

Genome mining e ensaio guiado permitem prever alta capacidade de produção de antibióticos por *Streptomyces wadayamensis* A23

Ana B. Gonçalves (IC), Pedro L. R. Cruz (PG), Marcelo Lancellotti(PQ) e Luciana G. de Oliveira (PQ)*

Instituto de Química, Unicamp, Campinas, São Paulo (luciana@iqm.unicamp.br)

Palavras Chave: genome mining, ensaio guiado, atividade antibiótica

Introdução

Streptomyces são bactérias gram-positivas, aeróbias e possuem alto conteúdo GC incorporado em seu genoma. São caracterizadas por sua diversidade morfológica e ecológica.¹ Durante seu ciclo de vida exibe micélios septados multicelulares que se diferenciam em hifas aéreas, originando posteriormente os esporos.² O processo de diferenciação morfológica em geral coincide com a produção de metabólitos secundários.

A análise recente do genoma de diversas linhagens de *Streptomyces* revelou uma grande abundância de agrupamentos de genes que codificam enzimas do metabolismo secundário.

Neste trabalho apresentamos resultados que permitem estimar um elevado potencial para a produção de moléculas com atividade antibiótica utilizando *genome mining* e ensaios guiados como ferramentas.

Resultados e Discussão

A linhagem endofítica *Streptomyces wadayamensis* A23 isoladas de *Citrus* ssp foi sequenciada recentemente pelo nosso grupo de pesquisas.³ A escolha desta linhagem se deu por testes prévios que acoplavam triagem de genes biossintéticos utilizando provas metabólicas e testes bioquímicos. Os genes foram anotados e utilizando-se análise *in silico* foi feita a atribuição dos clusters envolvidos na biossíntese de metabólitos. Análise via ANTISMASH⁴ revelou a presença de pelo menos 36 clusters biossintéticos dos seguintes grupos: t1-PKS, t2-PKS e t3-PKS, NPRS, terpeno, lantipeptídeo, sideróforo, bacteriocina, ectoina e vias mistas NRPS-t1PKS, lantipeptídeo-NRPS-t1-PKS, tiopeptídeo-lantipeptídeo, bacteriocina-terpeno. Em várias situações os clusters previstos por triagem metabólica⁵ foram confirmados pela informação do genoma para metabólitos já conhecidos como as desferrioxaminas, manopeptimicina e antimicinas.

De forma a ampliar o conhecimento sobre o perfil de metabólitos produzidos em condições de laboratório, a linhagem de *Streptomyces* A23 foi inoculada em meio vegetativo (SEED) e após 60 horas foram transferidas para dez diferentes meios de cultivo: Meio V, A, B, C, 8, INA, RA3, GYM, GPMY e V6. Os meios ficaram sob agitação orbital durante 7 dias em incubadora a 28 °C, e posteriormente, foi realizada a extração dos substratos produzidos com acetato de etila puro. A remoção do solvente deixou um extrato que foi particionado primeiramente com hexano e posteriormente diluído em metanol.

Nas análises da fração polar por UPLC-MS encontraram-se vários íons já conhecidos e

previstos pela análise do genoma como os íons 564 (aerobactina), 669 (enterobactina), 562 e 601 (desferrioxaminas B e E), 1294 (manopeptimicina), 547, 505, 519 e 533 (antimicinas A1, A4, A7 e A8). Além de alguns íons não atribuídos a estruturas conhecidas, mas persistentes na maioria dos cultivos como 914 e 639.

Os extratos de acetato de etila de A23 foram enviados para análise da capacidade antibiótica contra agentes patogênicos (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*). Além da atividade anteriormente observada contra *C. albicans*⁵ todos os extratos apresentaram alta atividade contra 3 diferentes cepas de *Meningococos*. O extrato do meio V apresentou atividade contra 1 cepa de *Staphylococcus aureus* multirresistente. Testes de MIC estão em andamento.

Experimentos de desreplicação metabólica via deleção, incorporação de precursores marcados e análise de *genome mining networking* estão em andamento para determinar as estruturas desconhecidas e elucidar os metabólitos promotores das atividades observadas.

Conclusões

A análise do genoma da linhagem *Streptomyces wadayamensis* A23 permite estimar sua alta capacidade para a produção de metabólitos com atividade antibiótica. Antimicinas são reconhecidas por sua atividade antifúngica e as manopeptimicina são glicopeptídeos eficazes ativos contra staphylococci e enterococci. Este trabalho evidencia o potencial de utilização de novas ferramentas combinadas a ensaios guiados para a busca de novas moléculas passíveis de serem aplicadas em diversas terapias.

Agradecimentos

FAPESP, IQ-UNICAMP

¹ Anderson, A. S.; Wellington, E. H. M. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **2001**, *51*, 797.

² Sherr, N.; Nguyen, L. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 699.

³ A organização do genoma e anotação foi realizada em colaboração com o Dr. Markiyam Samborsky, Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, UK.

⁴ Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M. A.; Weber, T.; Takano, E.; Breitling, R. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W339.

⁵ Cruz, P. L. Dissertação de Mestrado, 2010, Instituto de Química, UNICAMP