

## Fingerprint molecular em actinomicetos

Pedro L. R. da Cruz<sup>1</sup> (PG), Suelen R. Gomes<sup>1</sup> (IC), Luciana G. de Oliveira<sup>1,\*</sup> (PQ)  
(luciana@iqm.unicamp.br)

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia e Biossíntese Combinatória, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n – Caixa Postal 6154, CEP 13084-970 – Campinas/SP (Brasil).

Palavras Chave: policetídeo sintases, peptídeo não-ribossomal sintetase, actinomicetos, triagem metabólica.

### Introdução

Actinomicetos são um grupo de bactérias Gram-positivas amplamente encontradas no solo. Caracterizam-se por seu alto conteúdo GC no genoma e são certamente um dos mais importantes produtores de metabólitos bioativos.

Particularmente, os policetídeos reduzidos (PK-I) e peptídeos não ribossomais (NRP) são produzidos por um conjunto de enzimas multifuncionais contendo diversos módulos com múltiplas atividades enzimáticas. Existe uma relação colinear conhecida entre a atividade dos domínios enzimáticos e a estrutura da molécula biossintetizada. A partir desta informação é possível utilizar provas metabólicas que permitem amplificar regiões conservadas que codificam para os multidomínios enzimáticos de forma a direcionar os esforços de um trabalho de triagem para as linhagens mais promissoras.

Neste trabalho foi realizada uma triagem utilizando provas metabólicas para avaliar o potencial de linhagens de actinomicetos para a produção de policetídeos reduzidos e peptídeos não ribossomais.

### Resultados e Discussão

A metodologia consiste em um *fingerprint* molecular, baseado na avaliação do potencial metabólico das linhagens estudadas em produzir metabólitos secundários, efetivo para facilitar o processo de desreplicação. Este tipo de estudo permite focar os esforços de triagem por metabólitos bioativos nos microrganismos mais promissores, fator essencial para direcionar a triagem para a descoberta de novas drogas.

As provas metabólicas utilizadas neste estudo já foram descritas na literatura<sup>1</sup> e compreendem os conjuntos de *primers* K1F/M6R para amplificar domínios conservados de cetossintase (KS) + metilmalonil transferase (AT) em sistemas PKS-I (1200 pb) e os primers degenerados A3/A7 para amplificar domínios de adenilação (A) em NRPS (700 pb).

Foram estudadas 13 linhagens de actinomicetos isoladas de *Citrus* ssp e 8 linhagens de actinomicetos isoladas de amostras de solo, além de *Streptomyces coelicolor*, *S. rimosus* e *S. fradiae* e observou-se a amplificação de fragmentos relacionados a biossíntese de PKs e NRPs em altas

freqüências: 87% PKS e 92% NRPS. Um experimento do tipo “multiplex” também foi realizado com o objetivo de amplificar as duas sequências simultaneamente, facilitando o processo de triagem. Guiados por informações de testes biológicos, as linhagens denominadas A19, A23, A30 e B1 foram selecionadas para análise de *clusters*. Foram realizadas as análises de clusters para 5 clones de cada linhagem e as sequências geradas foram comparadas àquelas disponíveis na base de dados do NCBI originando árvores de filogenia.

2 clones de A19 e 2 clones de A30 levaram a altas similaridades com sequências bastante genéricas que codificam para policetídeo sintases em microrganismos. 3 clones de A30 apresentaram alta similaridade com o gene FscD de *Streptomyces* FR008 que pertence ao cluster de genes responsável pela biossíntese da Candicidina, um polieno macrolídico. Neste mesmo clado foram observados domínios adicionais envolvidos na biossíntese de polienos macrolídicos. Observaram-se também altas similaridades a sequências de domínios de KS envolvidas na biossíntese de polienos para clones de A19 e A23.

Na análise de clusters de NRPS para as linhagens A23 e B1 foram encontradas similaridades das sequências avaliadas à gramicidina sintetase de *Streptomyces albus*. Para B1 também foi observada similaridade com o gene envolvido na biossíntese da indigoidina, um pigmento azul que interessantemente observamos em placas de cultivo deste microrganismo

### Conclusões

O uso de ferramentas moleculares para detecção de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários permite eleger linhagens promissoras em um grupo de microrganismos. Apesar das limitações da triagem por PCR em superestimar diversidade e detectar etapas irrelevantes, os dados obtidos sugerem que o potencial metabólico das linhagens testadas merece ser investigado.

### Agradecimentos

FAPESP, CNPQ, IFS, IQ-UNICAMP

<sup>1</sup>Ayuso, A.; Clark, D.; Gonzales, I.; Salazar, O.; Anderson, A.; Genilloud, O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 795. Ayuso-Sacido, A.; Genilloud, O. *Microbial Ecology* **2005**, *49*, 10.