

LUANA LIMA DA CUNHA

Caracterização funcional dos genes *cosG2*, *cosT* e *cosT2* do cluster biossintético de cosmomicina D em *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2022

LUANA LIMA DA CUNHA

Caracterização funcional dos genes *cosG2*, *cosT* e *cosT2* do cluster biossintético de cosmomicina D em *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla  
Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2022

## RESUMO

CUNHA, L.L. **Caracterização funcional dos genes *cosG2*, *cosT* e *cosT2* do cluster biossintético de cosmomicina D em *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622.** 2022. 270 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O filo das actinobactérias, incluindo o gênero *Streptomyces* tem sido estudado nas últimas décadas pela capacidade de produzir vários compostos bioativos. Nesse gênero, a espécie *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 produz moléculas conhecidas como cosmomicinas, dentre as quais se destaca a cosmomicina D (COSD) por ser a fração majoritária. COSD é um policetídeo aromático tetracíclico da família das antraciclinas, com atividade antitumoral. Estudos de produção, toxicidade, análise estrutural, propriedades químicas, interação DNA•COSD e biossíntese já foram realizados indicando o potencial da COSD no tratamento de neoplasias. Existem várias pesquisas com objetivo de melhorar as propriedades farmacológicas das antraciclinas através da modificação dos açúcares. Compreender os mecanismos enzimáticos é importante para o desenvolvimento de novos compostos potencializando o perfil terapêutico por meio de biossíntese combinatória. O objetivo deste trabalho foi entender o processo de glicosilação da molécula de COSD visando a construção de cepas para a busca de análogos de produtos naturais de policetídeos com propriedades farmacológicas novas ou melhoradas por meio de modificações genéticas no processo de biossíntese da molécula COSD. Os genes de *S. olindensis* *cosT*, *cosT2* e *cosG2* foram estudados para elucidar a biossíntese e as etapas de glicosilação do composto COSD. Usando técnicas de biologia molecular foram obtidos mutantes nulos para estes três genes e vários derivados foram formados. As análises por HPLC mostraram um perfil diferente em comparação à cepa selvagem indicando a importância destes genes na biossíntese de COSD. Os resultados de espectrometria de massas mostraram um padrão de glicosilação alterado. Esses resultados indicam o papel da glicosiltransferase *cosG2* na transferência do segundo aminoaçúcar, L-rodosamina na posição C-10 da aglicona sugerindo um novo modelo de glicosilação

para o composto COSD. O novo modelo proposto integra resultados obtidos nesta tese e em trabalhos anteriores sobre a biossíntese de COSD.

**Palavras-chave:** Antraciclinas. Cosmomicina D. *Streptomyces olindensis*. Glicosiltransferases. Biossíntese.

## ABSTRACT

CUNHA, L.L. **Functional characterization of the genes *cosG2*, *cosT* and *cosT2* of cosmomycin D cluster from *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622.** 2022. 270 f. Ph.D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The phylum Actinobacteria, including the genus *Streptomyces* has been studied for its ability to produce numerous bioactive compounds. The strain *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 produces molecules known as cosmomycins, among which cosmomycin D (COSD) is the major and active fraction. This antitumor antibiotic is a tetracyclic aromatic polyketide of the anthracycline family. Studies of production, toxicity, structural analysis, chemical properties, DNA•COSD interaction and biosynthesis have already been performed indicating the future potential of cosmomycin for the treatment of neoplasias. There are several studies to improve the pharmacological properties of anthracyclines by modifying their sugars. Understanding of the involved enzymatic mechanisms is essential for developing new compounds and enhancing the therapeutic profile through combinatorial biosynthesis. This work had aimed to understand the COSD glycosylation pathway in light to find analogues of natural polyketide products, with novel or improved pharmacological properties, through genetic modifications in the biosynthesis process of COSD. The *S. olindensis* DAUFPE 5622 genes *cosT*, *cosT2* and *cosG2* have been studied to understand the involvement of sugars in the biosynthesis of COSD. These three genes were inactivated using molecular biology techniques, and several derivatives were generated. The HPLC analyzes showed a different profile compared to the wild strain, indicating the importance of these genes in molecule biosynthesis. The mass spectrums showed altered glycosylation patterns. These results are suggestive about the role of the glycosyltransferase *cosG2* to transfer the second aminosugar, a L-rhodamine unit, to the aglycone at C-10 position producing intermediates with glycosylation at position C-7 (due to *cosG* activity) and C-10. Afterward, the deoxysugars, 2-deoxy-fucose and L-rhodinose, are introduced by the action of the glycosyltransferase *cosK*. The genes *cosT* and *cosT2* codified two auxiliary proteins that enhance the *cosG* and *cosG2*

glycosyltransferase activity, respectively. This new model was proposed to integrate this thesis results and previously reported results for cosmomycin D biosynthesis.

**Keywords:** Anthracyclines. Cosmomycin D. *Streptomyces olindensis*. Glycosyltransferases. Biosynthesis.