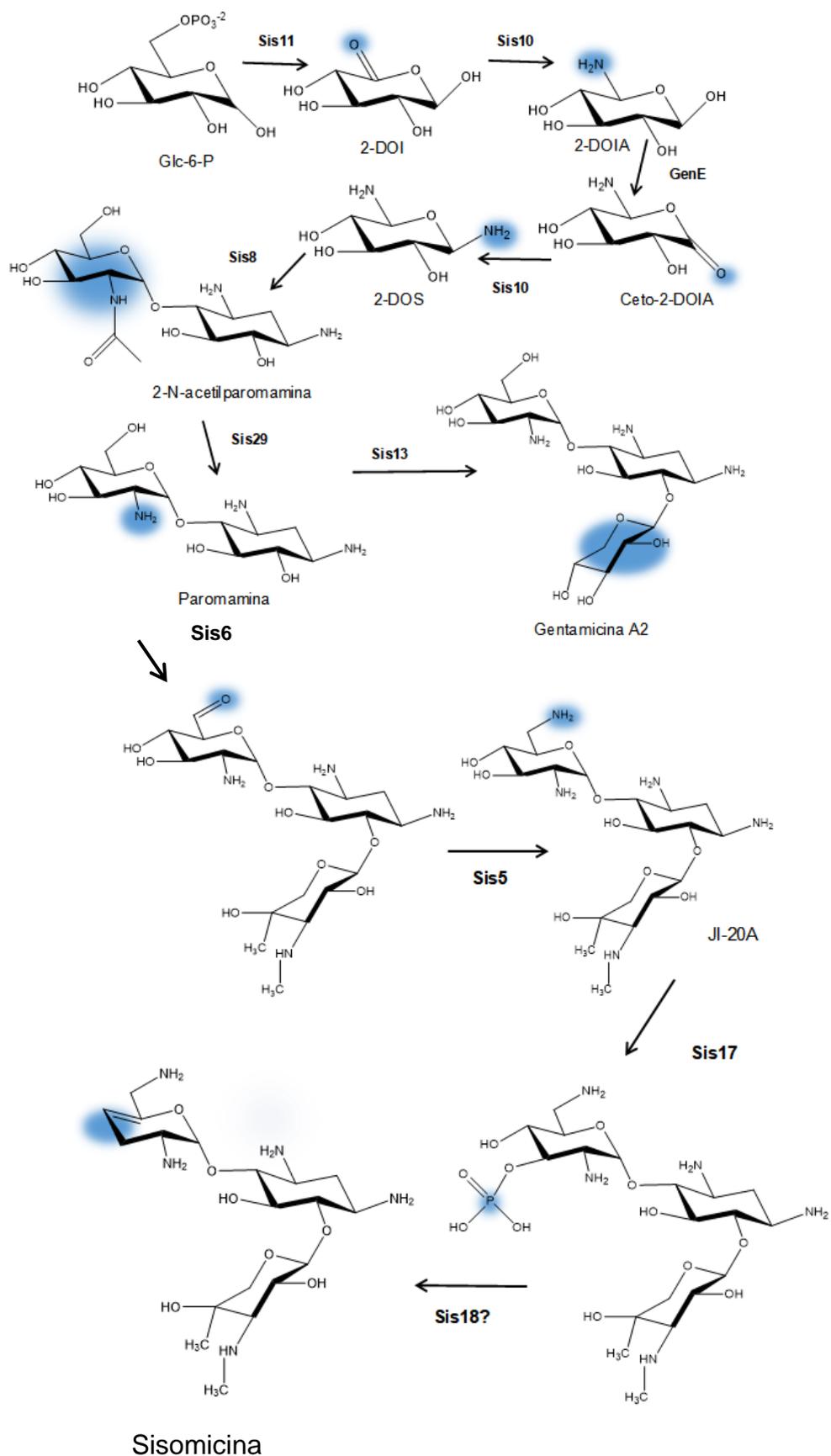


FIGURA 7. Proposta para a via de biossíntese da sisomicina. Nas setas as enzimas decoradoras e em azul as modificações.

Adaptado: Hong et al. (2009).

No agrupamento gênico da sisomicina ainda são identificados três genes que codificam metiltransferases: *sis14*, *sis28* e *sis30* que são homólogos aos genes *genD1*, *genT* e *genN*, respectivamente. Porém a metiltransferase *Sis28* parece não está relacionada com a biossíntese da sisomicina e deve estar envolvida na resistência bacteriana, uma vez que ela metila a base citosina1402 no RNAr 16S (HONG et al., 2009).

A organização dos genes em seus agrupamentos para a gentamicina e sisomicina são muito semelhantes, inclusive na identidade sequencial das enzimas que promovem a biossíntese dessas moléculas. Essas vias são praticamente idênticas até a ramificação para formação do complexo da gentamicina (HONG et al., 2009). Testa e Tilley 1975, verificou que mutantes *M. inyonensis* podem converter intermediários de biossíntese da gentamicina em sisomicina. Além disso, foi demonstrado que a dupla ligação de etileno é formada nos passos finais da biossíntese da sisomicina.

A gentamicina possui duas aminotransferases e uma metiltransferase adicionais em seu agrupamento gênico que são ausentes na sisomicina. Enquanto no agrupamento gênico da gentamicina são ausentes os genes *sis31*, *sis32* e *sis33* que possivelmente estão envolvidos na regulação transcricional (HONG et al., 2009).

Similarmente a outros aminoglicosídeos, a biossíntese de gentamicina inicia com a formação do núcleo amino-ciclitol 2-DOS, através da D-glicose-6-fosfato (Glc-6-P), seguida pela modificação para 2-desoxiscilinoze (2-DOI) através de uma carbociclicização pela GenC (2-deoxi-scilo-inosose sintase). A deoxi-scilo-inosose aminotransferase GenS1 adiciona um grupo amina 2-DOI, convertendo-o em 2-DOIA. A enzima GenE 2-deoxi-scilo-inosamina dehidrogenase retira uma hidroxila da posição C-1 do 2-DOIA convertendo-o em ceto-2-DOIA. Novamente a enzima GenS1 realiza uma transaminação nessa posição, levando a formação do núcleo 2-DOS. A glicosiltransferase GenM1 adiciona uma glicose ao 2-DOS formando um pseudodisacarídeo intermediário, o *N*-acetil paromanina. O açúcar adicionado contém um grupo acetil que é retirado pela enzima GenD, convertendo-o no intermediário paromamina. Posteriormente a glicosiltransferase GenM2 adiciona outro açúcar ao 2-DOS, formando a gentamicina A2 (PARK et al., 2008; HONG et al., 2009) (Figura 8).

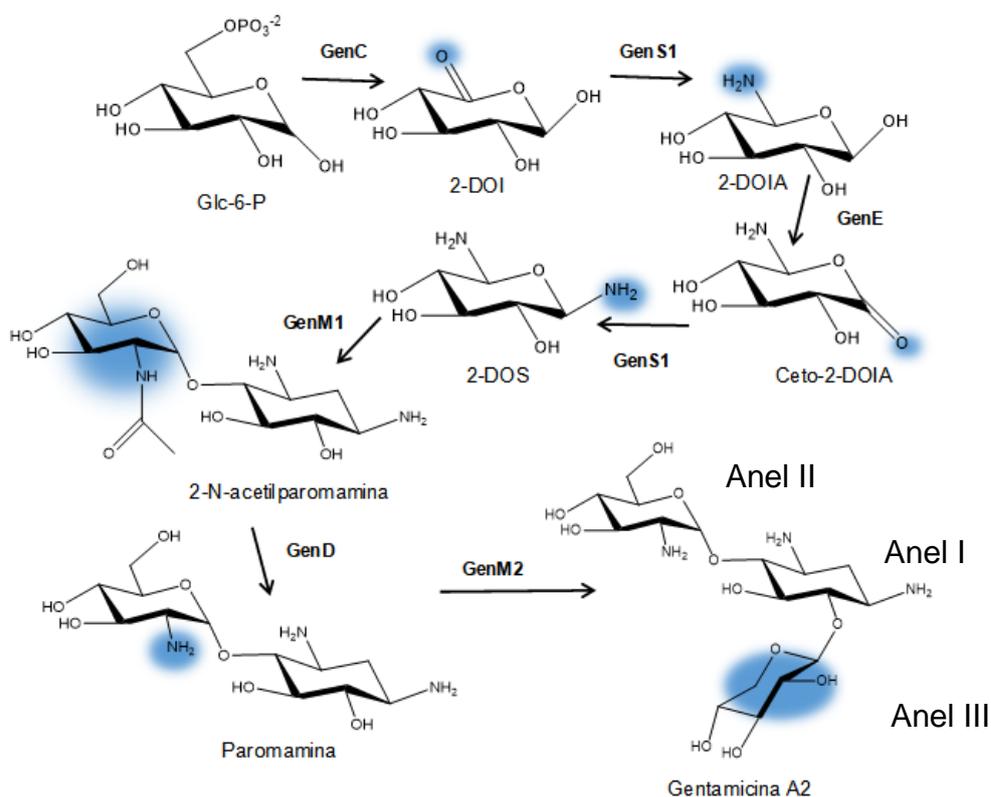


FIGURA 8. Biossíntese da gentamicina A2.

Em azul as modificações realizadas pelas enzimas identificadas no agrupamento gênico.

Adaptado: Park et al. (2014)

A partir do pseudotrisacarídeo gentamicina A2 ocorrem diversas modificações no anel III para produção de gentamicina A e três enzimas são essenciais para a sua formação. Essas enzimas são a óxido-redutase dependente de NAD⁺ GenD2 que retira um hidrogênio da posição C-3 do anel garosamina, convertendo-o no intermediário DOA2. Através da aminotransferase GenS2 ocorre a adição de um grupo amina nessa posição. Em seguida a *N*-metilação pela GenN, uma *N*-metiltransferase dependente de SAM (S-adenosil-metionina). Posteriormente na via, uma *C*-metiltransferase descrita como uma radical SAM dependente de cobalamina realiza a metilação na posição C-4, convertendo- a gentamicina A em gentamicina X2 (HUANG et al., 2015) (Figura 9).

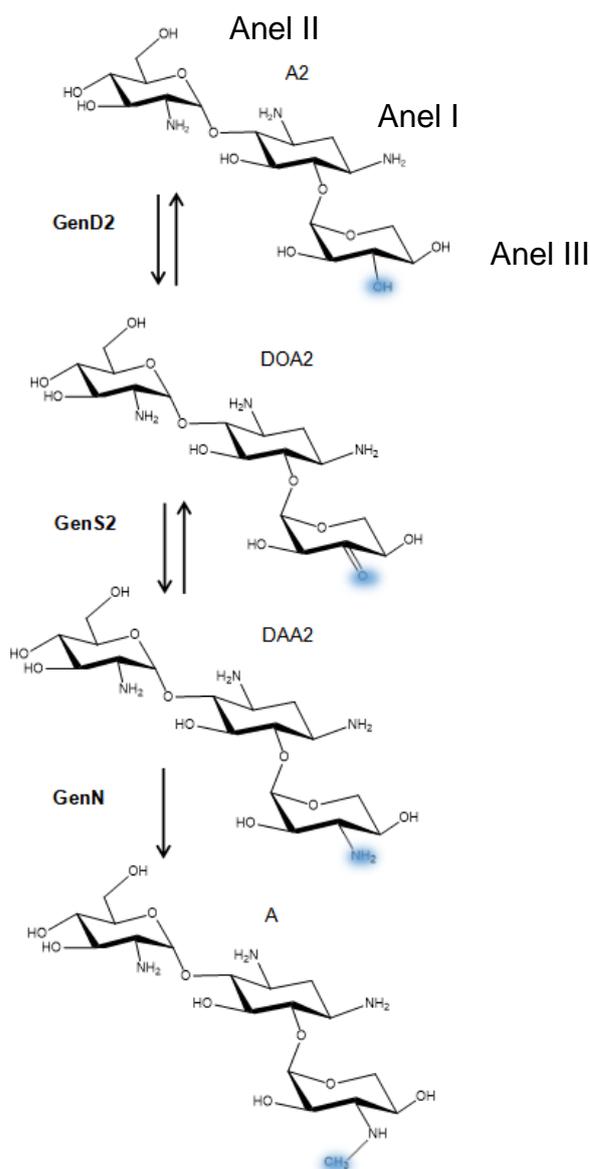


FIGURA 9. Formação do intermediário de biossíntese gentamicina X2. Em azul as modificações realizadas pelas enzimas GenD2, GenS2 e GenN.

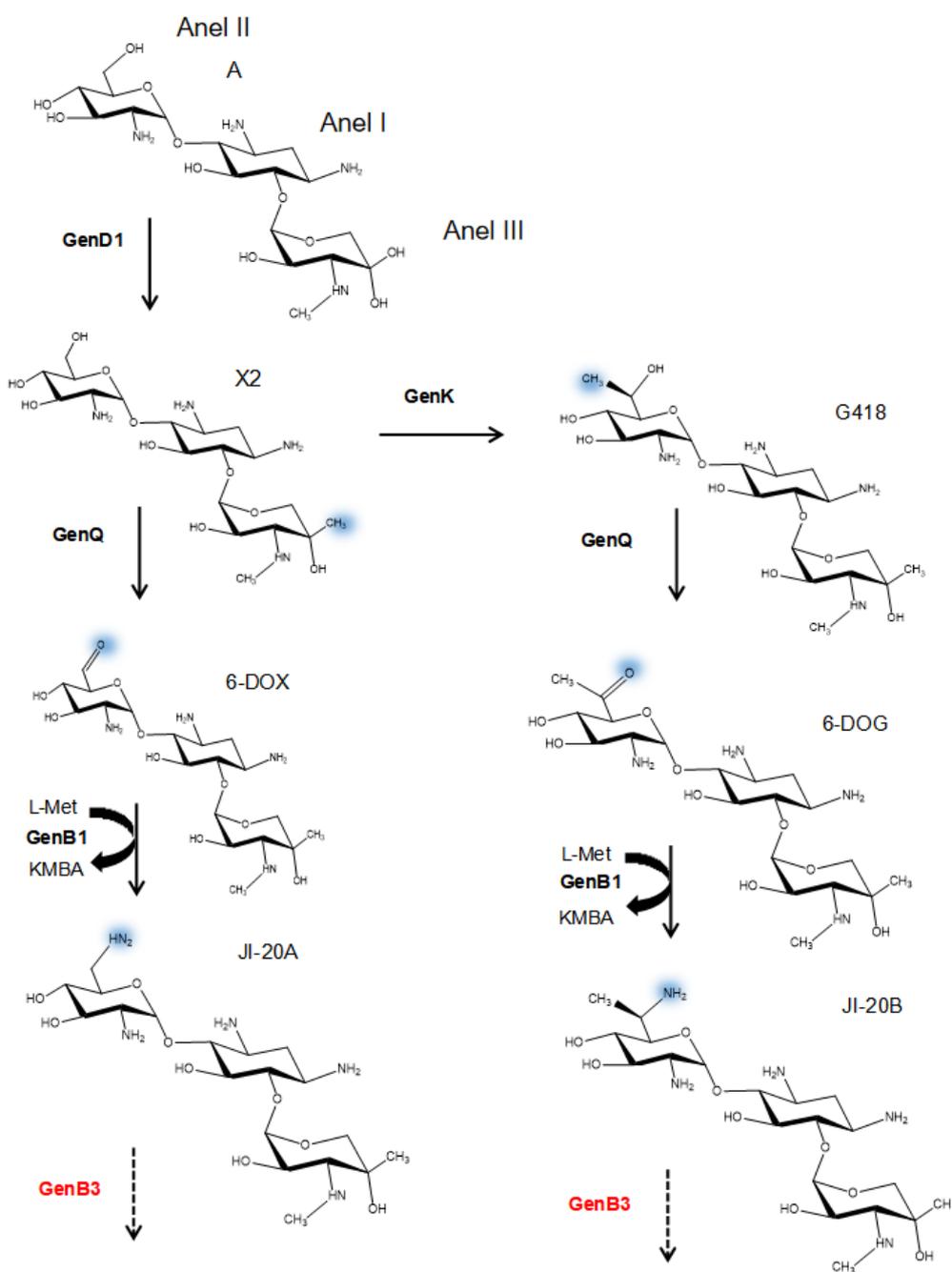
Adaptado: Huang et al. (2015)

A partir desse ponto, ocorre a ramificação da via em “lado esquerdo” para produção de gentamicina C1a e C2b e “lado direito” para formação de gentamicina C2a, C2 e C1 (Figura 10). Porém, os mecanismos e especificidades de algumas modificações nos intermediários de biossíntese não são claras, assim como quais são as enzimas que catalisam as reações. Pelo “lado direito”, a posição C-5 do açúcar purposamina da gentamicina X2 é metilada pela radical SAM-metiltransferase GenK

produzindo G418, que apesar de um intermediário da via de gentamicina, é também é utilizado como antibiótico (GUO et al., 2014).

GenK é radical SAM metiltransferase dependente de cobalamina. Essa enzima é essencial para a biossíntese da gentamicina, uma vez que ela ramifica a via possibilitando a formação de todos os componentes do complexo da gentamicina. Kim et al. (2017) verificou que a GenK é capaz de aceitar diferentes substratos, paromamina, neamina e cinco pseudosacarídeos, incluindo gentamicina A, A2 e B, juntamente com JI-20A. Porém o substrato biologicamente relevante é a Gentamicina X2.

Posteriormente, a posição C-5 do G418 sofre uma dehidrogenação pela enzima GenQ, modificando-o para 6-DOG. Nessa mesma posição onde permanece um grupo cetona ocorre uma transaminação por uma enzima dependente de PLP GenB1 convertendo-o em JI-20B, possivelmente usando uma metionina como doador do grupo amina. No anel II ainda ocorre a retirada de duas hidroxilas das posições C-3 e C-4. Essa modificação é um passo ainda obscuro, pois há hipóteses que as enzimas GenB3 e GenB4 possa realizar essa retirada, porém não se sabe qual o específico substrato. Essa então é parte da discussão do desse trabalho. Esse intermediário sem as hidroxilas é chamando de gentamicina C2a que já faz parte do complexo. O grupo metil da posição C-5 sofre uma epimerização, que segundo Gu et al., (2015) é realizado por uma enzima dependente de PLP GenB2, agora chamado de gentamicina C2. Uma outra enzima, GenL, descoberta recentemente catalisa a metilação no grupo amina na posição C-5 do anel II. Interessantemente, GenL foi identificada fora do cluster para a biossíntese de gentamicina, porém no cromossomo (Li et al., 2018). A outra mão da via, na qual a gentamicina X2 não sofre metilação por GenK. Neste caso a dehidrogenase GenQ retira uma hidroxila na posição C-5, convertendo-o em 6-DOX. Nessa posição permanece um grupo cetona que sofre uma transaminação pela GenB1, modificando o intermediário em JI-20A. Novamente, como na outra mão da via, ocorre a retirada de duas hidroxilas nas posições C-3 e C-4, por enzimas não bem descritas, formando um dos componentes do complexo, a gentamicina C1a (Guo et al., 2014). Que parte também é metilada na posição do grupo amina C-5, possivelmente pela enzima GenL, produzindo a gentamicina C2b que parte do complexo (LI et al., 2018) (Figura 10).



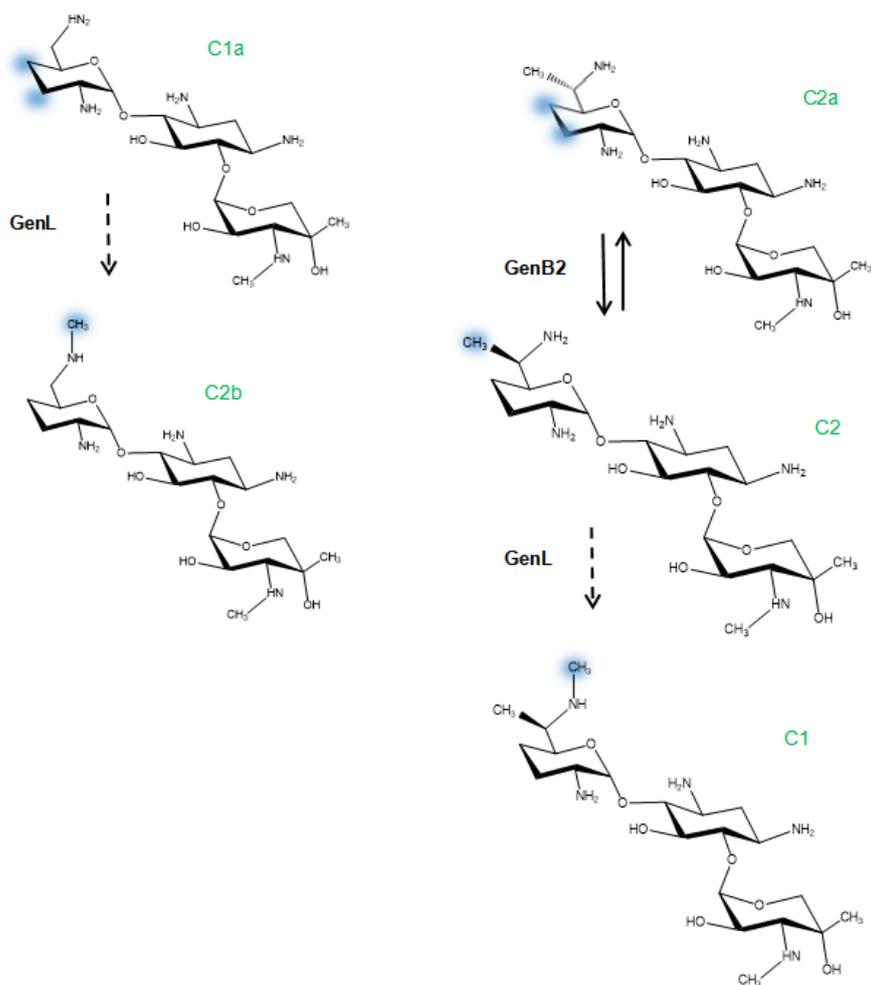


FIGURA 10. Formação do complexo da gentamicina.

Em azul as modificações realizadas no anel II dos intermediários de biossíntese. Na transaminação pela GenB1, o aminoácido metionina é um doador do grupo amina, cujo o produto é ácido 2-ceto-3-metiltiobutirico (KMBA).

Adaptado: Guo et al. (2014).

1.4 Metiltransferases

As enzimas metiltransferases dependentes de S-Adenosil-Metionina (SAM) são amplamente encontradas na natureza e catalisam uma diversidade de reações. Essas enzimas estão envolvidas na sinalização celular, síntese proteica, controle da expressão gênica e de proteínas e epigenética. Em produtos naturais essas enzimas realizam processos cruciais: metilam metabólitos especializados em microrganismos e plantas. Essas metilações fornecem a essas moléculas diferentes atividades biológicas ou permitem superar mecanismos de resistência. Estas reações são catalisadas através do seu co-substrato S-adenosil-metionina (SAM), que é um doador do metil deficiente em elétrons gerando o subproduto da metilação, o S-adenosil-homocisteína (SAH) (LISCOMBE; LOUIE; NOEL, 2012) (Figura 11).

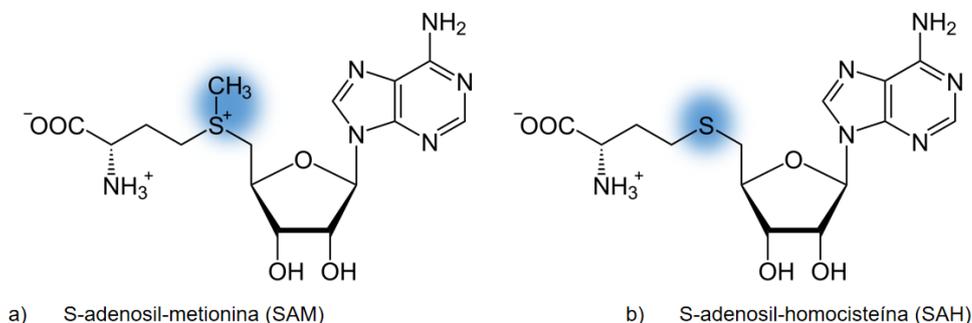


FIGURA 11. Dois estados do cofator S-adenosil-metionina.

a) SAM co-substrato com um grupo metil deficiente em elétrons reativos (em azul) para transferência a um aceptor de metil rico em elétrons. b) SAH produto da transferência do grupo metil para o substrato.

Adaptado: Liscombe; Louie; Noel, (2012).

São descritas cinco classes diferentes de metiltransferases dependentes de SAM baseadas em suas estruturas. A maioria das metiltransferases são da classe I e adotam o enovelamento tipo Rossmann, que consiste em um domínio de ligação do SAM composto por uma folha β central de sete fitas flanqueadas por α -hélices (KOZBIAL; MUSHEGIAN, 2005). Porém mesmo dentro desta classe, a identidade de sequência pode ser baixa (<15%). Além disso, a estrutura central é tipicamente decorada com elementos estruturais adicionais que moldam a especificidade do substrato e as interações proteína: proteína. Além disso, as metiltransferases são

classificadas de acordo com átomo aceptor do grupo metil do substrato, as mais comuns são as *O*-metiltransferases (54%) , *N* (23%), *C* (18%) ou *S* (3%) e outras metiltransferases podem acomodar outros aceitantes como haletos (LISCOMBE; LOUIE; NOEL, 2012).

1.4.1 *N*-Metiltransferases

As *N*-metiltransferases é o segundo grupo mais abundante em todos os domínios da vida. São comuns em vias de transdução de sinal em animais, onde eles modulam a atividade de moléculas sinalizadoras, feniletanolamina, histamina, indoletilamina. São responsáveis pela metilação de uma ampla variedade de substratos, como peptídeos não ribossômicos, hexosaminas, primárias aminas, aminas secundárias (indoles, imidazoles e alcalóides) e aminas terciárias (SCHMIDBERGER et al., 2010).

Estruturalmente as *N*-metiltransferases possuem de 200 a 500 resíduos e são monoméricas. Possuem enovelamento α/β : alternado α -hélices e folhas- β ao longo do comprimento da cadeia polipeptídica. Essas enzimas compartilham uma série de motivos conservados. Os motivos de I a IV estão relacionados a ligação do SAM no sítio ativo. O motivo I está presente na maioria das metiltransferases, é um motivo de ligação do SAM e consiste numa sequência assinatura "GxGxG" rica em glicina. Os motivos II, III e IV consistem na presença de um resíduo ácido próximo ao C-terminal. O motivo V consiste na presença de resíduos hidrofóbicos que posicionam o SAM (LISCOMBE; LOUIE; NOEL, 2012).

Essas enzimas possuem enovelamento classe I, denominado enovelamento Rossman é moldada pela alternância de α -hélices e fitas- β que formam uma folha- β relativamente planar envolta por α -hélices. Os resíduos do sítio de ligação ao substrato e catalítico são tipicamente localizados nas regiões C-terminal em fitas- β ou em loops adjacentes (KOZBIAL; MUSHEGIAN, 2005).

Essas proteínas apresentam o motivo DPPY conservado e que está envolvido na catálise. Assim, duas ligações de hidrogênio são formadas entre o nitrogênio nucleofílico e o átomo de oxigênio da cadeia lateral [D / N / S] e o oxigênio carbonílico da primeira prolina. Essas ligações de hidrogênio posicionam o substrato de tal forma que os pares de elétrons do nitrogênio nucleófilo apontam para o grupo metil e assim ocorre a transferência. Algumas enzimas da via de biossíntese de produtos naturais e

enzimas de resistência bacteriana a antibióticos estão dentro dessa classificação (SCHUBERT et al., 2003).

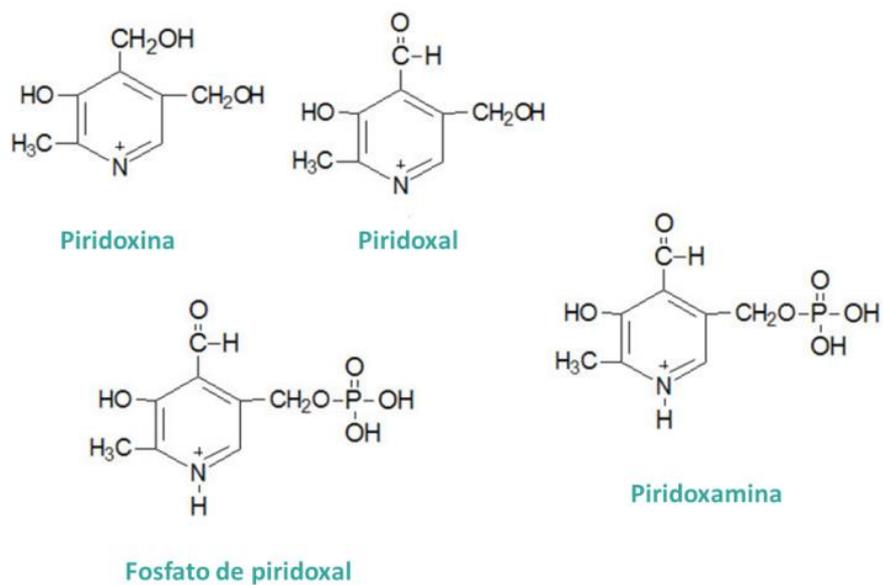
1.4.2 Metiltransferases envolvidas na biossíntese de gentamicina

A gentamicina e sisomicina são aminoglicosídeos altamente metilados. Essas metilações conferem características únicas a essas moléculas. Assim, no agrupamento gênico da sisomicina foram identificadas duas metiltransferases Sis14 e Sis30 que estão envolvidas na biossíntese. Sis14 é uma Radical SAM Metiltransferase que adiciona um grupo metil na posição do C-4 do anel garosamina. Sis30 é dependente de SAM e é responsável pela metilação do C-3 do anel garosamina. Foram identificadas quatro metiltransferases no agrupamento gênico da gentamicina GenD1, GenN, GenK e GenL. A enzima GenD1 é uma Radical SAM metiltransferase com alta similaridade com a Sis14 e realiza a metilação do intermediário de biossíntese gentamicina A2 convertendo-o em gentamicina X2. GenN apresenta identidade sequencial com a Sis30 e catalisa a metilação do substrato DAA2 para produzir Gentamicina A2. GenK realiza a ramificação da via da gentamicina metilando Gentamicina X2 convertendo-a em G418. A enzima GenL foi descrita recentemente, e tem ação nos passos finais da via da gentamicina metilando a gentamicina C2 transformando-a em gentamicina C1 (GUO et al., 2014; GU et al., 2015; LI et al., 2018).

1.5 Enzimas dependentes de PLP

Enzimas dependentes de piridoxal 5'-fosfato (PLP) são responsáveis por catalisar uma diversidade de reações na natureza. Estão envolvidas em processos celulares, biossíntese de aminoácidos e compostos aminados. Essa classe de enzimas foi identificada em 1951 e desde então vem sendo alvo de estudos por se tratar de enzimas versáteis e que estão envolvidas em processos cruciais na natureza (ELIOT; KIRSCH, 2004). O PLP é a forma ativa da vitamina B6 e é produzido através da hidrólise de ATP que doa um fosfato convertendo a piridoxina em PLP ou piridoxamina-5'-fosfato (PMP).

Vitamina B6



← / ≡ →

FIGURA 12. Vitamina B6 em sua forma inativa: Piridoxina e Piridoxal; forma ativa: piridoxal-5'-fosfato e piridoxamina-5'-fosfato.

Adaptado: Internet

O PLP é a coenzima que proporciona a essas enzimas essa versatilidade catalítica. Isso ocorre pela sua propriedade única em dissipar elétrons, estabilizam os intermediários da reação, e diminuindo assim a barreira de ativação durante a catálise (PAIARDINI et al., 2014)

As reações catalisadas pelas enzimas dependentes de PLP incluem transaminações, descarboxilações, racemizações, substituições β e γ , eliminações β e γ (ROMO; LIU, 2011).

Apesar da diversidade de reações, essas enzimas compartilham um mecanismo básico comum. No estado inativo, conhecido como aldimina interna, o PLP forma uma ligação covalente com um resíduo de lisina da enzima por uma ligação denominada Base de Schiff no sítio ativo. Com a ligação do substrato na enzima resulta no deslocamento do grupo amina da lisina por uma amina externa. Essa reação leva a formação de uma ligação do substrato com o PLP. Essa parte da reação é denominada aldimina externa. Ocorre então uma clivagem em uma das três ligações com o $C\alpha$, que pode resultar na remoção de prótons e ocorrer as reações de transaminação, β eliminação e racemização. Na maioria dos casos o PLP funciona como dissipador de elétrons que estabiliza o ânion do carbono. Esse estado é denominado intermediário quinonóide que se forma após a clivagem da ligação com o $C\alpha$. A estabilização só ocorre pela deslocalização da carga negativa através do sistema conjugação- π compreendido na Base de Schiff e o anel do pirimidínico do cofator (GRISWOLD; TONEY, 2011).

A grande questão em torno dessas enzimas é como elas regem a sua especificidade. Assim em 1966, Dunathan propôs uma teoria unificada da reação de enzimas dependentes de PLP (TION et al., 1966). Foi sugerido que se a energia de deslocalização for obtida após a perda de um grupo de $C\alpha$, a enzima dependente de PLP deve ligar os substratos em uma geometria específica para que a ligação seja quebrada em um plano perpendicular ao plano definido pelo sistema π , para tornar o vínculo passível a ser quebrado (TION et al., 1966). Por exemplo, foi prevista ligar na α -descarboxilase os substratos em uma orientação específica, tendo o grupo $-COO-$ perpendicular ao plano da base de Schiff e ao anel do PLP. Essa orientação foi proposta para facilitar o processo de descarboxilação (GRISWOLD; TONEY, 2011).

Enzimas PLP dependentes evoluíram em sete diferentes tipos de enovelamentos. Enovelamento tipo I, também referido como "superfamília de aspartato aminotransferases", maior quantidade e diversidade de membros. Enovelamento tipo II ou 'triptofano sintase'. Enovelamento tipo III contém racemases e descarboxilases de aminoácidos. Enovelamento tipo IV ou "família da transaminase D-alanina", que também inclui liases. Os enovelamentos dos tipos V, VI e VII contêm uma especificidade de reação, por exemplo, glicogênio fosforilase, D-lisina-5,6-aminomutases e L-lisina-2,3-aminomutases, respectivamente (STEFFEN-MUNSBURG et al., 2015).

1.5.1 Transaminases

As transaminases foram as primeiras enzimas identificadas dependentes de PLP. Essas enzimas adicionam um grupo amina ao substrato e estão abundantemente presentes na biossíntese de desoxi açúcares. Os açúcares aminados são amplamente encontrados na natureza, e são componentes de membrana celular, glicolipídios flagelos, toxinas bacterianas e componentes de diversos metabólitos secundários (LIANG et al., 2019).

Na transaminação, o cofator PLP serve como um dissipador de elétrons em toda a reação. É necessário um resíduo ácido no sítio ativo para estabilizar o anel pirimidínico do cofator, que geralmente é um resíduo de ácido aspártico (ROMO; LIU, 2011). As aminotransferases também possuem um resíduo de aminoácido aromático não carregado (Phe ou Tyr ou Trp, dependendo das diferentes aminotransferases) que realiza uma interação do tipo edge- π com o anel do PLP que está envolvido na transferência de prótons (LIANG et al., 2019). A transaminação ocorre em dois estágios, denominados primeiro metade e segunda metade da reação. Antes da reação, o PLP é ligado a uma lisina conservada por uma ligação covalente chamada Base de Schiff. Este aduto é conhecido como aldimina interna. Na primeira metade da reação, a lisina é trocada pelo aminoácido doador do grupo amina, resultando na aldimina externa. Nesse ponto da reação o PLP não está mais ligado covalentemente a enzima, mas está ancorado ao sítio ativo por uma rede de interações de hidrogênio, principalmente através do fosfato do PLP. Na segunda metade da reação, uma base conservada abstrai um próton do C α do complexo PLP-aminoácido para formar uma espécie quinoide. O próton abstraído é adicionado de volta na face si do complexo quinoide no C4 do cofator. Por fim, o complexo PLP-aminoácido é hidrolisado

causando a extrusão do α -cetoácido, convertendo o PLP em PMP (ROMO; LIU, 2011). As reações de aminação necessitam da presença de um aminoácido doador do grupo amina, que geralmente podem ser L-glutamina, L-metionina entre outros (GUO et al., 2014).

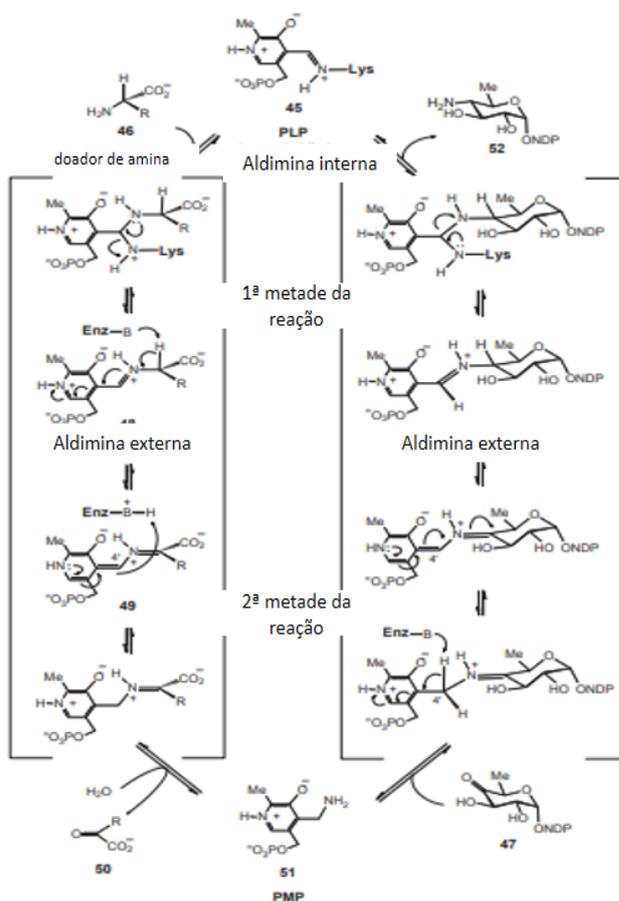


FIGURA 13. Fases da reação de transaminação.

Adaptado: Romo; Liu (2011).

1.5.2 Racemases

As racemases realizam a inversão estereoquímica de grupos químicos em aminoácidos. Essa reação ocorre pela desprotonação do C α para formar um intermediário, que em seguida sofre reprotonação do C α na face si do intermediário para fazer a inversão estereoquímica das moléculas em ambas as direções. As racemases podem ser divididos em duas classes, racemases de aminoácidos dependentes de PLP e racemases independentes de PLP (LIANG et al., 2019).

1.5.3 Descarboxilases

As descarboxilases dependentes de PLP usam o cofator também como dissipador de elétrons para deslocalizar os elétrons não ligados a fim de posicionar o substrato em uma orientação única que contribui para a descarboxilação e formação de um intermediário quinonoide. A protonação em C α leva a uma formação de imina, que é atacada pelo grupo amino da lisina para levar a uma formação de base de Schiff entre o resíduo de Lisina e o PLP (aldimina interna). Ao mesmo tempo, o produto amina é liberado. Este é o mecanismo geralmente aceito para o processo de descarboxilação (LIANG et al., 2019).

1.5.4 Reações de substituições e eliminações γ e β .

Para descrever os mecanismos de substituição e eliminação segue alguns exemplos de enzimas descritas. Substituição β : A enzima triptofano sintase catalisa uma substituição em rede, primeiro desprotonando a serina no C α , produzindo um intermediário quinonoide. A protonação do grupo hidroxila da lisina conservada promove sua eliminação, gerando a aldimina aminoacrilato (LIANG et al., 2019).

Substituição γ : A enzima cistationina sintase catalisa uma substituição através da desprotonação do O-succinil homoserina no C α para produzir o intermediário quinonoide que em seguida é protonado no C4 do cofator para gerar o intermediário cetimina. Através de uma base desconhecida, ocorre abstração de prótons em C β resultando na eliminação do grupo succinil (LIANG et al., 2019).

1.5.5 Enzimas PLP dependentes na biossíntese de deoxi-açúcares

As enzimas PLP dependentes são catalisadoras de diversas reações na via biossintética da gentamicina e sisomicina. No agrupamento gênico da sisomicina foram identificadas quatro enzimas dessa família, que estão envolvidas na transaminação dos anéis I e II (HONG et al., 2009). Enquanto no agrupamento gênico da gentamicina foram identificadas seis enzimas dependentes de PLP, sendo que três dessas enzimas GenB1, GenS1 e GenS2 têm suas funções esclarecidas como transaminases, enquanto as enzimas GenB2, GenB3 e GenB4 ainda não é bem compreendido os seus papéis na via, mecanismos catalítico, e seus substratos específicos (GUO et al., 2014). Gu et al. (2015) e Guo et al. (2014) verificaram a função dessas enzimas na via e através de deleções gênicas e por espectrometria de

massas. Através desses estudos foi sugerido que a enzima GenB2 tem a função de epimerase, modificando a estereoquímica do grupo metil da posição C-5 convertendo a gentamicina C2a em gentamicina C2. Entretanto a GenB2 também tem atividade de transaminase e pode ser uma enzima bifuncional. Guo et al., (2015) verificou que as enzimas GenB3 e GenB4 podem ser as responsáveis pela retirada de duas hidroxilas nas posições C-3 e C-4 dos intermediários JI-20A e JI20-B. Curiosamente essas enzimas apresentam alta similaridade sequencial, mas há evidências que o mecanismo de ação e os substratos podem ser diferentes.

1.6 Justificativa do trabalho

Os aminoglicosídeos consistem em uma importante classe de antibióticos que teve forte papel na luta contra patógenos. Desde a descoberta da estreptomicina, uma diversidade de moléculas dessa classe foi isolada. Houve um período de ouro para os antibióticos no qual muitas moléculas novas foram descobertas e diversas infecções foram sanadas. Porém com a plasticidade bacteriana em se adaptar ao ambiente, muitos microrganismos adquiriram mecanismos de resistência aos antibióticos utilizados. Hoje, sabemos que existem patógenos multiresistentes e alguns relatos que já existem microrganismos resistentes a todos os antibióticos. Infelizmente, os aminoglicosídeos apresenta alta toxicidade aos humanos, causando efeitos nefrotóxicos e ototóxicos. Vivemos hoje em era pós-antibióticos, que foram muito explorados por determinado tempo, mas hoje sabemos da disseminação indiscriminada dos mecanismos de resistência e efeitos colaterais. Assim o uso dessas moléculas foi reduzido drasticamente, sendo limitado a algumas infecções. A indústria passou a se dedicar a compostos sintéticos e semi-sintéticos devido a facilidade da produção e redução de riscos. Contudo, com a descoberta de microrganismos multiresistentes gerou grande necessidade para saúde mundial que se introduzam novos fármacos para driblar os mecanismos bacterianos de resistência. Assim, os produtos naturais são dotados de uma extraordinária diversidade estrutural e atividade biológica incomparável. Desta maneira hoje, novamente os produtos naturais ganharam atenção, inclusive os aminoglicosídeos. Com o avanço na ciência, hoje temos vasto conhecimento sobre como ocorre a biossíntese dessas moléculas, as enzimas que as produzem e muitos detalhes minucioso. Isso nos permite usar de

novas técnicas, principalmente por engenharia genética, a modificar os aminoglicosídeos e produzir moléculas derivadas de forma natural.

A gentamicina e sisomicina são aminoglicosídeos que são altamente metilados e em seus agrupamentos gênicos foram identificadas muitas enzimas envolvidas na decoração de seus anéis que lhes proporcionam características únicas. Essas moléculas se tornam assim, alvos muito interessantes em biossíntese combinatorial. Essa técnica explora a promiscuidade das enzimas e as empregam em diferentes substratos para produzir novos produtos a fim de se expandir a diversidade estrutural dos produtos naturais com potencial valor farmacêutico (FIGURA 14). Para que essa técnica seja viável é necessário profundo conhecimento sobre as enzimas que serão usadas como ferramentas.

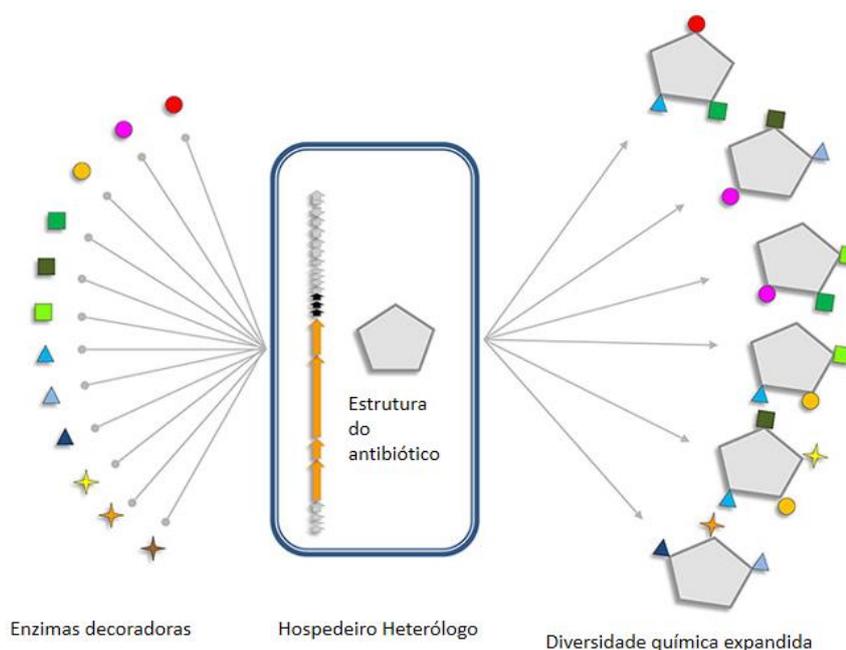


FIGURA 14. Esquema ilustrando o uso da biossíntese combinatorial. Enzimas decoradas são inseridas ao agrupamento gênico de uma bactéria hospedeira, gerando uma diversidade química no antibiótico.

Adaptado: (THAKER; WRIGHT, 2015)

Os aminoglicosídeos semi-sintéticos amicacina e plazamicina são exemplos de que através da combinação de características de moléculas é possível produzir derivados muito eficazes. A amicacina e plazamicina são usadas em infecções causadas por bactérias multiresistentes e novos estudos indicam que essas moléculas têm ação em outras doenças.

O estudo estrutural de enzimas relacionadas com a biossíntese de antibióticos, além de serem cruciais para produção de novas moléculas, também são extremamente importantes do ponto de vista bioquímico, pois fornecem com riqueza de detalhes informações sobre enovelamento, mecanismo catalítico e a natureza dessas proteínas.

2 OBJETIVOS

O objetivo global deste trabalho foi revelar informações estruturais a respeito de várias enzimas relacionadas com a biossíntese de gentamicina e sisomicina. Essas informações estruturais permitem um avanço no conhecimento das rotas biossintéticas desses dois aminoglicosídeos e podem contribuir para a aplicação dessas enzimas em processos biotecnológicos para produção de derivados de aminoglicosídeos com novas propriedades farmacológicas..

A razão pelo qual essas enzimas foram escolhidas é o fato delas provavelmente terem reações únicas entre os aminoglicosídeos e por não apresentarem homologia sequencial com outras enzimas, o que pode levar a determinação de estruturas completamente novas. Devido à dificuldade da técnica de cristalografia, nesse trabalho foi proposto o estudo estrutural de enzimas semelhantes em ambas as vias da sisomicina e gentamicina, para se obter maiores chances de sucesso em cristalizar ao menos uma delas.

Portanto, o objetivo específico deste trabalho é a caracterização estrutural das seguintes enzimas relacionadas com a biossíntese de gentamicina e sisomicina:

GenN e/ou Sis30: hipotéticas metiltransferases responsáveis pela adição do grupo metil na posição C3' do açúcar garosamina na biossíntese de gentamicina e sisomicina respectivamente.

GenB1 e/ou Sis5 que são hipotéticas aminotransferases e estão relacionadas na biossíntese da porção purpurosamina na biossíntese de gentamicina e sisomicina respectivamente.

GenB3 e GenB4 são possíveis dehidroxilases dependentes de piridoxal 5'-fosfato, na remoção de duas hidroxilas não ativados de um dos anéis de açúcar.

GenB2 é a possível catalisadora da epimerização da gentamicina C2a em gentamicina C2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação das enzimas GenN, Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4.

Os plasmídeos com as regiões codificantes para os genes *genN*, *sis5*, *genB2*, *genB3* e *genB4* foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Professor Peter Leadlay da Universidade de Cambridge-Reino Unido. Todas as construções realizadas por nossos colaboradores foram em vetor de expressão pET28a com resistência a canamicina, no qual a proteína é expressa com cauda 6xHis no N-terminal. O mutante *genB2* K227A foi gerado através de mutação de sítio dirigido usando o kit QuickChange (Stratagene) pela pesquisadora Dr Fanglu Huang, que também realizou os ensaios funcionais dos mutantes e nos cedeu o plasmídeo para realizarmos o estudo estrutural.

As enzimas foram expressas e purificadas de acordo com os trabalhos e protocolos dos nossos colaboradores. Células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) foram transformadas com os plasmídeos de expressão contendo os insertos e plaqueadas em ágar LB (Luria Bertani), contendo 30 ug/mL de canamicina. Foram selecionadas colônias isoladas dos transformantes e inoculadas em 100 mL de meio LB contendo também 30 ug/mL de canamicina e deixados em agitação em shaker (Thermo Scientific) por aproximadamente 20 horas. A partir desse inóculo crescido, foi retirada alíquota de 10 mL da cultura para adição em 1 litro de meio de cultura LB também suplementado com 30 ug/mL de canamicina. Para cada proteína foram utilizados 4 litros de meio de cultura distribuídos em um litro em cada Erlenmeyers com capacidade para 2 litros. Essas culturas foram crescidas à 37°C em agitação de 200 RPM (rotação por minuto) até alcançarem a densidade ótica de 0,6, medida em espectrofotômetro (WPA Biowave) com comprimento de onda de 600 nm. Nesse ponto, foi adicionado a cada litro da cultura 0,2 mM IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) e a temperatura de incubação foi reduzida para 18°C e mantidas em agitação constante (200RPM) por 20 horas.

Para determinação da estrutura por faseamento experimental utilizou-se o meio de mínimo M9 para a incorporação do aminoácido selenometionina. Este meio é composto por fosfato de sódio dibásico; fosfato de potássio monobásico; cloreto de amônio; Cloreto de sódio, suplementado com glicose, sulfato de magnésio, tiamina, sulfato de ferro, canamicina, L-lisina, L-fenilalanina, L-treonina, L-isoleucina, L-leucina, L-valina e L-selenometionina. A cultura foi acondicionada a 37°C até atingir a densidade ótica de 0,6. Quando a cultura alcançou o crescimento exponencial foi adicionado 0,1 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida) por litro e esta foi mantida por 20 horas a 18°C em agitação de 200 RPM.

Ao final da indução, as células foram isoladas por centrifugação à 7000g, 4 °C por 30 min e ressuspendidas em tampão de lise. Para as proteínas GenN e Sis5 foi utilizado tampão Tris 50 mM pH 7,8 e 200 mM NaCl; para as proteínas GenB2 e GenB3 foi utilizado tampão Hepes 50 mM pH 8 e NaCl 150 mM e para a proteína GenB4 foi utilizado tampão Hepes 50 mM pH 7 e NaCl 150 mM. Os tampões foram escolhidos conforme os protocolos de nossos colaboradores e alguns modificados de acordo com pI (ponto isoelétrico) de cada proteína. Para a lise, foram acrescentados a células ressuspendidas no tampão de lise: lisozima (1 mg/mL), DNase I (1 mg/mL) e fluoreto de fenilmetanesulfonil (10 mM). As células foram rompidas utilizando um sonicador Branson (5 min com amplitude de 50% por ciclo) e o lisado foi clarificado por centrifugação (15 000g, 4°C, 1 hora). O sobrenadante foi passado por uma coluna de 5 mL IMAC (GE Healthcare) carregado com níquel e previamente equilibrada com tampão A de carregamento (o mesmo utilizado na lise celular). A coluna foi lavada com o equivalente 50 mL de tampão de A contendo 25 mM de imidazol para eliminação dos contaminantes que eventualmente tenham se ligado por interações inespecíficas e então as proteínas foram eluídas em um gradiente linear de imidazol até a concentração de 500 mM em um Äkta Purifier (GE Healthcare).

As amostras referentes à proteína foram concentradas em filtros Amicon® Ultra-4 com membrana Ultracel-10, em centrífuga com rotação de 1860g até alcançarem 2 mL de volume. Esse volume foi injetado em um *loop* para iniciar o segundo passo da purificação.

Na cromatografia por exclusão molecular foi utilizado o mesmo tampão A de carregamento da afinidade. Nesse método foi utilizada uma coluna de gel filtração Superdex 16/60 200 (General Heathcare). No programa Unicorn foi elaborado um

método que consistiu em um equilíbrio da coluna com 120 mL de tampão, injeção da amostra e eluição em 120mL de tampão. Para a purificação do extrato proveniente de meio de cultura suplementado com selenometionina, em ambos os passos de purificação, os tampões utilizados foram acrescidos com 5mM de agente redutor TCEP (Tris 2-carboxietil fosfeno) , para manutenção das selenometioninas reduzida. As amostras foram concentradas em filtros Amicon® Ultra-4, em centrífuga com rotação de 1860g até alcançarem a concentração 20 mg/mL, em seguida foram armazenadas à -80°C.

3.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da pureza das amostras de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, no sistema BioRad. As proteínas foram aquecidas a 100 °C por 5 min em tampão de amostra de SDS, 50 % de glicerol e 0,01 % de azul de bromofenol em 0,31 mmol.L-1 de Tris-HCl pH 6,8) e separadas em gel contendo 10 a 15% de bis-acrilamida e 0,1% de SDS, em 0,375 mmol.L-1 de Tris-HCl pH 8,8. O gel de empilhamento foi constituído de 3 % de poliacrilamida, 0,3 % de bis-acrilamida e 0,1 % de SDS em 0,125 mmol.L-1 de Tris-HCl pH 6,8. Os géis de separação e empilhamento foram polimerizados na presença de 0,1% de persulfato de amônio e (1:2000) de TEMED (N'-Tetrametiletilenodiamina).

A corrida foi realizada em tampão constituído de 0,192 mmol.L-1 de glicina, 0,1 % de SDS e 0,025 mmol.L-1 de Tris-base pH 8,5 em uma voltagem constante de 100 V. Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por 15 min com corante coomassie blue G e descorados com água.

3.3 Ensaio Cristalográfico

A cristalografia de macromoléculas foi a técnica utilizada nesse trabalho para determinar as estruturas das proteínas propostas. Essa técnica é uma das estratégias experimentais mais comuns para obtenção de um modelo molecular detalhado de uma molécula. A cristalografia de macromoléculas permite a resolução de átomos individuais através da interpretação da difração de raios X a partir de muitas moléculas idênticas em uma matriz ordenada como um cristal (RHODES, 2006). Os cristais são formados a partir de substâncias moleculares, incluindo proteínas, que sob determinadas circunstâncias se solidificam em uma matriz cristalina. Ao entrar no estado cristalino a partir de uma solução, as moléculas individuais da substância adotam uma ou algumas orientações idênticas resultando em um cristal. Este último é uma matriz tridimensional ordenada de moléculas mantidas juntas por interações não covalentes. Para se obter um cristal de proteína é necessário diminuir a solubilidade da molécula de forma gradual e ordenada para que ocorra a nucleação dos cristais seguida por seu crescimento (RHODES, 2006; DOUBLIE, 2007; DRENTH, 2007).

Triagens iniciais de cristalização das enzimas GenN e Sis5 foram realizadas na plataforma de cristalização automatizada presente nas dependências do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPq). Foram testadas aproximadamente 500 condições de precipitantes comerciais (Hampton e Qiagen). Esses testes são realizados em placas MRC2 de 96 poços (Swissci), no sistema de gota sentada.

Por outro lado, os testes de cristalização das enzimas GenB3 e GenB4 incubados previamente com 5 mM de PLP foram realizados na plataforma de cristalização automatizada do robô Oryx4 (Douglas Instruments) nas dependências do Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (USP-São Paulo). Foram testadas aproximadamente 500 condições dos kits comerciais da Jena Bioscience e Hampton. Esses testes foram realizados em placas MRC2 de 96 poços (Swissci), no sistema de gota sentada.

A condição de cristalização para enzima GenB2 foi determinada pelo grupo do pesquisador Yuhui Sun do laboratório de biossíntese combinatorial e descobrimento de drogas, Escola de ciências farmacêuticas na China. O grupo chinês também é nosso colaborador nesse projeto e já havia iniciado o trabalho com a enzima GenB2

e assim nos cedeu a condição de cristalização para obtenção de complexos. Através da condição obtida, em colaboração com a aluna de mestrado Natalia Cerrone realizamos a cristalização da enzima GenB2 com o intermediário de biossíntese gentamicina X2 e do mutante GenB2 K227A. Com a obtenção de cristais, esses foram otimizados variando-se parâmetros como pH, concentração de proteínas ou precipitantes. A otimização foi realizada manualmente pelo método de gota pendurada em placas VDX de 24 poços (Hampton Research). As placas foram armazenadas à 18°C.

Para a determinação da fase através de SAD (dispersão anômala única) utilizando metais pesados usou-se a técnica de *quick-soaking* com os cristais, que consistiu na incubação dos cristais por aproximadamente 15 segundos com 0,2µL de brometo de sódio a 1M, 0,2µL de iodeto de sódio a 1M, 0,2µL brometo de potássio a 1M, 0,2µL de iodeto de potássio a 1M, 0,2µL de cloreto de mercúrio a 0,5M, 0,2µL de cloreto de ouro a 0,5M e 0,2µL de cloreto de platina a 0,5M.

3.3 Coleta e processamento de dados de difração de raios x

Na coleta de dados de difração de um cristal, são medidas as intensidades da difração de ondas espalhadas a partir de uma série de planos que cortam através do cristal em todas as direções. Pela intensidade é derivada as amplitudes das ondas espalhadas, mas na metodologia experimental essa informação é perdida. Esse fenômeno é conhecido como “problema das fases”. Assim, existem várias técnicas para reconstruir essa informação. Na maioria dos casos as fases são derivadas de coordenadas atômicas de uma proteína similar, método conhecido como substituição molecular. Porém para proteínas com sequências pouco conservadas com estruturas resolvidas, busca-se por átomos pesados que são incorporados a proteína ou adicionados. Essa metodologia, inclui diversas técnicas, sendo que as mais utilizadas são dispersão anômala múltipla (MAD) e dispersão anômala única (SAD) (TAYLOR, 2003).

Os cristais da proteína Sis5 foram coletados no SLS (Villigen, Suíça). Até a obtenção de cristais da Si5 não havia estrutura com identidade sequencial depositada no Protein Data Bank (PDB) que fosse suficiente para realizar substituição molecular. Desta maneira, foi utilizado o método Se-MAD, usando o sinal da selenometionina

para resolver o problema das fases. Porém a proteína apresentava baixa incorporação, logo foi utilizada uma estratégia desenvolvida pelo grupo SLS da Suíça (WEINERT et al., 2015) no qual foram necessários a coleta de 14.400 imagens para altíssima multiplicidade, o que permitiu a determinação dessa estrutura.

Assim os conjuntos de dados foram processados pelo programa XDS (KABSCH, 2010) e integrados. Através do programa Phaser (MCCOY et al., 2007) do pacote PHENIX (ADAMS et al., 2010) foi possível encontrar a fase experimental e determinar a estrutura cristalográfica da enzima Sis5. O refinamento da estrutura foi efetuado pelo Phenix.refine (AFONINE et al., 2012). A modelagem atômica foi realizada pelo programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004) e a preparação das figuras pelo PyMol (SCHRÖDINGER). A qualidade estereoquímica das estruturas foram checadas através do MOLPROBITY (CHEN et al., 2010).

Para os cristais da GenN foram coletadas 3600 imagens para diferentes cristais por um tempo de 0,1 segundo por imagem utilizando um detector PILATUS (PETRAIII-Alemanha). A estrutura da GenN foi determinada por SAD (*Single anomalous dispersion*) usando a incorporação de átomos de iodo. Para os cristais da GenN em complexo com os ligantes foram coletadas aproximadamente 1800 imagens a cada 0,20 graus num total de 360 graus nas linhas SLS-Suíça, PETRAIII-Alemanha e MX2-Brasil.

Os cristais da proteína GenB2 difrataram na linha PETRAIII na Alemanha, na qual foram coletados 3600 a cada 0,2 graus em tempo de exposição de 1 segundo. Foi utilizado o modelo da proteína Sis5 para substituição molecular, essas enzimas apresentam em torno de 35% de identidade sequencial o que nos permitiu o cálculo da fase.

Os cristais da GenB4 e GenB3 foram coletados na linha MX2/ LNLS, na qual foram coletas 1800 imagens a cada 0,2 graus com 1 segundo de exposição.

Para proteína GenB4 não foi possível usar o modelo da Sis5 para substituição molecular, pois essas apresentam similaridade sequencial abaixo de 30%. Assim, utilizamos o programa Mr. Bump da plataforma online do pacote CCP4 (KEEGAN; WINN 2007). Esse servidor utiliza algoritmo que através dos fatores de estrutura experimental e da sequência alvo, procura múltiplos e domínios para serem usados na substituição molecular em combinação com programa Arp/warp

(LANGER et al., 2008) que constrói o modelo da proteína a partir dos resultados gerados da substituição molecular.

A estrutura tridimensional da proteína GenB3 foi obtida através de substituição molecular utilizando o modelo da GenB4. Essas enzimas apresentam alta similaridade sequencial, o que nos permitiu o cálculo da fase.

Todos os dados coletados foram processados e integrados pelo programa XDS (KABSCH, 2010). Para averiguação de grupo espacial e obtenção do arquivo MTZ foi utilizado o programa AIMLESS (EVANS; MURSHUDOV, 2013) do pacote CCP4 (WINN et al., 2011). Para se obter as fases dos dados coletados por SAD e MAD foram utilizados os programas AutoSol (EVANS; MURSHUDOV, 2013) e Phaser (MCCOY et al., 2007) do pacote Phenix (ADAMS et al., 2010). As estruturas por substituição molecular foram obtidas pelos programas Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) do pacote CCP4 (WINN et al., 2011) e Phaser (MR) (MCCOY et al., 2007) do pacote Phenix (ADAMS et al., 2010). Os refinamentos das estruturas obtidas foram efetuados pelo Phenix.refine (AFONINE et al., 2012). A modelagem atômica foi realizada pelo programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004) e a preparação das figuras pelo PyMol (SCHRÖDINGER). A qualidade estereoquímica das estruturas foram checadas através do programa MOLPROBITY (CHEN et al., 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação

O grupo do Prof. Peter Leadley realizou a caracterização bioquímica e funcional das enzimas da biossíntese de sisomicina e gentamicina (GUO et al., 2014) envolvidas neste trabalho e, portanto, foi também determinado suas condições de expressão e purificação. Desta maneira, esses passos experimentais foram realizados de acordo com os protocolos previamente estabelecidos.

Abaixo os cromatogramas referentes as purificações por exclusão molecular (Figura 14). Para a proteína GenN houve alguns picos, possivelmente de contaminantes, antes da eluição da proteína com aproximadamente 80 mL de tampão. GenN possui aproximadamente 36 kDa de massa, no gel de poliacrilamida desnaturante é possível observar a banda relativa à proteína próxima ao tamanho de 37 kDa do marcador de proteína.

Sis5 eluiu com aproximadamente 80 mL de tampão na cromatografia por exclusão molecular. A proteína tem por volta de 47 kDa e é possível verificar no gel desnaturante uma banda relativa à proteína próxima ao marcador de 50 kDa.

GenB2 eluiu com aproximadamente 80 mL de tampão enquanto o mutante K227A eluiu com 70 mL de tampão. Ambas foram purificadas na coluna superdex 200 16/600 (GE Healthcare) apesar de possuírem a mesma massa, a diferença do tempo de retenção da coluna está relacionado ao fato da mudança de volume morto da coluna. Nos géis de poliacrilamida desnaturante é possível observar que ambas enzimas com aproximadamente 46 kDa se localizam no gel próximo a banda de 50 kDa do marcador.

GenB3 e GenB4 eluíram com aproximadamente 70 mL de tampão e possuem uma massa de aproximadamente 50 kDa, como verificado no gel de poliacrilamida desnaturante.

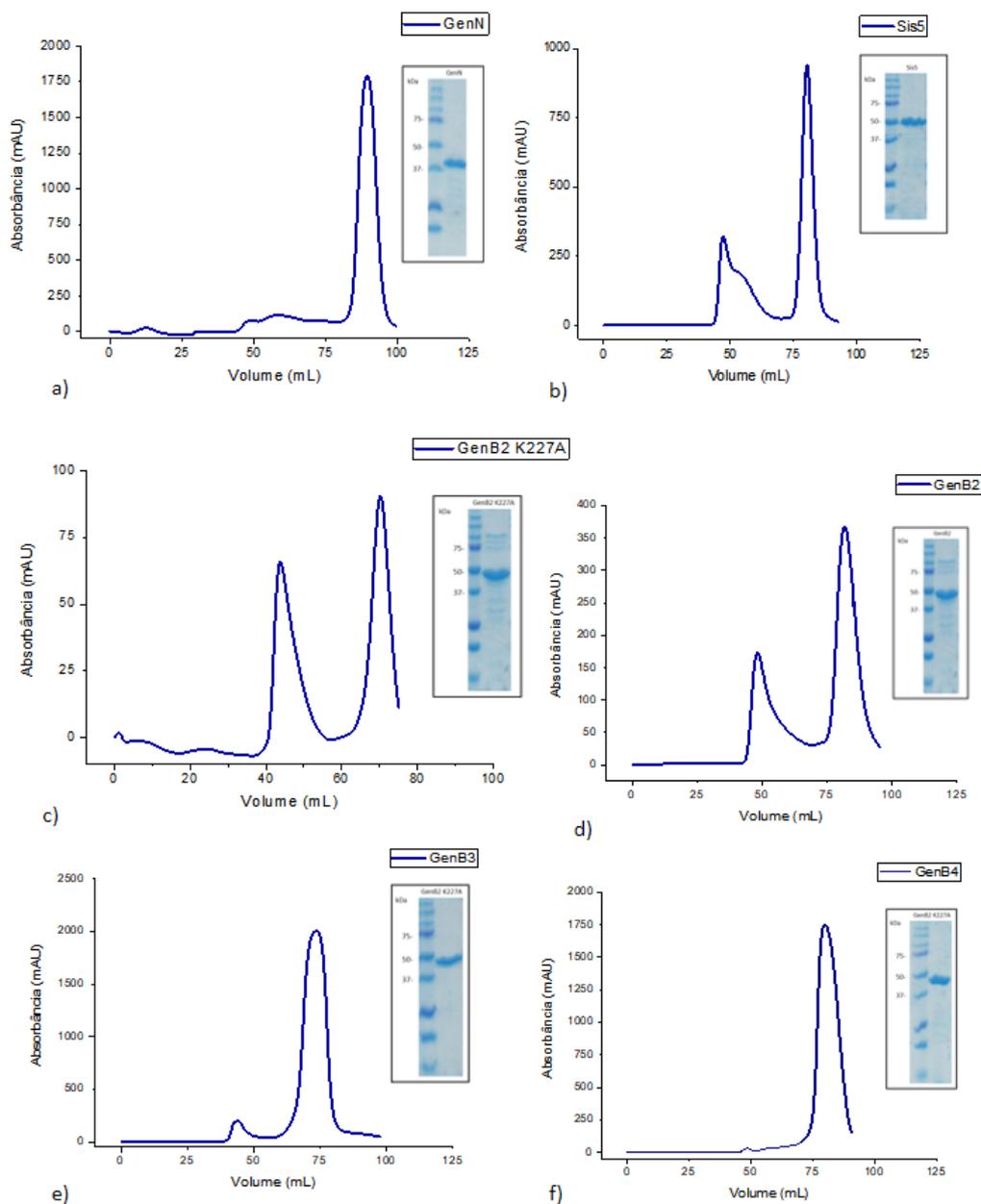


FIGURA 15. Cromatogramas gerados pelo program Unicorn (GE Healthcare) das cromatografias por exclusão molecular das proteínas GenN, Sis5, GenB2, GenB2 K227A, GenB3 e GenB4. E seus respectivos géis de poliacrilamida desnaturante. Marcador: Precision Plus Protein Dual color 250 kDa (Bio-rad).

4.2 Cristalização

Foi obtido cristais da proteína GenN através das triagens realizadas na plataforma automatizada do Robô-lab em Campinas em uma condição do kit JCSG (Quiagen). Para a cristalização da GenN foi utilizada uma concentração de 10 mg/mL, que foi incubada previamente com 5mM de SAM. Após aproximadamente 2 dias houve o crescimento de cristais em temperatura de 18°C. Os cristais foram otimizados manualmente pelo método de gota pendurada. Os complexos com substrato e análogos foram obtidos a partir de co-cristalização com aproximadamente 10 mM de cada ligante (Tabela 2 Figura 15).

Os cristais da Sis5 foram obtidos em uma condição do kit JCSG (Quiagen) em testes iniciais realizados na plataforma automatizada do Robô-lab em Campinas. A proteína a 10 mg/mL foi previamente incubada com 5 mM de PLP e após 24 horas da realização das gotas houve o crescimento de cristais na temperatura de 18°C. Após otimização manual, a condição abaixo foi a mais adequada para o crescimento de cristais grandes, únicos e bem definidos (Tabela 2 Figura 15).

As enzimas GenB2 e GenB2 K227A cristalizaram através da otimização da condição cedida pelo grupo do Prof. Yuhui Sun (Universidade de Wuham, China) em uma concentração de 8 mg/mL à 18°C, após 2 dias. Com os cristais da GenB2 foi realizado *soaking* com gentamicina X2 à 100 mM e congelados para difração (Tabela 2 Figura 15).

A proteína GenB3 em uma concentração de 10 mg/mL incubada com 5 mM do cofator PLP cristalizou em uma condição (kit Index-Hampton Research) dos kits iniciais do Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, após 1 semana, em temperatura de 18°C. Otimização manual através do método de gota pendurada foi necessária e os cristais foram reproduzidos na condição abaixo (Tabela 2 Figura 15).

A proteína GenB4 à 10 mg/mL foi incubada com 5 mM do cofator PLP e cristalizou após 3 dias à 18°C numa condição do kit Index (Hampton Research). Os cristais foram otimizados manualmente pelo método de gota pendurada e para obtenção do complexo foi necessário a incubação da proteína com 15 mM de sisomicina, que é muito semelhante a gentamicina C1a. Guo et al. (2014) ainda relata que a sisomicina pode ser um possível produto da GenB4 (Tabela 2 Figura 15).

TABELA 2. Condições de cristalização das enzimas após otimização.

GenN 10mg/mL	Condição I
	0,1 M Cloreto de Magnésio
	0,1 M Tris pH 8,5
	20% PEG 400
	20% PEG 8000
	Condição II
	0,1 M Cloreto de Magnésio
	0,1 M Tris pH 8,5
	25% PEG 400
	20% PEG 3350
	Condição III
	0,2 M Cloreto de cálcio
	0,1 M Hepes pH 7,0
	20% PEG 6000
Sis5 10mg/mL	Condição I
	0,16 M Acetato de cálcio
	0,08 M Cacodilato de sódio pH 6,5
	14.40% PEG 8000
	20% Glicerol
GenB2 8 mg/mL	0,1M PIPES pH 6.0
	1M NaCl
	29% PEG 4000
	30% Ácido 6-Aminohexanoico
GenB3 10 mg/mL	0,1M Malonato de sódio pH 4
	12% PEG 3350
GenB4 10 mg/mL	0,15 M Ácido DL málico pH 7
	20% PEG 3350

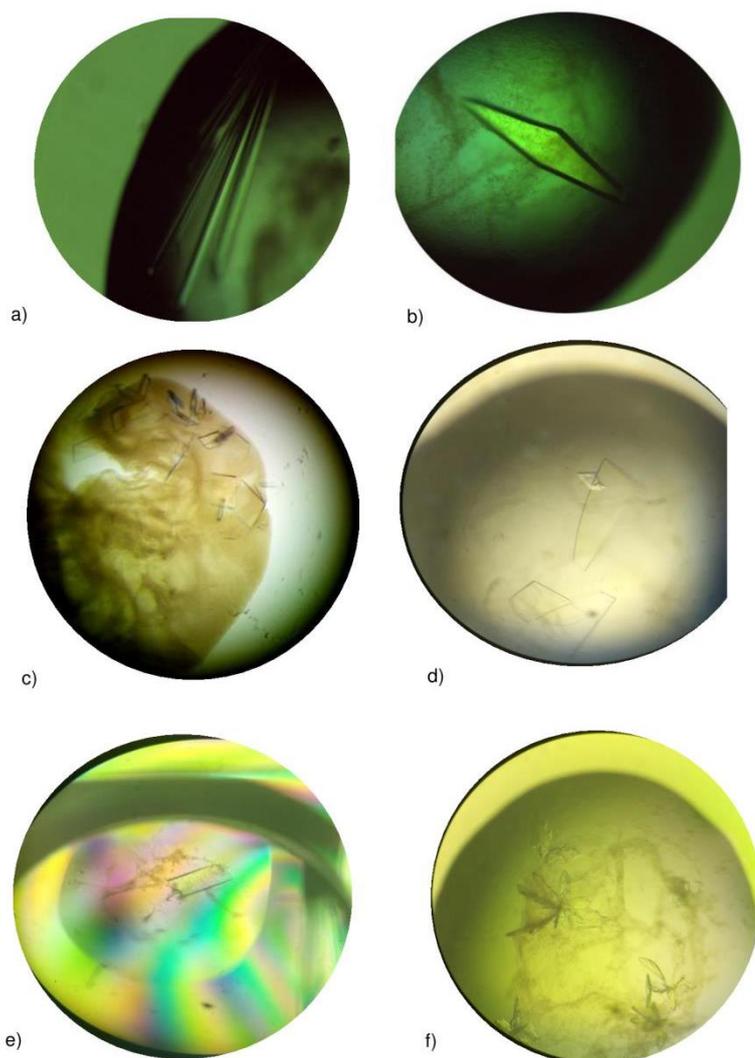


FIGURA 16. Cristais obtidos após otimização manual pelo método de gota pendurada. a) GenN em complexo com SAM; b) Sis5 em complexo com PLP; c) GenB2; d) mutante da GenB2 K227A; e) GenB3 em complexo com 5 mM de PLP f) GenB4 em complexo com Sisomicina.

4.3 Coleta e análise dos dados de difração em raios X

A estrutura da GenN foi determinada por SAD (*Single anomalous dispersion*) usando a incorporação de átomos de iodo a partir da incubação de cristais nativos com iodeto de sódio. Os complexos ternários com canamicina B, G418, tobramicina, DAA2 e Tris foram obtidos a partir da coleta de dados em diversos Síncrotrons (Apêndice A).

Os cristais da Sis5 com incorporação de selenometionina foram coletados na Linha SLS-Suíça, através do método descrito no item 3.5. Os cristais da Sis5:PMP foram difratados a 2.01 Å na linha MX2 em Campinas. Os cristais da Sis5:PLP:G418

foram difratados a 1.81Å na linha MX2 em Campinas coletados 1800 imagens com 1 segundo de exposição a 0,2 graus por imagem utilizando o detector PILATUS (Apêndice B).

Os cristais da proteína GenB2:PMP e GenB2:PMP:Gentamicina X2 difrataram a 1,90Å e 1,66Å, respectivamente, na linha PETRAIII (DESY), Alemanha, na qual foram coletados 3600 a cada 0,2 graus em tempo de exposição de 1 segundo (Apêndice C).

Os cristais da GenB4 e GenB3 foram coletados na linha MX2/ LNLS em Campinas numa resolução de 1,70Å, foram coletas 1800 imagens a cada 0,2 graus com 1 segundo de exposição (Apêndice C).

4.4 Análise da estrutural das enzimas dependentes de PLP

Nesse tópico foram descritas as análises realizadas a respeito das estruturas cristalinas das enzimas dependentes de PLP e seus respectivos complexos das vias de biossíntese da gentamicina e sisomicina (Tabela 4).

TABELA 3. Relação das estruturas cristalinas de enzimas PLP dependentes.

Estruturas Cristalinas	Resolução	Método
Sis5 selenometionina	2.00	SAD
Sis5:PLP	1.60	SM
Sis5:PMP	2.01	SM
Sis5:PLP: G418	1.81	SM
GenB2: PMP	1.90	SM
GenB2 K227A	1.99	SM
GenB2: PMP: Gentamicina X2	1.66	SM
GenB3: PLP	1.70	SM
GenB4:PLP	1.70	SM
GenB4:PLP: Sisomicina	1.40	SM

*SAD: dispersão anômala única, *SM: substituição molecular

4.4.1 Estrutura cristalina da transaminase Sis5

A enzima Sis5 é uma aminotransferase pertencente à família α com enovelamento tipo I dependente de piridoxal 5'-fosfato (Figura 3). Segundo Hong et al., (2009) Sis5 é homóloga a enzima GenB1 da biossíntese da gentamicina. Essas enzimas realizam a transaminação do intermediário 6'-DOG convertendo-o em JI20-B e a transaminação do intermediário 6'-DOX em JI-20A (Figura 17).

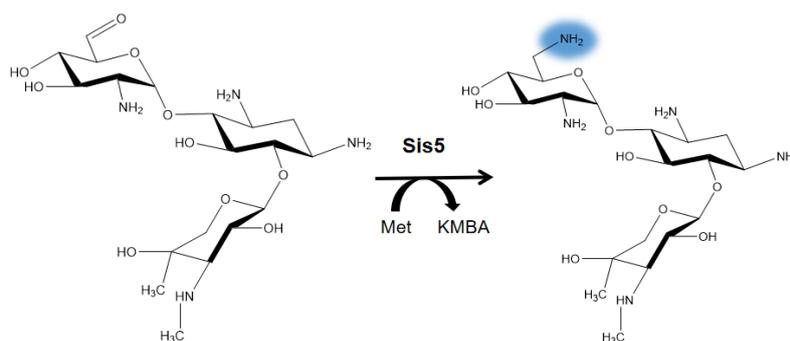


FIGURA 17. Intermediários de biossíntese da sisomicina

Em azul o grupo amina adicionado pela enzima Sis5 através da conversão da metionina em ácido 2-ceto-3-metiltiobutírico.

Adaptado: Hong et al. (2009).

Estruturalmente a enzima Sis5 apresenta enovelamento característico da grande família α de aminotransferases. Assim, cada monômero do homodímero contém aproximadamente 415 resíduos e apresenta 3 domínios (Figura 18a). O sítio ativo de cada protômero fica na face oposta ao outro sítio (Figura 18c). O domínio de ligação do PLP é composto por 1 folha- β constituída por 7 fitas, 3 antiparalelas, 4 paralelas e 7 α -hélices. Os outros domínios são os que flanqueiam o domínio de ligação do PLP (Iso45 a Arg275), O N-terminal (Gly8 a Trp44) é composto por 1 folha- β antiparalela de 3 fitas e o domínio C-terminal (Met276 a Trp414) é composto por 1 folha beta- β com 2 fitas antiparalelas e 4 α -hélices (Figura 18a)

Sis5 apresenta a cavidade do sítio ativo carregada negativamente, indicando uma possível afinidade por substratos carregados positivamente, que é o caso dos aminoglicosídeos. (Figura 18b).

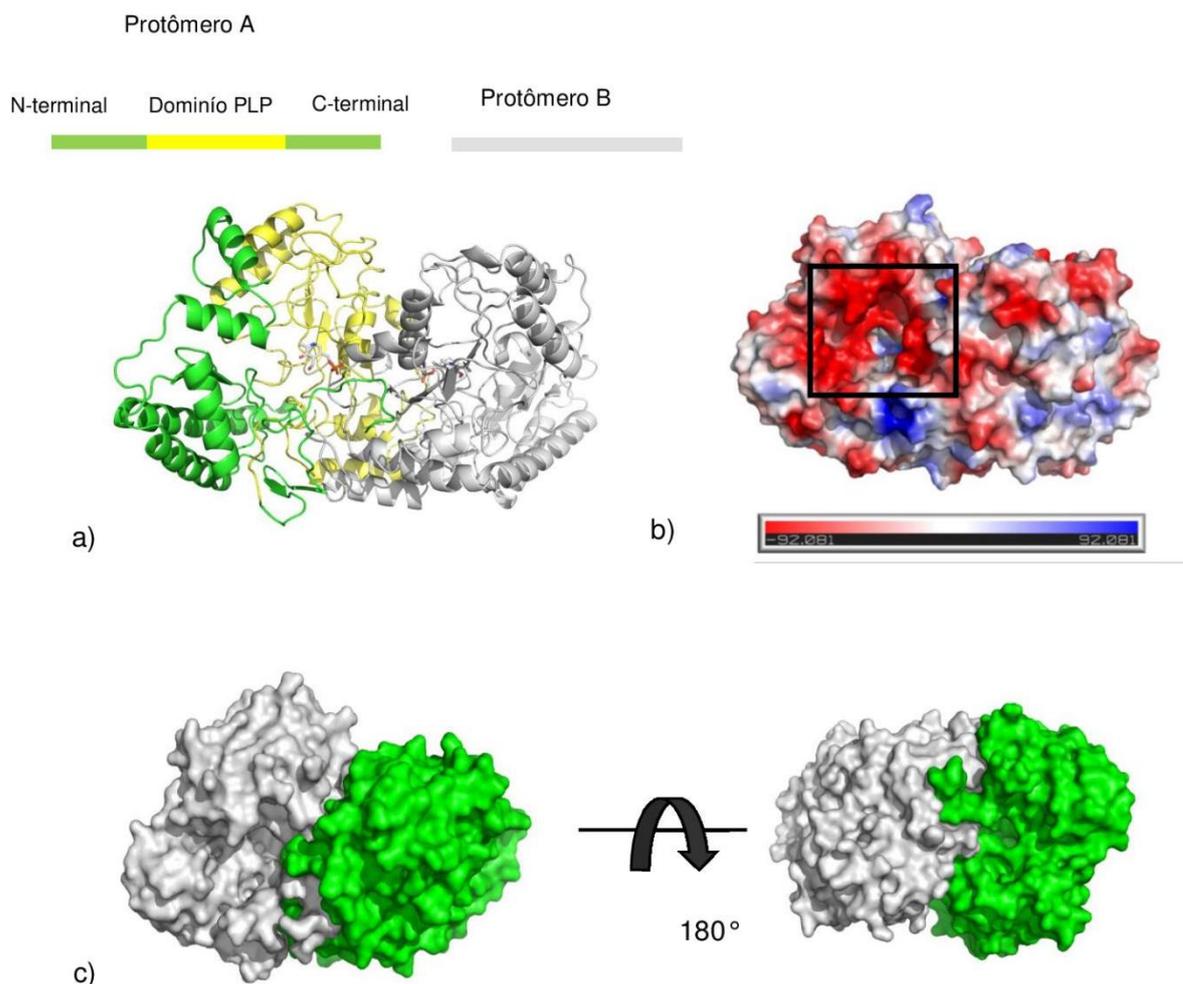


FIGURA 18. Representações da estrutura cristalográfica da enzima Sis5.

a) Dímero em *cartoon* da Sis5: o protômero A dividido em verde mostrando os domínios N e C terminais e em amarelo o domínio de ligação do cofator PLP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando esse projeto foi iniciado em 2014, a enzima com identidade sequencial mais próxima a Sis5 era uma isomerase de *Sinococcus* sp que tem aproximadamente 23% (R.M.S.D. 2.2Å) de similaridade com a Sis5. Assim, A sis5 era um alvo interessante pois não apresentava alta semelhança com as enzimas depositadas no PDB (Protein Data Bank) e também complementaria o trabalho com as outras enzimas PLP dependentes da via da gentamicina, fornecendo um parâmetro geral dessas a respeito dessas enzimas. Desta maneira, a Sis5 apo e em complexo com G418 foi a primeira enzima do projeto inicial de doutorado a ser resolvidas. Porém Dow et al (2018) e Ban et al., (2019) publicaram a estrutura da enzima GenB1, que é estruturalmente similar a Sis5. Porém, como o enfoque do nosso trabalho é a

comparação das enzimas dependentes de PLP GenB1-GenB4, utilizaremos ambas GenB1 e Sis5 para as nossas análises.

4.4.1.1 Complexo binário da Sis5 e Piridoxal 5-fosfato (PLP) e Piridoxamina 5-fosfato (PMP)

Para este trabalho foram determinadas as estruturas da Sis5 em complexo binário com o PLP e o PMP. O PLP encontra-se ancorado no sítio ativo por uma rede de interações de hidrogênio, que ocorre entre o fosfato do piridoxal e a Thr108, Gly107 e Thr259, além das interações intermediadas por duas águas. O anel do piridoxal interage covalentemente com a Lys232, formando a típica base de Schiff que é comumente encontrada em proteínas dependentes de PLP (ROMO; LIU, 2011) (Figura 19). Além disso, observamos uma interação de hidrogênio com o Asp206 e a Tyr132. Na estrutura em complexo com o PMP podemos observar que este último realiza as mesmas interações que o PLP, porém a interação com a Lys232 deixa de ser uma ligação covalente e passa ser uma interação de hidrogênio (Figura 19).

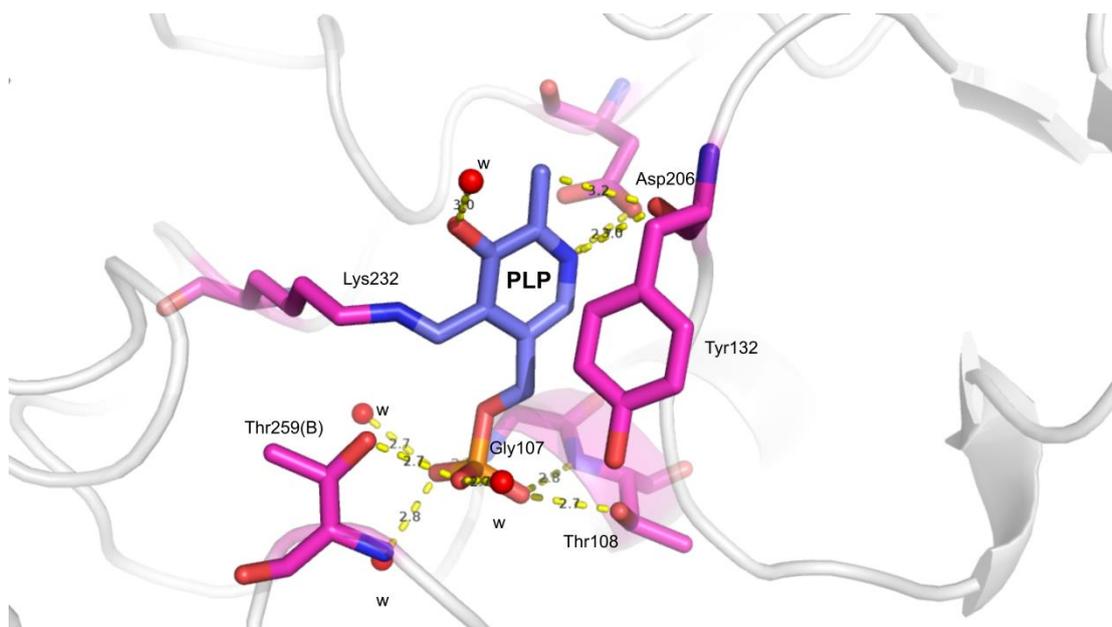


FIGURA 19. Piridoxal 5'-fosfato ancorado ao sítio ativo da enzima Sis5. Em rosa os resíduos que interagem com o cofator em azul, através de interações de hidrogênio, uma interação hidrofóbica com a Tyr132 e a Base de Schiff com a Lys232.

Fonte: Elaborado pelo Autor

A fim de se obter detalhes do mecanismo de transferência do grupo amina do PLP para o substrato, foi realizada a incubação da enzima Sis5 com o PMP na presença de metionina. Assim, foi obtida a enzima com a forma PMP do cofator que caracteriza o meio da reação para transferir para o grupo amina para o substrato, onde não há ligação covalente com a lisina conservada (Figura 7a). O cofator aminado promove o deslocamento da Lys232 em 1,9 Å, em relação à enzima com PLP e essa alteração está relacionada com a fase em que se encontra a catálise. Entretanto, realizando uma sobreposição da estrutura contendo PLP e a estrutura com PMP é possível verificar que a mudança do cofator não ocasiona uma mudança conformacional nas estruturas terciárias (R.M.S.D=0.14)(Figura 20).

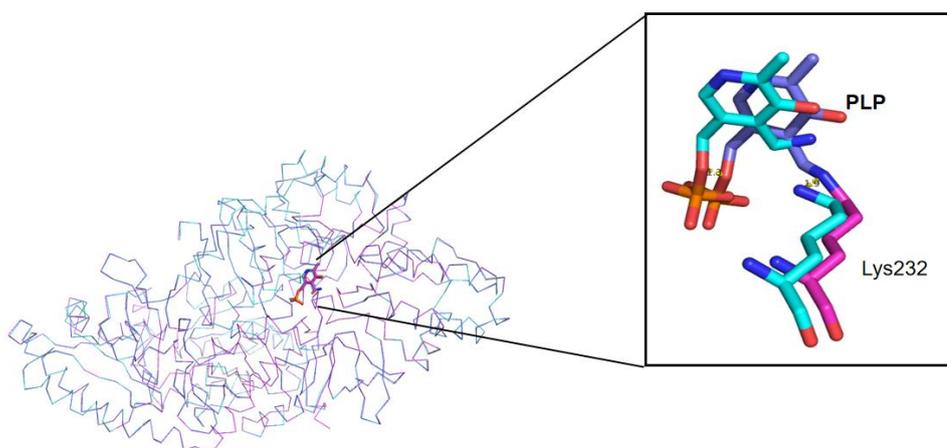


FIGURA 20. Sobreposição da enzima Sis5 com PLP (azul) e Sis5 com PMP (azul claro) no sítio ativo.

Em rosa o resíduo de lisina ligado covalentemente ao PLP. Em azul claro o resíduo de lisina fazendo apenas interação de hidrogênio com o PMP também em azul claro.

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com GUO *et al.*, (2014), a transaminação é dependente de um doador de grupo amino. Foram testados aminoácidos proteínogênicos e a L-metionina demonstrou ter maior capacidade de doação, pois houve maior conversão em JI-20A e JI-20B. Assim, foi realizado diversas tentativas de se obter o complexo com metionina para elucidarmos o mecanismo de doação da amina para o PMP, porém em nenhuma das estruturas foi possível identificar densidade eletrônica para o aminoácido doador.

4.4.1.2 Sis5 em complexo com G418

O G418 apesar de ser um precursor de biossíntese da gentamicina, que é semelhante a sisomicina, possui uma hidroxila na posição C-5 do anel II, para que ocorra a aminação pela Sis5 é necessário que nessa posição tenha um grupo cetona, portanto não foi possível a obtenção do produto da catálise. De acordo com Guo et al (2014), a transaminação do substrato pela GenB1 (ortólogo da sis5 na via da gentamicina), só é possível ocorrer através de uma catálise prévia de uma deidrogenase, que na via da sisomicina ocorre pela enzima Sis6. A ligação do G418 no sítio ativo ocorre por pontes de hidrogênio entre o oxigênio e nitrogênio do anel I (2-DOS) com os oxigênios da cadeia lateral do Asp395. Thr16 e o Asp345 fazem interações de hidrogênio com oxigênios do anel II e a Tyr132 realiza uma interação *stacking- π* com este mesmo anel. Além disso, são observadas algumas interações de hidrogênio que são intermediadas por moléculas de água, através do grupo metil do C-4 e grupo amino do C-3 do anel III. O anel I interage com uma água através da amina do C-1 e o Asp345, enquanto o anel II interage através de moléculas de água pela amina do C-2 (Figura 21).

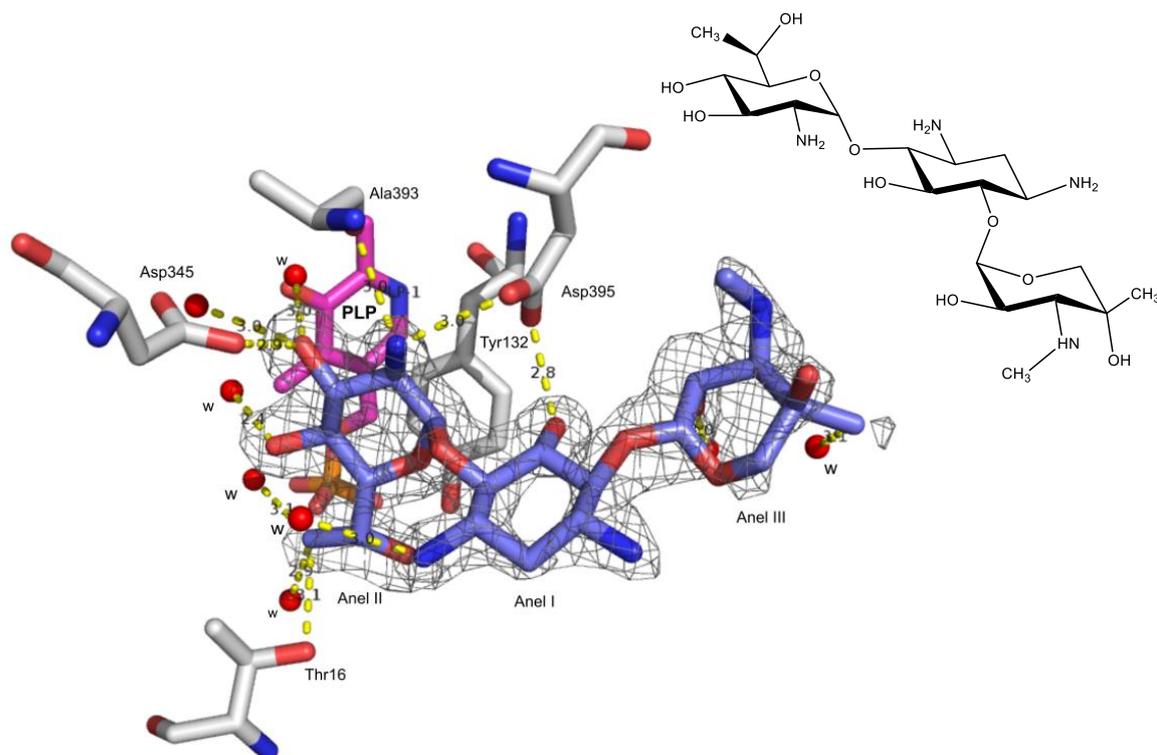


FIGURA 21. Intermediário de biossíntese da gentamicina G418 ancorando ao sítio ativo da enzima Sis5.

Mapa F_o-F_c atribuído ao G418 (azul) e os resíduos do sítio ativo de que realizam pontes de hidrogênio com o ligante (branco).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No complexo GenB1:PLP:JI-20A obtido por Ban et al. (2019) foi verificado que o Asp345 e Asp395 são essenciais para manutenção da carga negativa do sítio ativo, para manter a afinidade por substratos de carga positiva. Esses resíduos estão presentes no sítio ativo da Sis5 e também interagem com G418. O autor relata que ocorre a presença de um íon magnésio interagindo com os resíduos Asp345 e Asp395. Entretanto, na estrutura da Sis5 não há uma densidade clara que corresponda a esse íon. Além disso, os resíduos Trp391 Trp415, que são conservados na Sis5, estão realizando interações hidrofóbicas com o anel III do substrato para posicioná-lo no sítio ativo. A Tyr132 faz uma interação do tipo stacking- π com o anel I com JI20-A na GenB1, enquanto na estrutura da Sis5 com G418 esse mesmo resíduo faz uma interação hidrofóbica do tipo stacking- π com o anel II. Apesar de ambas as estruturas possuírem alguns resíduos conservados, o modo de ligação dos ligantes no sítio ativo dessas enzimas são diferentes. Isso pode estar relacionado ao G418 não ser o substrato natural, e, portanto, apresenta uma hidroxila na posição da catálise. Dessa maneira, o G418 não está ligado covalentemente ao PLP e está apenas ancorado ao sítio ativo por meio de interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Por outro lado, na estrutura da GenB1, JI-20A está ligado covalentemente ao PLP. Dow et al. (2019) obtiveram a estrutura da GenB1 com neamina, que é um intermediário de biossíntese que possui apenas os anéis I e II. Verificaram, portanto, que espacialmente os ligantes ocupam o mesmo lugar e interagem com os mesmos resíduos, exceto pelo fato que a presença do anel III do JI-20A ocasiona a inversão em $\sim 180^\circ$ do anel I perdendo a interação favorável com o Asp395. Se o anel II da JI-20A estivesse na mesma conformação que a do neamina ocorre um choque estérico entre o anel III do JI-20A e os resíduos do sítio ativo. Portanto, a presença do anel III em JI-20A afeta o modo de ligação do anel I. De qualquer forma, o estabelecimento de uma ligação covalente do substrato com a Sis5 ou GenB1 pode ocasionar mudança no modo de ligação dos seus ligantes devido a menor distância de ligação com o resíduo de Lys232. Assim, o posicionamento do anel III do G418 e do JI20-A no sítio ativo apresenta um deslocamento de até 3\AA . Além disso, o anel I do complexo G418 e do JI20-A também apresenta um deslocamento de quase 2\AA . Por outro lado, o anel II dos ligantes, local onde ocorre a aminação não apresentam mudanças bruscas nos

modos de ligação, com exceção do grupo metil em C6 presente no G418 que não está presente nos outros ligantes (Figura 22).

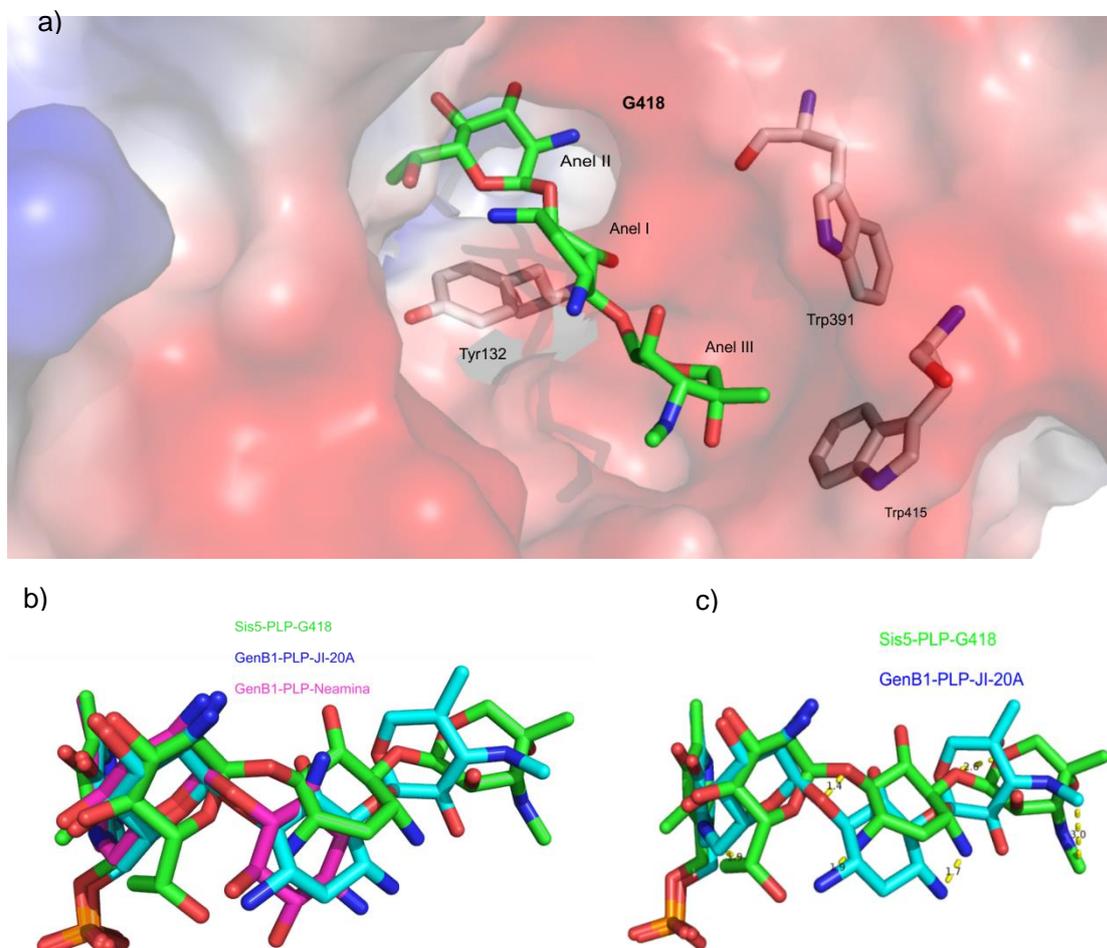


FIGURA 22. Modo de interação dos ligantes nos sítios ativos da GenB1 e Sis5.

a) Resíduos hidrofóbicos responsáveis pelo posicionamento do G418 no sítio ativo da Sis5. b) Sobreposição do G418, JI20A e Neamina posicionados nos sítios ativos das enzimas Sis5 e GenB1, respetivamente. c) Sobreposição do G418 e JI20A e as distâncias calculadas em Angstroms da mudança espacial dessas moléculas no sítio ativo.

Por outro lado, a sobreposição das estruturas da GenB1:PLP:JI-20-A, Sis5:PLP:G418 e GenB1:PLP:neamina indica que não ocorre mudança conformacional brusca na conformação da proteína. O RMSD da sobreposição da Sis5:PLP:G418 e GenB1:PLP:JI20-A é de 0,330Å, enquanto Sis5:PLP:G418 em relação a GenB1:PLP:neamina foi de 0,190Å.

4.4.2 Análise da estrutura tridimensional da proteína GenB2

De acordo com Guo et al. (2014) a enzima GenB2 realiza a epimerização do intermediário de biossíntese C2a em C2 e esses autores também observaram por deleção do gene *genB2* em *Micromonospora echinospora* e através de espectrometria de massas um decréscimo na produção de gentamicinas C1a e C2b, através do acúmulo de metabólitos inibitórios. Além disso, houve bloqueio na produção de C2 e C1, dois dos três componentes do complexo de gentamicina C que são produzidos no Ramo "direito" da via (Figura 10). O nível de C2a em contraste aumentou 7 vezes, implicando claramente que este estereoisômero pode ser o primeiro produto formado pela deidroxilação de JI-20B e validando a GenB2 como a responsável pela epimerização da gentamicina C2 (Figura 23).

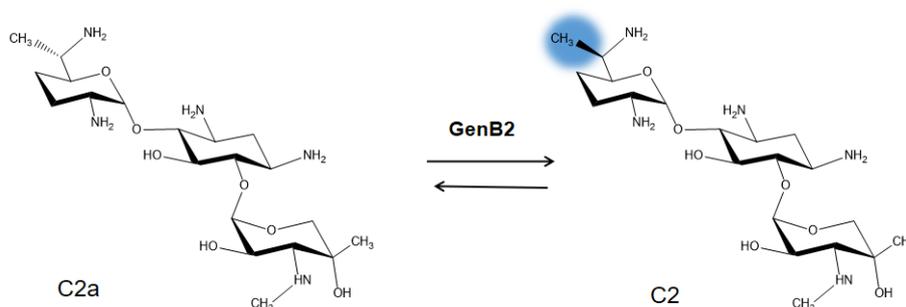


FIGURA 23. Componentes do complexo gentamicina. Em azul a mudança estereoquímica do grupo metil realizada pela GenB2.

GenB2 cristalizou no grupo espacial C222₁ com uma molécula na unidade assimétrica. O monômero é dividido em 3 domínios, sendo o domínio do N-terminal (Thr10 a Gly44) composto por uma folha- β formada por três fitas antiparalelas; o domínio do C-terminal (Val276 a Leu414) composto por cinco α -hélices e uma folha- β com duas fitas antiparalelas; e o domínio de ligação do cofator PLP/PMP que é composto por seis α -hélices e uma folha- β central formada por quatro fitas paralelas e três antiparalelas. O enovelamento é característico de transaminases do tipo I e assim como outras proteínas dessa classe também funcionam como homodímeros ou oligômeros, com dois sítios ativos por dímero. Os sítios ativos estão na interface do

dímero, e cada monômero contribui com resíduos essenciais para ambos os sites ativos. Em geral, os dois sítios ativos são independentes e apesar da GenB2 ter cristalizado como um monômero na unidade assimétrica, o dímero pode ser obtido por operação de simetria cristalina (Figura 24).

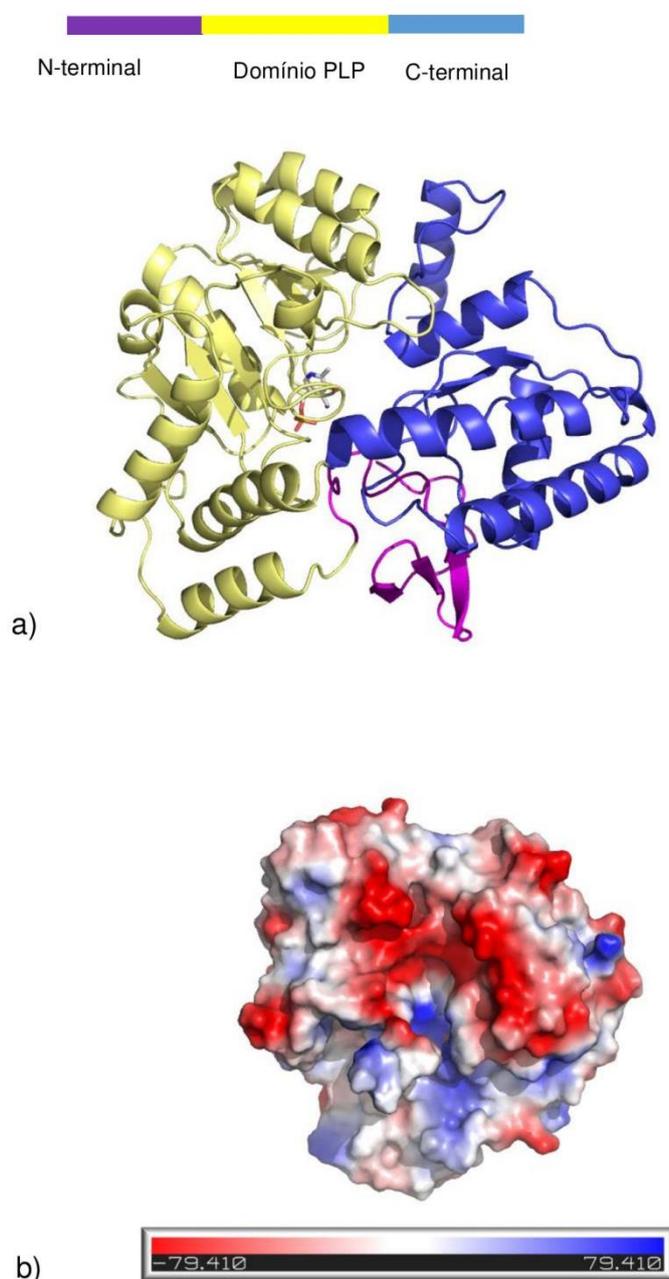


FIGURA 24. a) Monômero em *cartoon* da proteína GenB2: em roxo o domínio do N-terminal; em azul o domínio do C-terminal; em bege o domínio de ligação do PLP/PMP. B) Superfície eletrostática da GenB2 mostrando a cavidade do sítio ativo carregada negativamente.

Mesmo realizando tentativas de se cristalizar a GenB2 em complexo com PLP, só foi obtido o complexo com a PMP. Essa coenzima está interagindo no sítio ativo da GenB2 por meio de ligações de hidrogênio com a Lys227, Asp199, Tyr124, Gly99, Thr100 e Gly126 (Figura 7). De acordo com Eliot e Kirsh (2004), enzimas que realizam epimerização utilizam de um resíduo de tirosina para realizar a desprotonação do substrato, formando o intermediário quinoide. E esse é posteriormente reprotonado pela lisina conservada na face oposta no cofator para realizar a mudança do grupo alvo do substrato. Geralmente epimerases apresentam um resíduo de arginina que mantém o anel pirimídínico do PLP desprotonado, diminuindo a propriedade de retirada de elétrons (Eliot; Kirsh, 2004). Porém, em transaminases que necessitam de deslocamento de elétrons, o resíduo na posição da arginina possui carga negativa, para ativação do cofator (Figura 27). Na GenB2 o resíduo nessa posição é um ácido aspártico (Asp199), indicando que essa enzima possa ser bifuncional e apresente as funções de epimerase e transaminase (Figura 11), como descrito por Guo et al., 2014.

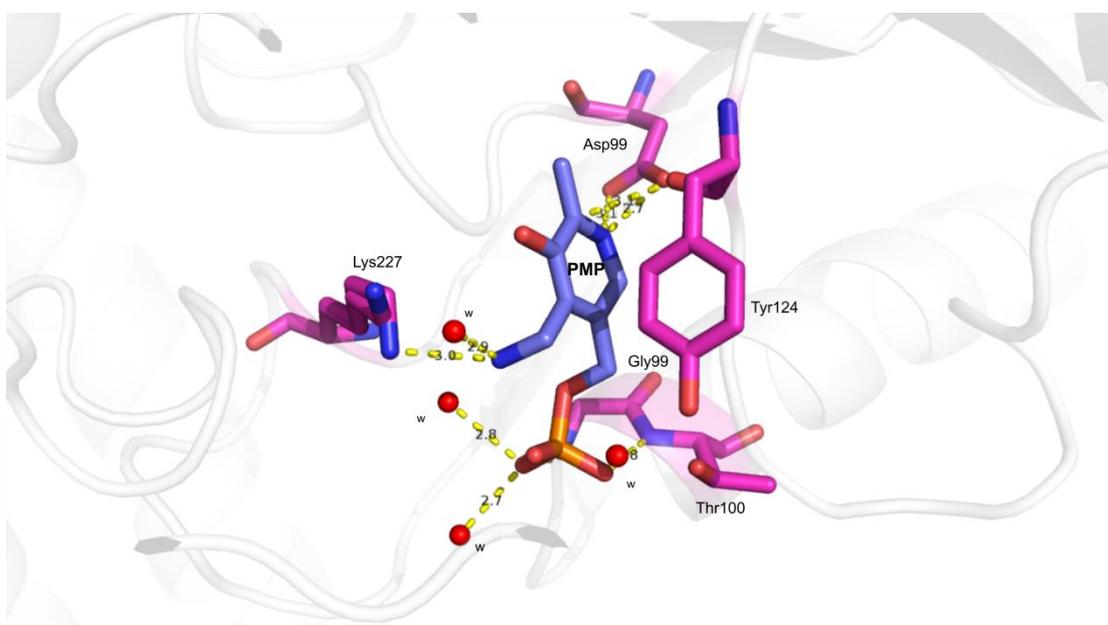


FIGURA 25. Sítio ativo da GenB2:

Em azul o cofator piridoxamina 5'-fosfato e em rosa os resíduos de interação da enzima GenB2. Circulado em vermelho o ácido aspártico na posição da arginina em racemases.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Guo et al. (2014) testou *in vitro* a capacidade de transaminação das quatro enzimas dependentes de PLP: GenB1, GenB2, GenB3 e GenB4, através da análise de acúmulo de intermediários de biossíntese nos dois ramos da via. Os resultados obtidos corroboraram que a GenB1 é a transaminase que converte 6DOX/6DOG em

JL20a/JL20b. Por outro lado, foi verificado que GenB3 e GenB4 foram capazes de transaminar JL20A em 6-DOX em proporções muito baixas. Porém, a enzima GenB2 foi capaz de transaminar os intermediários em 6-DOG/6-DOX em maiores proporções e em ambos os ramos da via, indicando assim, uma possível dupla funcionalidade dentro da rota biossintética da gentamicina (Figura 26).

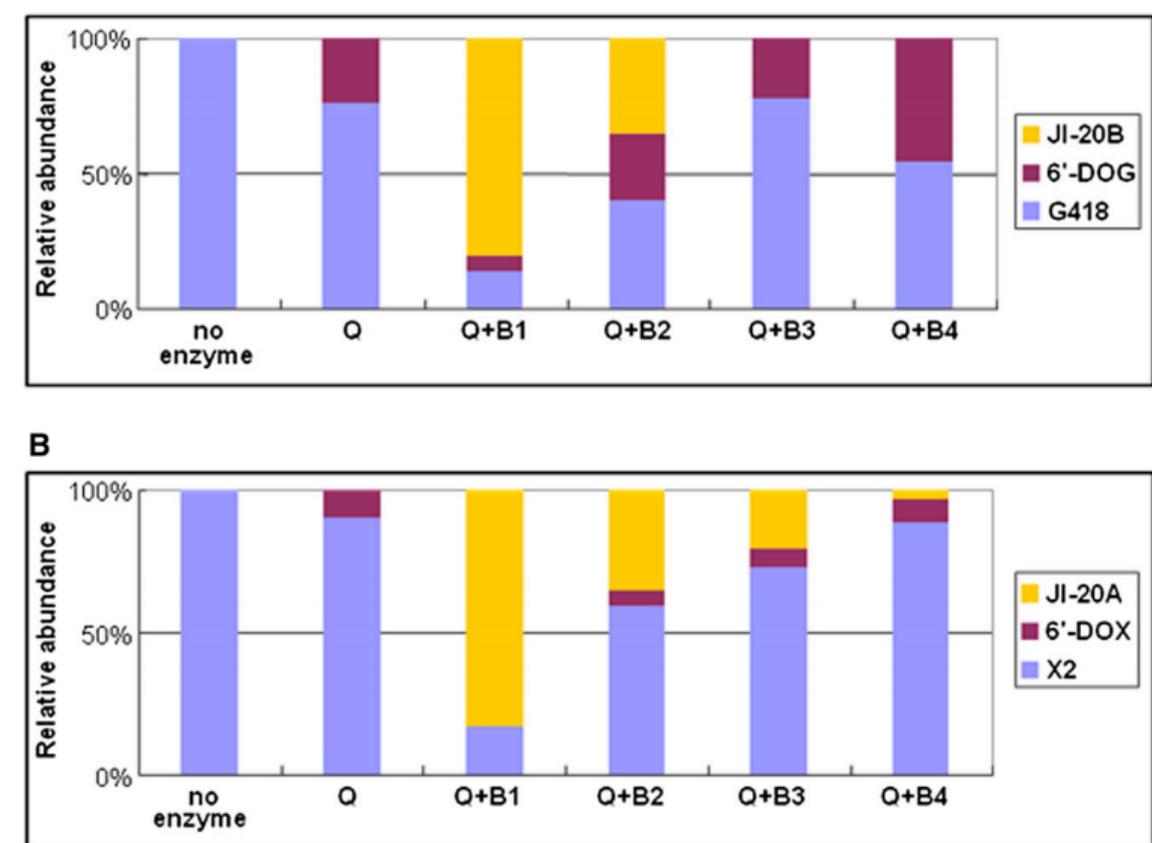


FIGURA 26. Análise *in vitro* da atividade das aminotransferases.

(A) Aminoação de 6-DOG gerado *in situ* a partir do G418 pela reação de GenQ combinada com as enzimas GenB1, GenB2, GenB3 e GenB4 (B) Aminoação de 6-DOX gerado *in situ* a partir da gentamicina X2 pela reação de GenQ combinada com as enzimas GenB1, GenB2, GenB3 e GenB4.

Adaptado: Guo et al. (2014).

Esses dados corroboram com os dados estruturais obtidos, pois enzimas que realizam epimerização são relatadas na literatura, por apresentarem diferenças significativas com transaminases, o que não ocorre na GenB2. Pouco se tem conhecimento sobre enzimas dependentes de PLP que realizam epimerização ou racemização. Os dados encontrados basicamente são de enzimas que tem por substrato aminoácidos para formação de estereoisômeros. De acordo com Eliot e Kirsh et al. (2004), racemases ou epimerases possuem um enovelamento do tipo III e possui um resíduo de carga positiva para inativação do PLP, mecanismo oposto à uma transaminase (Figura 27).

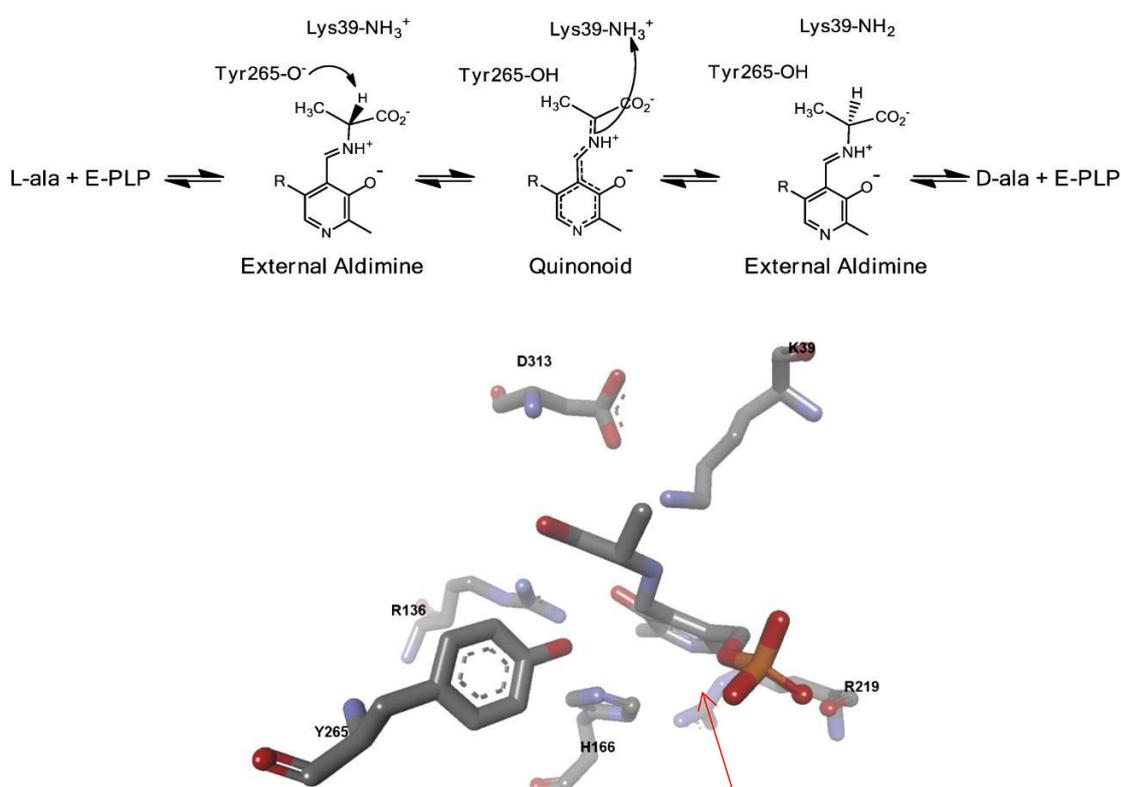


FIGURA 27. Mecanismo de racemização catalisado pelo cofator PLP e a estrutura do sítio ativo de alanina racemase com ligação PPL-I-Ala (base de Schiff reduzida).

Em vermelho o resíduo de arginina que inativa o PLP.

Adaptado: Toney (2011)

4.4.3 GenB2 em complexo com Gentamicina X2

A gentamicina X2 é um intermediário de biossíntese, que é o produto da metilação da enzima GenD1. Diferente da gentamicina C2a, que é o substrato da GenB2, a gentamicina X2 apresenta no anel garosamina uma hidroxila na posição C-

3 enquanto C2a possui um grupo metil e um grupo amina nessa posição, além da ausência de duas hidroxilas (Figura 28).

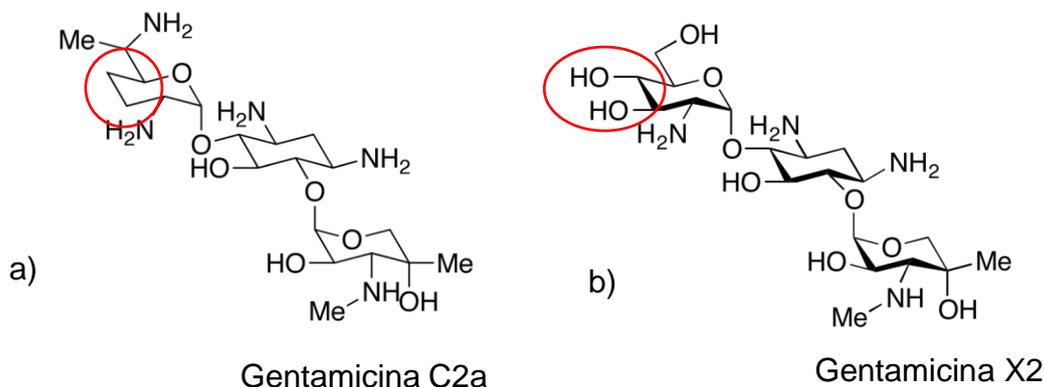


FIGURA 28: Estrutura química dos intermediários de biossíntese da gentamicina.

a) Gentamicina C2a substrato da enzima GenB2. b) Gentamicina X2 substrato da enzima GenQ circulado em vermelho as duas hidroxilas ausentes no substrato da GenB2.

Adaptado: Hong et al. (2009).

Obtivemos o complexo ternário da enzima GenB2 com a gentamicina X2 e o cofator PMP e assim pudemos ter informações sobre os resíduos que interagem com o substrato e a possível promiscuidade dessa enzima. A gentamicina X2 está ancorada ao sítio ativo através de interações de hidrogênio do anel II com os resíduos Asp139, Tyr342, Lys202, Lys227 e com os resíduos Gln390 e Asp392 intermediado por uma água. Além disso, Cys389 forma uma interação hidrofóbica do tipo *edge- π* do anel I com a Tyr124. A Lys227 é um resíduo conservado em enzimas dependentes de PLP e que está envolvido na formação da Base de Schiff com o cofator. Interessantemente, na estrutura da GenB2, este resíduo encontra-se em dupla conformação e acreditamos que isso pode ser um indício que no cristal poderia haver uma mistura de moléculas com PLP e PMP, que causa esse deslocamento dependendo do estado do cofator. A Tyr342 possivelmente é o resíduo responsável pela desprotonação do substrato para que ocorra a catálise. Por outro lado, a Tyr124 faz interação hidrofóbica com o cofator e com o substrato, consistindo um resíduo de grande importância no posicionamento para catálise. (Figura 29).

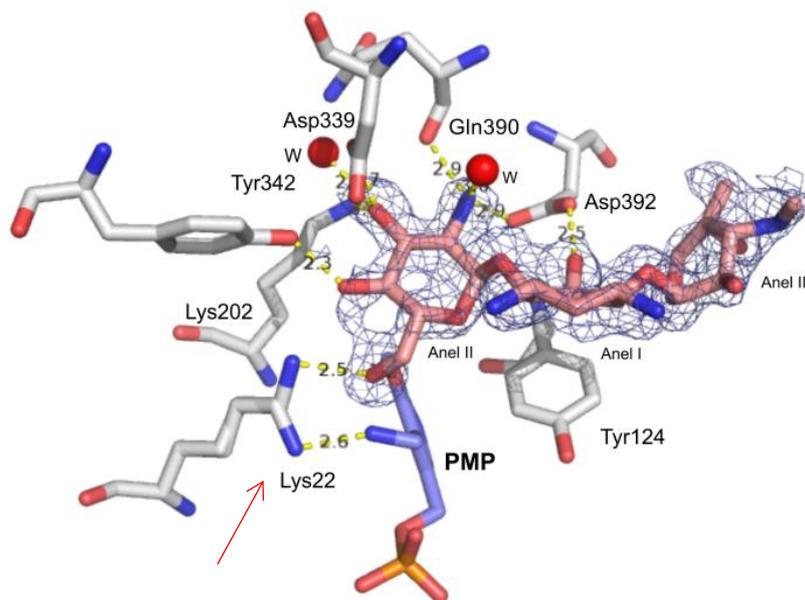


FIGURA 29. Sítio ativo da enzima GenB2.

Em branco os resíduos que interagem o anéis I e II da gentamicina X2. Mapa $F_o - F_c$ atribuído a Gentamicina X2 (rosa). Na seta vermelha a dupla conformação da lisina 227.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizando uma sobreposição da Sis5 que é uma transaminase e a GenB2, é possível observar que na posição da Tyr342 na GenB2 ocorre uma treonina na mesma posição, corroborando com a literatura que relata uma Tirosina essencial para que ocorra a epimerização. GenB2 e Sis5 compartilham 0,98Å de desvio médio dos átomos e resíduos conservados na interação com o PLP, porém possivelmente essa troca de resíduos Tyr/Thr é a característica que confere a GenB2 a capacidade de catalisar a mudança estereoquímica do grupo metil (Figura 30).

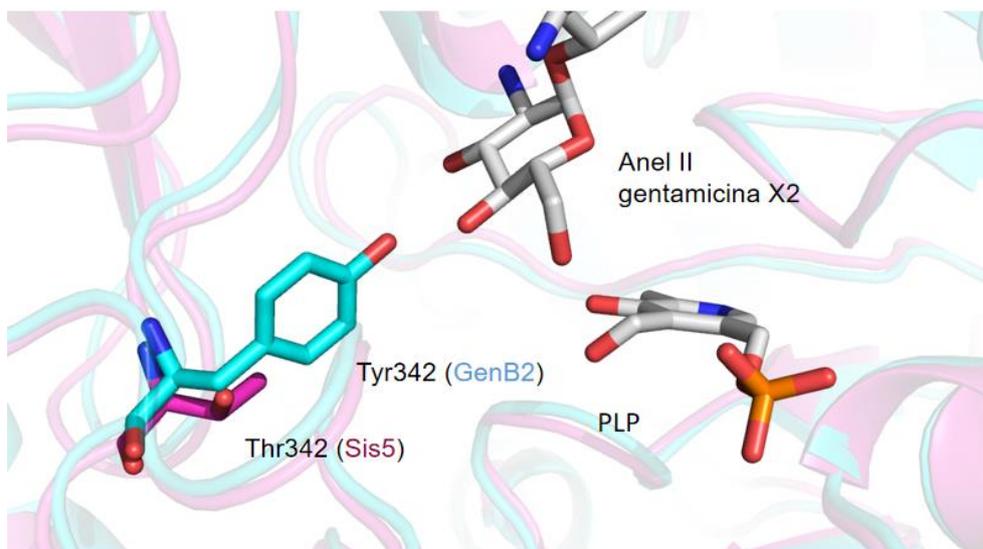
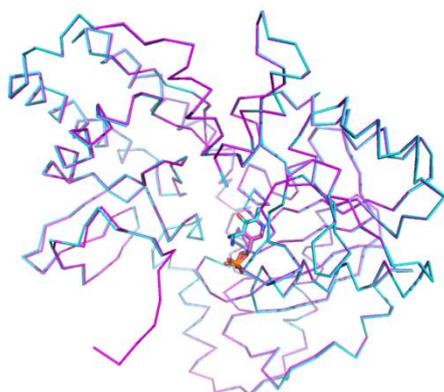


FIGURA 30. Sítio ativo das enzimas Sis5 e GenB2:PMP:Gentamicina X2. Em azul o resíduo de tirosina na GenB2 e em rosa o resíduo de treonina. Em Branco o PLP e a gentamicina X2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a intenção de se observar o papel que a Lis227 exerce na conformação da GenB2, foi realizada a mutagênese sítio dirigida deste resíduo substituindo-o por uma alanina. Estruturalmente, essa substituição não causou nenhuma mudança conformacional drástica com um RMSD de 0,18Å entre a enzima selvagem e o mutante. Entretanto, houve um deslocamento do grupo amina e um deslocamento do fosfato do PMP, em posição contrária ao PMP da enzima selvagem. No trabalho de Watanabe et al. (1999), a mutação dessa lisina em uma racemase, ocasionou na inativação da enzima, uma vez que em racemização, a lisina é essencial para a reprotonação do substrato. Entretanto a atividade do mutante da GenB2 K227A não foi realizada.

a)



b)

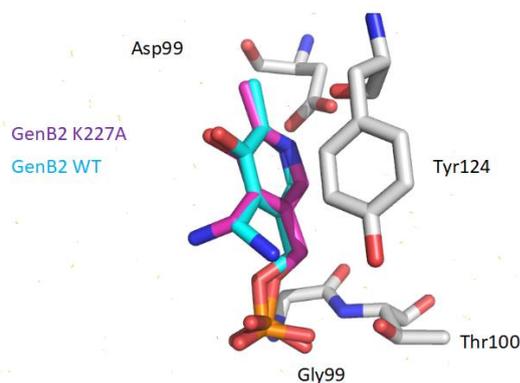


FIGURA 31. Comparação da enzima GenB2 selvagem e GenB2 K227A

a) Sobreposição da enzima GenB2 selvagem em azul e GenB2 K227A em roxo com R.M.S.D. 0.189Å. b) PMP ancorado ao sítio ativo das enzimas selvagem e mutante e resíduos de interação do sítio ativo em branco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 Análise da estrutura tridimensional da proteína GenB4

GenB4 cristalizou no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$ com um homodímero na unidade assimétrica. Sua estrutura apresenta um enovelamento similar das aspartato-aminotransferases tipo I, na qual cada protômero é dividido em três domínios: Domínio N-terminal (His-0 a Ala50), que é composto por uma α -hélice ligada por um grande loop a uma folha- β formada por três fitas antiparalelas; O domínio de ligação ao PLP/PMP (Asp51 a Gly288) composto por sete α -hélices e uma folha- β central com cinco fitas antiparalelas e três paralelas; O domínio C-terminal (Val289 a Gln443) é composto por cinco α -hélices e uma folha- β com duas fitas antiparalelas (Figura 32). O sítio ativo está localizado na face oposta ao outro, com alguns resíduos de um protômero interagindo no sítio ativo do outro protômero.

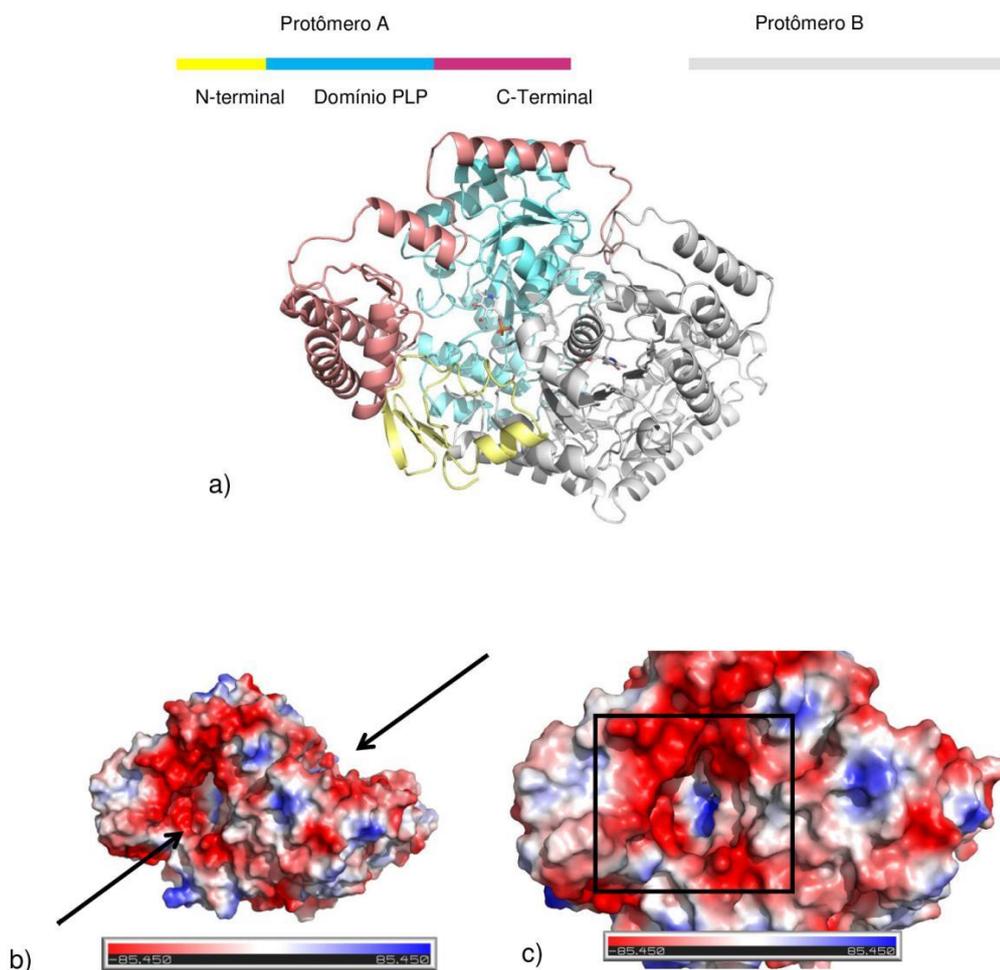


FIGURA 32. Representações da estrutura cristalográfica da GenB4

a) Dímero da GenB4, protômero A: Em azul o domínio de ligação do PLP, em amarelo domínio N-terminal e em rosa o domínio C-terminal. b) Superfície eletrostática da GenB4, em vermelho os resíduos com carga negativa e em azul, resíduos carregados positivamente. Nas setas mostrando a cavidade do sítio ativo na face oposta ao outro protômero. c) sítio ativo carregado negativamente que favorece a interação com substrato carregado positivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3.1 GenB4 em complexo com a Sisomicina

Guo et al (2015), propôs os passos finais da formação do complexo da gentamicina. Foi descrito que após a formação do intermediário JI-20A e JI-20B ocorre a retirada de duas hidroxilas do anel II, porém não é claro quais enzimas catalisam essas modificações. Havia hipóteses de que as enzimas GenB3 e GenB4 poderiam catalisar essas modificações. Assim, estudos recentes e não publicados do grupo do Professor Peter Leadlay indica que a GenB4 pode retirar a ligação de etileno da sisomicina (que também pode ser um intermediário da biossíntese de gentamicina), convertendo-a em gentamicina C1a (Figura 33). Interessantemente, na biossíntese de sisomicina não existe uma enzima ortóloga a GenB4 (Hong et al., 2009).

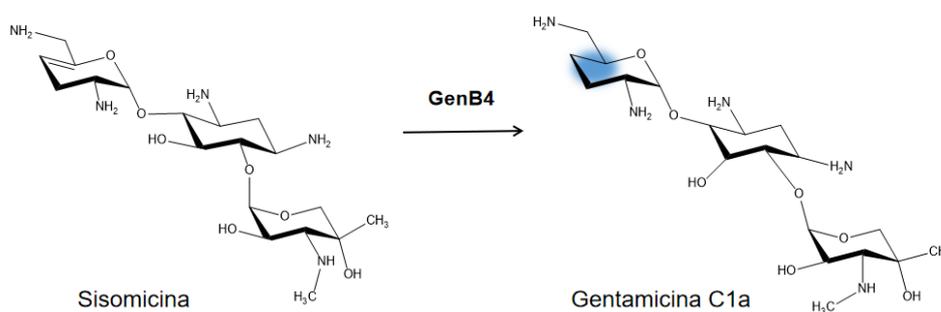


FIGURA 33. Possível catálise da enzima Genb4. Em azul o produto da enzima sem a ligação do etileno.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta maneira, foi determinada a estrutura da GenB4 em complexo com a sisomicina. A sisomicina está ligada ao sítio ativo da enzima através da ligação covalente com o PLP. Assim, o anel II está ligado pela posição C-6 no grupo amina ao anel pirimidínico do PLP. Além disso, nesse mesmo anel ocorre uma interação de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral do Asp52. O anel I só realiza uma interação de hidrogênio com o oxigênio da cadeia principal da Ala407. O anel III realiza uma interação de hidrogênio com oxigênio da cadeia lateral do Asp326 e com a cadeia lateral do Glu185. Como na estrutura da Sis5 e GenB1, resíduos aromáticos são encontrados no sítio ativo posicionando o substrato na GenB4. Tyr135 faz uma interação hidrofóbica do tipo stacking- π com anel I da sisomicina, enquanto a Tyr214 posiciona também o anel I e a Phe408 posiciona o anel III. (Figura 34).

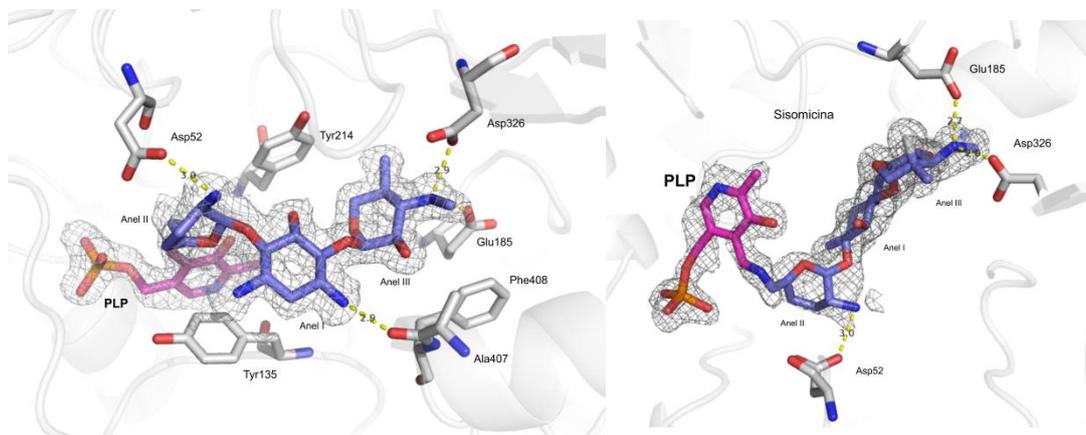


FIGURA 34. Estrutura da GenB4 em complexo com a sisomicina.

a) resíduos de carga negativa interagindo por pontes de hidrogênio e resíduos hidrofóbicos posicionando o antibiótico no sítio ativo da enzima. b) Ligação da sisomicina com o PLP formando o intermediário quinonoide. Mapa $F_o - F_c$ atribuído a Sisomicina (azul).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.4 Análise da estrutura tridimensional da proteína GenB3

No agrupamento gênico para a gentamicina foi identificado um gene de codifica uma fosfotransferase, *genP* com função não determinada. Ni et al. (2015), verificou que a enzima GenP pode estar relacionada na formação do complexo da gentamicina. Através de deleções do gene *genP*, houve acúmulo dos intermediários de biossíntese JI20A e JI20B e a não formação do complexo (C1, C1a, C2, C2a). Guo et al (2015) propôs que após a formação do intermediário JI-20A e JI-20B ocorria a retirada de duas hidroxilas do anel II, porém não era claro quais enzimas catalisam essa modificação. Deste modo, o grupo do prof Peter Leadlay realizou deleção do gene *genB3* em *Micromonospora echinospora* e analisou por espectrometria de massas dos produtos secretados no meio. Através de análise cuidadosa deste experimento foi possível validar a função da enzima GenB3 (Dados não publicados e em preparação para publicação). Assim, esta enzima é responsável pela retirada das hidroxilas dos intermediários de biossíntese JI-20A e JI-20B. Interessantemente, o intermediário isolado apresenta a fosforilação no C-3 do anel III. Essa fosforilação deve ser atribuída a GenP, e a GenB3, dessa maneira, deve atuar para a retirada das hidroxilas sobre um substrato fosforilado. Embora tenhamos efetuado tentativas da obtenção do

complexo da GenB3 com o intermediário fosforilado, não obtivemos sucesso (Figura 35).

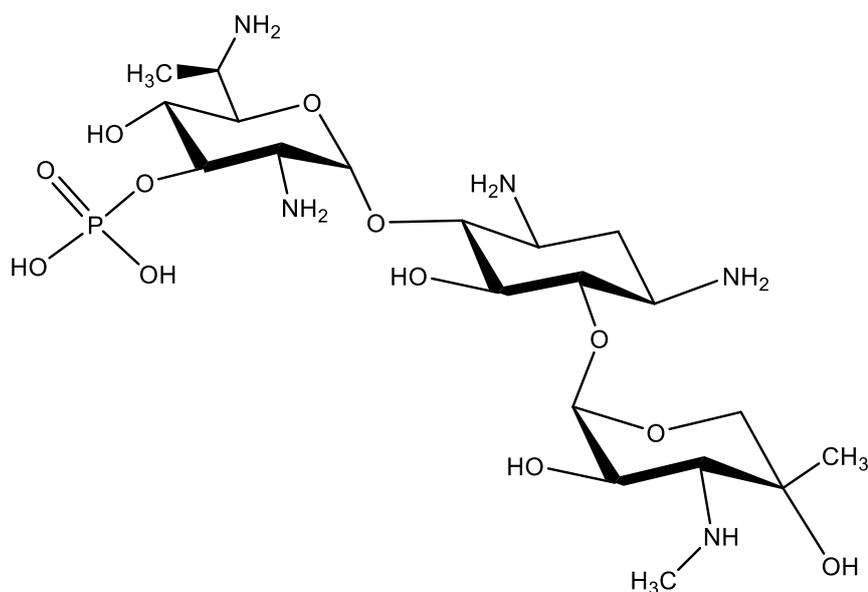


FIGURA 35. Estrutura química do intermediário de biossíntese JI-20A fosforilado que é o possível substrato da enzima GenB3.

Fonte: Elaborado pelo autor

GenB3 cristalizou no grupo espacial $P2_1$ com duas moléculas na unidade assimétrica. Cada protômero é dividido em 3 domínios, sendo o domínio do N-terminal (Asn0 a Gly57) composto por duas alfa-hélices e uma folha- β formada por três fitas antiparalelas; o domínio do C-terminal (Tyr291 a Gln444) composto por cinco α -hélices e uma folha- β com duas fitas antiparalelas; e o domínio de ligação do cofator PLP/PMP (His58 a Val290) que é composto por oito α -hélices e uma folha- β central formada por quatro fitas paralelas e três antiparalelas. O enovelamento é característico de transaminases do tipo I e são cataliticamente ativas como homodímeros com dois sítios ativos por dímero. Cada sítio ativo fica na face oposta ao outro, porém resíduos de um protômero fazem parte do sítio ativo do outro protômero. A cavidade do sítio ativo é carregada negativamente, assim como das demais proteínas dependentes de PLP descritas neste trabalho (Figura 36).

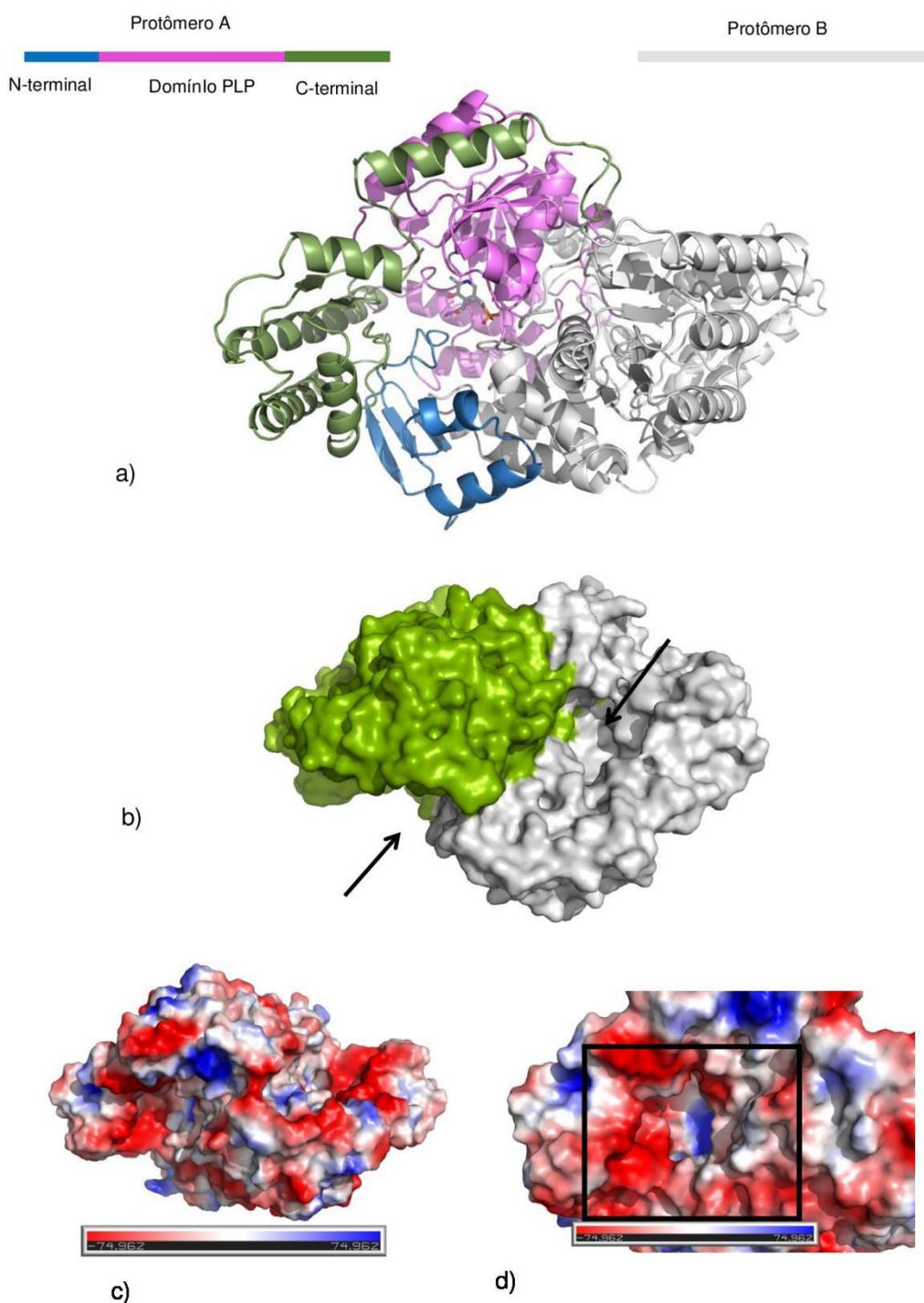


FIGURA 36. Demonstrações do Dímero da GenB3.

a) Protômero A: em azul domínio N-terminal, em rosa domínio de ligação do PLP e em verde o domínio C-terminal. b) Rotação do dímero, demonstrando o local do sítio ativo de um protômero em relação ao sítio ativo do outro protômero. c) Superfície eletroestática do dímero, resíduos carregados negativamente em vermelho e resíduos com carga positiva em azul. d) Cavidade do sítio ativo carregada negativamente.

Fonte elaborado pelo autor.

Através da análise do alinhamento das sequências primárias (90% de identidade) e terciária (R.M.S.D 0.36) de GenB3 e GenB4 observamos a alta

similaridade entre as proteínas. Do ponto de vista bioquímico é intrigante como enzimas tão similares, onde a troca de alguns resíduos modificam a função e especificidade da enzima. Deste modo, utilizamos a estrutura da GenB4 em complexo com a sisomicina como modelo para posicionar o substrato fosforilado no sítio ativo da GenB3.

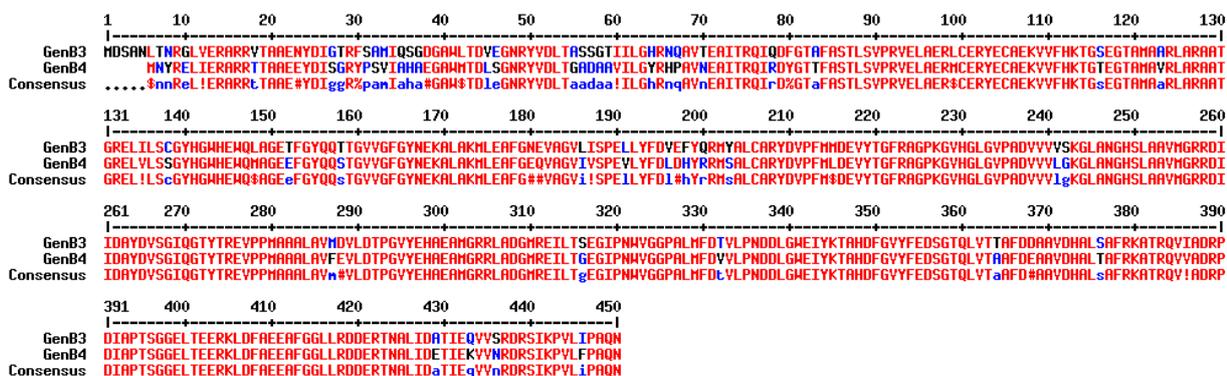


FIGURA 37. Alinhamento das proteínas GenB3 e GenB4.

Em azul, resíduos não correspondentes a ambas as sequências. Em vermelhos resíduos que estão presentes na GenB3 e GenB4.

Fonte: Multalin

Desta maneira, o substrato fosforilado posicionado no sítio ativo da GenB3 faz as mesmas interações de hidrogênio e hidrofóbicas que ocorre na GenB4, como esperado. Porém na GenB3 devido a presença do fosfato ocorre uma interação com a Gln265 que pode estar envolvida na catálise. Entretanto, análises de mutações sítio dirigidas ainda são necessárias para determinação do mecanismo catalítico desta enzima.

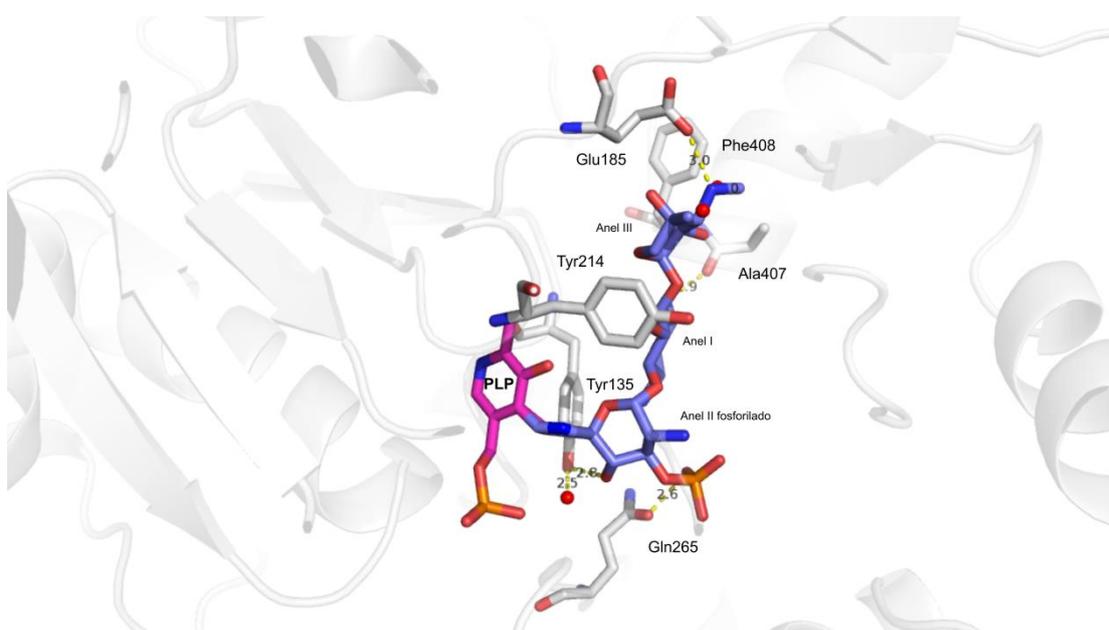


FIGURA 38. Modelo da posição do substrato JI-20A fosforilado no sítio ativo da enzima GenB3, obtido a partir com complexo GenB4:sisomicina.

Fonte: elaborado pelo autor.

Através da sobreposição das enzimas, observamos que o resíduo Asn295 na estrutura da GenB3 que interage com o fosfato do substrato sofre uma mudança conformacional em relação ao mesmo resíduo na GenB4 de aproximadamente 2Å. Também nessa mesma região observamos que o Asp52 na GenB4 é substituído por uma serina na GenB3 (Figura 39). Deste modo a cadeia lateral do ácido aspártico é maior do que da serina, dificultando o posicionamento de um grupo fosfato. Estudos adicionais sobre efeito desses resíduos na função dessas proteínas ainda são necessários para completa sua completa validação.

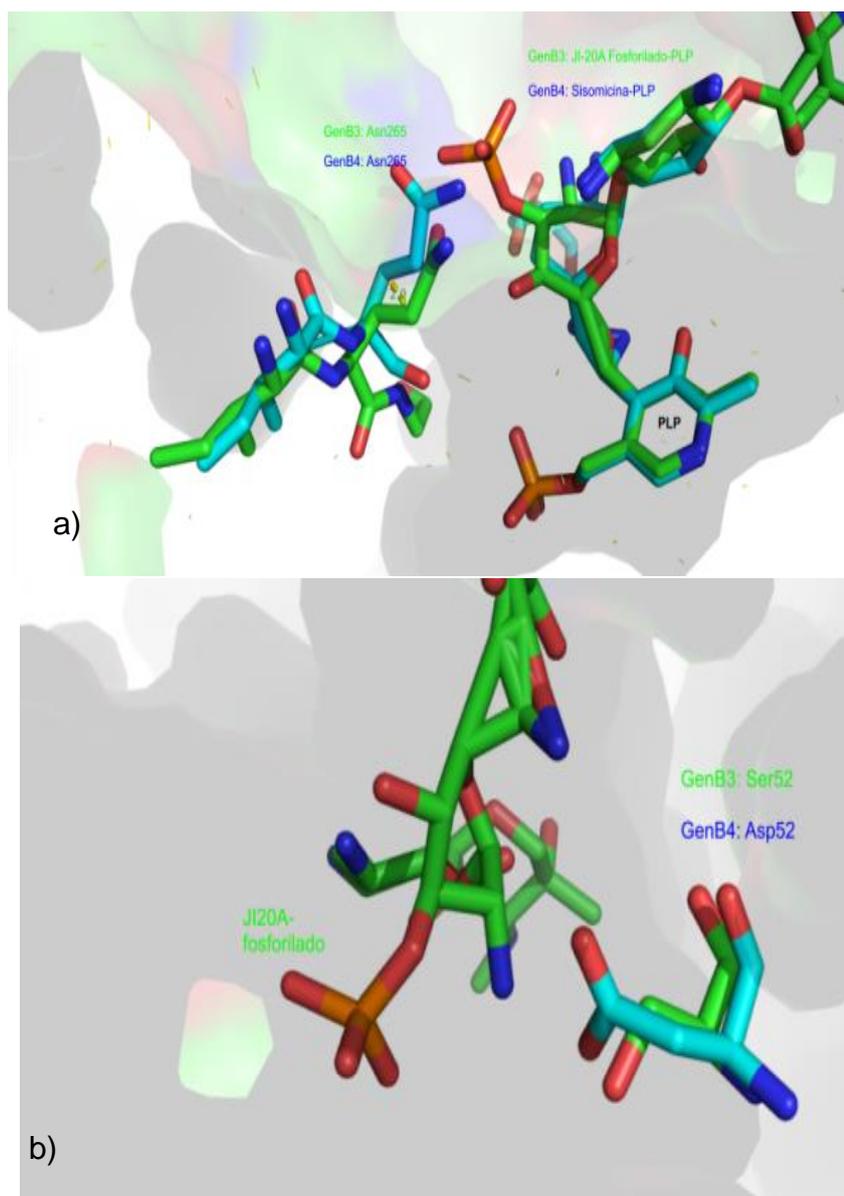


FIGURA 39. Sítio ativo das enzimas GenB3 e GenB4

a) Sobreposição das enzimas GenB3 e GenB4. a) Mudança conformacional de 2Å da Gln265 em relação ao substrato da GenB3 fosforilado. c) Troca de resíduos na GenB3 uma serina e na GenB4 um aspártico e a localização em relação ao substrato fosforilado.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4.5 Comparação entre Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4

As quatro enzimas dependentes de PLP apresentadas nesta tese, apesar de pertencerem a mesma família, realizam diferentes funções na via da gentamicina. Realizando um alinhamento dessas proteínas é possível observar que algumas sequências são conservadas, como GYHG, DEV e a lisina. Esses resíduos são

motivos conservados nessas enzimas e estão relacionados a ligação do cofator no sítio ativo (Figura 40).

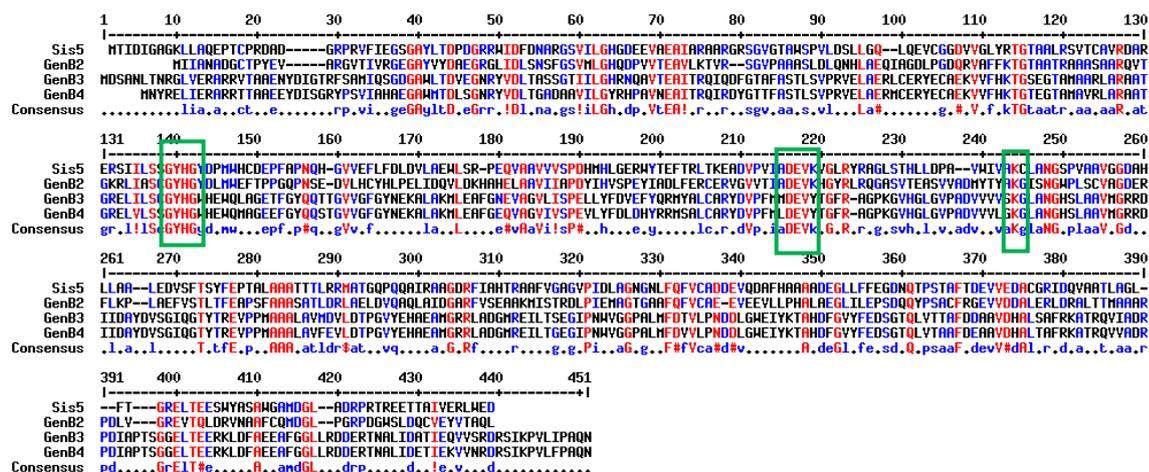


FIGURA 40. Alinhamento das proteínas Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4. No retângulo verde os resíduos conservados que interagem com o cofator e estão envolvidos na catálise.

Fonte: Multialin

Através da sobreposição das estruturas, pode-se observar que as quatro enzimas apresentam diferenças significativas, como apontado pelo desvio médio dos átomos (R.M.S.D) (Figura 41)..

- GenB3 e GenB4 R.M.S.D 0.36
- GenB3 e GenB2 R.M.S.D 1.38
- GenB3 e Sis5 R.M.S.D 3.39
- Sis5 e GenB2 R.M.S.D 0.98

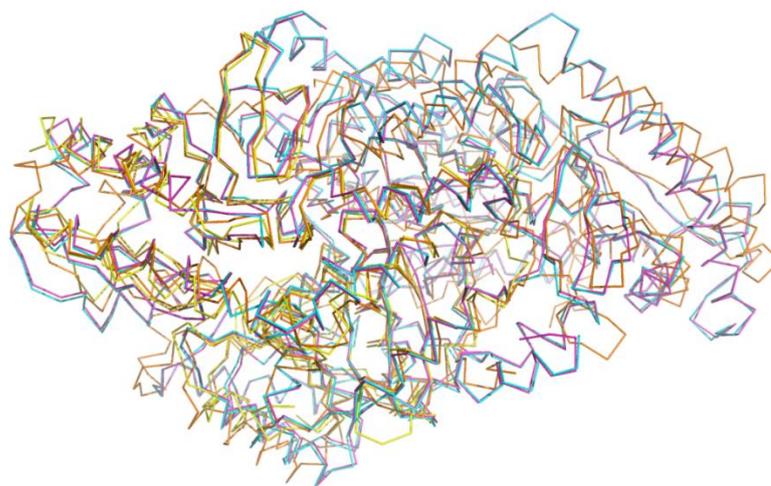


FIGURA 41. Sobreposição estrutural das enzimas Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4.

Fonte: Elaborada pelo autor

As diferenças estruturais corroboram com a função relatada, pois Sis5 e GenB2 que apresentam baixo desvio médio dos átomos, podendo compartilhar das mesmas função, levando em conta a dupla funcionalidade da GenB2. Enquanto GenB3 e GenB4 que possivelmente realizam funções similares de retirada de grupos, mudando

apenas a especificidade do substrato, apresentam também baixo desvio dos átomos. Contudo, GenB3 e Sis5 que realizam funções distintas apresentam altos desvio dos átomos.

Analisando a superfície eletrostática das quatro proteínas dependentes de PLP é possível observar que o sítio ativo se encontra na superfície e a presença de resíduos carregados negativamente é predominante. Uma característica que evidencia a interação com o substrato aminoglicosídeo a predominância de cargas negativas. Internamente há resíduos positivos presentes que fazem a face complementar ao sítio ativo ácido, relacionados à catálise. Na enzima GenB2, há a formação de um ducto na entrada do sítio ativo devido a conformação do N-terminal. Isso pode estar relacionado à ancoragem do substrato no sítio ativo, porém a região que está causando essa forma é uma região de alta flexibilidade (Figura 19).

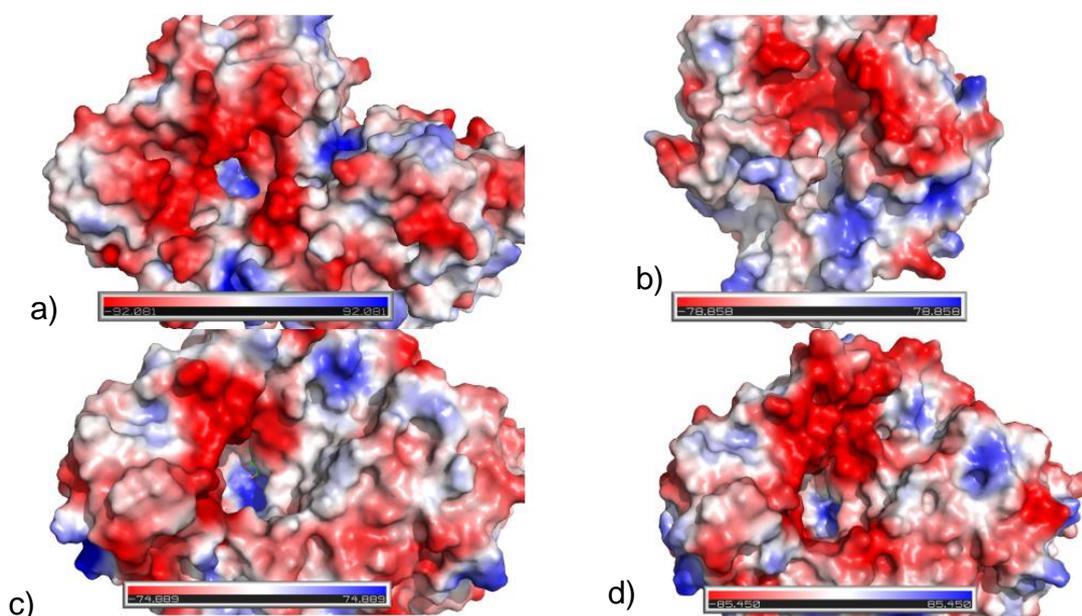


FIGURA 42. Superfície eletrostática das enzimas

a) Sis5; b) GenB2; c) GenB3 e d) GenB4. Em vermelho os resíduos com carga negativa, em azul os resíduos com carga positiva que interagem no sítio ativo e em branco, regiões hidrofóbicas.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Análise da estrutura tridimensional da proteína GenN

A GenN é uma metiltransferase que está envolvida na metilação da posição 3' do anel garosamina durante a biossíntese de gentamicina. Esta enzima cristalizou no

grupo espacial P212121 com uma molécula na unidade assimétrica. A GenN apresenta uma identidade abaixo de 34% com outras estruturas depositadas no PDB (Protein Data Bank), e com uma cobertura de 27%. Para a determinação da estrutura, a fase foi calculada por SAD, através de *quick-soaking* com Iodeto de Sódio, onde foram identificadas 7 moléculas de iodeto. Para cristalização da GenN foi adicionado o cofator S-adenosilmentionina, porém no modelo obtido, o grupo metil do SAM não é observado no mapa de densidade eletrônica, pois possivelmente este é hidrolisado durante o processo de cristalização e consequentemente obtivemos S-adenosilhomocisteína (SAH).

A GenN é composta por dois domínios, um domínio do N-terminal e o outro de ligação do SAM (C-terminal), o segundo apresenta um enovelamento característico de *Rossmann-folding*, no qual é composto por uma folhas- β com 7 fitas intercalados por 6 α -hélices e loops. Realizando uma busca no *software* Dali-Server (Holm; Rosenstrom, 2010), foi possível encontrar proteínas com enovelamento de até 22% de identidade, porém entre as metiltransferases encontradas a GenN é a única que possui 1 folhas- β composta por 8 fitas no domínio de ligação do SAM. A oitava fita se posiciona paralelamente com a sétima fita. Assim, de acordo com a classificação de metiltransferases, GenN não se enquadra em nenhuma das classes, portanto, essa enzima possivelmente pertence à uma classe ainda não descrita (GANA et al., 2013), et al., 2013) (Figura 43).

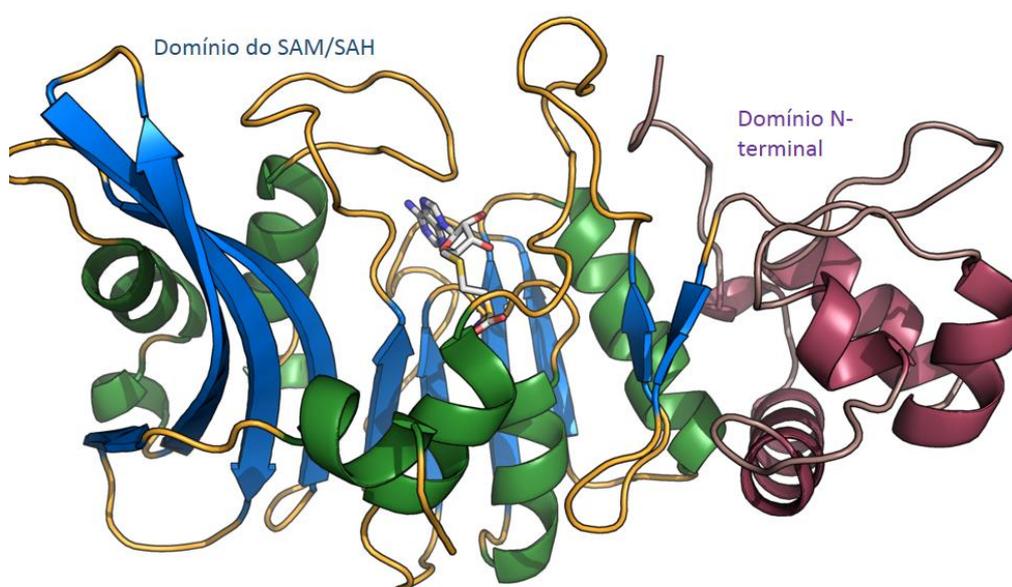


FIGURA 43. Representação em cartoon da estrutura cristalográfica da enzima GenN

Em azul, 2 folhas- β , a menor com duas fitas antiparalelas e a maior composta por 8 fitas sendo 4 paralelas e 4 antiparalelas, intercalada por 6 α -hélices em verde e loops em amarelo. Em lilás o domínio do N-terminal com quatro α -hélices.

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o servidor Dali (HOLM, 2019), uma hipotética metiltransferase do microrganismo *Methanococcus jamae* apresenta 22% de semelhança sequencial com a GenN, com um Z score de 16.9 e rmsd de 2,9 Å. Apesar da homologia, a cobertura entre as estruturas é de apenas 27%. Ao realizar uma sobreposição de ambas enzimas, é possível identificar que o domínio do N-terminal da GenN está ausente na MJ0882 (Huang, et al., 2002) (Figura 44).

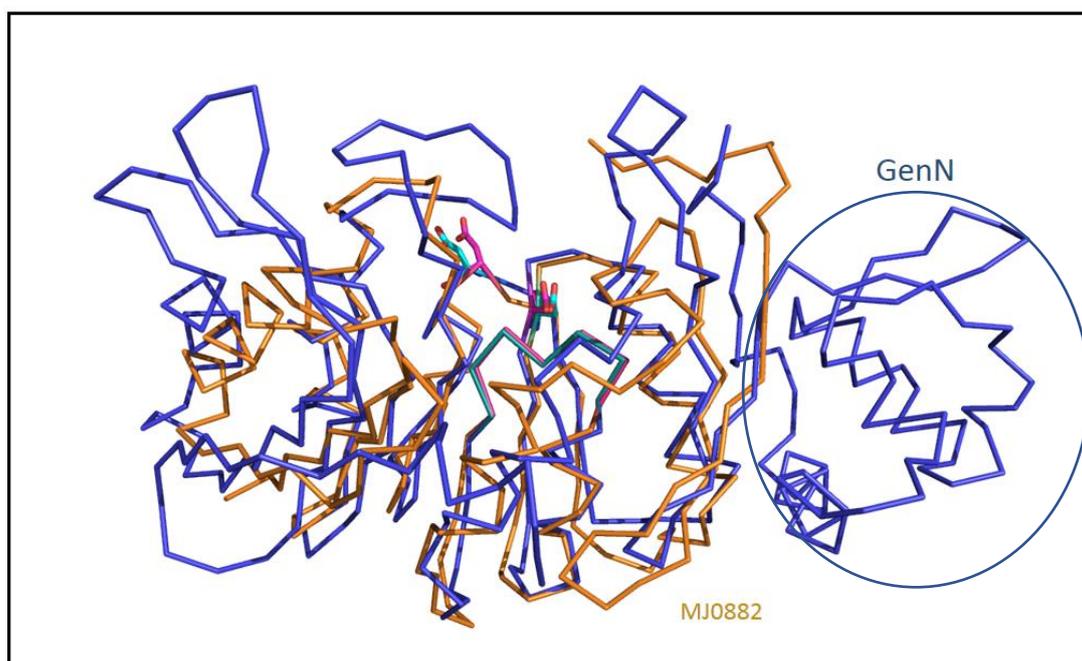


FIGURA 44. Sobreposição da enzima MJ0882 em amarelo e a GenN em azul, no círculo azul o domínio N-terminal ausente na MJ0882.

Fonte: Elaborado pelo autor

Outra enzima listada no servidor Dali é a HemK, que consiste em uma 5-metiluridina metiltransferase de *Thermus thermophilus*, relacionada à metilação RF-1 durante a síntese proteica. HemK e GenN apresentam o domínio N-terminal composto por 4 α -hélice. Na HemK esse domínio interage diretamente com o fator de liberação (RF-1) (GRAILLE et al., 2005). De acordo com o servidor Dali, outras metiltransferases envolvidas na biossíntese de produtos naturais, possuem o domínio N-terminal, porém essas formam complexos com outras enzimas através desse

domínio de interação. Ao analisar a superfície eletrostática da GenN, fica evidente uma região próxima a cavidade do sítio ativo, altamente apolar, indicando uma possível região de interação com outra proteína (Figura 45). De acordo com Huang et al. (2015), a adição do grupo metil no açúcar no grupo amino do carbono 3" da garosamina, ocorre após a catálise de uma deidrogenase, a GenD2 e uma aminotransferase Gens2. Esse resultado levanta a hipótese que essas três enzimas poderiam formar um complexo, o que seria uma novidade na biossíntese dessas moléculas, já que não há nada descrito na literatura. Entretanto, as enzimas AprD3 e aprD4 na biossíntese apramicina (KUDO; TOKUMITSU; EGUCHI, 2017) só apresentam atividade na presença de ambas as enzimas, suportando a hipótese da formação do complexo na biossíntese de aminoglicosídeos.

Desta forma, realizamos alguns testes de incubação com a GenN, GenD2 e GenS2 e posteriormente submetidas à uma coluna de exclusão molecular, além, de um ensaio de *cross-linking* químico, para análise de formação de complexo em gel de SDS-PAGE. Infelizmente, em ambos os casos, não foi obtido um resultado conclusivo para comprovar a interação dessas enzimas. Portanto, para confirmação dessa hipótese, novos experimentos podem ser realizados, como a co-expressão dos genes no mesmo sistema de expressão, que pode ser alcançada através da clonagem dos genes referentes as enzimas em pETduet.

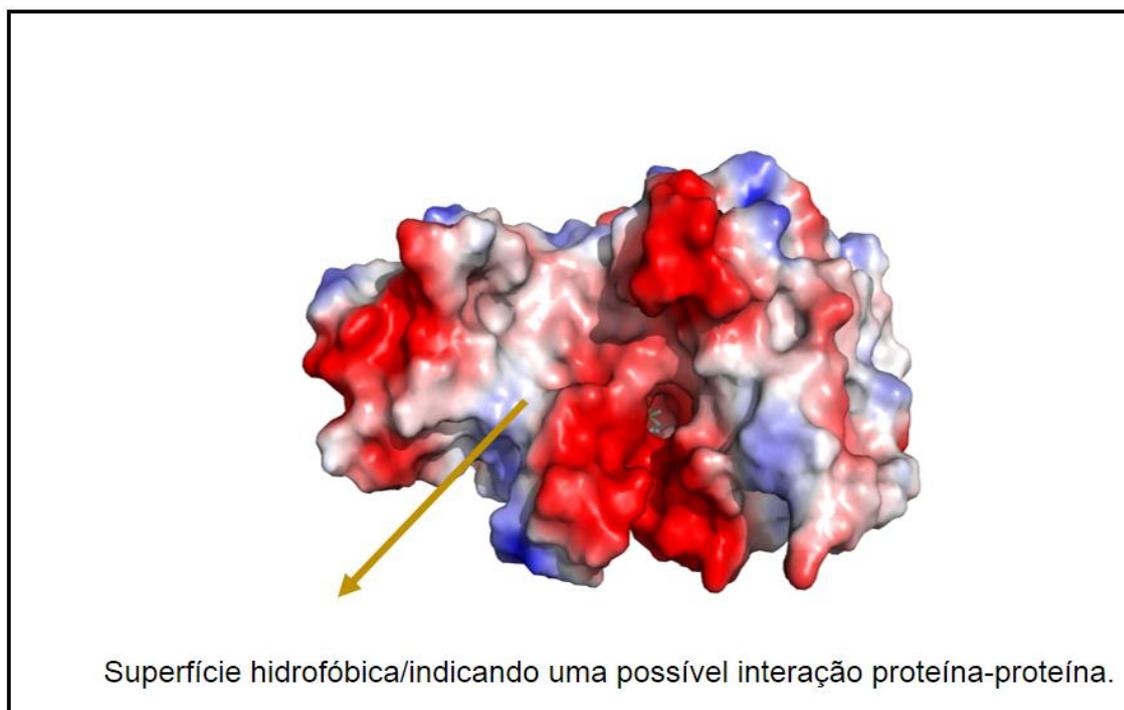


FIGURA 45. Superfície eletrostática da enzima GenN. Na seta amarela a região hidrofóbica próxima ao sítio ativo, indicando uma possível interação proteína/proteína.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.1 GenN e seu cofator SAM/SAH

GenN é uma enzima dependente do S-adenosilmetionina (SAM), que é um cofator responsável pela doação do grupo metil para o substrato. A S-adenosilmetionina é um cofator característico de metiltransferases de diversas classes que podem metilar proteínas, DNA, e RNA através de diferentes mecanismos (Gana, *et al.*, 2013). A GenN é classificada como uma metiltransferase de classe-I e realiza sua catálise em um produto natural independentemente de outros fatores, como ferro-enxofre ou cobalamina. Enzimas dessa classe apresentam motivos conservados no sítio de ligação do SAM e resíduos essenciais para a catálise (STOJKOVI; FUJIMORI, 2015). De acordo com Goto-Ito *et al.* (2008), o motivo II contém um resíduo ácido e um resíduo hidrofóbico, no caso da GenN o resíduo ácido é um ácido Asp179 que realiza uma ponte de hidrogênio entre as hidroxilas 2' e 3' da ribose do SAM. E o resíduo hidrofóbico consiste em uma Met180 que realiza uma interação de van der Waals com a adenina do SAM. Vários motivos de metiltransferases estão envolvidos em contatos conservados com o SAM, incluindo resíduos consenso ricos em glicina, que é uma região conservada para metiltransferases e os oxigênios da cadeia

principal da Gly131 e Cys142 que fazem a interação de hidrogênio com o nitrogênio do SAM ou SAH. Esse nitrogênio ainda faz interações com o grupo carboxil do Asp129, com a Leu137 e Asp194 e com o oxigênio da cadeia principal da Met130 e Gly131 através de moléculas de água. Os grupos hidroxila da porção da ribose realizam interações com o nitrogênio da cadeia principal do Asp107 e com duas moléculas de água. A porção de adenina de SAM / SAH só faz interações de hidrogênio com o grupo carboxil do Asp179, que é conhecido como o motivo III de metiltransferases, e o nitrogênio da cadeia principal da Met180. No entanto, tal como descrito para a outra metiltransferase, a porção da adenina está localizado num bolsão altamente hidrofóbico que é formado pelas cadeias laterais de vários resíduos não conservados, incluindo a Met130, Val153, Met180, Pro196, Phe204, Leu207, Ala210 e Ile214 (Figura 46).

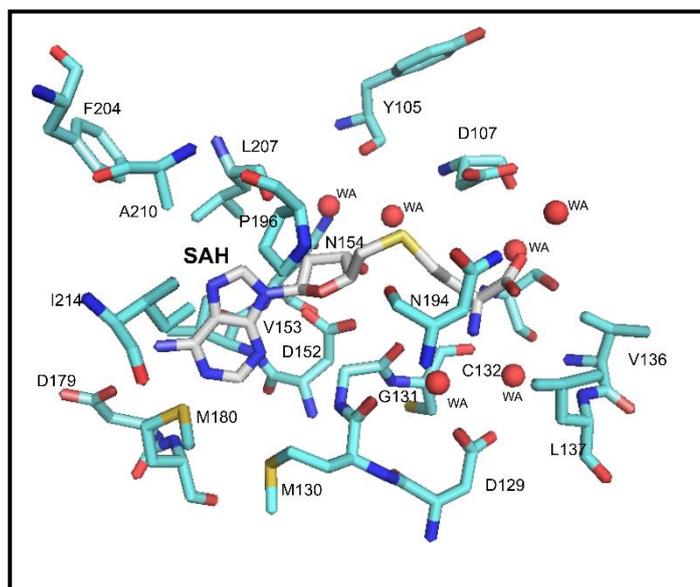


FIGURA 46. Interações do S-adenosilhomocisteína (branco) com resíduos do sítio ativo (azul).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 GenN em complexo com G418, Canamicina B, Tobramicina e o intermediário de biossíntese DAA2.

Através de co-cristalização foram obtidos complexos da enzima GenN com outros aminoglicosídeos e intermediários de biossíntese (Tabela 4).

TABELA 4. Relação dos complexos obtidos com a enzima GenN.

Estruturas Resolvidas				
Enzima	Ligante	Método	Resolução	Linha
GenN	Tris	SAD*	2.19Å	PETRAIII
GenN	G418	SM*	2.19Å	SLS
GenN	KANB	SM	2.21Å	MX2
GenN	DAA	SM	2.11Å	MX2
GenN	Tobmet	SM	2.10Å	MX2
GenN	apo	SM	2.16Å	MX2

*SAD: Difração anômala de comprimento de onda único, *SM: Substituição molecular

Os ligantes utilizados são moléculas semelhantes ao substrato DAA2 (Figura 47), entretanto todos os ligantes testados apresentam diferentes decorações nos anéis, para se ter conhecimento de como essas modificações poderiam afetar o seu modo de ligação com a enzima.

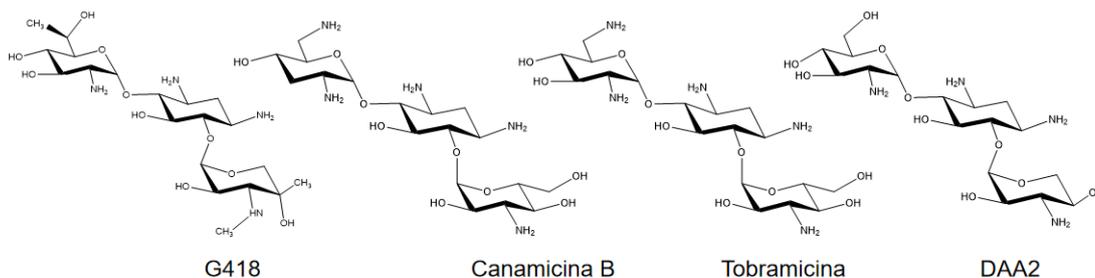


FIGURA 47. Aminoglicosídeos e ou precursores de biossíntese obtidos em complexo com a GenN.

4.5.1.1 GenN em complexo com o G418

O G418 ou geneticina é um precursor da gentamicina, mais precisamente é o produto da reação da metiltransferase GenK que metila a hidroxila 6' do anel II e converte a gentamicina X2 em G418 (NI et al., 2016). Apesar de ser um precursor, o G418 também é utilizado como antibiótico para seleção de células mamíferas (BARADARAN-HERAVI et al., 2016). O G418 estruturalmente apresenta diferenças em relação ao DAA2, o anel III já possui uma metilação no C-3 e no C-4.

Assim, a ligação do G418 no sítio ativo da GenN ocorre por interações de hidrogênio entre o anel III do ligante com os resíduos de Ser195, Asn194 e Glu111. Enquanto o anel II realiza interações de hidrogênio com o Asp95 e Glu98. O anel I realiza uma interação de hidrogênio com o Asp107 e uma interação hidrofóbica do tipo *stacking- π* com o Trp110 posicionando o G418 no sítio ativo.

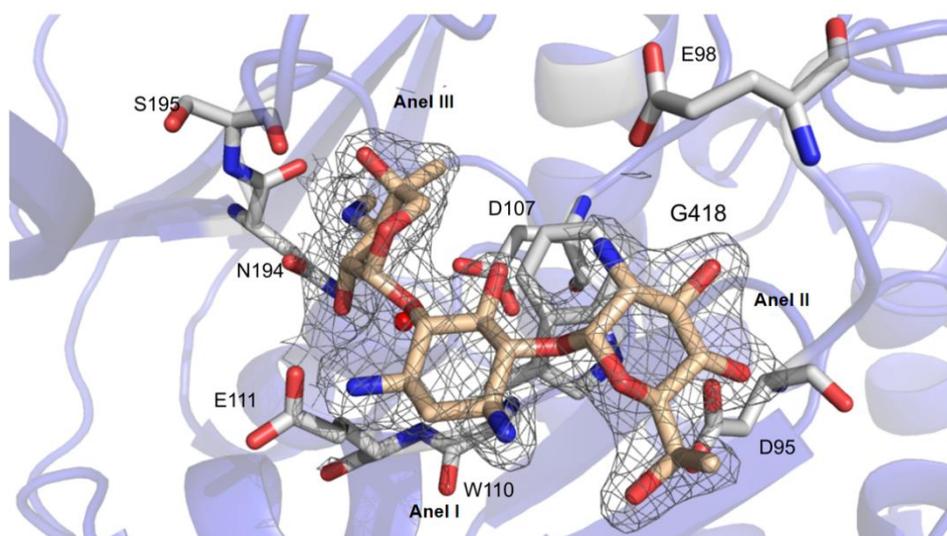


FIGURA 48. Interações do G418 resíduos e águas do sítio ativo da GenN. Em branco, os resíduos realizando interações de hidrogênio e o mapa $F_o - F_c$ atribuído ao G418 (rosa).

Fonte: Elaborada pelo autor

4.5.1.2 GenN em complexo com a tobramicina

Tobramicina é um aminoglicosídeo de amplo espectro utilizado no tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Estruturalmente é semelhante à gentamicina, porém não apresenta nenhuma metilação nos anéis (Figura 47). No trabalho de Huang et al. (2015), através de análises de LC-ESI-MS, ao incubar a tobramicina com a metiltransferase GenN, foi possível indicar um pico com a relação massa/carga referente à tobramicina metilada. A tobramicina é semelhante ao substrato da GenN pois apresenta o grupo amino na posição C-3 do anel III onde ocorre a metilação catalisada pela enzima. Portanto, foi obtida a estrutura

tridimensional da enzima GenN em complexo com a tobramicina, e essa por sua vez, apresentou a amina C-3" metilada.

Assim, a ligação da tobramicina no sítio ativo da GenN ocorre por interações de hidrogênio entre o anel III do ligante com os resíduos de Leu208, Asn194 e Glu111. Enquanto o anel II realiza interações de hidrogênio com o Glu98, Val96 e Asp98. O anel I realiza uma interação de hidrogênio com o Glu98 e uma interação hidrofóbica do tipo *stacking- π* com o Trp110 posicionando a tobramicina no sítio ativo (Figura 49).

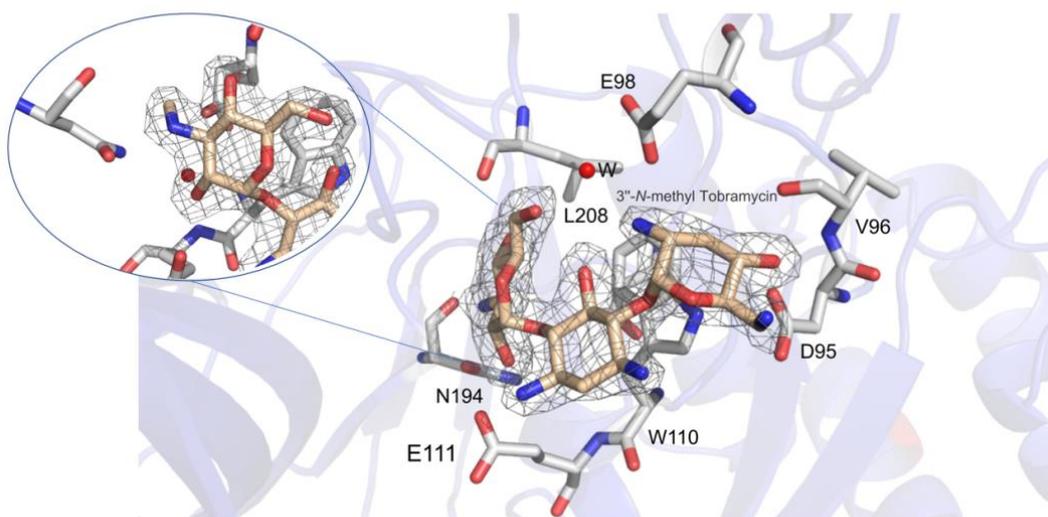


FIGURA 49. Interações da tobramicina no sítio ativo da GenN. Mapa F_o-F_c atribuído a Tobramicina metilada. E em Branco os resíduos da proteína realizando interações de hidrogênio com a tobramicina metilada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1.3 4.5.2.3 GenN com DAA2

3"-N-demetil gentamicina A ou DAA2 é um precursor de biossíntese da gentamicina C1a, C2, C2a e C1. O DAA2 é produto da catálise das enzimas GenD2 e GenS2, apresentando um grupo amino no C-3" do anel III, onde ocorre a doação do grupo metil pelo SAM catalisado pela GenN (HUANG et al., 2015). No trabalho de Ni et al. (2016), o gene *genN* foi abolido do cluster de *Micromonospora echinospora*, e através de análises de HPLC observou-se o acúmulo de gentamicina A2 o que aboliu a produção do complexo de gentamicinas. Esse experimento confirma, assim, a função e a importância da enzima na biossíntese da gentamicina.

Para corroborar com a literatura, realizamos a co-cristalização da GenN com o DAA2 que foi isolado pelo nosso colaborador Prof. Dr. Yuhui Sun (Universidade de Wuhan, China). Desta forma, foi obtida a estrutura em complexo com o substrato, porém essa por sua vez, não metilou a amina do C-3", possivelmente, houve a degradação do grupo metil do SAM no processo de cristalização.

Assim, a ligação do DAA2 no sítio ativo da GenN ocorre por interações de hidrogênio entre o anel III do ligante com os resíduos de Leu208, Asn194 e Glu111 e Ser195. Enquanto o anel II realiza interações de hidrogênio com o Glu98, Val96, Gln101 e Asp98. O anel I realiza uma interação hidrofóbica do tipo *stacking- π* com o Trp110 posicionando o DAA2 no sítio ativo (Figura 50).

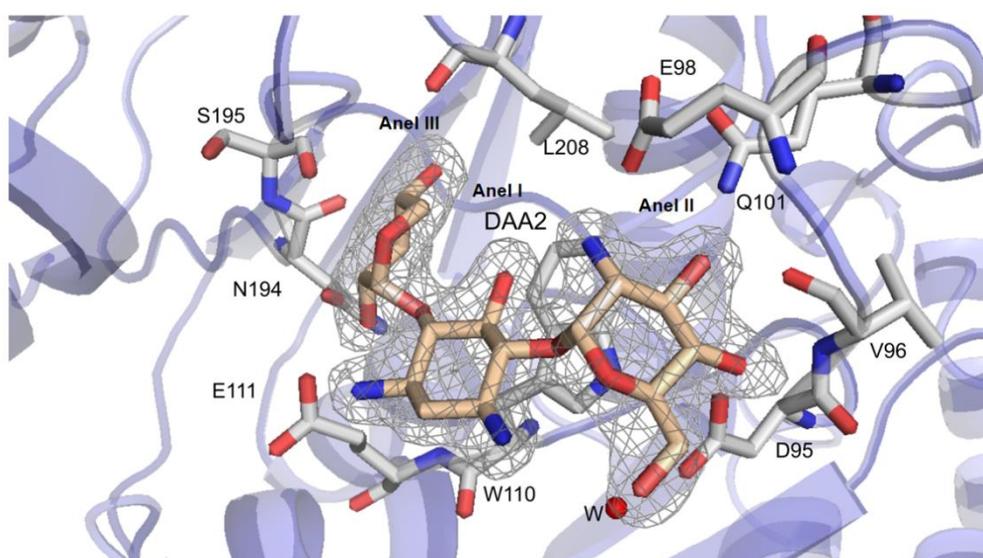


FIGURA 50. Interações do DAA2 no sítio ativo da GenN.

Mapa $F_o - F_c$ atribuído a DAA2. E em Branco são representados os resíduos da proteína realizando interações de hidrogênio com o DAA2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1.4 GenN em complexo com a Canamicina B

Canamicina B consiste em um aminoglicosídeo de amplo espectro derivado da canamicina, porém esse antibiótico apresenta cinco aminações nos anéis, diferente da canamicina.

Estruturalmente a canamicina B é semelhante ao substrato DAA2, porém o DAA2 não possui um grupo amino no anel II e a posição de uma hidroxila nos anéis

III e II estão invertidas nas moléculas (Figura 47). Essas semelhanças favoreceram a obtenção do complexo da GenN com a canamicina B, através de co-cristalização. Portanto, foi obtido a estrutura da GenN em complexo com a canamicina B e essa por sua vez apresentou uma metilação na posição 3" do anel III, essa modificação não é encontrada na biossíntese natural.

Assim, a ligação da Canamicina B no sítio ativo da GenN ocorre por interações de hidrogênio entre o anel III do ligante com os resíduos de Leu208, Glu111 e Asn194. Enquanto o anel II realiza interações de hidrogênio com o Glu98, Val96, Gln101 e Asp98. O anel I realiza uma interação de hidrogênio com a His301 intermediada por uma água e uma interação hidrofóbica do tipo *stacking- π* com o Trp110 posicionando a canamicina B no sítio ativo (Figura 51).

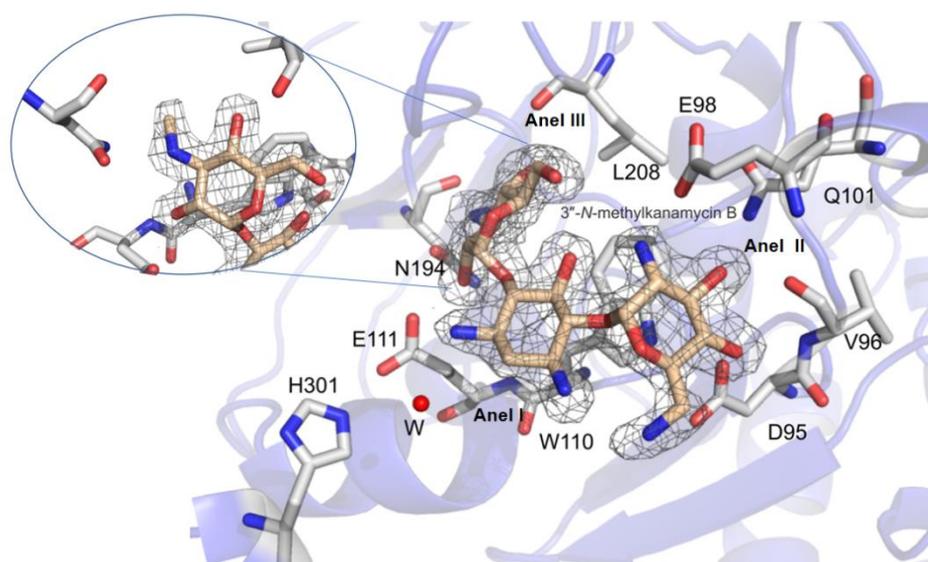


FIGURA 51. Interações da Canamicina B no sítio ativo da GenN

Mapa F_o-F_c atribuído a Canamicina B metilada. E em Branco os resíduos da proteína realizando interações de hidrogênio com a Canamicina B metilada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 Mecanismo de catálise da enzima GenN

Apesar de apresentar baixa similaridade com outras metiltransferases, o mecanismo de catálise da GenN é similar à metiltransferases DNA citosina e adenosina de classe I, porém o motivo IV (D/N)PPY) não é completamente

conservado na GenN, na qual apresenta os resíduos NSPT. O mecanismo de catálise da GenN é baseado na transferência direta do grupo metil do SAM para o anel III. Os resíduos do sítio ativo envolvidos na transferência do grupo metil são a Asn194 e o oxigênio da cadeia principal da Ser195. Contudo, a Pro196 tem um papel chave para realizar a torção da cadeia primária da Ser195 para que haja a interação de hidrogênio com o nitrogênio do anel III. A ausência de um resíduo básico perto do sítio ativo demonstra que o nitrogênio do anel III não deve ser ativado por desprotonação. Assim, a proximidade de dois aceptores de hidrogênios da Asp194 e a Ser195 pode estar envolvidos na ativação do nitrogênio do anel III para um ataque nucleofílico do grupo metil do SAM, que está alinhado totalmente com nitrogênio ativado do anel III. A posição correta do SAM é favorecida pelo nitrogênio da cadeia lateral da Asp194 que faz uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da metionina do SAM. Isso proporciona a formação de um intermediário instável metilamina no qual provavelmente perde um próton para o solvente durante o lançamento do produto (SCHUBERT; BLUMENTHAL; CHENG, 2003). Além disso, Asp107 também tem um papel fundamental e favorece a posição correta do grupo metil da SAM durante o ataque nucleofílico do N do anel III (Figura 52).

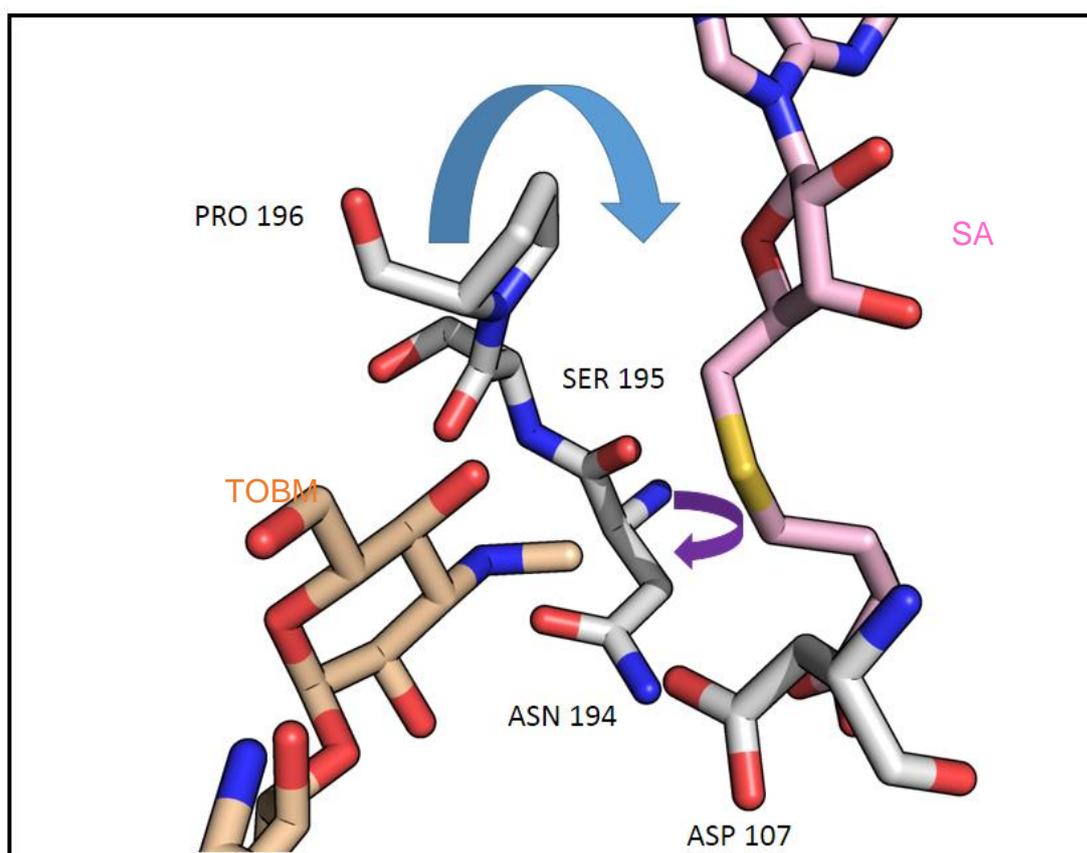


FIGURA 52. Mecanismo catalítico da enzima GenN

Em rosa o SAH, em branco os resíduos catalíticos e em bege a tobramicina. A seta azul está demonstrando a torção que a Pro196 exerce sobre a Ser195 posicionando seu oxigênio da cadeia principal para realizar uma interação de hidrogênio com a amina do C-3 do anel III. A asparagina possivelmente realiza a desprotonação do nitrogênio do grupo amino do C-3. Na seta roxa, demonstrando o sentido do ataque nucleofílico do grupo metil do SAM na amina, posicionado pelo Asp107.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os aminoglicosídeos possuem grande relevância clínica e foram responsáveis pelo controle de diversas infecções, inclusive foi o medicamento pioneiro contra a tuberculose. Essas moléculas contribuíram para fase de ouro dos antibióticos, na qual muitas moléculas foram descobertas e diversos patógenos foram combatidos. Entretanto, os aminoglicosídeos apresentam efeitos colaterais podendo causar danos aos rins e sistema auditivo. Mas, principalmente, ao fenômeno da resistência bacteriana está limitando o uso dos aminoglicosídeos. Assim indústria farmacêutica passou a sintetizar moléculas com propriedades antimicrobianas, pelo baixo custo e facilidade. Porém a resistência bacteriana aos antibióticos é crescente, o que nos leva a um problema de saúde mundial, pois já é relatado casos de microrganismos resistentes a todos os antibióticos. Atualmente esse fato, conduziu novamente interesse aos produtos naturais. Na natureza são produzidas moléculas de amplo espectro e de grande diversidade química, podendo ser alvos muito interessantes de modificações para produção de novas moléculas. Os aminoglicosídeos ainda são antibióticos de grande interesse e são passíveis de modificações, devido a suas decorações nos anéis que lhes conferem um amplo espectro e características únicas. Portanto esse trabalho contribuiu significativamente através de conhecimentos preliminares para uso dessas enzimas decoradoras para modificação de aminoglicosídeos na produção de derivados.

O estudo estrutural conduzido com a metiltransferase GenN em complexo com diferentes moléculas evidência o seu grande potencial no uso em biossíntese combinatorial, pois claramente, a enzima foi capaz de metilar outras moléculas que não são seus substratos naturais, produzindo tobramicina e canamicina metilada. A catálise da enzima apesar de conservada, apresentou algumas peculiaridades, como resíduos conservados na classe I de metiltransferases que divergem na GenN, além da presença de um segundo domínio característico de metiltransferases que formam complexos com outras enzimas, indicando a possibilidade de que haja interações com outras proteínas da biossíntese da gentamicina. Esse trabalho foi finalizado em 2017 e publicado na revista ACS Chemical Biology.

A outra parte dessa tese foi um estudo com enzimas dependentes de PLP. Essas enzimas são capazes de catalisar uma variedade de reações e, portanto, atuam em diversas vias metabólicas, incluindo a conversão de aminoácidos, aminas biogênicas, compostos tetrapirrólicos e aminoçúcares. Este trabalho contribui com informações sobre enzimas PLP dependentes envolvidas na biossíntese de gentamicina e sisomicina, como mecanismo catalítico e especificidade de substrato. As informações obtidas demonstram que as enzimas GenB3 e GenB4 apresentam características únicas e substratos que ainda não são relatados na literatura. GenB3 retira hidroxilas de um substrato fosforilado. Enquanto a GenB4 tem a função de reduzir a ligação de etileno do intermediário de biossíntese. Hong et al. (2009), relata em seu trabalho que a ligação de etileno ocorre nos últimos passos para a formação da sisomicina, que é semelhante a gentamicina C1a. No agrupamento gênico da sisomicina não ocorre um gene ortólogo codificador para a enzima GenB4. Nossos colaboradores verificaram por ensaios funcionais que esta enzima é responsável pela retirada da ligação de etileno e a estrutura da GenB4 em complexo com sisomicina fortemente sugere o papel desta enzima nos passos finais da produção do complexo das gentamicinas. A enzima GenB2 é relatada como uma epimerase, porém na literatura enzimas com essa função eram encontradas apenas na síntese de epímeros de aminoácidos. Entretanto a enzima GenB2 realiza a mudança da estereoquímica do grupo metil em um dos compostos do complexo da gentamicina. Essa enzima compartilha de características estruturais de transaminases corroborando com o trabalho de Guo et al (2014), que verificou por ensaios funcionais que essa enzima pode ter dupla funcionalidade, catalisando transferência de grupo amina e também epimerização de grupos químicos. Em contrapartida, a enzima Sis5 é uma transaminase que possui o mecanismo catalítico bem descrito na literatura, inclusive através das estruturas recentes para a enzima GenB1.

O estudo estrutural das enzimas Sis5, GenB2, GenB3 e GenB4 forneceu um panorama geral sobre enzimas dependentes de PLP da via da gentamicina, na qual possuíam passos ainda não esclarecidos. Contudo, além das informações fornecidas a respeito do mecanismo bioquímico dessas enzimas, o estudo também pode ser um precursor para uso em modificação de aminoglicosídeos para produção de moléculas menos tóxicas e que driblem mecanismos de resistência bacterianos. Os trabalhos a respeito dessas enzimas ainda não foram publicados, mas três artigos estão em

preparação a respeito das estruturas dessas enzimas em conjunto com dados funcionais.

6 REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M.; BRANCO, P. S. Natural Product-Like Combinatorial Libraries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 675–712, 2003.
- ADAMS, P. D. et al. research papers PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution research papers. p. 213–221, 2010.
- AFONINE, P. V et al. research papers Towards automated crystallographic structure refinement with phenix . refine research papers. p. 352–367, 2012.
- ARYA, D. P. **Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery**. [s.l.] Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: Indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**, v. 41, n. 6, p. 441–449, 2011.
- BENTLEY, S. D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141–147, maio 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/417141a>>.
- BUSSCHER, G. F.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN DELFT, F. L. 2-Deoxystreptamine: Central scaffold of aminoglycoside antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 3, p. 775–791, 2005.
- CASHMAN, D. J.; RIFE, J. P.; KELLOGG, G. E. Which aminoglycoside ring is most important for binding? A hydrophobic analysis of gentamicin, paromomycin, and analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 119–122, 2001.
- CHEN, V. B. et al. research papers MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography research papers. p. 12–21, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- DE LIMA PROCÓPIO, R. E. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>>.
- DIVISION, D. Editor 463. **Comparative and General Pharmacology**, v. 1, n. 3, 1963.
- DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. HHS Public Access. v. 30, n. 2, p. 523–537, 2017.
- DOUBLIE, S. **Macromolecular Crystallography Protocols**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2007.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-Ray Crystallography**. [s.l.] Springer-Verlag New York, 2007.
- 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.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, 2004.
- ENSIGN, J. C. et al. Physiology of some actinomycete genera. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 8, p. 657–660, 1993.
- EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 7, p. 1204–1214, 2013.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and

efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

GANNA, R. et al. 1472-6807-13-6 (1).Pdf. 2013.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11–27, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5MD00344J>>.

GOTO-ITO, S. et al. Crystal structure of archaeal tRNA(m1 G37)methyltransferase aTrm5. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 4, p. 1274–1289, 2008.

GRAILLE, M. et al. Molecular Basis for Bacterial Class I Release Factor Methylation by PrmC. **Molecular Cell**, v. 20, n. 6, p. 917–927, dez. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727650501720X>>.

GRISWOLD, W. R.; TONEY, M. D. Role of the pyridine nitrogen in pyridoxal 5'-phosphate catalysis: Activity of three classes of PLP enzymes reconstituted with deazapyridoxal 5'-phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 37, p. 14823–14830, 2011.

GU, Y. et al. Biosynthesis of Epimers C2 and C2a in the Gentamicin C Complex. **ChemBioChem**, v. 16, n. 13, p. 1933–1942, 2015.

GUO, J. et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 5, p. 608–618, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.03.005>>.

HOLM, L. Structural bioinformatics Benchmarking fold detection by DaliLite v . 5. n. July, p. 1–2, 2019.

HONG, W. R. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the sisomicin biosynthetic gene cluster from *Micromonospora inyoensis*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 3, p. 449–455, 2009.

HOPWOOD, D. A. **Streptomyces in Nature and Medicine**. [s.l.] Hardcover, 2007.

HOUGHTON, J. L. et al. The future of aminoglycosides: The end or renaissance? **ChemBioChem**, v. 11, n. 7, p. 880–902, 2010.

HUANG, C. et al. Delineating the biosynthesis of gentamicin X2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex. **Chemistry and Biology**, v. 22, n. 2, p. 251–261, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.012>>.

JUN LIN, KUNIHICO NISHINO, MARILYN C. ROBERTS, MARCELO TOLMASKY, RUSTAM I. AMINOV, L. Z. **Mechanisms of antibiotic resistance**. [s.l.] frontiers, 2007.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444909047337>>.

KOZBIAL, P. Z.; MUSHEGIAN, A. R. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. **BMC Structural Biology**, v. 5, 2005.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1–18, 2016.

KUDO, F.; EGUCHI, T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 9, p. 471–481, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2009.76>>.

- KUDO, F.; TOKUMITSU, T.; EGUCHI, T. Substrate specificity of radical S-adenosyl-l-methionine dehydratase AprD4 and its partner reductase AprD3 in the C3'-deoxygenation of aminoglycoside antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 423–428, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2016.110>>.
- LANGER, G. et al. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP / wARP version 7. v. 3, n. 7, p. 1171–1179, 2008.
- LI, S. et al. Methyltransferases of gentamicin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 6, p. 1340–1345, 2018.
- LIANG, J. et al. Current Advances on Structure-Function Relationships of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. March, 2019.
- LISCOMBE, D. K.; LOUIE, G. V.; NOEL, J. P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 10, p. 1238–1250, 2012.
- LLEWELLYN, N. M.; SPENCER, J. B. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p. 864–874, 2006.
- MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727–737, 1999.
- MONCIARDINI, P. et al. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209–220, 2014.
- NI, X. et al. Assembly of a novel biosynthetic pathway for gentamicin B production in *Micromonospora echinospora*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.
- OHNISHI, Y. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 4050–4060, 2008.
- PAIARDINI, A. et al. PLP-Dependent Enzymes. v. 2014, p. 2–4, 2014.
- PARK, J. W. et al. Yoon-Sohng PNAS 2008.pdf. v. 2, 2008.
- PARK, S. R. et al. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: Recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 1, p. 11–20, 2013.
- PERRY, J. A.; WESTMAN, E. L.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: What's new? **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 45–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.002>>.
- RHODES, G. **Crystallography Made Crystal Clear**. [s.l.] Copyright © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved, 2006.
- ROMO, A. J.; LIU, H. W. Mechanisms and structures of vitamin B 6-dependent enzymes involved in deoxy sugar biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 11, p. 1534–1547, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.02.003>>.
- SANDERS WE JR, S. C. Sisomicin: a review of eight years' experience. **Rev Infect Dis**, p. 182–95, 1980.
- SCHMIDBERGER, J. W. et al. Halomethane biosynthesis: Structure of a SAM-dependent

halide methyltransferase from arabisidopsis thaliana. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 21, p. 3646–3648, 2010.

SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL Molecular Graphics System**, [s.d.].

SCHUBERT, H. L.; BLUMENTHAL, R. M.; CHENG, X. Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 329–335, 2003.

SERIO, A. W. et al. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

STEFFEN-MUNSBURG, F. et al. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 566–604, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.012>>.

STOJKOVI, V.; FUJIMORI, D. G. **Radical SAM-Mediated Methylation of Ribosomal RNA**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

SUBRAMANI, R.; SIPKEMA, D. **Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products**. [s.l.: s.n.]v. 17

TAYLOR, G. CCP4 study weekend The phase problem CCP4 study weekend. p. 1881–1890, 2003.

THAKER, M. N.; WRIGHT, G. D. Opportunities for synthetic biology in antibiotics: Expanding glycopeptide chemical diversity. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 3, p. 195–206, 2015.

TION, C. et al. the “Activation”. v. 49, n. 1965, p. 712–716, 1966.

TRYLSKA, J.; KULIK, M. Interactions of aminoglycoside antibiotics with rRNA. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 4, p. 987–993, 2016.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1997.

VEYISOGLU, A. et al. *Micromonospora yasonensis* sp. nov., isolated from a Black Sea sediment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, n. 7, p. 1019–1028, 2016.

VEIGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WEINERT, T. et al. Fast native-SAD phasing for routine macromolecular structure determination. **Nature Methods**, v. 12, n. 2, p. 131–133, 2015.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 1, p. 35–48, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3155>>.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011.

XIE, J.; TALASKA, A. E.; SCHACHT, J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. **Hearing Research**, v. 281, n. 1–2, p. 28–37, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2011.05.008>>.

ZHANG, LIXIN, DEMAINE, A. L. **No Title**. 1. ed. New Delhi, India: Humana Press, 2005.

APÊNDICE A - Tabela Cristalográfica GenN

	GenN-SAH- Tris	GenN-SAH- DAA2	GenN-SAH	GenN- SAH-G418	GenN-SAH- Tobramicina	GenN-SAH-6"metil Canamicina B
PDB	5U4T	5U0N	5TYQ	5U18	5U0T	5U1I
Conjunto de Dados						
Linha/Comprimento de onda(Å)	PETRAIII/2.38	MX2/1.45	MX2/1.45	SLS/0.97	MX2/1.45	MX2/1.45
Resolução (Å)	48.00-2.10 (2.15 -2.20)	48.50-2.10 (2.20-2.10)	48.0-2.15 (2.25-2.15)	47.40-2.20 (2.30-2.20)	43.60-2.10 (2.20-2.10)	43.0-1.95 (2.00-1.90)
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁					
Célula Unitária	66.60 66.80 69.10	58.00 67.40 70.00	66.70 66.90 68.80	68.90 69.30	50.80 69.90 84.80	51.00 70.00 86.00
Reflexões totais	210579 (12812)	197957 (17138)	196611 (16927)	32730 (3092)	206399 (14287)	46166 (4406)
Reflexões únicas	17433 (1335)	16081 (1533)	16909 (1571)	16377 (1550)	17891 (1681)	23107 (2206)
Multiplicidade	12.1 (9.5)	12.3 (11.2)	11.6 (10.8)	2.0 (2.0)	11.5 (8.5)	2.0 (2.0)
Completeza (%)	92.00 (72.40)	99.25 (97.60)	99.50 (95.00)	99.20 (95.60)	99.60 (96.60)	97.30 (94.60)
Média I/sigma	24.70 (3.90)	10.50 (1.85)	17.00 (3.50)	13.60 (2.45)	19.20 (3.80)	21.80 (6.90)
Fator B Wilson	24.80	24.15	18.30	29.10 0.038	23.90	16.40
R-merge	0.085 (0.47)	0.20 (1.45)	0.18 (1.10)	0.33 (0.33)	0.11 (0.57)	0.024 (0.11)
Refinamento						
R-work	0.15 (0.20)	0.17 (0.23)	0.20 (0.28)	0.17 (0.22)	0.15 (0.18)	0.18 (0.20)
R-free	0.22 (0.26)	0.23 (0.29)	0.27 (0.40)	0.23 (0.28)	0.22 (0.29)	0.22 (0.25)
Número de átomos não hidrogênio	2673	2538	2499	2665	2668	2660
macromoléculas	2465	2387	2401	2484	2434	2450
ligantes	28	32	1	34	34	35
água	180	119	97	147	200	175
Resíduos proteicos	316	307	307	319	311	309
RMS(ligações)	0.013	0.009	0.008	0.013	0.009	0.007
RMS(ângulos)	1.41	1.08	1.21	1.45	1.27	0.97
Ramachandran favorável (%)	96	95.08	95	96.21	97	96.09
Ramachandran permitido (%)	4	4.59	4.35	3.15	3	3.26
Ramachandran não permitido (%)	0	0.33	0.65	0.63	0	0.65
Clashscore	4.50	1.20	5.92	4.03	3.73	3.28
Média B-factor	26.80	5.06	19.20	32.19	25.10	18.12
macromoléculas	26.30	24.82	19.00	32.03	24.40	17.82
ligantes	37.20	24.71	21.20	30.69	24.70	15.46
solvente	31.90	20.07	22.60	35.25	33.70	22.85

(*)Os valores em parênteses são referentes a camada de mais alta resolução

$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h |I_h - \langle I \rangle|}{\sum_h I_h}$, onde I_h é a intensidade da reflexão; $\langle I \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões relacionados por simetria.

APÊNDICE B - Tabela Cristalográfica Sis5

Conjunto de Dados	Sis5:PLP semet	Sis5 PLP	Sis5 PMP	Sis5 G418
Comprimento de onda	SLS/0.97	SLS/0.97	MX2/1.45	MX2/1.45
Resolução	46.15 - 2.00 (2.07 - 2.00)	46.2 - 1.60 (1.63 - 1.60)	46.05 - 2.01(2.08 - 2.01)	34.82 - 1.81 (1.87 - 1.81)
Grupo espacial	C2	C2	C2	I 1 2 1
Célula unitária	66.99 61.53 210.42 90.00 95.02 90.00	66.82 61.76 210.14 90 95 90	214.25 61.17 66.48 90 103.14 90	66.73 61.52 209.70 90 94.99 90
Reflexões totais	28346	28434	315748	315758
Reflexões únicas	4416	4193	55202 (5192)	74328 (6821)
Multiplicidade	6.4	6.8	5.7 (3.3)	6.2(4.9)
Completeza (%)	98.2(96.4)	99.15 (97.94)	99 (93)	96.8(85.3)
Média I/sigma(I)	4.3 (2.5)	15.5 (9.5)	15.69 (2.22)	14.6(1.7)
Refinamento do modelo				
Wilson B-factor		16.75	24.08	20.7
R-merge		0.18	0.07897 (0.5646)	0.090(0.92)
R-work		0.1691 (0.2362)	0.1686 (0.2869)	0.156
R-free		0.1932 (0.2534)	0.2029 (0.3096)	0.2013 (0.3016)
Número de átomos não hidrogênios		7007	6944	7120
Macromoléculas		6190	6426	6279
Ligantes		3	3	6
Águas		785	549	450
Resíduos proteicos		818	818	816
RMS(ligações)		0.007	0.008	0.007
RMS(ângulos)		1.13	1.05	1.07
Gráfico de Ramachandran				
Regiões Favoráveis (%)		98	99	98
Regiões permitidas (%)		1.26	0.83	1.3
Regiões não permitidas (%)		0.74	0.12	0.24
Clashscore		11.67	4.85	1.1
Média B-factor		22.8	29.91	24.51

(*)Os valores em parênteses são referentes a camada de mais alta resolução

$R_{sym} = \frac{\sum_h |I_h - \langle I \rangle|}{\sum_h I_h}$, onde I_h é a intensidade da reflexão; $\langle I \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões relacionados por simetria.

APÊNDICE C - Tabela Cristalográfica GenB2, GenB3 e GenB4

	GenB2 Gentamicina X2	GenB2 K227A	GenB4 PLP	GenB3 PLP
Comprimento de onda Å	0.97	1.45	1.45	0.97
Resolução	46.64 - 1.66 (1.71 - 1.66)	12.24 - 1.99 (2.05 - 1.99)	45.98 - 1.70 (1.76 - 1.70)	44.88 - 1.7 (1.76 - 1.7)
Grupo espacial	C 2 2 2 ₁	C 2 2 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P21
Célula unitária	75.40 104.19 104.65 90 90 90	74.55 103.67 104.06 90 90 90	71 74.21 181 90 90 90	59.51 158.00 64.04
Reflexões totais	97401 (9535)	56387 (5538)	209969 (20513)	14698 (18326)
Reflexões únicas	48785 (4780)	28202 (2772)	105014 (10268)	112648 (10068)
Multiplicidade	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)	1.9 (1.8)
Completeza (%)	99.64 (99.15)	99.41 (99.50)	99.78 (98.77)	94.90 (85.47)
Média do I/sigma	12.53 (2.25)	12.34 (1.99)	15.90 (1.85)	12.72 (1.72)
Refinamento do modelo				
Wilson B-factor	20.74	20.6	18.38	30.56
R-merge	0.02861 (0.33)	0.04982 (0.37)	0.03501 (0.40)	0.03104 (0.38)
R-work	0.21 (0.28)	0.16 (0.24)	0.15 (0.24)	0.1750 (0.31)
R-free	0.23 (0.32)	0.22 (0.30)	0.18 (0.27)	0.2086 (0.32)
Número de átomos não hidrogênicos	3199	3433	8192	7628
macromoléculas	3183	3139	6958	6918
ligantes	16	16	32	30
Resíduos proteicos	412	278	1202	680
RMS (ligações)	0.007	0.008	890	0.019
RMS (ângulos)	1.21	0.83	0.006	1.83
Ramachandran regiões favoráveis (%)	98.77	97.32	0.85	97.06
Ramachandran regiões permitidas (%)	1.23	2.44	96.73	2.71
Ramachandran regiões não permitidas	0	0.24	3.05	1.42
Rotâmeros permitidos (%)	não	0.6	0.31	0.23
Clashscore	2.98	3.05	0.14	0.56
Média do B-factor	23.11	22.34	3.85	5.17

(*)Os valores em parênteses são referentes a camada de mais alta resolução

$R_{\text{sym}}^a = \frac{\sum_h |I_h - \langle I \rangle|}{\sum_h I_h}$, onde I_h é a intensidade da reflexão; $\langle I \rangle$ é a intensidade média de todas as reflexões relacionados por simetria.

APÊNDICE D – Artigo: Structural Basis of the Selectivity of GenN, an Aminoglycoside N-Methyltransferase Involved in Gentamicin Biosynthesis



Cite This: *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 2779–2787

pubs.acs.org/acschemicalbiology

Articles

Structural Basis of the Selectivity of GenN, an Aminoglycoside N-Methyltransferase Involved in Gentamicin Biosynthesis

Priscila dos Santos Bury,[†] Fanglu Huang,^{‡,§} Sicong Li,[§] Yuhui Sun,[§] Peter F. Leadlay,[‡] and Marcio Vinicius Bertacine Dias^{*,†,§}

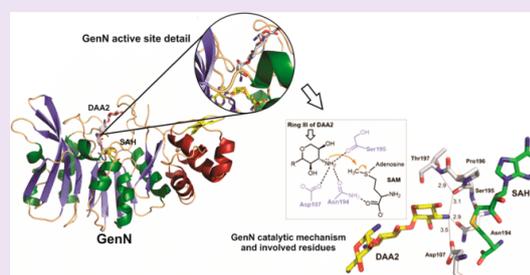
[†]Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[‡]Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, CB2 1GA, United Kingdom

[§]Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, People's Republic of China

Supporting Information

ABSTRACT: Gentamicins are heavily methylated, clinically valuable pseudotrisaccharide antibiotics produced by *Micromonospora echinospora*. GenN has been characterized as an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase with low sequence similarity to other enzymes. It is responsible for the 3''-N-methylation of 3''-dehydro-3''-amino-gentamicin A2, an essential modification of ring III in the biosynthetic pathway to the gentamicin C complex. Purified recombinant GenN also efficiently catalyzes 3''-N-methylation of related aminoglycosides kanamycin B and tobramycin, which both contain an additional hydroxymethyl group at the C5'' position in ring III. We have obtained eight cocrystal structures of GenN, at a resolution of 2.2 Å or better, including the binary complex of GenN and S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) and the ternary complexes of GenN, SAH, and several aminoglycosides. The GenN structure reveals several features not observed in any other N-methyltransferase that fit it for its role in gentamicin biosynthesis. These include a novel N-terminal domain that might be involved in protein:protein interaction with upstream enzymes of the gentamicin X2 biosynthesis and two long loops that are involved in aminoglycoside substrate recognition. In addition, the analysis of structures of GenN in complex with different ligands, supported by the results of active site mutagenesis, has allowed us to propose a catalytic mechanism and has revealed the structural basis for the surprising ability of native GenN to act on these alternative substrates.



Methylation is an important reaction in the biosynthesis of specialized metabolites in both microorganisms and plants, where methylation on (principally) oxygen, nitrogen, or carbon¹ contributes significantly to the chemical diversity^{2–5} and bioactivity⁶ of the products. Gentamicins are clinically valuable aminoglycoside antibiotics constructed from three modified sugar units, including the unusual aminocyclitol 2-deoxystreptamine (2-DOS).^{7,8} Gentamicins inhibit protein synthesis by interfering with initiation, codon fidelity, and translocation. They are isolated from the filamentous bacterium *Micromonospora echinospora* as the gentamicin C complex, a mixture of five components differing in their methylation patterns (Figure 1A). Gentamicin C complex is effective against life-threatening sepsis caused by Gram-negative bacterial infections. Unfortunately, these vital drugs entail a serious risk of kidney damage and hearing loss,⁹ so there is great interest in generating novel gentamicin components with a potentially greater therapeutic window.

The later, diversity-generating steps in the biosynthetic pathway to gentamicins have been intensively studied in recent years, greatly aided by the sequencing of the gentamicin gene cluster.¹⁰ The pseudotrisaccharide intermediate 3''-dehydro-3''-

amino-gentamicin A2 (DAA2) is first converted to gentamicin A by transfer of a methyl group to the amino group at position 3'' in ring III^{11,12} (Figure 1A). The cobalamin-dependent radical SAM C-methyltransferase GenD1 then methylates the C4'' in ring III of gentamicin A to produce gentamicin X2,¹¹ the branch point in gentamicin biosynthesis. Further methylation at the C6'' position in ring II of X2 catalyzed by GenK, a second cobalamin-dependent radical SAM C-methyltransferase,^{13–16} yields the intermediate G418, which undergoes amination and loss of ring II hydroxy groups to give gentamicins C2a and C2. Analogous amination and didehydroxylation of gentamicin X2 yields gentamicin C1a (Figure 1A). The final two components of the gentamicin C complex, C2b and C1, are formed by N-methyl transfer to the amino group at the 6''-position in, respectively, gentamicin C1a and gentamicin C2. The catalyst(s) for these terminal steps have not been identified. In contrast, GenN has been previously shown to catalyze

Received: June 4, 2017

Accepted: September 6, 2017

Published: September 6, 2017

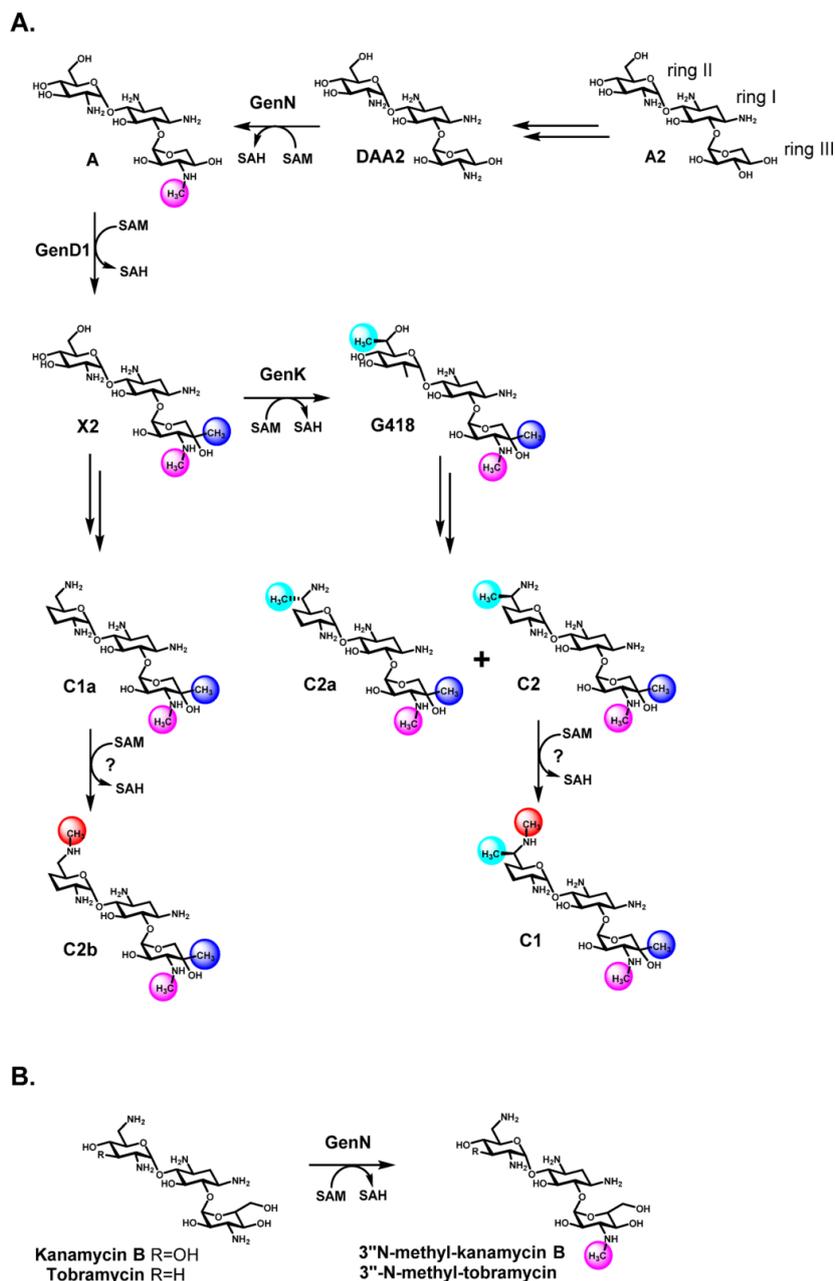


Figure 1. (A) Methylation steps in gentamicin biosynthetic pathway. (B) GenN catalyzed 3''-N-methylation of kanamycin B and tobramycin.

methylation of the 3''-amino group in both kanamycin B (KanB) and tobramycin (Tob; Figure 1B), indicating the potential for this enzyme to generate novel aminoglycosides.¹¹ GenN is an enzyme with low sequence similarity to other *N*-methyltransferases, with the exception of Sis30 from the biosynthetic pathway to sisomicin, an aminoglycoside closely related to gentamicin.¹⁷ There is increasing interest in using

such class I *S*-adenosyl methionine- (SAM) dependent methyltransferases¹⁸ that act within biosynthetic pathways as tools for biocatalysis and biotransformation.¹⁹ Certain of these methyltransferases have been shown to accept a relatively broad range of substrates,^{19–21} while others have narrow substrate tolerance.³ Structural insights are therefore indispensable to future efforts to understand and engineer substrate preference.

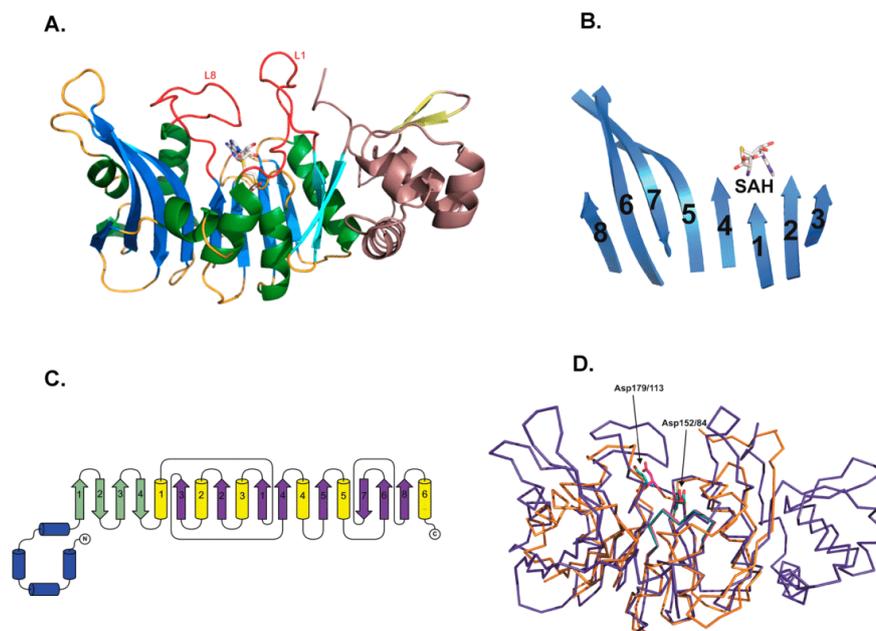


Figure 2. Overall structure of GenN. (A) General structure. (B) Order of the strands in the eight-stranded β -sheet of the SAM-binding domain showing the position of the bound SAH. (C) Topology of GenN. The main secondary elements of the N-terminal domain and C-terminal domain are represented in blue, yellow, and purple, respectively; two additional β -hairpins between the N-terminal domain and C-terminal domain are represented in green. (D) Superposition of GenN structure (blue) and its best match homologue MJ0882 (brown). The conserved aspartate residues interacting with SAM/SAH, Asp152 and Asp179 of GenN and Asp84 and Asp113 of MJ0882, are indicated.

We have determined the crystal structure at atomic resolution of GenN, in ternary complex with the reaction product *S*-adenosylhomocysteine (SAH) and each of several aminoglycoside ligands, and we have used site-directed mutagenesis to probe the roles of specific amino acid residues in binding and catalysis. This has provided insight into both the catalytic mechanism of GenN and the structural basis for its ability to accept these alternative substrates and underlined its promise as a tool for regiospecific methylation of further aminoglycoside templates.

RESULTS AND DISCUSSION

Overall Structure. The crystal structure of GenN was solved in cocomplex with *S*-adenosylhomocysteine (SAH) and several different substrates or products: the binary complex of GenN–SAH and the ternary complexes of GenN–SAH–DAA2, GenN–SAH–3′-*N*-methyltobramycin (GenN–SAH–Tobm), GenN–SAH–KanB, GenN–SAH–3′-*N*-methylkanamycin B (GenN–SAH–KanBm), GenN–SAH–gentamicin X2 (GenN–SAH–X2), GenN–SAH–G418, and GenN–SAH–Tris(hydroxymethyl)aminomethane (GenN–SAH–Tris). GenN, in all these complexes, crystallized in the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with a single monomer in the asymmetric unit, and the crystals diffracted to a maximum resolution between 1.9 Å and 2.2 Å (Supporting Information Table 1). The protein exists in the crystal as a monomer, consistent with its behavior in solution during gel filtration.¹¹ The crystal structure of the GenN–SAH–Tris was initially solved by single anomalous dispersion (SAD) after soaking with sodium iodide. Thirteen iodine atom peaks were identified which were used to

calculate phases and to produce the initial electronic density map. The other seven structures were solved by molecular replacement using the structure of the GenN–SAH–Tris complex as a search model.

The GenN structure (Figure 2A) is composed of two domains, a predominantly α -helical N-terminal domain (residues Met1–78) connected to a larger C-terminal SAM-binding domain (residues Pro79–321) containing the active site. The latter domain shares the general canonical fold of class I methyltransferases, closely related to the Rossmann nucleotide-binding fold,¹⁸ and consisting of a conserved eight-stranded β -sheet ($\uparrow\beta_3$, $\uparrow\beta_2$, $\uparrow\beta_1$, $\uparrow\beta_4$, $\uparrow\beta_5$, $\downarrow\beta_7$, $\uparrow\beta_6$, and $\uparrow\beta_8$, Figure 2B) sandwiched between six α -helices and a β -hairpin (Figure 2A and C). As in other class I methyltransferases, the order of these eight strands is 3-2-1-4-5-7-6-8 with the seventh strand antiparallel to the others. However, GenN is distinctive in having an eighth strand of the β -sheet (β_8) lying parallel to the sixth and appears to form a new topological subclass (class Io).²² The SAM and aminoglycoside binding sites are in the N-terminal portion of the β -sheet, between strands 1 and 2 (Figure 2C). GenN does not share extensive sequence similarity with other methyltransferases. A search using the program DALI²³ identified the closest match to be the putative methyltransferase MJ0882 from *Methanococcus jannaschii*²⁴ with a Z score of 17.1 and a RMSD of 3.0 Å (Figure 2D and Supporting Information Figure 1). The similarity between the GenN and MJ0882 sequences is 34%, extending over only 27% of the sequence. MJ0882 has a β -hairpin in the SAM binding domain as in GenN, but it has neither the extra eighth strand in the central β -sheet nor the N-terminal domain (Figure 2D). Other related topological

structures revealed by DALI include 5-methyluridine methyltransferase from *Thermus thermophilus*²⁵ (Z score = 16.6), PrmC, a HemK methyltransferase involved in the methylation of RF1 during protein synthesis²⁶ (Z score = 16.4), and the tRNA(m¹G37) methyltransferase aTrm5 from *Methanococcus jannaschii*²⁷ (Z score = 16.3). GenN does, however, conserve the classical SAM/SAH binding motifs identified for the class I methyltransferases,¹ including the glycine-rich consensus “GXGXXG” at the C-terminal portion of strand 1 of the central β -sheet, which interacts with the carboxypropyl portion of SAM/SAH, the acidic residue in motif II (Asp152 at the C-terminus of β 2 in GenN) which hydrogen bonds to the ribose of SAM/SAH, and the acidic residue in motif III (Asp179 located between the β 3 and β 4) that interacts with the adenosyl group (Figure 2D and Supporting Information Figure 1).

Analysis of the electrostatic surface of GenN reveals a large noncharged groove between the N - and C-terminal domains (Supporting Information Figure 2) indicating some potential for protein–protein interaction. The N -terminal subdomain of GenN is composed of a four α -helical bundle and a small β -hairpin (Figure 2A and B). A DALI search using this subdomain yielded the best, albeit low, Z scores (2.0–4.5), indicating a topology shared with several O -methyltransferases involved in the biosynthesis of natural products.^{28–31} The N -terminal domains in these O -methyltransferases are involved in homodimer formation. In contrast, GenN is monomeric in solution, although the results of kinetic experiments¹¹ have suggested it might form a functional complex with neighboring enzymes GenD2 and GenS2 in the gentamicin biosynthetic pathway. Such an arrangement has been reported for coupled enzymes in the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexose³² and of the aminoglycoside apramycin.³³

The SAM/SAH Binding Site. Although we initiated cocrystallization of GenN with SAM, either in the presence or in the absence of aminoglycoside, SAH rather than SAM was observed at the active site in all the binary and ternary complex structures, with or without 3'- N -methylation product. This is a very common observation in the crystallization of methyltransferases. The SAH molecule binds in a buried position between strands 1 and 2 of the central β -sheet (Figure 1B) and makes extensive hydrophobic and hydrogen bonding interactions with the protein (Figure 3A and Supporting Information Figure 3). These interactions include hydrogen bonding between the backbone amide oxygen of Gly131 and Cys132 in the glycine-rich motif I and the nitrogen of the carboxypropyl moiety of SAM/SAH. This nitrogen atom also interacts, *via* water molecules, with the carboxylate in the side chain of Asp129, the backbone amide nitrogens of Leu137 and Asn194, and the backbone amide oxygens of Met130 and Gly131. The Asp152 (motif II) interacts with the ribosyl hydroxyl groups of SAM/SAH, which also interact *via* water molecules with the backbone amide nitrogen of Asp107 and the backbone amide oxygen of Tyr105. The adenine moiety of SAM/SAH hydrogen-bonds to the carboxyl group of Asp179 (motif III) and to the backbone nitrogen of Met180. As in other methyltransferases, the adenine moiety is located in a highly hydrophobic pocket, which in GenN is formed by the side chains of Met130, Val153, Met180, Pro196, Phe204, Leu207, Ala210, and Ile214 (Figure 3A, Supporting Information Figures 3 and 4).

Superimposition of the structures of all the solved GenN complexes shows that the mode of SAM/SAH binding, in an extended conformation typical of class I methyltransferases, is

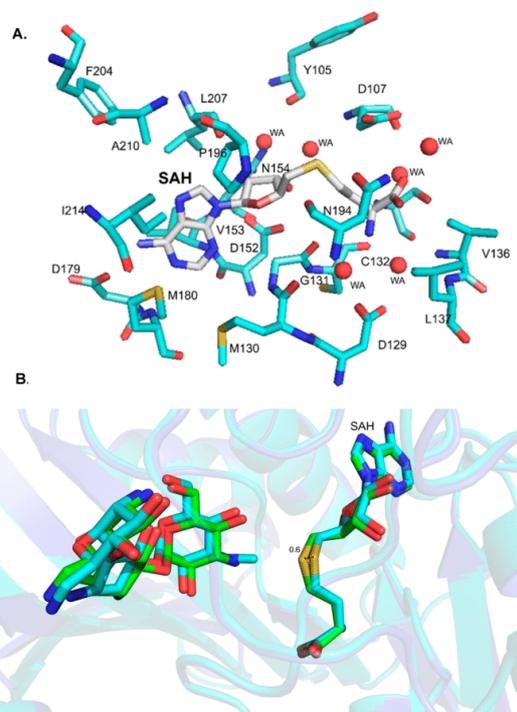


Figure 3. SAM/SAH binding site. (A) Residues interacting with SAM/SAH. (B) Positions of the sulfur of SAM/SAH in the absence and presence of 3'- N -methyl group of the kanamycin B.

well conserved, with no major active site differences between SAH/substrate and SAH/product ternary complexes. The presence of 3'- N -methylated product caused a shift of only about 0.6 Å in the position of the sulfur when compared with the structure containing the corresponding nonmethylated ligand (Figure 3B). All attempts to crystallize uncomplexed GenN have failed, so it remains unclear whether there are significant conformational changes upon SAM/SAH binding.

The DAA2 Binding Site. GenN-catalyzed methylation using SAM as the methyl donor converts DAA2 into gentamicin A (Figure 1).¹¹ In the ternary complex of GenN–SAH–DAA2, DAA2 binds between strands 1 and 4 of the central β -sheet on the side opposite to the SAM/SAH binding site, with the 3'-amino group pointing toward the position of the methyl group of SAM (Figure 4A). The DAA2 binding cavity is almost exclusively defined by interactions with two long loops of the SAM-binding domain: L1 (residues 92–112), which connects the β -hairpin to the SAM binding domain, and L8 (residues 194–212), which connects strand β 4 to helix α 4 (Figure 4B). In all other class I methyltransferases, the position and size of the L1 and L8 loops are dramatically different, implicating L1 and L8 in determining the specificity of GenN for its aminoglycoside substrate. Primary sequence alignment of GenN with several N -methyltransferases whose structures have been solved also indicates that these regions are not conserved (Supporting Information Figure 1). Eight of the 21 residues of L1 and six of the 19 residues of L8 are negatively charged, to match the polycationic DAA2 (Figure 1). Glu98 in L1 hydrogen-bonds to the amino group of the glucosamine ring

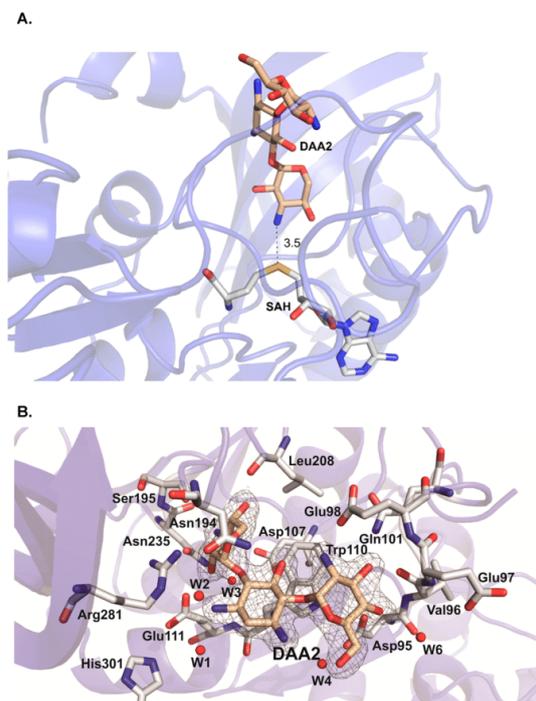


Figure 4. Active site of GenN-SAH-DAA2 complex. (A) Binding of DAA2 and SAH. (B) Residues interacting with DAA2.

(ring II) of DAA2 and Glu111 in L1 hydrogen-bonds to the C1-amino group of the 2-DOS ring (ring I). Ring II also makes further hydrogen bonds to the side chain of Asp95, to the backbone amide oxygen of Val96, and the backbone nitrogen of Glu98. There is a stacking hydrophobic interaction between the 2-DOS ring and the indole ring of Trp110. The 3'-desmethylgarosamine ring (ring III) of DAA2, which is deeply buried in the active site, strongly interacts with various residues, including the backbone oxygens of Ser195 and Leu208; the side-chains of Glu111, Asn198, and Asn235; and, through water molecules, the side-chains of Asp107 and Asn194 and the backbone nitrogen of Glu111 (Figure 4B). A metal ion, possibly a magnesium or calcium ion from the crystallization solution, is observed in some of the ternary complexes, including GenN-SAH-KanBm, and it is coordinated by the side chains of Glu98 from L1, Asp104 from L8, and by four water molecules (Supporting Information Figure 5). This ion is not seen in all ternary complex crystal structures, and its location is too remote from the active site to support its playing any direct catalytic role.

A ternary complex of GenN-SAH-Tris was adventitiously crystallized from the cocrystallization trial of GenN and SAM. The Tris molecule occupies the binding site of the substrate DAA2 so that the primary amino group is at the position of the 3'-NH₂ and one of its three hydroxyl groups is at the 4'-OH position (Supporting Information Figure 6A). Replacement of the Tris buffer with the HEPES buffer yielded crystals of the GenN-SAH binary complex, with no observable effect on the structure (Supporting Information Figure 6B). Crystals were also obtained of GenN with SAH and the advanced gentamicin intermediates X2 and G418, which unlike DAA2 already bear a

3''-N-methyl group and a 4''-C-methyl group, as well as a 6'-methyl group in the case of G418. These structures are essentially superimposable on the ternary complex with SAH and DAA2. Notably, the 4''-C-methyl group of X2 and G418 does not clash sterically with any active site residues (Supporting Information Figures 7A,B and 8), a hint that GenN might tolerate substrates bearing an equivalent modification at this position of ring II.

Residues Potentially Involved in the Catalytic Mechanism of GenN. Methyl transfer in SAM-dependent methyltransferases requires the close approach (to within about 3 Å) and precise orientation of the substrates to promote S_N2-like in-line nucleophilic attack by the acceptor on the methyl group of SAM.^{1,34} In the GenN-SAH-DAA2 ternary complex, the carbonyl of the amide side chain of Asn194 forms a hydrogen bond with the 3''-amino group of DAA2 (2.9 Å), helping to activate the amino group for nucleophilic attack on the electron-deficient methyl group of SAM. Two more hydrogen bonds, between the 3''-amine of the DAA2 and the main chain amide oxygen of Ser195 (3.1 Å) and with the carboxylate side chain of Asp107 (3.5 Å), reinforce the nucleophilicity of the 3''-nitrogen and would help stabilize the positive charge on this center arising during methyl transfer. At the same time, the amino group of the Asn194 carboxamide side chain closely (2.7 Å) interacts with the carboxyl group of SAM/SAH (Figure 5A), a potentially crucial interaction to bring the two substrates together for the methyl transfer to occur. The distance found between the 3''-amine of the DAA2 and the sulfonium moiety of SAH is 3.5 Å (Figure 4A), well within the expected range.¹ A kink caused by Pro196 plays a key role in aligning the backbone amide NH group of Thr197 to make a hydrogen bond (2.9 Å) to the backbone carbonyl of Ser195, stabilizing the interaction between Ser195 and the 3''-amine. The role played by the "NSPT" (Asn194-Ser195-Pro196-Thr197) motif in GenN (Figure 5A and Supporting Information Figure 1) is similar to that of the conserved (D/N)PPY motif in the protein N(5)-glutamine methyltransferase PmcC/HemK, which positions the amide nitrogen of the glutamine residue.¹⁸ The same catalytic strategy has been reported for *TaqI* DNA methyltransferase.³⁵⁻³⁷ As shown in Figure 5B, a 100% conversion of DAA2 (10 nmoles) to gentamicin A by wild-type GenN (0.15 nmoles) was obtained after 10 min of incubation at 30 °C. A conservative Asp107 to Asn107 mutant of GenN (D107N) exhibited only 23% of the activity under the same assay conditions. Replacing the Asn194 with Asp (N194D), which presumably still retains the ability to deprotonate the 3''-amine but lost the interaction with the carboxyl group of SAM/SAH (Figure 5A), significantly decreased the activity to around 10% of the wild type enzyme. Therefore, none of these residues is uniquely essential for catalysis, consistent with a mechanism for catalysis in which numerous active site interactions combine to define the productive conformation of the substrates. The stability of the D107N and N104D GenN mutants was probed by circular dichroism, and characteristic curves for a protein containing both α helices and β sheets were obtained, indicating the integrity of the mutant proteins (Supporting Information Figure 9A-C).

The Structural Basis for Kanamycin B and Tobramycin As Alternative Substrates for GenN. We have previously shown¹¹ that GenN is able to methylate both KanB and Tob to produce, respectively, 3''-N-methylkanamycin B (KanBm) and 3''-N-methyltobramycin (Tobm). Both kanamycin and tobra-

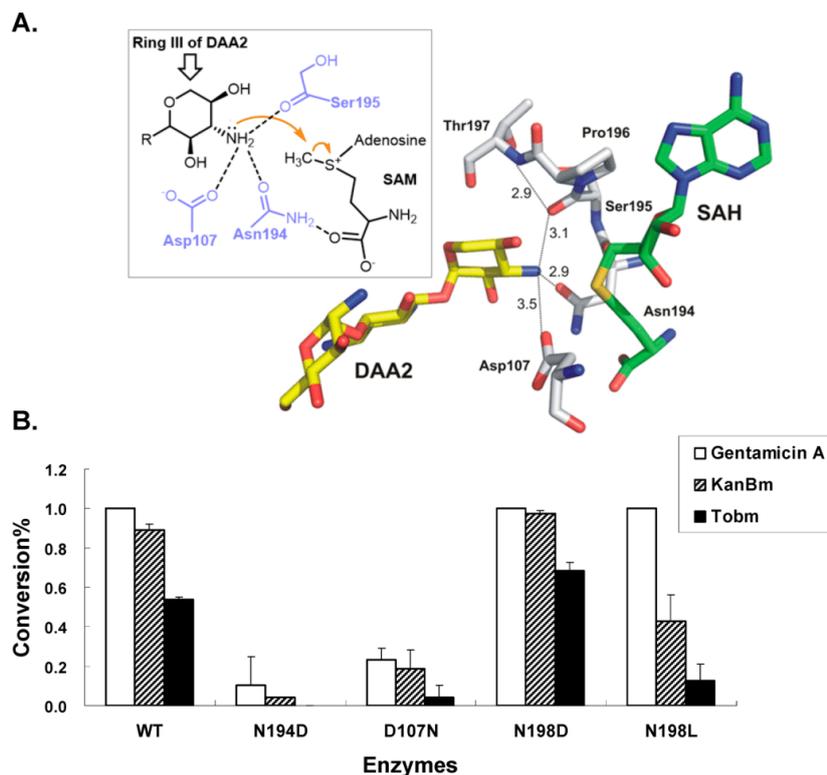


Figure 5. Putative catalytic residues of GenN and the effect of their mutation on the activity of GenN. (A) NSPT motif and proposed catalytic mechanism of GenN. (B) 3'-N-methylation of DAA2, kanamycin B, and tobramycin catalyzed by wild-type GenN and its mutants (N194D, D107N, N198D, and N198L) after 10 min incubation at 30 °C. The error bars stand for standard deviation of duplicate data points.

mycin (Figure 1) are analogues of DAA2 that differ in having an extra hydroxymethyl group at the C4'' position, and tobramycin also lacks the 3'-hydroxy group (Figure 1B). Crystals of ternary complexes of GenN–SAH–KanB, GenN–SAH–KanBm, and GenN–SAH–Tobm (Supporting Information Figure 7C–E) were obtained by cocrystallization with the alternative substrates in the presence of SAM. The presence of KanBm in the GenN active site reveals that methyl transfer occurred to some extent during the process of crystallization. The structures of all these complexes were very similar to the structures of the binary complex GenN–SAH and the ternary complexes GenN–SAH–DAA2 and GenN–SAH–Tris, with near-identical orientation of the ligands within the active site. This suggests a relatively rigid structure of GenN unaffected by the binding of substrates/products, in contrast with certain other methyltransferases where loops poorly defined in the structure of the binary enzyme–SAH complex become well-ordered in ternary complexes.^{22,37,38}

A comparison of the conformation of active site residues in the several ternary complexes, and their likely hydrogen-bonding interactions with the aminoglycoside substrate reveal a plausible basis for the initially surprising ability of GenN to methylate kanamycin B and tobramycin. Although the hydrogen bond observed between the nucleophilic 3'-amino group of DAA2 and the side chain of Asp107 is missing in the structures of GenN–SAH–KanB, GenN–SAH–KanBm, and GenN–Tobm–SAH, this is compensated by a new hydrogen

bond donated from the 4''-hydroxymethyl group of KanB or Tob to the side chain carboxamide of Asn198 (Figure 6). As a

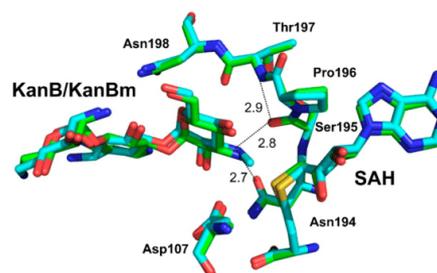


Figure 6. Binding of kanamycin B, 3'-N-methylkanamycin B, and SAH in GenN–SAH–KanB (green) and GenN–SAH–KanBm (light blue) complexes. The distance between the 3'-N of kanamycin B and the interacting NSPT motif is indicated.

result, the 3''-amino group in these complexes remains at almost the same position as in GenN–SAH–DAA2 and is still the most chemically reactive and best positioned nucleophile in the vicinity of the methyl group of SAM (Figure 6). A total of 89% and 54% of KanB and Tob, respectively, were methylated by wild-type GenN after incubation at 30 °C for 10 min (Figure 5B). The weaker activity of GenN on KanB and Tob than on

DAA2 could be explained by the fact that only two residues (the side chain of Asn194 and the backbone carbonyl of Ser195), instead of three as with DAA1, are carrying out the deprotonation of the target 3'-amine. It is therefore not surprising that the N194D mutation was more detrimental to the activity of GenN toward KanB and Tob (Figure 5B). N198L mutation did not affect the activity of GenN on DAA2. The same mutant, however, was significantly less active on KanB and Tob. Conservative mutant N198D, which presumably is still able to hydrogen bond with the 4'-hydroxymethyl group of KanB or Tob, showed similar activity to the wild-type enzyme (Figure 5B). These observations support the notion that the interactions between the Asp198 side chain and the 4'-hydroxymethyl group of KanB or Tob plays a role in stabilizing the binding of these substrate analogs in the enzyme.

Conclusion. Aminoglycosides are clinically valuable natural products, and gentamicin is one of the most functionalized molecules of this group. Gentamicin is of particular interest due to its effectiveness against sepsis caused by Gram-negative bacteria and the potential of related metabolites in the treatment of human inherited diseases that are associated with premature termination codons.³⁹ The biosynthesis of gentamicin has been intensively studied over the past few years, and several methyltransferases have been characterized *in vivo* and *in vitro*, including the class I SAM-dependent *N*-methyltransferase GenN, which has low sequence similarity to any other *N*-methyltransferase. The fact that GenN is active against alternate aminoglycoside substrates opens the possibility of exploring its use to generate novel methylated aminoglycoside derivatives. In the class I SAM-dependent methyltransferases, a highly conserved SAM-binding fold has evolved to accommodate a multiplicity of catalytic mechanisms, including metal-dependent catalysis, involvement of a specific general base, electrostatic interactions, and deployment of numerous hydrogen-bond interactions to stabilize the transition state. The structure of GenN described herein has provided the first insight into the structure, function, and mechanism of *N*-methyltransferases handling highly basic intermediates in aminoglycoside biosynthesis. The GenN structure has several special features, not observed in other *N*-methyltransferases, which confer its ability to bind polycationic molecules. In addition, a GenN mechanism of catalysis is proposed for which support has been gained by analysis of the activity of specific mutants. Finally, this work has also allowed the rationalization of the previous finding of excellent GenN activity against KanB and Tob and provides the starting point for future efforts to harness the enzyme for production of novel aminoglycosides.

METHODS

Cloning, Expression, and Purification of GenN. The *genN* gene from *Micromonospora echinospora* ATCC15835 was cloned into plasmid pET28a(+), expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells (Novagen), and purified to apparent homogeneity by nickel-NTA affinity chromatography and gel filtration as previously described.¹¹ The N-terminal His-tag was retained in subsequent experiments. Briefly, *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the GenN expression plasmid were grown at 37 °C to an A_{600} of 0.6–0.8. The overexpression of GenN was induced by the addition of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (0.2 mM) and culturing at 18 °C for 20 h. Cells were harvested by centrifugation (4000g, 4 °C, 30 min) and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl in the presence of lysozyme (1 mg mL⁻¹), DNase I (1 mg mL⁻¹) and phenylmethanesulfonyl fluoride (10 mM). Cells were disrupted by sonication (5 min with a 50% duty cycle), and the lysate was clarified by

centrifugation (15 000g, 4 °C, 1 h). The supernatant was passed through a 5 mL IMAC column (GE Healthcare) charged with nickel and previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and 150 mM NaCl. GenN was eluted using a linear gradient of imidazole (up to 500 mM) in a buffer of 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and 150 mM NaCl on an Äkta Purifier (GE Healthcare). Fractions containing GenN were concentrated using Amicon-Ultra Centrifugal Filters (Millipore) and further purified by gel filtration on a 16/60 Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and 150 mM NaCl. Fractions containing GenN were concentrated to 15–20 mg mL⁻¹, and the enzyme was stored at –80 °C until use.

Crystallization and Diffraction. Crystallization trials were carried out using the sitting-drop method. GenN at 10 mg mL⁻¹ was incubated in the presence of 5 mM SAM and submitted to crystallization screening using Crystal Screens I and II and SaltRx (Hampton Research), Wizards I and II and Precipitant Synergy (Emerald Biosystem), and JCSG+ and PACT (Qagen). The initial trials were performed using a Honeybee robot at the crystallization facility of LNBio-Campinas-Brazil using the sitting drop method in 96 well plates. The drops had a total volume of 0.4 μ L, comprising equal volumes of protein solution and well solution. The plates were stored in an automated imaging system (Rocker Imager 1000, Formulatrix) at 20 °C. Crystals of GenN appeared after 3–4 days, and the best conditions were optimized manually by hanging drop vapor diffusion using 24 well Linbro plates. The best and most reproducible crystallization conditions for GenN were (1) 0.1 M MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 20% (v/v) PEG 400, 20% (w/v), and PEG 8000 and (2) 0.2 M CaCl₂, 0.1 M HEPES (pH 7.0), and 20% (w/v) PEG 6000. The crystals were allowed to grow for approximately 10 days. To obtain the structure of GenN in ternary complex with different aminoglycosides and SAH, the protein was incubated for 10 min in the presence of 5 mM SAM and 10 mM of the aminoglycoside ligands, KanB, X2, Tob, G418, and DAA2. DAA2 was isolated and purified from a fermentation culture of the Δ genN mutant of ATCC15835.¹¹ The identity and the purity of DAA2 was confirmed by LC-ESI-HRMS (Supporting Information, Method 1 and Figure 10). All other aminoglycosides used are commercially available products (KanB and X2 from TOKU-E and Tob and G418 from Sigma). All the ternary complexes with SAH and various aminoglycoside ligands were crystallized under condition 1, while the crystals of the binary complex with SAH were obtained under condition 2.

Data Collection and Processing and Structure Determination. Data collection of GenN crystals was carried out at different Synchrotron facilities as indicated in Table S1. The data sets were processed using the program XDS⁴⁰ and scaled using AIMLESS⁴¹ from the CCP4i suite.⁴² The structure of GenH-SAH-Tris was determined by single wavelength anomalous (SAD) diffraction using the incorporation of iodine atoms. For this, sodium iodide was added (to 100 mM) to a well solution containing native crystals of GenN, and the mixture was incubated for 5 min. The anomalous signal was checked by the program XDS,⁴⁰ and the structure determination was performed using the program Phaser and AutoSol⁴³ from the Phenix suite.⁴⁴ The structure was refined using Phenix.refine⁴⁵ and REFMAC.⁴⁶ Manual building, visual inspection, and analysis were carried out using COOT,⁴⁷ and further analysis and figure preparation used the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 (Schrodinger, LLC). The quality of the structure was checked using the program Molprobit (Supporting Information Table 1).⁴⁸

GenN Mutagenesis and Assay of Native and Mutant Enzymes. Site-directed mutants of GenN were generated using the QuikChange method (Stratagene; see Supporting Information Table 2 for sequences of PCR primers) using the wild-type *genN* gene inserted in a pEX-A2 vector (Eurofins) between the NdeI and BamHI sites as the template. PCR amplifications were carried out using HF Pfuusion DNA polymerase (NEB) with 30 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 2 min followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The resulting PCR products were digested with DpnI at 37 °C for 1 h to remove the template before being introduced into *E. coli* Novablue cells

(Novagen). The NdeI/BamHI fragments of the plasmids bearing the desired mutation were purified and inserted into plasmid pET28a(+), and the recombinant plasmids were verified by DNA sequencing. The mutant enzymes were expressed and purified from *E. coli* as for the wild-type GenN. Circular dichroism measurements were performed to assess the stability of the GenN mutants using a J810 spectropolarimeter (JASCO) with a Peltier temperature controller and a quartz cuvette of 0.04 cm optical path. The wild type and mutant GenN proteins were measured at a concentration of 0.166 mg mL⁻¹ in a buffer constituted of 10 mM potassium phosphate and 150 mM NaCl, at pH 7.5. Spectra were obtained between the wavelengths of 184 and 260 nm with a scanning speed of 50 nm min⁻¹. Origin 2016 was used to plot the curves. End-point assays of GenN activity were carried out using 2 mM SAM as a methyl donor, 0.4 mM substrate, and 10 μM enzyme in 50 mM Tris-HCl, at pH 7.5 at 30 °C for 10 min. Product formation was monitored by LC-ESI-MS (Supporting Information Method 2).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscchembio.7b00466.

Figures S1–S10, Tables S1 and S2, and supplementary Methods (PDF)

Accession Codes

Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the PDB under accession codes PDB: SUAT, SU0N, STYQ, SU18, SU1E, SU0T, SU19, SU1I.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mvbdias@usp.br.

ORCID

Fanglu Huang: 0000-0002-0320-299X

Yuhui Sun: 0000-0002-9258-2639

Marcio Vinicius Bertacine Dias: 0000-0002-5312-0191

Author Contributions

P.d.S.B. performed the expression, purification, structure determination, and analysis of all GenN structure complexes. F.H. performed the cloning, mutagenesis experiments, and activity assays of wild type and mutant enzymes. S.L. and Y.S. purified and checked the quality of DAA2. M.V.B.D., P.F.L., F.H., and P.d.S.B. wrote the manuscript, and M.V.B.D. led the project.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo under grants 2010/15971-3, 2014/50324-0, and 2015/09188-8 to M.V.B.D. and fellowship 2014/07843-6 to P.S.B.; by a project grant from the Medical Research Council, UK (G1001687) to P.F.L.; and by the 973 and 863 programs from the Ministry of Science and Technology of China, National Science Foundation of China, and from the Translational Medical Research Fund of Wuhan University School of Medicine to Y.S.

■ REFERENCES

- (1) Liscombe, D. K., Louie, G. V., and Noel, J. P. (2012) Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1238–1250.
- (2) Chen, J. M., Hou, C., Wang, G., Tsodikov, O. V., and Rohr, J. (2015) Structural insight into MtmC, a bifunctional ketoreductase-methyltransferase involved in the assembly of the mithramycin trisaccharide chain. *Biochemistry* 54, 2481–2489.
- (3) Hao, Y., Blair, P. M., Sharma, A., Mitchell, D. A., and Nair, S. K. (2015) Insights into methyltransferase specificity and bioactivity of derivatives of the antibiotic plantazolicin. *ACS Chem. Biol.* 10, 1209–1216.
- (4) Tsodikov, O. V., Hou, C., Walsh, C. T., and Garneau-Tsodikova, S. (2015) Crystal structure of O-methyltransferase CalO6 from the calicheamicin biosynthetic pathway: a case of challenging structure determination at low resolution. *BMC Struct. Biol.* 15, 13.
- (5) Rodriguez, M. J., Snyder, N. J., Zweifel, M. J., Wilkie, S. C., Stack, D. R., Cooper, R. D., Nicas, T. I., Mullen, D. L., Butler, T. F., and Thompson, R. C. (1998) Novel glycopeptide antibiotics: N-alkylated derivatives active against vancomycin-resistant enterococci. *J. Antibiot.* 51, 560–569.
- (6) Schönherr, H., and Cernak, T. (2013) Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* 52, 12256–12267.
- (7) Houghton, J. L., Green, K. D., Chen, W., and Garneau-Tsodikova, S. (2010) The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *ChemBioChem* 11, 880–902.
- (8) Park, S. R., Park, J. W., Ban, Y. H., Sohng, J. K., and Yoon, Y. J. (2013) 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 30, 11–20.
- (9) Bockenbauer, D., Hug, M. J., and Kleta, R. (2009) Cystic fibrosis, aminoglycoside treatment and acute renal failure: the not so gentle min. *Pediatr. Nephrol.* 24, 925–928.
- (10) Unwin, J., Standage, S., Alexander, D., Hosted, T., Jr., Horan, A. C., and Wellington, E. M. (2004) Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex. *J. Antibiot.* 57, 436–445.
- (11) Huang, C., Huang, F., Moison, E., Guo, J., Jian, X., Duan, X., Deng, Z., Leadlay, P. F., and Sun, Y. (2015) Delineating the biosynthesis of gentamicin X2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex. *Chem. Biol.* 22, 251–261.
- (12) Ni, X., Zong, T., Zhang, H., Gu, Y., Huang, M., Tian, W., and Xia, H. (2016) Biosynthesis of 3'-demethyl-gentamicin C components by *genN* disruption strain of *Micromonospora echinospora* and test their antimicrobial activities in vitro. *Microbiol. Res.* 185, 36–44.
- (13) Karki, S., Kim, J. Y., Park, S. H., and Kwon, H. J. (2012) Gene inactivation study on *gntK*, a putative C-methyltransferase gene in gentamicin biosynthesis from *Micromonospora echinospora*. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji* 55, 439–442.
- (14) Hong, W., and Yan, L. (2012) Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 349–356.
- (15) Kim, H. J., McCarty, R. M., Ogasawara, Y., Liu, Y. N., Mansoorabadi, S. O., LeVieux, J., and Liu, H. W. (2013) GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 8093–8096.
- (16) Guo, J., Huang, F., Huang, C., Duan, X., Jian, X., Leeper, F., Deng, Z., Leadlay, P. F., and Sun, Y. (2014) Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis. *Chem. Biol.* 21, 608–618.
- (17) Hong, W. R., Ge, M., Zeng, Z. H., Zhu, L., Luo, M. Y., Shao, L., and Chen, D. J. (2009) Molecular cloning and sequence analysis of the sisomicin biosynthetic gene cluster from *Micromonospora inyoensis*. *Biotechnol. Lett.* 31, 449–455.
- (18) Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., and Cheng, X. (2003) Many paths to methyltransferase: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* 28, 329–335.
- (19) Struck, A. W., Thompson, M. L., Wong, L. S., and Micklefield, J. (2012) S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem* 13, 2642–2655.

- (20) Zhang, Q., and van der Donk, W. A. (2012) Catalytic promiscuity of a bacterial α -N-methyltransferase. *FEBS Lett.* 586, 3391–3397.
- (21) Siegrist, J., Netzer, J., Mordhorst, S., Karst, L., Gerhardt, S., Einsle, O., Richter, M., and Andexer, J. N. (2017) Functional and structural characterisation of a bacterial O-methyltransferase and factors determining regioselectivity. *FEBS Lett.* 591, 312–321.
- (22) Gana, R., Rao, S., Huang, H., Wu, C., and Vasudevan, S. (2013) Structural and functional studies of S-adenosyl-L-methionine binding proteins: a ligand-centric approach. *BMC Struct. Biol.* 13, 6.
- (23) Holm, L., and Sander, C. (1997) Dali/FSSP classification of three-dimensional protein folds. *Nucleic Acids Res.* 25, 231–234.
- (24) Huang, L., Hung, L., Odell, M., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S. H. (2002) Structure-based experimental confirmation of biochemical function to a methyltransferase, MJ0882, from hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *J. Struct. Funct. Genomics* 2, 121–127.
- (25) Pioszak, A. A., Murayama, K., Nakagawa, N., Ebihara, A., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2005) Structures of a putative RNA 5-methyluridine methyltransferase, *Thermus thermophilus* TTHA1280, and its complex with S-adenosyl-L-homocysteine. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 867–874.
- (26) Graille, M., Heurgué-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Scrima, N., Ulryck, N., van Tilbeurgh, H., and Buckingham, R. H. (2005) Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC. *Mol. Cell* 20, 917–927.
- (27) Goto-Ito, S., Ito, T., Ishii, R., Muto, Y., Bessho, Y., and Yokoyama, S. (2008) Crystal structure of archaeal tRNA(m¹G37)-methyltransferase aTrmS. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 72, 1274–1289.
- (28) Jansson, A., Koskineniemi, H., Mäntsälä, P., Niemi, J., and Schneider, G. (2004) Crystal structure of a ternary complex of DnrK, a methyltransferase in daunorubicin biosynthesis, with bound products. *J. Biol. Chem.* 279, 41149–41156.
- (29) Robin, A. Y., Giustini, C., Graindorge, M., Matringe, M., and Dumas, R. (2016) Crystal structure of norcloaurine-6-O-methyltransferase a key rate-limiting step in the synthesis of benzyloisoquinoline alkaloids. *Plant J.* 87, 641–653.
- (30) Wolters, S., Neeb, M., Berim, A., Schulze-Wischeler, J., Petersen, M., and Heine, A. (2013) Structural analysis of coniferyl alcohol 9-O-methyltransferase from *Linum nodiflorum* reveals a novel active-site environment. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 69, 888–900.
- (31) Wada, K., Yamaguchi, H., Harada, J., Niimi, K., Osumi, S., Saga, Y., Oh-Oka, H., Tamiaki, H., and Fukuyama, K. (2006) Crystal structures of BchU, a methyltransferase involved in bacteriochlorophyll c biosynthesis, and its complex with S-adenosylhomocysteine: implications for reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 360, 839–849.
- (32) Chen, X. M., Ploux, O., and Liu, H. W. (1996) Biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses: in vivo and in vitro evidence for protein-protein interaction between CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose 3-dehydrase (E1) and its reductase (E3). *Biochemistry* 35, 16412–16420.
- (33) Lv, M., Ji, X., Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Su, L., Ding, W., Deng, Z., Yu, Y., and Zhang, Q. (2016) Characterization of a C3 deoxygenation pathway reveals a key branch point in aminoglycoside biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 6427–6435.
- (34) O'Hagan, D., and Schmidberger, J. W. (2010) Enzymes that catalyze S_N2 reaction mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* 27, 900–918.
- (35) Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R. S., Scheidig, A. J., and Weinhold, E. (2001) Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M.TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nat. Struct. Biol.* 8, 121–125.
- (36) Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R. M., and Cheng, X. (1997) Structure of Pvu II DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Res.* 25, 2702–2715.
- (37) Demirci, H., Belardinelli, R., Seri, E., Gregory, S. T., Gualerzi, C., Dahlberg, A. E., and Jogl, G. (2009) Structural rearrangements in the active site of the *Thermus thermophilus* 16S rRNA methyltransferase KsgA in a binary complex with 5'-methylthioadenosine. *J. Mol. Biol.* 388, 271–282.
- (38) Torres, M. A., Hoffarth, E., Eugenio, L., Savtchouk, J., Chen, X., Morris, J. S., Facchini, P. J., and Ng, K. K. (2016) Structural and functional studies of pavine N-methyltransferase from *Thalictrum flavum* reveal novel insights into substrate recognition and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 291, 23403–23415.
- (39) Nudelman, I., Glikin, D., Smolkin, B., Hainrichson, M., Belakhov, V., and Baasov, T. (2010) Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of Geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3735–3746.
- (40) Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- (41) Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 69, 1204–1214.
- (42) Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
- (43) Terwilliger, T. C., Adams, P. D., Read, R. J., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Zwart, P. H., and Hung, L. W. (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 65, 582–601.
- (44) McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
- (45) Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., and Adams, P. D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 68, 352–367.
- (46) Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMACS for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 67, 355–367.
- (47) Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- (48) Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 12–21.

APÊNDICE E – Artigo: Crystal Structure of GenD2, an NAD-Dependent Oxidoreductase Involved in the Biosynthesis of Gentamicin



Cite This: *ACS Chem. Biol.* 2019, 14, 925–933

pubs.acs.org/acschemicalbiology

Articles

Crystal Structure of GenD2, an NAD-Dependent Oxidoreductase Involved in the Biosynthesis of Gentamicin

Natalia Cerrone de Araújo,[†] Priscila dos Santos Bury,[†] Maurício Temotheo Tavares,[‡] Fanglu Huang,^{§,¶} Roberto Parise-Filho,[‡] Peter Leadlay,[§] and Marcio Vinicius Bertacine Dias^{*,†,||}

[†]Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, Brazil

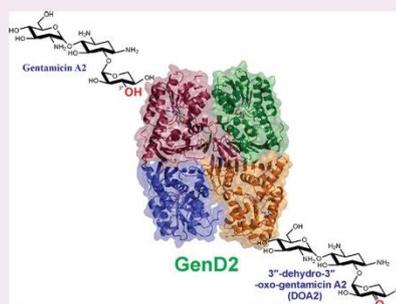
[‡]Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue 580, 05508-900 São Paulo, Brazil

[§]Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, U.K.

^{||}Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, U.K.

Supporting Information

ABSTRACT: Gentamicins are clinically relevant aminoglycoside antibiotics produced by several *Micromonospora* species. Gentamicins are highly methylated and functionalized molecules, and their biosynthesis include glycosyltransferases, dehydratase/oxidoreductases, aminotransferases, and methyltransferases. The biosynthesis of gentamicin A from gentamicin A2 involves three enzymatic steps that modify the hydroxyl group at position 3'' of the unusual garosamine sugar to provide its substitution for an amino group, followed by an *N*-methylation. The first of these reactions is catalyzed by GenD2, an oxidoreductase from the Gfo/Idh/MocA protein family, which reduces the hydroxyl at the C3'' of gentamicin A to produce 3''-dehydro-3''-oxo-gentamicin A2 (DOA2). In this work, we solved the structure of GenD2 in complex with NAD⁺. Although the structure of GenD2 has a similar fold to other members of the Gfo/Idh/MocA family, this enzyme has several new features, including a 3D-domain swapping of two β -strands that are involved in a novel oligomerization interface for this protein family. In addition, the active site of this enzyme also has several specialties which are possibly involved in the substrate specificity, including a number of aromatic residues and a negatively charged region, which is complementary to the polycationic aminoglycoside-substrate. Therefore, docking simulations provided insights into the recognition of gentamicin A2 and into the catalytic mechanism of GenD2. This is the first report describing the structure of an oxidoreductase involved in aminoglycoside biosynthesis and could open perspectives into producing new aminoglycoside derivatives by protein engineering.



Aminoglycosides are antibiotics that usually target the bacterial ribosome causing decoding errors and consequently leading to inaccurate mRNA translation and/or premature termination of protein synthesis.¹ Gentamicins are among the most clinically relevant antibiotics of this class to treat severe infections caused by Gram-negative bacteria.² The commercial form of gentamicin is composed of a mixture of five different compounds (gentamicin C1a, C2b, C2a, C2, and C1) that differ in the level of methylation in their unusual sugar rings.³ Gentamicins have also been demonstrated to have effects on cancer cells by delaying the cell growth and inducing cell death, indicating that this antibiotic has other pharmacological use.^{4–6} In spite of their benefits, gentamicins, similar to other aminoglycosides, also have several side effects, including reversible nephrotoxicity and irreversible hearing loss.⁷ Gentamicins are highly modified trisaccharides that contains a central 2-deoxystreptamine (2-DOS) ring as an aminocyclitol aglycone (ring I), which is further decorated by a purpuros-

amine (ring II) and garosamine (ring III) at positions C4 and C6, respectively,^{8,9} (Figure 1). Gentamicins are produced by several *Micromonospora* species, including *M. echinospora*,¹⁰ and their biosynthesis has been extensively studied,^{3,8,10,11} although the last steps for the gentamicin complex C are not yet completely understood.¹² A minimal set of genes responsible for the biosynthesis of gentamicin A, including the biosynthetic intermediates, was elucidated recently.³ The biosynthesis of gentamicin A from gentamicin A2 occurs in three steps, which involves the dehydrogenation of the 3''-hydroxyl group on the ring III by GenD2 using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as a cofactor, the resulting C3''-keto group is transaminated by GenS2 followed by the methylation at the 3''-amine by GenN, an *N*-methyltransfer-

Received: February 12, 2019

Accepted: April 17, 2019

Published: April 17, 2019

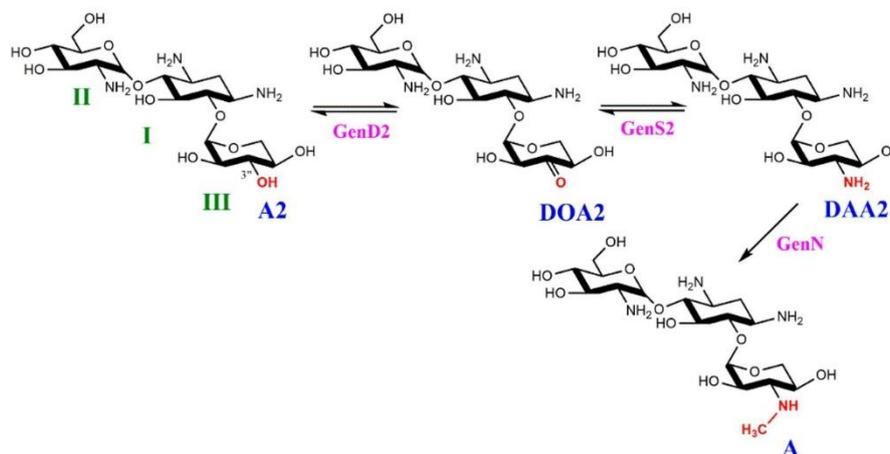


Figure 1. Biosynthesis of gentamicin A from gentamicin A2. The ring I is 2-DOS, II is the purpurosamine, and III is the garosimine. A2, gentamicin A2; DOA2, 3''-dehydro-3''-oxo-gentamicin A2; DAA2, 3''-dehydro-3''-amino-gentamicin A2; A, gentamicin A. GenD2 is the oxidoreductase, GenS2 is the aminotransferase, and GenN is the *N*-methyltransferase.

ase.³ (Figure 1). The functions of these enzymes have been validated *in vivo* and *in vitro*.³ The crystal structure of GenN has been solved and its catalytic mechanism was proposed recently.¹³ Interestingly, Huang et al.³ were not able to prove the activity of any of these enzymes individually, and the conversion of gentamicin A2 to gentamicin A was only possible when the three enzymes were incubated together in the presence of NAD⁺, *L*-glutamate, and *S*-adenosyl methionine (SAM). It is possible to speculate that these enzymes might form a protein complex¹³ or the activity of GenD2 and GenS2 could be inhibited by low levels of their own products, and the activity of GenN could restore the activity of the two upstream enzymes.³ GenD2 is the 3''-oxidoreductase that catalyzes the oxidation of the C3''-hydroxyl group of gentamicin A to produce DOA2, which is the substrate for the transaminase GenS2.³ GenD2 only shows a high sequence identity to Sis12 (97%), TobD2 (56.6%), and KanD2 (48.7%) involved in the biosynthesis of the aminoglycosides sisomycin, tobramycin, and kanamycin, respectively.¹⁴ On the other hand, these four enzymes show modest similarity to other dehydrogenases or oxidoreductases, including several ones that have been structurally characterized. GenD2 belongs to the Gfo/Idh/MocA family of oxidoreductases/dehydratases based on its sequence, in which the proteins have a fold composed of two domains, a Rossmann-like or nucleotide binding domain and an oligomerization C-terminal domain.¹⁵ However, most of the Gfo/Idh/MocA family enzymes are involved in the oxidation of monosaccharides. In contrast, gentamicin A2 is a pseudotrisaccharide, and consequently, GenD2 may have a number of specializations for its substrate recognition. In addition, only a few oxidoreductases that act on position C3''-hydroxyl groups from sugars were so far characterized, indicating a lack of understanding of these enzymes.^{16,17}

In order to understand the structure of GenD2 and provide insights into its substrate specificity and catalytic mechanism, herein we have determined the 3D structure of the C3''-oxidoreductase GenD2 in complex with NAD⁺ and performed docking simulations. In addition, we have confirmed the preference of GenD2 for NAD⁺ using isothermal titration calorimetry (ITC) and the stabilization of the GenD2 by

different aminoglycoside-like substrates through differential scanning fluorimetry (DSF).

RESULTS AND DISCUSSION

Overall Structure. GenD2 was successfully expressed in BL21(DE3) cells, and the enzyme had about 95% of purity after the gel filtration purification step, in which the enzyme eluted as a single peak (Figure S1, Supporting Information (SI)). Crystals for the enzyme were obtained in several conditions, although the unique one that was reproducible contained a high concentration of sodium formate.

The GenD2 structure in complex with NAD⁺ was solved by molecular replacement using the MrBUMP server¹⁸ at a resolution of 2.4 Å. Attempts to solve the structure using a single model of oxidoreductases from the Protein Data Bank were unsuccessful. GenD2 crystals belong to the space group P 31 2 1 and have six protomers in the asymmetric unit; although the proteins eluted as a tetramer by analytical gel filtration (figure not shown), these molecules do not form the canonical glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) tetramer in the asymmetric unit. However, this tetrameric quaternary structure could be obtained by applying the symmetrical operations, and this has a 222-point symmetry.

All six protomers of the asymmetric unit have almost the entire polypeptide chain (340 residues), with exception of the last alanine, and the root-mean-square deviation (RMSD) between them is about 0.3 Å, indicating a rigid and restrained structure. Table 1 shows the X-ray data analyses, refinement, and stereochemistry quality. The sequence of GenD2 has a modest similarity to other oxidoreductase and dehydratase structures, with about 24 and 23% of the identity with GFOR from *Zymomonas mobilis*¹⁹ and with oxidoreductase YvaA from *Bacillus subtilis* (PDB entry, 3GFG; data not published), respectively (Figure 2). However, a search using the server DALI rendered the structure of the oxidoreductase domain from *Kribbella flavida* (PDB entry, 4H3V; data not published) and oxidoreductase WlbA from *Bordetella pertussis*,¹⁷ with a Z-score of 37.5 and 36.7 and RMSD of about 2.0 Å.

GenD2 protomers have a general folding similar to other NAD/NADP dependent oxidoreductases, as described pre-

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics^a

data collection	PDB
PDB entry	6NOR
wavelength (Å)	0.976260
resolution range (Å)	49.95–2.40 (2.49–2.40)
space group	P 31 2 1
unit cell (Å)	124.0, 124.0, 272.6
total reflections	1215767 (53058)
unique reflections	95397 (9371)
multiplicity	12.7 (11.4)
completeness (%)	99.98 (99.86)
mean I/sigma(I)	13.48 (3.38)
Wilson B-factor (Å ²)	33.93
R-merge	0.17 (1.05)
R-meas	0.19 (1.13)
R-pim	0.05 (0.32)
CC1/2	1 (0.78)
	Refinement
R-work	0.174 (0.224)
R-free	0.223 (0.287)
number of non-hydrogen atoms	16099
macromolecules	15399
ligands	264
water	436
protein residues	2049
RMS (bonds) (Å)	0.009
RMS (angles) (°)	1.17
Ramachandran favored (%)	96
Ramachandran outliers (%)	0.49
clashscore	4.12
average B-factor (Å ²)	33.7
macromolecules	33.7
ligands	34.40
solvent	33.40

^aAll numbers in parentheses refer to the high-resolution shell.

viously for GFOR and dihydrodipicolinate reductase (DHPR).¹⁹ The GenD2 protomer has two domains, including an N-terminal domain, which is a Rossmann fold or the nucleotide binding domain, and a C-terminal domain characterized to have a six-stranded β -sheet that participates in both active sites and in oligomerization and further has two α -helices. The C-terminal β -sheet is predominantly hydrophobic, and it is involved in the dimerization through of a back-to-back of a β -sheet from one protomer with the β -sheet from the adjacent protomer forming a 2-fold symmetry axis. The α -helices of the C-terminal domain are in another face of the C-terminal domain β -sheet and form an α/β sandwich. The N-terminal domain is located adjacently to the α -helices of the C-terminal domain (Figure 3A). The superposition of GenD2 to other Gfo/Idh/MocA protein family members indicated that the N-terminal domain is structurally conserved, while the C-terminal domain has more drastic conformational changes (Figure 3B). The most prominent structural difference is in the region between the residues Gly261 to Pro283, which includes the β -strands 7 and 8, that is flipped about 180° in comparison to other oxidoreductase/dehydrase structures.^{17,19,22} These two β -strands are involved in a 3D domain swapping since they are involved in the 8-strand β -sheet commonly found in all members of this protein class. At least to our knowledge, this is the first description of a 3D domain swapping into the Gfo/Idh/MocA protein family involving two β -strands to form a

quaternary structure. However, the description of swapping of other secondary elements has been reported for other members of this protein class, including for GFOR from *Zymomonas mobilis*.¹⁹ The structure of this enzyme has an N-terminal arm which extends to another protomer of the tetramer, and a truncated protein missing the first 31 residues rendered only dimers instead of tetramers and has an impact in the binding of the cofactor, including the preference for NADP or NAD, indicating a key functional role of this extension.²³ Thus, although 3D domain swapping has been related to have a possible physiological relevance, including allosteric regulation, this role in GenD2 has not been studied in this work. In contrast, in other NAD(P) dependent oxidoreductases, such as GFOR and Wlba, this region produces two extra strands of the C-terminal β -sheet to form the intradomain eight-stranded β -sheet. In GenD2, this region also participates in the C-terminal domain β -sheet but in an interdomain mode, and consequently, it is involved in the contact with the C-terminal domain β -sheet of the adjacent protomer to form a continuous β -sheet, with 6 β -strands from one monomer and 2 from the adjacent one. Unlike other members of the Gfo/Idh/MocA protein family, which all strains of the C-terminal domain form a continuous and extensive 16-stranded β -sheet involving two protomers, the C-terminal domain of each GenD2 protomer is not involved to produce a 16-stranded β -sheet, and rather, 4 individual 8-stranded β -sheets in the interface of the tetramer are observed. Due to that, the 8-stranded β -sheets of each protomer of this dimer interface seem to be twisted about 30° in relation to each other in comparison to other proteins from the same family (Figures 3C and S2). The tetramer of GenD2 forms a homooligomer of about 72 × 95 × 50 Å, indicating that the quaternary structure of the protein has an approximately flattened shape (Figure 3D). The main contact for oligomerization is the C-terminal β -sheet, which is back-to-back between two protomers with an extensive hydrophobic interaction and between the other two protomers through the 3D-domain swapping, described above, and which is involved in the inter 8-stranded β -sheet.

Analysis of the electrostatic potential surface of the GenD2 tetramer did not reveal any evident surface for interaction with other enzymes involved in the modification of the C3' position of ring III of gentamicin (Figure S3). Attempts to copurify GenD2 with GenS2 and GenN or to form the complex using cross-linkage assays failed. Whether the activity of GenD2 is dependent on the protein complex formation remains elusive.

Cofactor Preference of GenD2. In order to identify the preference of GenD2 to NAD⁺ or NADP⁺, we have measured the K_D using ITC. GenD2 was titrated against both cofactors, in which only NAD⁺ indicated interaction with the protein, while NADP⁺ did not show any significant heat of interaction (Figure S4). The thermodynamic parameters obtained in the presence of NAD⁺ are shown in Table S1, and the obtained K_D was about 7.1 ± 0.1 μ M, which is consistent with the *in vitro* enzymatic assays³ in which GenD2 is a NAD-dependent oxidoreductase.

The crystal structure of the GenD2–NAD⁺ complex was obtained by incubating the protein in the presence of NAD⁺ during crystallization experiments. As expected, NAD⁺ binds to GenD2 in the N-terminal domain, sitting on the β_1 , β_3 , β_4 , and β_5 strands of the Rossmann fold, and is highly buried in the protein between the N- and C-terminal domains (Figure 4A). The adenine-ribose moiety of NAD⁺ is relatively exposed to the solvent and does not form any hydrogen bond

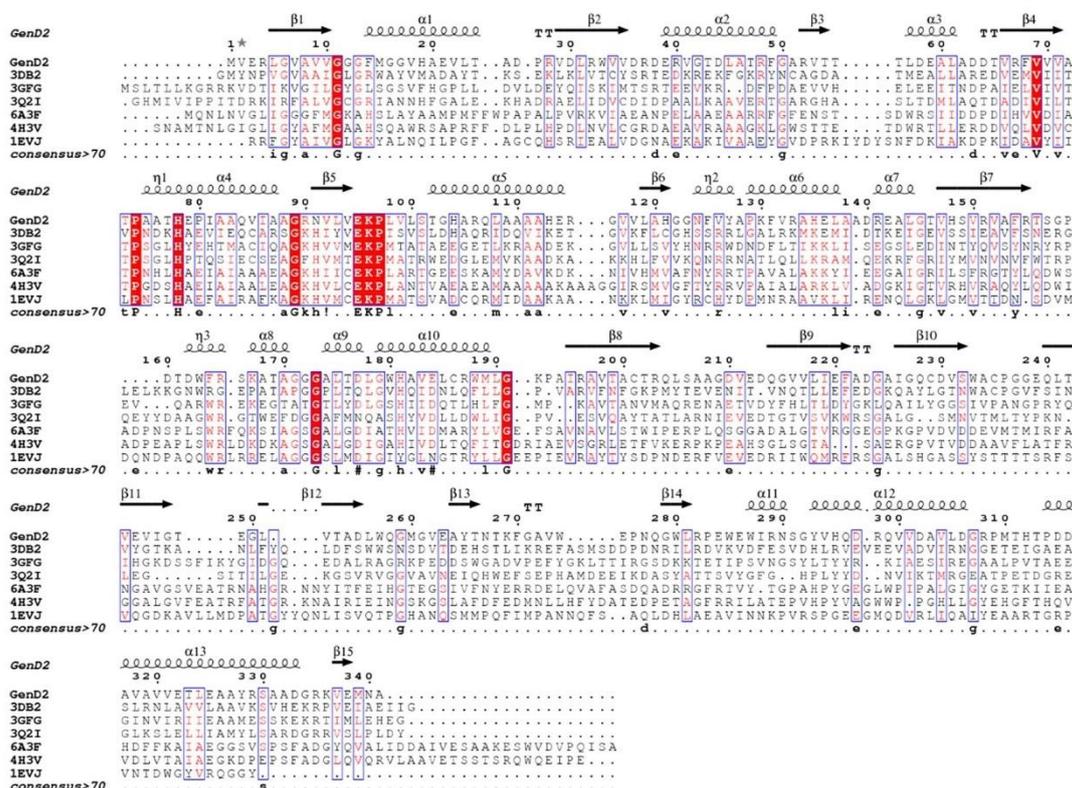


Figure 2. Sequence analysis of GenD2. Alignment of closest homologues of GenD2 rendered by DALI server.²⁰ Amino acids in red boxes are conserved in all sequences. Amino acids in red and inside blue line boxes are conserved in most of the sequences. Amino acids in black are not significantly conserved. The alignment was prepared using the ENDScript server.²¹

interaction with residues of the protein. The phosphoryl group is hydrogen bonded to the main chain nitrogens of Phe14 and Met15 and the nitrogen indole of Trp163. The nicotinamide hydroxyl ribose groups hydrogen interacts with the main chain carbonyl groups of Thr73 and Lys96 and the imidazole side chain of His78. Finally, the nicotinamide group is positioned in the active site and interacts through a hydrogen bond with the side chain of Glu95, Asn124, and Tyr293; the main chain carbonyl group of Gly122; and through a water molecule with the side chain of Glu95, Asn124, and Gln296 (Figure 4B).

Insights into the Substrate Binding and Catalytic Mechanism. Our attempts to obtain a crystal structure of GenD2 in complex with gentamicin homologues, kanamycin and tobramycin, through cocrystallization and soaking assays failed to observe any electron density corresponding to these molecules at the active site. However, we have performed a DSF assay using different aminoglycosides, and most of the tested molecules promoted an increase in the melting temperature of GenD2 ranging from 4.5 °C for paramamine to 10 °C for gentamicin C, suggesting that interactions might occur between GenD2 and these aminoglycosides (Figure S5 and Table S2). The lowest increment of melting temperature observed for paramamine is expected since this compound does not have the ring III, and only 2-DOS (ring I) and ring II contribute to the increase in temperature, indicating a lower affinity of this ligand compared to the other used ligands.

Although various GFO/IDH/MocA family members have been structurally characterized, only a limited number of enzymes that act on C3-hydroxyl groups of sugars have been studied, including Wlba from *Bordetella pertussis* and *Chromobacterium violaceum*, which catalyze the oxidation of UDP-N-acetyl-D-glucosaminuronic acid (UDP-GlcNADcA) to UDP-2-acetamido-2-deoxy-3-oxo-D-glucuronic acid (UDP-3-keto-Glc-NACa).¹⁷ The catalytic mechanism of the enzymes in this class involves an NAD(P)(H)-mediated hydride ion (H⁻) transfer from dehydrogenases to the substrate (reductases).¹⁵ GenD2 was proven to be a dehydrogenase acting on the gentamicin A2 at the C3' position of ring III to produce DOA2 during the biosynthesis of gentamicin A. However, the activity of GenD2 was only observed in the presence of another two enzymes, aminotransferase GenS2 and N-methyltransferase GenN.¹¹ Similar to most of the other members of the Gfo/Idh/MocA protein family, the active site of GenD2 is a solvent-exposed region near the nicotinamide moiety of NAD⁺ between the N- and C-domain. In addition, GenD2 has the conserved motif EKP (Figure 2). The Lys96 in the motif interacts with side chains of Asp177 and His181, and they could be the catalytic triad, as suggested for other GFO/IDH/MocA family members.^{19,24} Trp233 might also play a role in coordinating the position of Asp177 via the interaction between the nitrogen in the indole side chain to the side chain of Asp177 (Figure 5A). In addition,

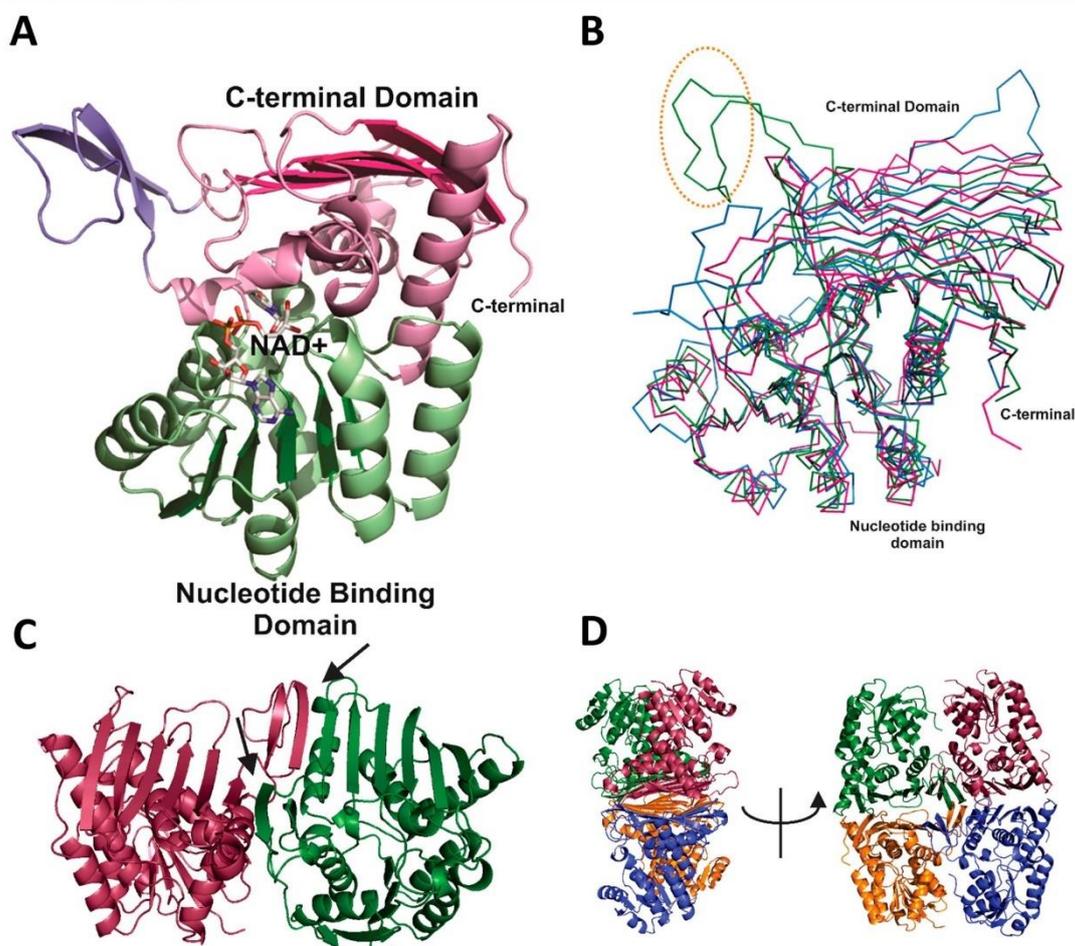


Figure 3. Tertiary and quaternary structure of GenD2. (A) The monomer of GenD2. In green is represented the nucleotide binding domain, in pink is represented the C-terminal domain, and in blue are the two β -strands involved in the 3D-domain swapping. (B) The superposition of GenD2 with the two closest structural homologues from the Gfo/Idh/MocA family. In a dashed orange circle is represented the two β -strands involved in the domain swapping. The GenD2 structure is in green, the 3Q2I PDB entry (WlbA dehydrogenase from *Chromobacterium violaceum*) is in pink, and the 4H3V PDB entry (oxidoreductase from *Kribbella flavida*) is in blue. (C) Dimer interface involving the 3D-domain swapping in GenD2. (D) Quaternary structure of GenD2 in two different perspectives with a rotation of 90° .

Lys96, as observed in other members of Gfo/Idh/MocA protein family oxidoreductases, is located in the N-terminal domain at the end of $\beta 6$. The superposition of the GenD2 holoenzyme with the WlbA dehydrogenase holoenzyme from *Chromobacterium violaceum* in complex with UDP-GlcNAcA suggests that the ring III of gentamicin A2 might adopt a similar position and interacts as the glucose moiety of UDP-GlcNAcA, and the two enzymes could have similar catalytic mechanisms, although WlbA has an asparagine instead an aspartate in the catalytic triad (Figure 5A). Lys96 could act as a catalytic base, abstracting a proton from the C3'-hydroxyl group, and a hydride ion from C3'' oxygen could be transferred to the C4 of the nicotinamide ring of NAD⁺. In addition, the position of the nicotinamide moiety of NAD⁺ is also conserved in GenD2, indicating that the ring III of gentamicin A2 may also bind at the *re* face of this moiety (Figure 5B). Residues Asp160 and Glu239 at the active site

pocket may also be involved in the substrate recognition through their negatively charged side chains, which are complementary to the highly positively charged aminoglycoside substrate (Figure 5C). Furthermore, Asn124, Thr156, and Tyr293 could potentially form hydrogen bonds with the substrate. Finally, several hydrophobic amino acids, Phe14, Phe125, Phe154, Phe164, Trp257, Trp274, and Trp287, could form π -interactions with the substrate rings for the correct positioning at the catalytic cavity (Figure 5D).

Moreover, docking simulations using gentamicin A2 as a ligand corroborated the hypothetical catalytic mechanism of GenD2. The best-ranked pose of gentamicin A2 (Figure 6A) indicated that ring I interacts with GenD2 through two hydrogen bonds, which includes the side chains of Glu239 (not shown) and Tyr293. Ring II is stabilized by a hydrogen bond with Asp160 and further π -interactions with Trp274, Trp287, and Phe14 (not shown). Interestingly, the ring III of

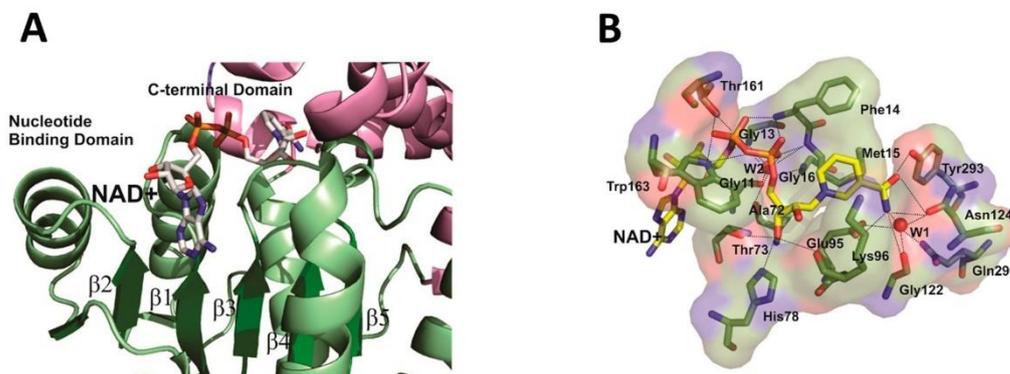


Figure 4. NAD⁺ binding site in GenD2. (A) The binding site of NAD⁺ indicating that NAD⁺ is sitting on the β 1– β 4 on GenD2 structure. (B) NAD⁺ binding site indicating the residues that hydrogen interact with NAD⁺.

gentamicin A2 forms three hydrogen bonds with all amino acids of the proposed catalytic triad, including Lys96, Asp177, and His181, which supports the involvement of these amino acids in the catalysis. The superposition of all docked poses indicates a well-conserved disposition of both ring I and III of gentamicin A2 in the narrow cavity of GenD2, while ring II, which is located in the solvent-exposed region, was able to adopt different conformations due to the entropic profile of the area (Figure 6B). Noteworthy, the C4 of the nicotinamide ring of NAD⁺ and the C3''-hydroxyl group of gentamicin A2 face each other inside the cavity (Figure 6C) and are surrounded by the proposed catalytic triad (Figure 6D). However, a structure of the GenD2 holoenzyme in complex with the substrate or close analogs is required to further validate the proposed binding mode of gentamicin A2 in the GenD2 active site.

Conclusion. The substitution of the hydroxyl to amino groups on the sugar molecules is performed by two enzymatic steps, a dehydrogenase/oxidoreductase that converts the hydroxyl to a ketone group, and this is further acted on by an aminotransferase that replaces the oxygen to an amino group. Several sets of dehydrogenation/transamination reactions are identified to act on different hydroxyl groups of aminoglycosides, but the modification at position C3'' of ring III occurs only in gentamicins, sisomicin, tobramycin, and kanamycin, and the biosynthetic gene clusters of these antibiotics all have the specific and conserved genes that act on this position. To investigate the structural basis of the function of GenD2, we have obtained its crystal structure in complex with NAD⁺ at 2.4 Å resolution. GenD2 belongs to the Gfo/Idh/MocA protein family of oxidoreductases and has the conserved catalytic residues proposed for deprotonation of the substrate to facilitate hydride abstraction from the substrate to the cofactor NAD⁺. ITC analysis has further confirmed the interaction between NAD⁺ and GenD2. Interestingly, GenD2 is the first member of the Gfo/Idh/MocA protein family to have a 3D-domain swapping involving two β -strand of the C-terminal domain. Several features of the GenD2 structure have an implication on the substrate recognition, including a very negatively charged active site for the binding of the alkaline substrate and several hydrophobic residues that could perform π -interaction with the unusual sugar rings to further stabilize the binding. *In silico* studies also suggested that Lys96, Asp177, and His181 could be involved in the C3'' oxidation of ring III of gentamicin A2 by GenD2. The characterization of the

GenD2 structure could provide useful information for increasing the promiscuity of this enzyme in generating novel valuable aminoglycosides through both *in vivo* and *in vitro* approaches.

METHODS

Expression and Purification of Recombinant Proteins. The *genD2* gene from *Micromonospora echinospora* ATCC15835 was cloned into the plasmid pET28a (+) as described by Huang et al.³ The transformation of plasmids was performed by heat shock in *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. *E. coli* BL21 (DE3) cells carrying the recombinant plasmids were cultivated in LB (Luria–Bertani) medium supplemented with kanamycin (50 μ g/mL) at 37 °C until the cell density reached 0.6 at 600 nm. Overexpression of the protein was induced by β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.2 mM) at 18 °C with shaking at 200 rpm overnight. Cells were harvested by centrifugation (6000g, 4 °C, 30 min) and resuspended 1:1 in buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.7) with the addition of DNase and lysozyme at a concentration of 50 μ g/mL and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (5 μ M). Cell lysis was performed by sonication, and the lysate was clarified by centrifugation (17000g, 4 °C, 1 h). The recombinant protein was purified by affinity chromatography using a 5 mL IMAC column (GE Healthcare) and Ni²⁺ ion-charged His-Bind metal chelating resin (Novagen). GenD2 was eluted using a linear gradient of imidazole (up to 500 mM) on an Äkta Purifier system (GE Healthcare). To increase the purity, a gel filtration purification step was further performed using a HiLoad 16/60 Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl and 100 mM NaCl, pH 7.7. Fractions were collected and concentrated up to 15–20 mg mL⁻¹, and the enzyme was stored at –80 °C. The purity of GenD2 was confirmed by SDS-PAGE 12% stained using Coomassie Brilliant Blue.

Protein Crystallization. GenD2 crystallization trials were performed using the sitting-drop method using an Oryx 4 robot (Douglas Instruments) in 96-well plates (MRC2 Swissci). The drops had a total volume of 0.9 μ L, with 50% of protein solution at a concentration of 10 mg mL⁻¹ with a 5 mM cofactor NAD⁺ and 50% crystallization condition. After obtaining the first crystal hits, these conditions were optimized manually by a hanging drop vapor diffusion method using 24-well VDX plates (Hampton Research). The best and most reproducible crystallization condition for GenD2 contained 0.1 M sodium acetate, pH 4.6, and 2 M sodium formate at a protein concentration of 15 mg mL⁻¹, and the crystals appeared after approximately 7 days in crystallization plates incubated at 30 °C.

Diffraction and Data Collection. Data collection of GenD2 crystals was performed at Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY), PETRA III, P13 beamline, in Hamburg, Germany. The data analysis

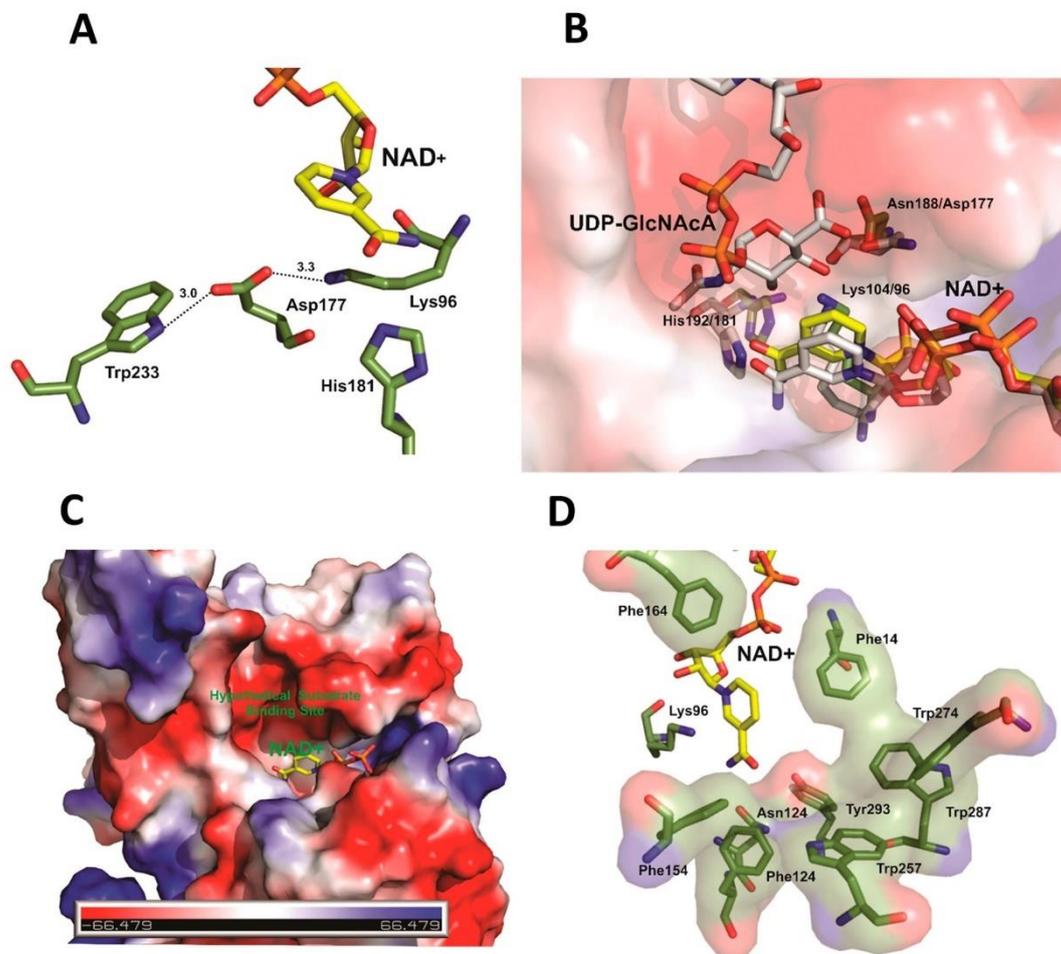


Figure 5. Hypothetical substrate binding site of GenD2. (A) The hypothetical catalytic triad that could be involved in the oxidoreductase reaction. (B) Superposition of GenD2 (carbons in yellow) and WlbA dehydrogenase from *Chromobacterium violaceum* in complex with NAD⁺ and UDP-GlcNAc (carbons in white). The electrostatic potential surface is from GenD2. (C) An electrostatic potential surface of GenD2 indicating the highly negative charged hypothetical substrate binding site. (D) Hydrophobic residues that could be involved in the substrate orientation in the GenD2 active site.

of X-ray diffraction images was performed by XDS.²⁵ The data were escalated by AIMLESS²⁶ from the program CCP4 suite.²⁷

Structure Determination. The initial phases for the GenD2 structure were obtained by molecular replacement using the online server MrBUMP.¹⁸ The refinement was carried out using Phenix.refine²⁸ from the Phenix crystallographic suite.²⁹ The visual inspections were performed using COOT,³⁰ and the stereochemistry quality of the model was accessed using MolProbity.³¹ All figures were prepared using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 (Schrödinger, LLC).

DSF. DSF experiments were performed using a Bio-Rad CFX connect Real-Time System with detection and excitation filters ranging from 450 to 580 nm. For the experiments, 10 μ M of GenD2 in the presence of 1 mM of NAD⁺ diluted in a buffer constituted by 50 mM HEPES and 100 mM NaCl, pH 7.0, was incubated with different aminoglycoside-like substrates (kanamycin, gentamicin, gentamicin sulfate, apramycin, sisomicin, neomycin, amikacin, paromamine, and meropenem). This last one was used as a negative control at a concentration of 125 μ M in the presence of the fluorescent dye

SYPRO Orange 5X (Life Science). The volumes of 25 μ L of protein, each ligand, and fluorescent dye were added to a well of the 96-well plates (Bio-Rad). The protein solutions were scanned from the temperature of 25–95 $^{\circ}$ C with an increment of 0.5 $^{\circ}$ /min. T_m values were estimated using the Bio-Rad CFX Manager software or using the program Origin, and the ΔT_m for each compound was calculated by the difference of protein T_m in the presence of ligand and protein T_m in the absence of ligand.

ITC. ITC experiments were performed using an iT200 microcalorimetry (Malvern) at 25 $^{\circ}$ C. Protein and cofactors (NAD⁺ and NADP⁺) were prepared using exactly the same buffer, which was constituted by 50 mM HEPES and 100 mM NaCl, pH 7.0. The protein concentration used in the cell was 150 μ M, and the ligand concentration in the syringe ranged from 2 to 10 mM. Eighteen injections of 10 μ L of ligand were performed against the protein, spaced at 180 s with a stirring speed of 400 rpm. The ITC curves were fitted using nonlinear least-squares regression using the non-interaction one-site model from Origin 5.0.

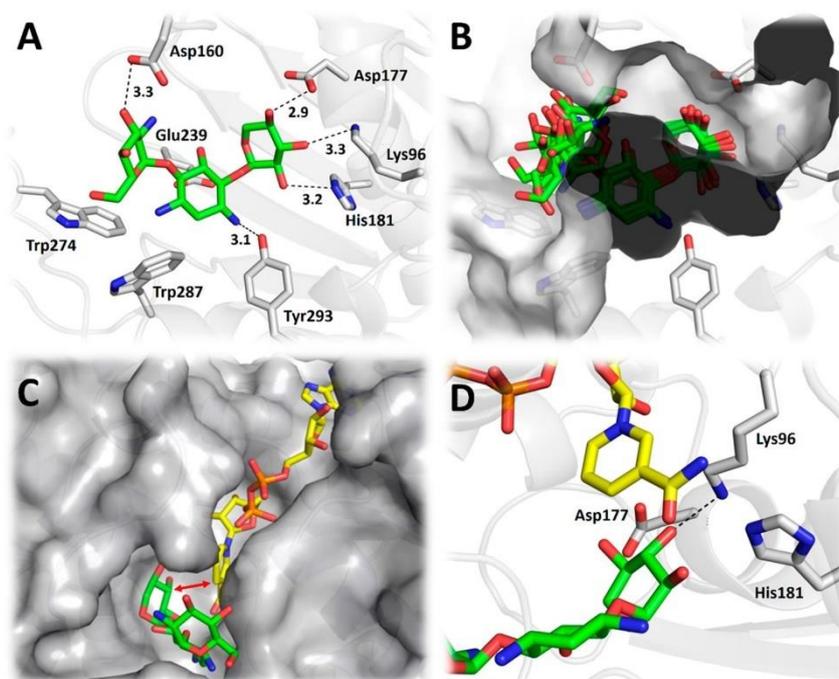


Figure 6. GenD2 docking findings. (A) The best-ranked pose of gentamicin A2 (carbons in green). (B) Superposed poses of the gentamicin A2 at the GenD2 binding cavity. (C) Merged structures of NAD⁺ (carbons in yellow) and gentamicin A2 (carbons in green) through the binding cavity of GenD2. The double-headed red arrow indicates the C3' of ring III of gentamicin and the C4 of the nicotinamide ring of NAD⁺. (D) Docked ring III from gentamicin A2 surrounded by the suggested catalytic triad of GenD2 and the nicotinamide moiety from NAD⁺. Cartoon protein depicted in white. Carbons of GenD2 in white. Oxygen in red. Nitrogen in blue. Phosphorus in orange. Hydrogen bonds indicated as black dashed lines. Interatomic distances in Å.

Molecular Docking Studies. The gentamicin A2 structure was built and energy-minimized with the density functional theory (DFT) method of Becke-3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) with the standard 6-31G* basis set available in the Spartan'14 program (Wave Function, Inc., Irvine, CA, USA). The experimental starting geometry used for the construction of gentamicin A2 was described previously (PDB entry 5U0N, gentamicin A).¹³ Molecular docking was performed with the GOLD 5.2 program (CCDC). The scoring function used was "ASP", which is a default function of the GOLD 5.2 program. Hydrogen atoms were added to GenD2 according to the data inferred by the GOLD 5.2 program on the ionization and tautomeric states. The docking interaction cavity in the protein was established with a 12 Å radius from the phenolic hydroxyl group (OH) of Tyr293. The number of genetic operations (crossover, migration, and mutation) in each docking run that was used in the search procedure was set to 100 000. Docking simulations were performed six times. The figure of the best and most frequent docking pose for gentamicin A2 was generated by the PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 (Schrödinger, LLC).

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscchembio.9b00115.

GenD2 purification steps, GenD2 oligomerization interface, electrostatic potential surface of GenD2 tetramer, calorimetry parameters for GenD2 against NAD⁺ and NADP⁺, ITC titration of NAD⁺ and NADP⁺ against

GenD2, DSF for GenD2 in the presence of different aminoglycoside-like substrates, and analysis of DSF for GenD2 in the presence of different aminoglycosides (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mvbdias@usp.br.

ORCID

Mauricio Temotheo Tavares: 0000-0002-4400-7787

Fanglu Huang: 0000-0002-0320-299X

Marcio Vinicius Bertacine Dias: 0000-0002-5312-0191

Author Contributions

N.C.A. performed the expression, purification, crystallization and structure refinement, and ITC and DSF assays. P.S.B. determined the structure and performed the refinement. F.H. performed the cloning and determined the best expression conditions. P.F.L. and M.V.B.D. conceived the work, and M.V.B.D. and F.H. wrote the manuscript. M.T.T. and R.P. performed the docking simulations and reviewed the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPESP under grant 2010/15971-3, 2014/50324-0, and 2015/09188-8 to M.V.B.D., a fellowship 2014/07843-6 to P.S.B., and a CAPES fellowship to N.C.A. and also by a project grant from the Medical Research Council, UK (G1001687), to P.F.L. We also would like to thank R.F. de Souza for helpful discussions and C. Oliveira from Institute of Physics of University of São Paulo (IFUSP) for the calorimetry facility.

REFERENCES

- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. D. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 727–732.
- Hayward, R. S., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., and Ross, J. D. C. (2018) Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: A systematic review. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84, 223–238.
- Huang, C., Huang, F., Moison, E., Guo, J., Jian, X., Duan, X., Deng, Z., Leadlay, P. F., and Sun, Y. (2015) Delineating the biosynthesis of gentamicin X2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex. *Chem. Biol.* 22, 251–261.
- Codini, M., Cataldi, S., Ambesi-Impombato, F. S., Lazzarini, A., Floridi, A., Lazzarini, R., Curcio, F., Beccari, T., and Albi, E. (2015) Gentamicin arrests cancer cell growth: The intriguing involvement of nuclear sphingomyelin metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 2307–2319.
- Cuccarese, M. F., Singh, A., Amiji, M., and O'Doherty, G. A. (2013) A novel use of gentamicin in the ROS-mediated sensitization of NCI-H460 lung cancer cells to various anticancer agents. *ACS Chem. Biol.* 8, 2771–2777.
- Prokhorova, I., Altman, R. B., Djumagulov, M., Shrestha, J. P., Urzhumtsev, A., Ferguson, A., Chang, C.-W. T., Yusupov, M., Blanchard, S. C., and Yusupova, G. (2017) Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E10899–E10908.
- Fosso, M. Y., Li, Y., and Garneau-Tsodikova, S. (2014) New trends in aminoglycosides use. *MedChemComm* 5, 1075–1091.
- Kharel, M. K., Subba, B., Basnet, D. B., Woo, J. S., Lee, H. C., Liou, K., and Sohng, J. K. (2004) A gene cluster for biosynthesis of kanamycin from *Streptomyces kanamyceticus*: Comparison with gentamicin biosynthetic gene cluster. *Arch. Biochem. Biophys.* 429, 204–214.
- Llewellyn, N. M., and Spencer, J. B. (2006) Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 23, 864–874.
- Unwin, J., Standage, S., Alexander, D., Hosted, T., Horan, A. C., and Wellington, E. M. (2004) Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex. *J. Antibiot.* 57, 436–445.
- Guo, J., Huang, F., Huang, C., Duan, X., Jian, X., Leeper, F., Deng, Z., Leadlay, P. F., and Sun, Y. (2014) Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis. *Chem. Biol.* 21, 608–618.
- Li, S., Guo, J., Reva, A., Huang, F., Xiong, B., Liu, Y., Deng, Z., Leadlay, P. F., and Sun, Y. (2018) Methyltransferases of gentamicin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 1340–1345.
- Bury, P. D. S., Huang, F., Li, S., Sun, Y., Leadlay, P. F., and Dias, M. V. B. (2017) Structural basis of the selectivity of GenN, an aminoglycoside N-methyltransferase involved in gentamicin biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* 12, 2779–2787.
- Kudo, F., and Eguchi, T. (2009) Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* 62, 471–481.
- Taberman, H., Parkkinen, T., and Rouvinen, J. (2016) Structural and functional features of the NAD(P) dependent Gfo/Idh/MocA protein family oxidoreductases. *Protein Sci.* 25, 778–786.
- Kubiak, R. L., and Holden, H. M. (2011) Combined Structural and Functional Investigation of a C-3'-ketoreductase involved in the biosynthesis of DTDP-l-digitoxose. *Biochemistry* 50, 5905–5917.
- Thoden, J. B., and Holden, H. M. (2011) Biochemical and structural characterization of WlbA from *Bordetella pertussis* and *Chromobacterium violaceum*: enzymes required for the biosynthesis of 2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-mannuronic acid. *Biochemistry* 50, 1483–1491.
- Keegan, R. M., and Winn, M. D. (2008) MrBUMP: An automated pipeline for molecular replacement. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 64, 119–124.
- Kingston, R. L., Scopes, R. K., and Baker, E. N. (1996) The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure* 4, 1413–1428.
- Holm, L., and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 38, W545–W549.
- Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320–324.
- Sugiura, M., Nakahara, M., Yamada, C., Arakawa, T., Kitaoka, M., and Fushinobu, S. (2018) Identification, functional characterization, and crystal structure determination of bacterial levoglucosan dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 293, 17375–17386.
- Lott, J. S., Halbig, D., Baker, H. M., Hardman, M. J., Sprenger, G. A., and Baker, E. N. (2000) Crystal structure of a truncated mutant of glucose-fructose oxidoreductase shows that an N-terminal arm controls tetramer formation. *J. Mol. Biol.* 304, 575–584.
- van Straaten, K. E., Zheng, H., Palmer, D. R. J., and Sanders, D. A. R. (2010) Structural investigation of Myo-inositol dehydrogenase from *Bacillus Subtilis*: implications for catalytic mechanism and inositol dehydrogenase subfamily classification. *Biochem. J.* 432, 237–247.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 69, 1204–1214.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., and Adams, P. D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with Phenix.refine. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 68, 352–367.
- Terwilliger, T. C., Adams, P. D., Read, R. J., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Zwart, P. H., and Hung, L. W. (2009) Decision-making in structure solution using bayesian estimates of map quality: the PHENIX autoSol wizard. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 65, 582–601.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 35, W375–W383.