

TRIAGEM METABÓLICA POR PKS E NRPS EM ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Citrus reticulata*

Pedro L. R. da Cruz<sup>a</sup>, Leila R. Giarola<sup>b</sup>, Suellen da Silva Moraes<sup>a</sup>, Déborah Ellen S. G. da Silva<sup>a</sup>, Joelma Marcon<sup>c</sup>, João L. Azevedo<sup>c</sup>, Wellington L. Araújo<sup>d</sup> e Luciana G. de Oliveira<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

<sup>b</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Genética, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 13418-900 Piracicaba – SP, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 30/07/2014; aceito em 06/11/2014; publicado na web em 11/02/2015

METABOLIC SCREENING FOR PKS AND NRPS IN ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA FROM *Citrus reticulata*. Polyketides and non-ribosomal peptides are natural products widely found in bacteria, fungi and plants. The biological activities associated with these metabolites have attracted special attention in biopharmaceutical studies. Polyketide synthases act similarly to fatty acids synthetases and the whole multi-enzymatic set coordinating precursor and extending unit selection and reduction levels during chain growth. Acting in a similarly orchestrated model, non-ribosomal peptide synthetases biosynthesize NRPs. PKSs-I and NRPSs enzymatic modules and domains are collinearly organized with the parent gene sequence. This arrangement allows the use of degenerated PCR primers to amplify targeted regions in the genes corresponding to specific enzymatic domains such as ketosynthases and acyltransferases in PKSs and adenilation domains in NRPSs. Careful analysis of these short regions allows the classifying of a set of organisms according to their potential to biosynthesize PKS and NRPs. In this work, the biosynthetic potential of a set of 13 endophytic actinobacteria from *Citrus reticulata* for producing PKS and NRP metabolites was evaluated. The biosynthetic profile was compared to antimicrobial activity. Based on the inhibition promoted, 4 strains were considered for cluster analysis. A PKS/NRPS phylogeny was generated in order to classify some of the representative sequences throughout comparison with homologous genes. Using this approach, a molecular fingerprint was generated to help guide future studies on the most promising strains.

Keywords: endophytic actinobacteria; molecular fingerprint; polyketides; non-ribosomal peptides; genome mining.

## INTRODUÇÃO

Os micro-organismos produzem uma imensurável diversidade de metabólitos raros que desempenham um papel importante em sua auto-defesa (independente de forças ou agentes externos), como autodefesa, agressão e principalmente comunicação intra- e intercomunidades. Muitos destes compostos, coincidentemente, apresentam valiosa atividade biológica para a humanidade.<sup>1</sup> Os metabólitos secundários, como são chamados, não são necessariamente produzidos em qualquer condição e, na grande maioria dos casos, a função destes compostos e seus benefícios para o organismo não são ainda conhecidos.<sup>2</sup>

*Streptomyces* e outras actinobactérias relacionadas encontram-se entre as fontes mais produtivas de metabólitos secundários, com uma série de atividades biológicas e aplicações.<sup>3</sup> Estima-se que cerca de metade dos antibióticos produzidos industrialmente, além de vários compostos comercializados como agentes imunossuppressores, quimioterápicos, herbicidas e vermífugos, entre outros compostos farmacologicamente ativos, sejam produzidos por esses organismos.<sup>4</sup>

Dentre os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces*, os policetídeos e peptídeos não-ribossomais constituem uma das classes mais importantes e podem ocorrer esporadicamente em determinadas condições de cultivo em laboratório. Muitos destes compostos são produzidos apenas em condições específicas, em contraste com os metabólitos ditos primários, responsáveis pela estrutura e energia de todas as células vivas.<sup>5</sup> As cadeias que formam a estrutura principal dos policetídeos são sintetizadas via um caminho iterativo por um grupo de enzimas conhecidas como policetídeo sintases (PKSs). De forma similar os peptídeos não-ribossomais são biossintetizados pelas peptídeo não-ribossomais sintetases (NRPSs).<sup>6</sup>

As policetídeo sintases (PKSs) do tipo I são enzimas multifuncionais organizadas em módulos, também conhecidas como policetídeo modulares, sendo que cada módulo abriga um conjunto completo de domínios enzimáticos independentes, responsáveis por cada ciclo de alongamento e modificação da cadeia policetídeo. Entre os exemplos mais comuns encontram-se as 6-deoxieritronolídeo B sintases, DEBS 1, 2 e 3, responsáveis pela produção do 6-deoxieritronolídeo B (após formação da aglicona – 6DEB, outras enzimas pós-modificadoras como hidroxilases e glicosidases promovem a formação da eritromicina), além de outros complexos multienzimáticos responsáveis pela biossíntese de outros policetídeos reduzidos (macrolídeos, poliéteres e polienos).<sup>7</sup>

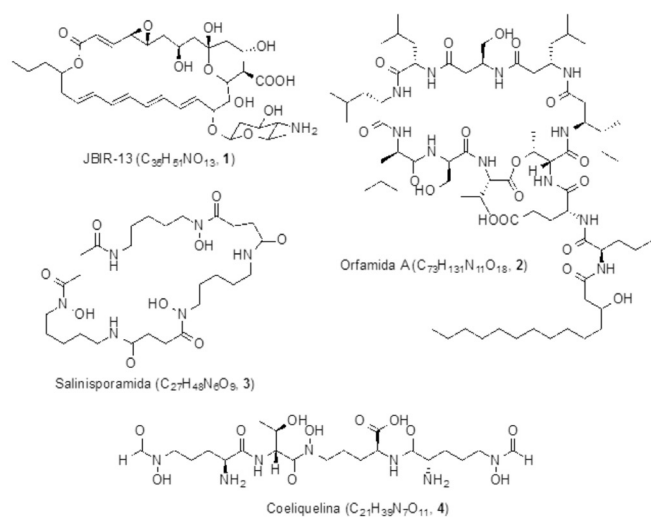
Analogamente, a síntese de peptídeos não-ribossomais é mediada por enzimas conhecidas como peptídeo não-ribossomal sintetases e requer ao menos o envolvimento de três domínios enzimáticos. O domínio de adenilação (A) seleciona o aminoácido cognato e o ativa como aminoacila adenilato. O aminoácido ativado é então transferido para uma proteína carreadora de peptídila (PCP) que o transfere ao domínio de condensação (C) que, finalmente, catalisa a formação da ligação peptídica.<sup>8</sup>

Uma alternativa para facilitar a busca por grupamentos de genes que codificam um produto policetídeo ou polipeptídico envolve a triagem dos módulos enzimáticos em “bibliotecas” do DNA genômico utilizando experimentos de PCR.<sup>9</sup> Como existem regiões altamente conservadas nos domínios das cetossintase (KS), acila-transferases (AT) em PKSs e de adenilação (A) em NRPSs, é possível desenhar primers (oligonucleotídeos) que possam, em condições adequadas, amplificar boa parte dos trechos correspondentes a estes domínios enzimáticos curtos e desta forma prever se um determinado organismo apresenta potencial para a produção de policetídeos e peptídeos não-ribossomais, entre outros metabólitos.<sup>10</sup>

\*e-mail: luciana@iqm.unicamp.br

Acoplada a ferramentas de bioinformática, a prospecção de genes (*genome mining*) tem sido utilizada para a descoberta de inúmeras moléculas bioativas. O conhecimento das sequências de nucleotídeos dos *clusters* de genes ou até mesmo de todo o genoma do micro-organismo permite que novas abordagens sejam adotadas para a química de produtos naturais, uma vez que a previsão da estrutura do metabólito pode facilitar a sua obtenção.<sup>11</sup> Utilizando-se uma metodologia de prospecção de genes, é possível promover uma reconstrução baseada na escala evolutiva para comparar genes biossintéticos, direcionando a busca por uma entidade química. Esta abordagem direcionou a descoberta de um análogo de pimáricina, JBIR-13 (**1**), produzido por *Streptomyces bicolor* a partir da análise filogenética de fragmentos de genes de PKS depositados no NCBI, demonstrando que é possível descobrir novas estruturas a partir desta metodologia.<sup>12</sup> Outros metabólitos como a orfamida (**2**),<sup>13</sup> salinisporamida (**3**),<sup>14</sup> e coeliquelina (**4**)<sup>15</sup> também foram descobertos utilizando-se metodologias de prospecção de genes biossintéticos (Figura 1).

Nesse trabalho descrevemos a aplicação de provas metabólicas para avaliar o potencial para a produção de metabólitos do tipo poliketídicos e peptídicos não-ribossomais em linhagens de actinobactérias endofíticas, isoladas de *Citrus reticulata*.<sup>16</sup> A triagem utilizando provas metabólicas permite gerar um *fingerprint* molecular bastante efetivo para promover desrepleção metabólica. Adicionalmente, a atividade antibiótica promovida pelas actinobactérias foi avaliada como ferramenta para seleção das linhagens mais promissoras para estudos futuros.



**Figura 1.** Estruturas do JBIR-13, análogo de pimáricina, salinisporamida, orfamida e coeliquelina, elucidados por metodologias de prospecção de genes biossintéticos (*genome mining*)

## PARTE EXPERIMENTAL

### Linhagens de micro-organismos

Foram avaliadas 13 linhagens de actinobactérias endofíticas isoladas da raiz de *Citrus reticulata* (A1 (*Streptomyces* sp), A3, não identificada), A4 (não identificada), A9 (*Nocardia dassonvillei*), A13 (*Streptomyces* sp), A14 (*Nocardia nova*), A19 (*S. bicolor*), A30 (*S. cyaneus*), A23 (*S. wadayamensis*), B1 (*Streptomyces* sp), A21 (*S. cyaneus*), A10 (*Streptomyces* sp), A18 (*Streptomyces* sp). O isolamento e identificação (por análise do fragmento 16S) foi realizado pelo Prof. Dr. Wellington Araújo, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e Msc. Joelma Marcon, da Universidade de São Paulo.<sup>16</sup> *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147 possui o genoma sequenciado e anotado

e foi utilizado neste estudo como micro-organismo modelo. As linhagens *Streptomyces fradiae* NCIMB 11002 e *S. rimosus* ATCC 14827 foram cedidas pela Fiocruz. As linhagens de micro-organismos patogênicos *Candida albicans* CCT 0776, *Enterococcus faecalis* CCT 1494, *Salmonella typhimurium* CCT 1478, *Staphylococcus aureus* CCT1485, *Escherichia coli* CCT1457, *Bacillus megaterium* CCT 2478 e *Pseudomonas aeruginosa* CCT 1476 foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical, da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo).

### Extração do DNA genômico das actinobactérias

O DNA genômico das actinobactérias foi isolado de acordo com o protocolo de Sharma e Singh.<sup>17</sup> As linhagens foram inoculadas em 2 mL de meio LB e deixadas em agitador orbital a 30 °C, 300 rpm por toda a noite. As células crescidas foram centrifugadas a 5000 rpm, a 25 °C, por 5 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em 200 µL de solução tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 50 ng de RNase). Foram adicionados 400 µL de solução I (1% p/v sarcosil, 0,5 M de cloreto de sódio, 1% p/v SDS) e as suspensões resultantes foram misturadas por inversão. Os tubos foram mantidos por 10 minutos a 37 °C com agitação por inversão nos intervalos de 5 e 10 minutos. Adicionou-se igual volume de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1). A mistura foi feita por inversão e posteriormente centrifugou-se as células a 10000 rpm (em centrífuga de bancada) por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 10% em volume de acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 60% em volume de isopropanol. Misturou-se por inversão 6 vezes e a solução resultante contendo o DNA precipitado foi centrifugada por 5 minutos a 10000 rpm a 25 °C. O *pellet* (DNA precipitado) foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 10000 rpm por 3 minutos. Após evaporação do solvente, adicionou-se 100 µL de água milliQ estéril.

### Ensaios de triagem de módulos e domínios enzimáticos utilizando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As reações de amplificação dos módulos enzimáticos foram realizadas em condições adequadas seguindo o protocolo sugerido por Ayuso *et al.*,<sup>10</sup> utilizando o DNA genômico como molde e Phusion polimerase (High Fidelity). Os *primers* degenerados A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') e A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') foram utilizados para amplificar 700 pb dos domínios de adenilação. Para amplificação dos domínios de cetossintase-metilmalonila-CoA-transferase (1200 pb) utilizou-se o par de *primers* KIR (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') e M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'). KS-BEF (5'-CCGCGCGAGGCGCTGGCCGTCGAC-3') e KS-BER (5'-CCGCGCCGGGCGGGGCTCTCGTCGTTCCGGCATCAGCGCACCAACGCG-3') foram utilizados para detectar domínios KS em geral em sistemas PKS-I. As reações foram realizadas na presença das proporções adequadas de DNA (1, 2 e 5 µL de uma solução com concentração inicial de 10 µg µL<sup>-1</sup>), *primers*, dNTPs, polimerase e DMSO (volume final de reação de 20 µL). Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando Syber Safe (Invitrogen) como intercalante de DNA.

### Clonagem e seleção dos clones

Os produtos do PCR foram subclonados utilizando o vetor apropriado para cada caso: para fragmentos que possuem extremidade abrupta, gerada pela Phusion DNA polimerase, foi utilizado pCR-blunt do kit Zero Blunt (Invitrogen), o qual possui marcador de

resistência a canamicina ou pUC19 que possui marcador de resistência a ampicilina; para fragmentos com extremidades coesivas geradas pela Pfx ou Taq DNA polimerase foi utilizado o vetor pGEMT-Easy que possui marcador de resistência a ampicilina. A reação de ligação foi mediada por T4 DNA ligase utilizando proporções inserto:vetor que variaram de 3:1 a 10:1 (16 °C, 18 horas). As ligações foram transformadas em células DH5 $\alpha$  quimicamente ou eletro-competentes em placas de meio LB sólido contendo os antibióticos adequados na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . PCR de colônia foi utilizado para verificar a presença de inserto em cerca de 20 clones por reação de transformação. Os clones positivos foram purificados por minipreparação e encaminhados para sequenciamento. Outros protocolos padrão de biologia molecular foram realizados conforme descrito por Sambrook and Russel.<sup>18</sup>

### Ensaios de inibição vertical para avaliação da atividade antibiótica<sup>19</sup>

A avaliação da atividade antibiótica foi realizada por teste de inibição em placa.<sup>19</sup> Os meios de cultivo propícios para a difusão Anti I e Anti II foram preparados de acordo com o protocolo da Difco. Inicialmente fez-se uma estria em posição vertical de cada uma das actinobactérias testadas e encubaram-se as placas em estufa microbiológica 30 °C por 7 dias. Posteriormente, as linhagens patogênicas *Salmonella typhimurium* CCT 1478, *Escherichia coli* CCT1457, *Bacillus megaterium* CCT0776, *Staphylococcus aureus* CCT1485 e *Candida albicans* CCT 0776 foram inoculadas em posição perpendicular a actinobactéria. As placas foram retornadas para estufa por 18 horas. Foram anotadas as inibições e os valores foram expressos em porcentagem de inibição. Os testes foram realizados em triplicata.

### Sequenciamento e alinhamento

O sequenciamento das subunidades amplificadas nos experimentos de PCR foi realizado pela empresa Helixxa (Campinas, SP). Uma vez adquiridas as sequências, os eletroferogramas foram visualizados utilizando o programa Bioedit para obter a sequência de nucleotídeos removendo-se os nucleotídeos correspondentes ao vetor de clonagem. Estas sequências foram alinhadas com as existentes no banco de dados do NCBI (NCBI – National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta blastn (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para construção da árvore filogenética, a sequência de nucleotídeos de cada clone foi traduzida em aminoácidos utilizando o programa Expsy que contém a ferramenta *translate*. Depois de geradas as 6 sequências possíveis (*frames*), foi realizado o alinhamento destas sequências novamente utilizando o banco de dados do NCBI com a ferramenta blastp.

As sequências do banco de dados foram ajustadas no programa Bioedit. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW. Para a construção da árvore filogenética utilizou-se o método *Neighbor Joining*. A visualização da árvore foi feita pelo programa *Treeview*. As análises das sequências foram realizadas também por meio do programa Geneious.<sup>20</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desrepliação metabólica por PCR

A análise recente do genoma de diversas linhagens de *Streptomyces* e outras actinobactérias revelou uma grande abundância de *clusters* de genes que codificam enzimas do metabolismo secundário. Após análises das informações dos genomas de *S. coelicolor*,<sup>21</sup> *S.*

*avermitilis*<sup>22</sup> e *Saccharopolyspora erythraea*,<sup>23</sup> as primeiras linhagens de actinobactérias a serem sequenciadas, pode-se prever a existência de um grande número de etapas metabólicas esperando para serem descobertas, uma vez que a capacidade para a produção de metabólitos nem sempre é acessada sob as condições de cultivo em laboratório.<sup>24</sup>

Novas metodologias baseadas na aplicação de ferramentas genômicas para direcionar a busca por metabólitos desconhecidos podem ser encontradas na literatura.<sup>11</sup> Uma alternativa para facilitar a busca por grupos de genes que codificam para os produtos policetídeos (PKs) e peptídeos não-ribossomais (NRPs) envolve a triagem dos módulos enzimáticos, os quais correspondem a sequências curtas de nucleotídeos, no DNA genômico utilizando experimentos de PCR.<sup>9</sup> Essa aproximação consiste em um *fingerprint* molecular, baseado na avaliação do potencial metabólico das linhagens estudadas em produzir metabólitos secundários, e que pode ser efetivo para facilitar o processo de desrepliação. O estudo permite focar os esforços de triagem por compostos bioativos nos micro-organismos mais promissores, fator essencial para direcionar a triagem para a descoberta de alvos terapêuticos.

O estudo do potencial biossintético das actinobactérias isoladas de *Citrus* foi realizado adotando-se o uso de provas metabólicas (*primers*) que se basearam nas regiões conservadas KS (em PKSs) e A (em NRPSs). A construção dos oligonucleotídeos para amplificar regiões dos genes *pks* e *nrps* assim como as condições de PCR foram baseadas no estudo de Ayuso *et al.*<sup>10</sup>

Foram estudadas 13 linhagens de actinobactérias isoladas de *Citrus reticulata* além de *Streptomyces coelicolor*, *S. rimosus* e *S. fradiae*. A metodologia permitiu identificar a presença de genes *pks* e *nrps* relacionados à biossíntese de PKs e NRPs no genoma das actinobactérias em altas frequências: 87% PKS e 92% NRPS (Tabela 1). Um experimento do tipo “multiplex” também foi realizado com o objetivo de amplificar as duas sequências simultaneamente, facilitando o processo de triagem (Figura 2).<sup>25</sup> Foram utilizadas três diferentes concentrações de DNA: 0,5, 1,0 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , uma vez que a concentração de molécula molde pode influenciar o resultado da reação de amplificação. Os pares de *primers* degenerados A3F e A7R têm como alvo domínios de adenilação (A), amplificando uma região de cerca de 700 pb, enquanto K1R e M6R permitem a amplificação de uma região correspondente a 1200 a 1400 pb dos domínios de cetossintase-metilmalonila transferase (KS-AT). Os *primers* KS-BEF e KS-BER amplificam fragmentos entre 500-600 pb (Material Suplementar, Figuras 1S, 2S e 3S).

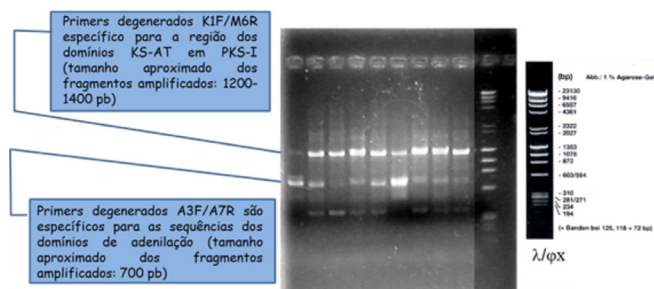
### Avaliação qualitativa da atividade antibiótica

Para ajudar a reduzir o universo de micro-organismos a serem estudados, uma vez que a triagem utilizando provas metabólicas revelou a presença de regiões associadas à PKS e NRPS na maioria das linhagens, foram acoplados testes de atividade biológica. As linhagens foram avaliadas com relação à atividade antibiótica por meio de testes de inibição em placa de agar.<sup>19</sup> O teste utiliza um meio de cultivo apropriado para a difusão dos metabólitos exudados. Dentre as 13 cepas testadas, pode-se observar pelo teste de inibição que B1, A19, A23 e A30 apresentaram maior capacidade em promover a inibição do crescimento dos micro-organismos patogênicos. A linhagem padrão utilizada para comparação foi *Streptomyces rimosus* ATCC14827, conhecida por produzir oxitetraciclinas e tetraciclina.<sup>26</sup> Nesse ensaio *S. rimosus* promoveu inibição elevada dos organismos *S. typhimurium*, *E. coli* e *B. megaterium*. Sabe-se que algumas cepas de *S. rimosus* produzem o polieno antifúngico rimocidina, entretanto não observou-se efeito sobre o crescimento de *C. albicans*. As linhagens A9 e A18 promoveram a inibição do crescimento dos patógenos testados apenas em pequena extensão.<sup>27</sup> Já as actinobactérias B1, A19, A23 e A30

**Tabela 1.** Triagem por genes *pks* e *nrps* utilizando provas metabólicas

Linhagem	Identificação <sup>a</sup>	PKS-I (KS + AT)	PKS-I (KS)	NRPS
A1	<i>Streptomyces</i> sp	--	+	+
A3	Não identificada	--	+	+
A4	Não identificada	--	+	--
A9	<i>Nocardia dassonvillei</i>	+	+	+
A13	<i>Streptomyces</i> sp	+	+	+
A14	<i>Nocardia nova</i>	+	+	--
A19	<i>S. bicolor</i>	+	+	+
A30	<i>S. cyaneus</i>	+	+	+
A23	<i>S. wadayamensis</i>	+	+	+
B1	<i>Streptomyces</i> sp	+	+	+
A21	<i>S. cyaneus</i>	+	+	+
A10	<i>Streptomyces</i> sp	+	+	+
A18	<i>Streptomyces</i> sp	+	+	+
ATCC 10147	<i>S. coelicolor</i>	--	--	+
NCIMB 11002	<i>S. fradiae</i>	+	+	+
ATCC 14827	<i>S. rimosus</i>	+	+	+

<sup>a</sup>Identificação das linhagens através da análise do RNA 16S (Ref. 16).



**Figura 2.** Fotodocumentação em gel de agarose (1,5%) da amplificação das regiões de 700 pb e 1200 pb correspondentes aos domínios A e KS-AT, respectivamente, em um experimento de PCR multiplex. É possível observar que ambas as regiões são amplificadas com alta frequência (a ordem dos organismos avaliados está descrita na Tabela 1S)

promoveram inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, sendo que B1 em maior extensão (61%). A19, A23 e B1 foram também ativas na inibição de *Bacillus*, enquanto a linhagem B1 promoveu a inibição de *Staphylococcus aureus* (Tabela 2).

#### Análise dos clusters de PKS e NRPS para as linhagens B1, A19, A23 e A30

Guiados por informações de testes biológicos, as linhagens denominadas A19, A23, A30 e B1 foram selecionadas para análise

de clusters. Os fragmentos gerados por PCR foram subclonados em pCRblunt e transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Alguns clones da biblioteca foram selecionados por PCR de colônia e após minipreparação os plasmídeos foram encaminhados para sequenciamento.

A análise de cluster pode ser utilizada para desreplacação metabólica uma vez que as informações da sequência são comparadas àquelas depositadas em banco de dados (NCBI). Para todas as sequências de nucleotídeos obtidas foram feitas buscas em banco de dados utilizando-se as ferramentas blastn e blastx, as quais permitem avaliar a similaridade das sequências de nucleotídeos com relação a outras sequências de nucleotídeos e também com relação a uma base de sequências não redundantes de proteínas. Foram considerados apenas os hits gerados contendo 60-99% de identidade com relação às sequências depositadas em banco de dados, valores de cobertura do alinhamento acima de 50% e *e-values* maiores que  $1 \times 10^{-8}$ .

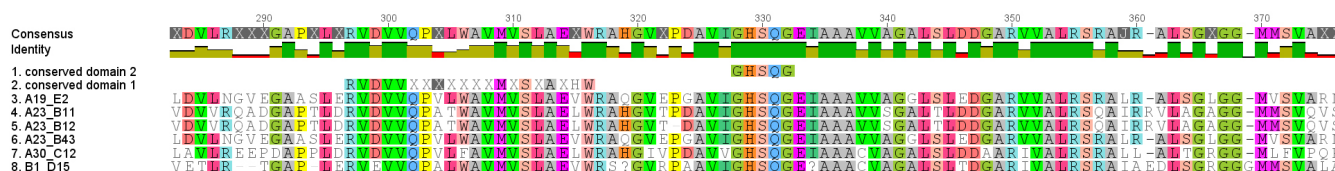
#### Análises de PKS

A partir dos resultados de sequenciamento dos fragmentos clonados correspondentes aos domínios de KS-AT inicialmente, verificou-se a presença de resíduos conservados de cetossintase-metilmalonil transferase, uma vez que os primers utilizados amplificam a região KS-AT relacionadas a incorporação de subunidades de propanoato. Os resíduos conservados correspondem a RVDVVXXXXXXXXMXSXAxhW (sendo que x representa Arg, Ser, Ala ou Glu e h um grupo hidrofóbico) e GHSQG (Figura 3).<sup>28</sup> Todas as sequências para PKS foram também analisadas no PKSDB

**Tabela 2.** Inibição do crescimento das linhagens patogênicas em função da produção de metabólitos com atividade antibiótica pelas actinobactérias endofíticas

Linhagem*	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
A9	<5%	<5%	<5%	--	<5%
A18	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%
A19	--	34%	39%	--	27%
A30	--	--	--	--	39%
A23	8%	--	31%	--	45%
B1	--	--	54%	41%	61%
<i>S. rimosus</i> ATCC 14827	72%	55%	53%	--	--

\*As demais linhagens avaliadas não produziram inibição considerável.



**Figura 3.** Resíduos conservados de KS-AT que incorporam propanoato. Alinhamento gerado no programa Geneious<sup>19</sup>

e apresentaram correta organização de domínios (KS-AT). Os clones considerados para as análises posteriores foram E2 de *Streptomyces bicolor* A19; B11, B12 e B43 de *Streptomyces wadayamensis* A23; C12 de *Streptomyces cyaneus* A30; e D15 de *Streptomyces* sp B1.

Os resultados dos alinhamentos e possíveis metabólitos associados às sequências amplificadas relacionadas aos domínios KS-AT estão compilados na Tabela 3. As sequências amplificadas de *Streptomyces* sp B1 conduziram a similaridade a outras genéricas depositadas como PKSs do tipo I, não associadas a metabólitos específicos. Já para o micro-organismo A23, as sequências de nucleotídeos de 3 fragmentos apresentaram alta similaridade com o gene *fscD* de *Streptomyces* FR-008, pertencente ao cluster de genes responsável pela biossíntese de um polieno análogo a candidicina. Outros genes homólogos são *nysA*, *ampha*, *pimS1* e *canP2*,<sup>29</sup> que estão envolvidos na biossíntese de nistatina, anfotericina, pimaricina e candidicina. Outras sequências avaliadas de A23 não estavam associadas a metabólitos discriminados. Observaram-se também altas similaridades a sequências de domínios de KS envolvidas na biossíntese de polienos para clones dos micro-organismos A19 e A30.

A partir do alinhamento gerado em comparação ao NCBI, as sequências com baixos parâmetros *e-value* envolvidas na biossíntese de metabólitos conhecidos foram utilizadas para construir a árvore de taxonomia metabólica para cada um dos organismos (MS, Figuras S5, S6 e S7). O método utilizado para estabelecer uma relação de filogenia foi o *Neighbor Joining*.

Para *Streptomyces bicolor* A19 pode-se observar a localização das sequências referentes a dois dos fragmentos amplificados no mesmo clado das proteínas FscB e FscD, participantes na biossíntese da candidicina. Já para um fragmento representativo de *Streptomyces cyaneus* A30 observa-se o clone C12 no mesmo clado da proteína BafII de *Streptomyces lohii*, produtora da bafilomicina. Os clones de *S. wadayamensis* A23 situaram-se nos mesmos cladogramas que as proteínas FscB e FscD. Esses resultados permitem observar que a maior quantidade de sequências obtidas a partir do alinhamento utilizando as ferramentas blastn e blastp, para as linhagens A19 e A23 está relacionada a biossíntese de policetídeos poliênicos, sugerindo a possibilidade desses micro-organismos apresentarem em seu genoma um *cluster* de genes semelhante e, portanto, ter o potencial para

produção desta classe química de metabólitos. O mesmo raciocínio se aplica para A30, um possível produtor de bafilomicina ou molécula estruturalmente análoga.

#### Análises de NRPS

Para os domínios de adenilação em NRPSs são conhecidas 10 regiões conservadas que permitem verificar sua correta organização: A1 (L(TS)YxEL); A2 (LKAGXAY(VL)P(LI)D); A3 (LAYxxYTSG(ST)TGxPKG); A4 (FDxS); A5 (NxYGPTe); A6 (GELxLxGxG(VL)ARGYL); A7 (Y(RK)TGDL); A8 (GRxDxQVKIRGxRIELGEIE); A9 (LPxYM(IV)P) e A10 (NGK(VL)DR).<sup>30</sup> Em função da qualidade das sequências geradas, os domínios de adenilação foram avaliados somente para os micro-organismos *Streptomyces* sp B1 e *S. wadayamensis* A23, além do organismo modelo *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147. Observou-se que os domínios de adenilação amplificados pelos *primers* A3F e A7R (700 pb) contêm as sequências conservadas denominadas por A3, A4, A5, A6 e A7 (Figura 4).

Os resultados dos alinhamentos comparativos utilizando-se as ferramentas blastn e blastp e possíveis metabólitos associados às sequências amplificadas relacionadas aos domínios de adenilação estão compilados na Tabela 4. Pode-se observar pelos resultados apresentados que as sequências amplificadas de *Streptomyces wadayamensis* A23 apresentam elevada similaridade a gramicidina, actinomicina e manopeptimicina,<sup>31</sup> enquanto *Streptomyces* sp B1 possui um *cluster* de genes relacionado à produção do pigmento azul indigoidina.<sup>32</sup> De maneira bastante interessante, ao cultivarmos o microorganismo B1 em condições específicas, em meio contendo farinha de soja e manitol (SFM), observamos a produção de uma coloração azul, certamente relacionada à biossíntese de indigoidina.

Similarmente, o alinhamento das sequências com baixos parâmetros *e-value* em comparação ao NCBI foi utilizado para construir a árvore de taxonomia metabólica para cada um dos organismos (MS, Figuras 8S e 9S).

A sequência de nucleotídeos correspondente à indigoidina foi traduzida e alinhada com proteínas do banco de dados do NCBI. Observou-se que esta possui uma identidade de 97% com a sintetase de *Streptomyces albus* (Tabela 4), que também está envolvida na biossíntese do metabólito indigoidina.<sup>32</sup> Foi possível observar

**Tabela 3.** Análise de *cluster* para os fragmentos KS-AT amplificados a partir do genoma das linhagens de *Streptomyces* B1, A19, A23 e A30

Sequência (PKS)	Número de acesso	Análogo a	Metabólito sugerido	Proteína	E-value	Cobertura/Identidade (%)
A19-E2	AAQ82565	<i>Streptomyces</i> sp FR-008	Polieno/candidicina	FscB	7.29e-114	55/82
A19-E5	AAQ82568	<i>Streptomyces</i> sp FR-008	Polieno/candidicina	FscD	2.75e-100	49/88
A23-B11/B12	AAQ82568	<i>Streptomyces</i> sp FR-008	Polieno/candidicina	FscD	0	100/99
A23-B43	AAQ82565	<i>Streptomyces</i> sp FR-008	Polieno/candidicina	FscB	5.78e-149	57/97
A30-C12	ADC79617	<i>Streptomyces lohii</i>	Bafilomicina	BafAII	0	100/84
B1-D15/D15_1	ACM78579	<i>Streptomyces</i> sp	PKS	Type-I PKS	2.20e-131	48/96

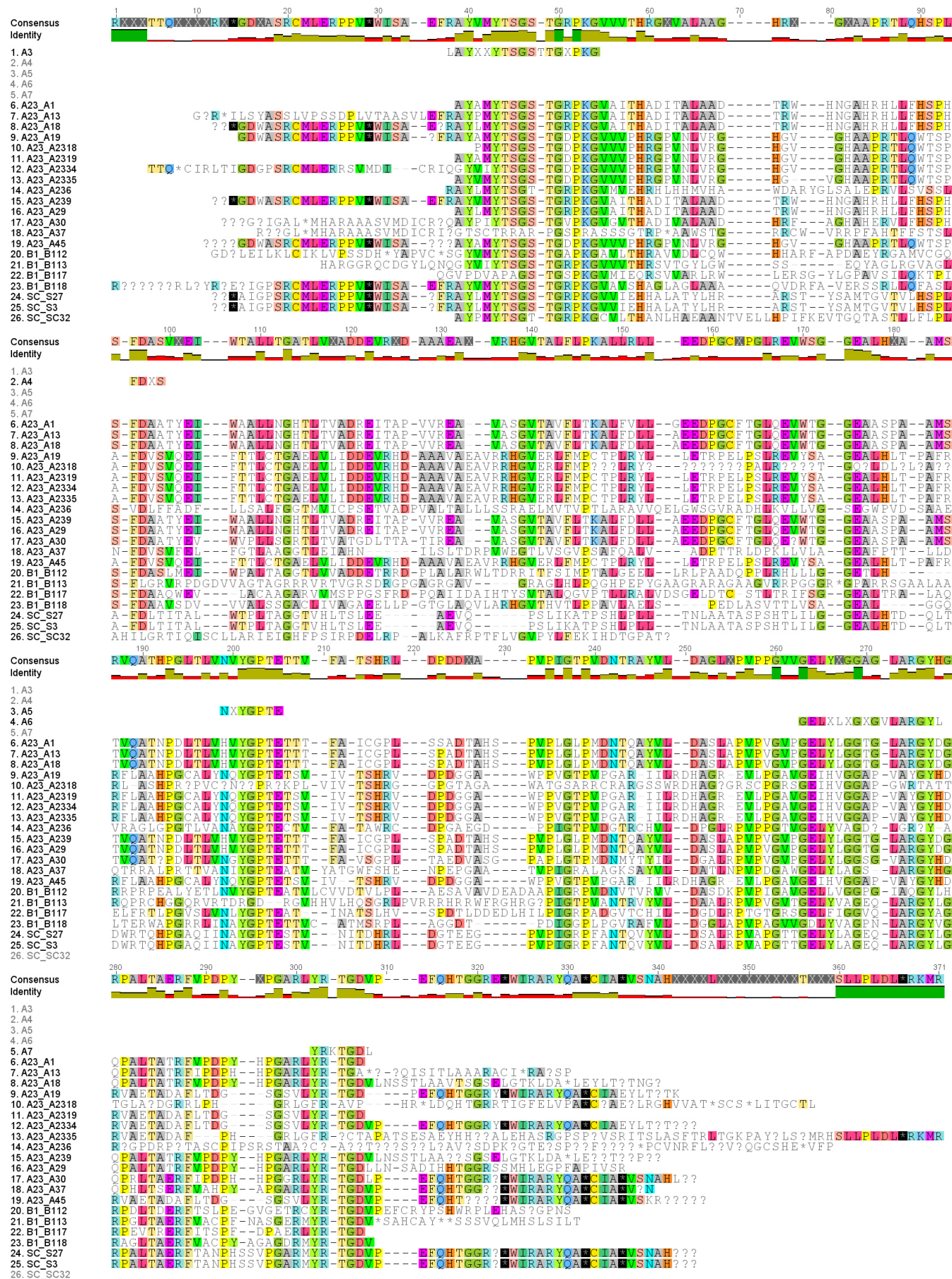


Figura 4. Resíduos conservados de adenilação. Alinhamento gerado no programa Geneious<sup>20</sup>

**Tabela 4.** Análise de cluster para os domínios de adenilação amplificados a partir do genoma das linhagens de *Streptomyces* B1, A23 e *S. coelicolor*

Sequência (NRPS)	Número de Acesso	Análogo a	Metabólito sugerido	Proteína	E-value	Cobertura / Identidade (%)
<b>A23-A19/A1/A13/A239/A29</b>	HM038106.1/ ZP_04702856.1	<i>Streptomyces anulatus/albus</i>	Actinomicina/Gramicidina	Acm/LgrC-LgrB (gramicidin like)	2e-127/5e-83	100/87 93/74
<b>A23-19/45/34/18/19/35</b>	ZP_0658914.9	<i>S. albus</i> J1074	--	Proteína hipotética	2.60 e-137	81/100
<b>A23-30</b>	ZP_0659158.6	<i>S. albus</i> J1074	--	ATP-dependente valina adenilase	5.17e-117	82/79
<b>A23-37</b>	ZP_06591587	<i>S. albus</i> J1074	--	NRPS	1.17e-120	
<b>A23-236</b>	AAU34203	<i>S. hygrosopicus</i>	Manopectimicina	MppB	1.92e-87	72/68
<b>SC-3/27</b>	NP_627444	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	CDA	CDA peptídeo sintetase	2.16e-142	84/95
<b>SC-2/19/25/29/32/35</b>	Todas relacionadas a genes <i>nrsp</i> genoma de <i>S.coelicolor</i>					
<b>B1-13/17</b>	ZP_06589410.1	<i>Streptomyces albus</i> J1074	indigoidina	Sintetase de pigmento azul	5.40e-139	97/90

também, em menor grau, similaridade com sequências de micro-organismos de outros gêneros tais como *Renibacterium salmoninarum*, *Rhodobacterales*, *Vogesella indigofera* e *Erwinia chrysanthemi*, que também estão envolvidas com a biossíntese da indigoidina (IndC-like protein – Figura 4S).

Já as sequências de nucleotídeos relacionadas aos domínios de adenilação presentes nos clones provenientes de A23 (A19/A1/A13/A239/A29) foram traduzidas e o alinhamento dos aminoácidos mostrou uma cobertura de 100% com a proteína LgrC de *Streptomyces albus* J1074. Na árvore de taxonomia metabólica essas sequências aparecem no mesmo clado que a proteína LgrC de 3388 aminoácidos envolvida na biossíntese da gramicidina, (representada pela cor azul na árvore, MS, Figura 9S), um pentadecapeptídeo que contém aminoácidos D e L em sua estrutura (HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) biossintetizado por algumas linhagens de *Streptomyces* e também encontrado em culturas de *Bacillus brevis*.<sup>33</sup>

Utilizando a Ferramenta NRPS predictor2 ([www.nrps.informatik.uni-tuebingen.de](http://www.nrps.informatik.uni-tuebingen.de)),<sup>34</sup> fez-se uma análise dos domínios de adenilação amplificados relacionados a produção de gramicidina em A23 e indigoidina em B1. Pode-se observar que estes domínios apresentam os aminoácidos conservados em regiões específicas e são responsáveis pela incorporação de D-valina e glutamina, respectivamente (Tabela 5).

#### Considerações sobre o método de desrepliação metabólica utilizando primers degenerados

Como os primers utilizados são degenerados e permitem o anelamento em diversas regiões do genoma, esperava-se obter

amplificações de diferentes localidades associadas aos domínios de adenilação no caso de NRPS ou cetossintase-metilmalonila transferase no caso de PKS. Ao contrário, o sequenciamento mostrou que a maior parte das sequências de nucleotídeos amplificados era idêntica (Figura 10S). Esta é uma falha associada a metodologia de triagem que revela uma tendência a amplificação de determinadas sequências em detrimento de outras, o que mostra que o método não é abrangente para revelar o verdadeiro potencial biossintético dos micro-organismos avaliados. Portanto, estudos de produção de metabólitos a partir de seu cultivo em meios de produção com fontes diversificadas de nutrientes continuam sendo necessários. Uma alternativa aos cultivos envolve o sequenciamento completo do genoma das linhagens eleitas como promissoras, o que permite a avaliação do potencial global para a produção de metabólitos secundários a partir da anotação dos genes, possibilitando ainda direcionar os estudos na busca por metabólitos não produzidos nas condições de cultivo e a obtenção de compostos possíveis candidatos a fármacos com mais agilidade.<sup>35</sup>

#### CONCLUSÃO

Neste trabalho descrevemos o emprego de provas metabólicas como metodologia de triagem para avaliar o potencial para a produção de policetídeos e peptídeos não-ribossomais em actinobactérias isoladas de *Citrus reticulata*. A metodologia agrega ferramentas de biologia molecular e taxonomia metabólica tendo como objetivo facilitar a identificação de linhagens promissoras em um grupo de micro-organismos.

Os dados apresentados evidenciam que actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata* apresentam significante potencial para a produção de compostos bioativos da classe dos policetídeos e peptídeos não-ribossomais. Os altos níveis de detecção de genes relacionados a

**Tabela 5.** Previsão dos aminoácidos incorporados pelos domínios relacionados a gramicidina em A23 e indigoidina em B1 utilizando NRSPredictor2

	235	235	239	278	299	301	322	303	313	517	AA
LgrC (D1)	D	A	Y	T	W	G	V	T	F	K	D-Val
LgrC	D	A	Y	K	W	G	V	T	F	K	D-Val
<b>A23-A1</b>	D	A	Y	F	W	G	V	T	F	K	D-Val
Blue pigment synthetase	D	A	W	Q	F	G	L	I	N		Gln
<b>B1-13/17</b>	D	A	W	Q	F	G	L	I	N	K	Gln

biossíntese de PKS-I, PKS-II e NRPS confirmam a ampla distribuição dessas sequências neste filo.

A partir da análise de *clusters* foi possível classificar as sequências representativas como participantes da biossíntese de alguns grupos específicos de metabólitos (p. ex. polieno).

A ocorrência de sequências de PKSs e NRPSs não associadas a metabólitos identificados sugere a capacidade das linhagens em produzir metabólitos cujos agrupamentos de genes participantes das vias metabólicas ainda não são conhecidos ou ainda não encontram-se incorporados a base de dados. O uso de provas metabólicas como ferramenta de triagem apresenta-se, portanto, como uma alternativa a ser acoplada às triagens convencionais na busca por novos produtos naturais e como metodologia para desrepliação.

Percebe-se que a análise por PCR tem a limitação de subestimar a diversidade e detectar etapas irrelevantes. Ainda assim, os dados obtidos demonstram que o potencial metabólico das linhagens merece ser estudado, uma vez que actinobactérias carregam um arsenal biossintético único que continua a direcionar a busca por novas substâncias bioativas para diversas aplicações. Os resultados também evidenciam que as triagens convencionais aplicadas ao acesso da diversidade microbiana possuem limitações. Nesses casos, abordagens complementares podem ser utilizadas para direcionar as pesquisas voltadas para os produtos naturais microbianos.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp (Processos No. 2008/00605-1 – Jovem Pesquisador), 2008/06097-8 (L. R. Giarola), 2009/03793-6 (P. L. R. Cruz), 2010/16798-3 (S. S. Moraes), CNPQ (Bolsa PQ 306932/2009-1), Faepex- UNICAMP (Convênio: 519.292, Solicitações 596/2008 e 788/2009), IFS (Grant Support No. F/4735-1) e Para Mulheres na Ciência (Edição 2008, L. G. De Oliveira).

## REFERÊNCIAS

- Hutchinson, C. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 3336.
- Dewick, P. M.; *Medical Natural Products*, 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons, Ltd: UK, 2009.
- Bibb, M. J.; *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 208.
- Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A.; *Practical Streptomyces Genetics*; The John Innes Foundation: Norwich, 2000; Hopwood, D. A.; *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotics Makers*, Oxford University Press: New York, 2007.
- Hopwood, D. A.; Sherman, D. H.; *Annu. Rev. Genet.* **1990**, *24*, 37.
- Weber, T.; Welzel, K.; Pelzer, S.; Vente, A.; Wohlleben, W.; *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 221.
- Shen, B.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 285.
- Kleinkauf, H.; Von Dohren, H.; *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 335.
- O'Hagan, D.; *The Polyketide Metabolites*, Ellis Horwood: Chichester, 1991.
- Ayuso, A.; Clark D.; Gonzales, I.; Salazar, O.; Anderson, A.; Genilloud, O.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 795; Ayuso-Sacido, A.; Genilloud, O.; *Microb. Ecol.* **2005**, *49*, 10.
- Corre, C.; Challis, G. L.; *Chem. Biol.* **2007**, *4*, 7; De Oliveira, L. G.; Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 1577.
- Komaki, H.; Izumikawa, M.; Ueda, J.; Nakashima, T.; Khan, S. T.; Takagi, M.; Shin-ya, K.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 127.
- Gross, H.; Stockwell, V. O.; Henkels, M. D.; Thomson, B. N.; Loper, J. E.; Gerwik, W. H.; *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 53.
- Udwarý, D. W.; Zeigler, L.; Asolkar, R. N.; Singan, V.; Lapidus, A.; Fenical, W.; Jensen, P. R.; Moore, B. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10376.
- Lautru, S.; Deeth, R. J.; Bailey, L. M.; Challis, G. L.; *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 265
- Marcon, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
- Sharma, A. D.; Singh, J.; *Anal. Biochem.* **2005**, *337*, 354
- Sambrook, J.; Russel, D.W.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.
- <http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=book&type=user&func=displayarticle&aid=93>, acessada em 28/01/2015; Waksman, S. A.; *The Actinomycetes: their nature, occurrence and importance*, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., USA, 1950 (<http://www.biodiversitylibrary.org/item/31000#page/53/mode/1up>, acessada em 28/01/2015); apesar de ser atribuído um valor de porcentagem de inibição, o teste de avaliação de atividade antibiótica permite uma avaliação apenas qualitativa.
- Geneious version 6.1.6 created by Biomatters. Disponível em <http://www.geneious.com/>
- Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A.-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C.-H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabinowitsch, E.; Rajandream, M.-A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, T.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A.; *Nature* **2002**, *417*, 141.
- Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S.; *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 526.
- Oliynyk, M.; Samborsky, M.; Lester, J. B.; Mironenko, T.; Scott, N.; Dickens, S.; Haydock, S. F.; Leadlay, P. F.; *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 447.
- Sattely, E. S.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T.; *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757.
- Cruz, P. L. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2011.
- Petkovic, H.; Cullum, J.; Hranueli, D.; Hunter, I. S.; Peric-Concha, N.; Pigac, J.; Thamchaipenet, A.; Vujaklija, D.; Long, P. L.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 704.
- Observou-se que as linhagens patogênicas não chegam a tocar a estria de crescimento da actinobactéria, e, portanto a inibição ocorre em pequena extensão, enquanto para 0% de atividade as linhagens se encontram na placa (ver ref. 19).
- Haydock, S. F.; Aparicio, J. F.; Molnár, I.; Schwecke, T.; Khaw, L. E.; König, A.; Marsden, A. F. A.; Galloway, I. S.; Staunton, J.; Leadlay, P. F.; *FEBS Lett.* **1995**, *374*, 246.
- Chen, S.; Huang, X.; Zhou, X.; Lee, S. Y.; Deng, Z.; *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1065.
- Challis, G. L.; Ravel, J.; Townsend, C. A.; *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 211; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A.; *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493.
- A análise da anotação do genoma de *Streptomyces wadayamensis* A23 permitiu confirmar a presença do agrupamento de genes que codifica para a biossíntese da manopeptimicina.
- Pela análise da anotação do genoma de *Streptomyces* sp B1 (resultados não publicados), é possível encontrar o cluster de genes idêntico ao descrito estar envolvido na biossíntese desse metabólito: Yu, D.; Xu, F.; Valiente, J.; Wang, S.; Zhan, J.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 159 (GenBank: JX499187.1); Chen, Y.; Li, P.; Li, J.; Guo, Z.; *Streptomyces lavendulae* stereospecific keto reductase gene, partial cds; and



- SARP-family Regulator, bpsA, ribose-phosphate pyrophosphkinase, NADH flavin oxidoreductase, Indigoidine synthase A, and tautomerase genes, complete cds, Acesso GenBank: KJ192365.1
33. Burkhart, B. M.; Gassman, R. M.; Langs, D. A.; Pangborn, W. A.; Duax, W. L.; Pletnev, V.; *Peptide Sci.* **1999**, *51*, 129.
  34. Rottig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O.; *Nucl. Acids Res.* **2011**, *39*, W326.
  35. O estudo levou ao direcionamento das linhagens identificadas como B1 e A23 como bastante promissoras. Essas linhagens foram recentemente sequenciadas utilizando tecnologia Illumina MiSeq e estão sendo investigadas por estudos via *genome mining*. A projeto genoma total (whole-genome shotgun project) de *Streptomyces wadayamensis* A23 está depositado no DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso JHDU00000000; de Oliveira, L. G; Tormet Gonzalez, G. D.; Samborsky, M.; Marcon, J.; Araujo, W. L.; Azevedo, J. L.; *Genome Announcements* **2014**, *2*, e00625.