

**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

## 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.