

Artigo

Avanços Recentes na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais

González, G. D. T.;* Sigrist, R.; Paulo, B. S.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (6), 1998-2025. Data de publicação na Web: 26 de dezembro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Recent Advances in Genetic Manipulation of Organisms for the Production of Nonribosomal Peptides

Abstract: Nonribosomal peptides (NRP) are a class of natural products biosynthesized by nonribosomal peptide synthetases (NRPS). These complex multimodular enzymes are present mainly in bacteria and filamentous fungi and each module is responsible for substrates insertion, elongation and chemical modification of the NRP chain. NRP are polypeptides with broad biological activity and the antibiotic property is of especial interest to the pharmaceutical industries in order to fight against one of the biggest challenges of modern medicine: bacterial multiresistance to current available drugs. Over the last years, the NRP biosynthesis have been studied and engineered in order to obtain structural diversity. The advances in molecular biology in the post-genomic era assured the enhancement of already known techniques, such as site-directed mutation, increasing the promiscuity of enzymes, furthermore the introduction of new techniques, as heterologous expression, complete transference of gene clusters to heterologous organisms allowed the identification of new compounds or increasing expression level of already identified products. The present review aims to highlight the relevance of mutasynthesis and heterologous expression for the production of new natural products biosynthesized by NRPS.

Keywords: Nonribossomal peptides; Nonribossomal peptide synthetases; Mutasynthesis; Heterologous expression.

Resumo

Os peptídeos não ribossomais (NRP) são uma classe de produtos naturais produzidos, principalmente, por bactérias e fungos filamentosos. Estes compostos são biossintetizados através de maquinários enzimáticos multimodulares, denominados sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS). Cada módulo é responsável pela incorporação de um substrato, alongação e modificação química da cadeia do polipeptídeo. Os NRP possuem uma ampla atividade biológica e a ação antibiótica é de especial interesse para as indústrias farmacêuticas na corrida para enfrentar um dos maiores desafios da medicina moderna, a multirresistência bacteriana aos medicamentos em uso. Nos últimos anos, as NRPS têm sido amplamente estudadas e geneticamente modificadas com o intuito de obter o maior número de compostos com diversidade estrutural. Os avanços na biologia molecular que surgiram na era pós-genômica garantiram o aprimoramento de técnicas já conhecidas, como a mutação sítio-dirigida, aumentando a aceitação das enzimas por novos substratos, além de introduzir novas técnicas, como a expressão heteróloga, onde a transferência completa de *clusters* de genes para um organismo heterólogo possibilita a identificação de novos compostos ou até mesmo aumentar do nível de expressão daqueles já conhecidos. A presente revisão tem como objetivo destacar a importância da mutassíntese e da expressão em organismo heterólogo na obtenção de novos produtos naturais biossintetizados por NRPS.

Palavras-chave: Peptídeos não ribossomais; Sintetases de peptídeos não ribossomais; Mutassíntese; Expressão heteróloga.

* Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Laboratório de Biotecnologia e Biossíntese Combinatória (LaBBiComb), CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

✉ gabrielatormet@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20160135](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160135)

Avanços Recentes na Manipulação Genética de Organismos para a Produção de Peptídeos não Ribossomais

Gabriela D. T. González,* Renata Sigrist, Bruno S. Paulo

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Laboratório de Biotecnologia e Biossíntese Combinatória (LaBBiComb), CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

* gabrielatormet@gmail.com

Recebido em 10 de junho de 2016. Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2016

1. Introdução
2. Produtos naturais: desafios do século XXI
3. Peptídeos não ribossomais: uma classe de produtos naturais com grande potencial
4. Biossíntese de peptídeos não ribossomais
5. Estratégias para gerar diversidade estrutural em peptídeos não ribossomais
 - 5.1. Mutassíntese para inserir substratos não-naturais
 - 5.2. Biologia sintética e produção em organismo heterólogo
6. Conclusões e perspectivas

1. Introdução

Há muito tempo, o homem busca na natureza componentes para suprir suas necessidades médicas, cujos efeitos terapêuticos foram atribuídos de forma empírica ao longo dos séculos. Já no século XX, o trabalho pioneiro do prêmio Nobel Alexander Fleming, que descreveu o uso de culturas do gênero *Penicillium* como agente antibiótico contra vários patógenos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*,¹ marcou o início da “era dos antibióticos”.^{2,3}

A partir da descoberta da penicilina por Fleming, extensos esforços foram dedicados

à descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, antifúngicos, imunossuppressores, entre outros, incluindo a busca por agentes com atividade biológica na vasta gama de compostos disponíveis na natureza e a síntese orgânica de fármacos sintéticos a partir do desenho racional de novas drogas. Atualmente, estas duas abordagens continuam sendo utilizadas na busca por novos agentes farmacológicos, sendo de grande relevância o auxílio da genética e da biologia molecular, especialmente na busca por produtos naturais bioativos.^{2,4-7}

2. Produtos naturais: desafios do século XXI

Os produtos naturais (PN) contribuíram como a maior fonte de agentes terapêuticos durante quase toda a história, porém devido às dificuldades no isolamento de PN em grande escala, no século XX a produção de fármacos mediante técnicas de síntese orgânica fina teve um grande avanço e, atualmente, encontra-se como a principal fonte de medicamentos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA). No entanto, entre os anos 1981 e 2010 os produtos naturais constituíam 34% dos fármacos aprovados pela FDA baseados em pequenas moléculas e este número continua crescendo.⁶⁻⁸

A ação antibiótica dos produtos naturais é de especial interesse nas pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas para enfrentar um dos maiores desafios da medicina moderna: a multirresistência de bactérias aos antibióticos de uso tradicional.⁹ Dados provenientes do Relatório de Resistência Antimicrobiana do ano 2014, da Organização Mundial da Saúde (OMS),¹⁰ revelaram um aumento na resistência aos antibióticos das principais linhagens bacterianas patogênicas a nível mundial, destacando, por exemplo, casos como a bactéria *Escherichia coli* cuja resistência aos antibióticos da classe das cefalosporinas já alcançou a terceira geração. Neste sentido, a OMS indicou um Plano Mundial de Ação que, entre outras medidas, sugere um maior investimento em pesquisas para o teste e desenvolvimento de novos antibióticos.¹⁰

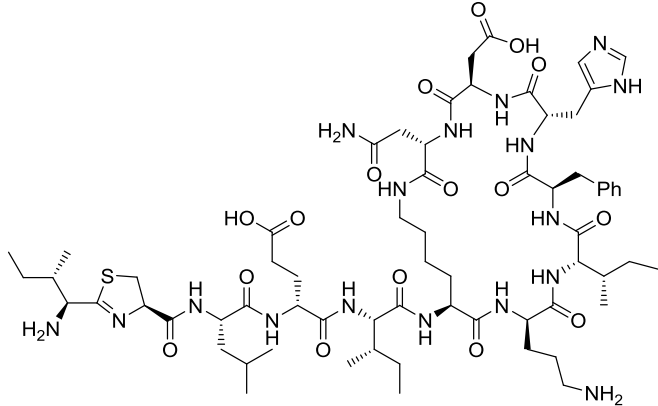
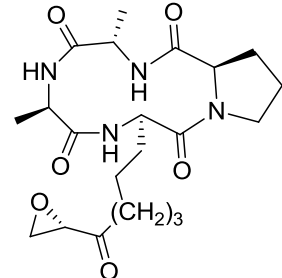
A busca e obtenção de novos fármacos de origem natural têm sido abordadas de forma mais rápida e eficiente através da integração das diversas tecnologias que surgiram a partir da era genômica e, mais recentemente, devido à incorporação de outras “ômicas”, como a metabolômica, metagenômica e proteômica, assim como diversas ferramentas de bioinformática, tais como antiSmash,¹¹ NRSPredictor,¹² MIBiG,¹³ RAST,¹⁴ Smurf,¹⁵ para busca e caracterização

in silico de metabólitos secundários produzidos por bactérias, fungos e plantas com atividades não somente antibióticas, mas também antivirais, antifúngicas e antitumorais.^{3,7,16}

3. Peptídeos não ribossomais: uma classe de produtos naturais com grande potencial

Peptídeos não ribossomais (NRP) são uma classe de compostos naturais produzidos em sua grande maioria por bactérias e alguns organismos eucariotos, como fungos filamentosos, através de vias biossintéticas das quais não participa o ribossomo.¹⁷⁻¹⁹ A principal fonte de peptídeos não ribossomais são as bactérias, constituindo aproximadamente 89% dos microorganismos produtores, sendo os de maior importância actinobactérias, proteobactérias, firmicutes e cianobactérias.²⁰

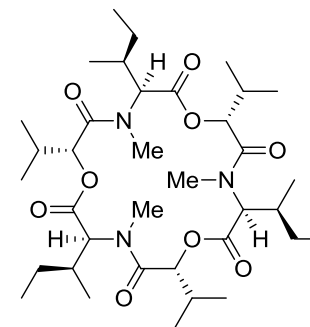
Os NRP são de grande importância para a indústria farmacêutica devido à ampla atividade biológica, o que os coloca entre os produtos naturais com maior potencial para a descoberta de novos fármacos.^{5,17} Entre os NRP mais empregados em tratamentos médicos estão antibióticos como a vancomicina e a daptomicina produzidos pelas bactérias *Amycolatopsis orientalis*²¹ e *Streptomyces roseosporus*,²² respectivamente; e o imunossupressor ciclosporina A produzido por *Cylindrocarpon lucidum* e *Tolypocladium inflatum* (Tabela 1).^{5,23} Outro grande grupo de NRP são os sideróforos²⁴ e, embora não se encontrem entre os NRP de maior relevância para uso medicinal, o entendimento do mecanismo de ação apresenta-se interessante por ser a principal fonte de acesso a ferro de alguns patógenos para cumprir suas funções vitais, como a petrobactina, em *Bacillus anthracis* e a estafiloferrina B, em *Staphylococcus aureus*.^{5,25-29}

Produto Natural	Atividades Biológicas	Organismos Produtores	Estrutura	Ref.
<p>Bacitracinas mistura de nove NRP, maioritariamente da Bacitracina A</p>	<p>Antibiótico</p>	<p><i>Bacillus licheniformis</i>, <i>Bacillus subtilis</i></p>		<p>30</p>
<p>Toxina-HC</p>	<p>Toxina produzida pelo fungo <i>C. carbonum</i>, afetando às plantações de milho</p>	<p><i>Cochliobolus carbonum</i></p>		<p>31</p>

Enniantinas
Mistura de NRP,
principalmente de
enniantina A, A1, B e B1

Antimicrobiana e potencial
antitumoral

Fusarium sp.



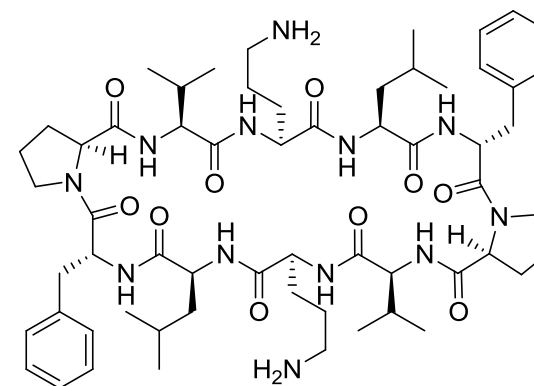
Enniantina A

32,33

Gramicidina S

Antibacterial

Bacillus brevis ATCC 9999

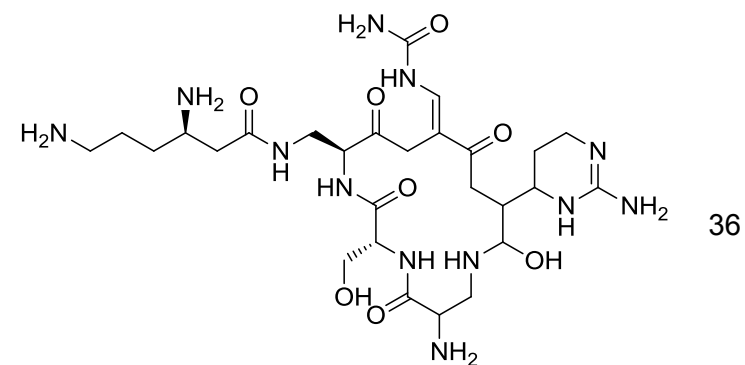


34,35

Capreomicina
Mistura de NRP,
principalmente de
capromicina IA e IB

Antibióticos

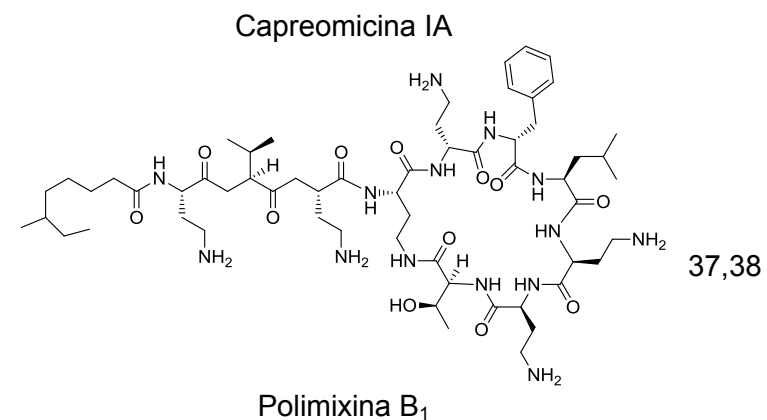
Streptomyces capreolus



Polymyxinas
Mistura NRP,
principalmente de
polymixinas B₁, B₂ e C

Antibióticos

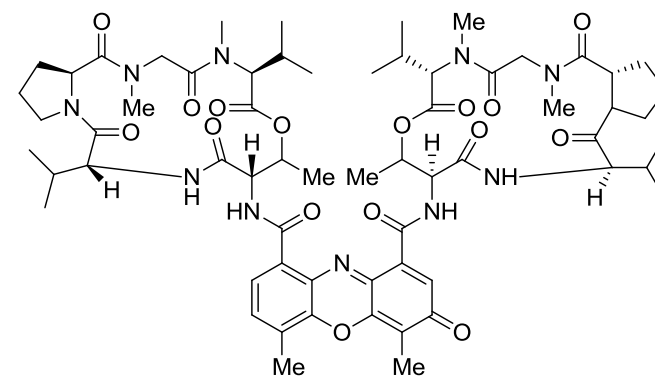
Bacillus polymyxa e outras
bactérias do gênero *Bacillus*



Daptomicina

Antibiótico

Streptomyces roseosporus

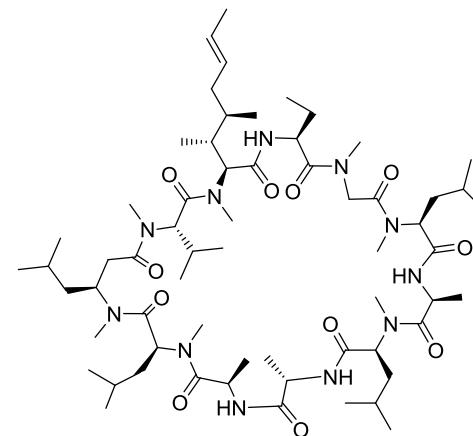


22

Ciclosporina A

Imunosupresor

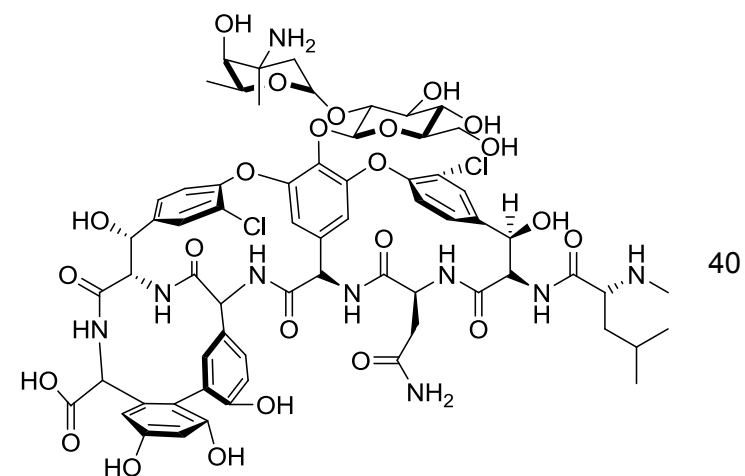
Cylindrocarpon lucidum;
Tolypocladium inflatum



39

Vancomicina

Antibiótico

Amycolatopsis orientalis

Atualmente, de forma semelhante a outros PN, o potencial dos peptídeos não ribossomais como agentes terapêuticos se mostra mais acessível devido ao desenvolvimento das novas técnicas de genética e biologia molecular que surgiram na época pós-genômica.⁴¹ Adicionalmente ferramentas de bioinformática, principalmente aquelas relacionadas com estratégias genoma guiadas (ou *genome-mining*), facilitam a exploração de genes que codificam para metabólitos secundários de grande interesse anotados nos genomas sequenciados durante as últimas décadas.^{4,7,16,20}

Entre os micro-organismos sequenciados destacam-se o gênero das *Streptomyces*, um dos principais produtores de NRP, com 57 projetos de sequenciamento de genoma completos e publicados, 232 completos, 397 *drafts* (esboços) e 395 projetos de sequenciamento em andamento.⁴² Desta forma, pesquisadores ao redor do mundo se mostram otimistas em encontrar, entre todos estes novos genomas sequenciados, *clusters* de genes associados a novos NRP e, com o objetivo de unir todas essas informações, têm sido criados bancos de dados de metabólitos secundários, como o recém lançado MIBiG, o qual até a data tem depositado 209 *clusters* de genes que codificam para metabólitos secundários do tipo peptídeos não ribossomais e 149 *clusters* de genes que correspondem a metabólitos com características mistas de policetídeos e peptídeos não ribossomais.¹³

Adicionalmente, em 2014, Wang *et al.*²⁰ fizeram uma busca detalhada nos dados disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁴³ e verificaram que em 2699 organismos estudados (incluindo bactérias, archeas e eucariotos) foram encontrados 1531 *clusters* de genes associados à biossíntese de NRP e 1147 associados a metabólitos com características mistas policetídeos e peptídeos não ribossomais.²⁰ Estas informações confirmam o grande potencial dos peptídeos não ribossomais na descoberta de novos fármacos.

4. Biossíntese de peptídeos não ribossomais

O estudo da biossíntese dos peptídeos não ribossomais é essencial para o entendimento dos mecanismos pelos quais estes compostos atuam e que conferem a relevante atividade biológica que os caracteriza. Adicionalmente, a compreensão da síntese dos NRP permite o desenho de possíveis modificações estruturais que possam dar origem a novos compostos derivados dos naturais.

A biossíntese de peptídeos não ribossomais começou a ser estudada na década de 1960, quando pesquisadores que trabalhavam na elucidação da biossíntese de peptídeos produzidos por diferentes espécies de *Bacillus* observaram que alguns dos peptídeos eram sintetizados por um mecanismo enzimático independente do ribossomo.⁵ Em 1963, Mach *et al.*⁴⁴ relataram a primeira evidência de biossíntese de um peptídeo via mecanismo independente do ribossomo, a tirocidina, produzida pela espécie *Bacillus brevis*.

Nas décadas seguintes, grupos de pesquisadores envolvidos no estudo da biossíntese dos antibióticos ediene,⁴⁵ gramicidina S,^{35,46} e polimixina B³⁸ revelaram que, de forma semelhante à tirocidina, estes compostos eram sintetizados em um mecanismo independente do ribossomo. O grupo do Prof. Lipmann dedicou inúmeros esforços ao esclarecimento deste mecanismo e propuseram que a biossíntese do composto gramicidina S acontecia via uma reação ATP-dependente, catalisada por enzimas responsáveis pela incorporação de aminoácidos em um mecanismo de duas etapas.^{47,48} A incorporação de sucessivos aminoácidos alongaria a cadeia peptídica enquanto essa permaneceria ancorada covalentemente a uma “enzima carreadora”.⁴⁹ Adicionalmente, observaram a correlação de aproximadamente 70-75 kDa de proteínas existentes por aminoácido

ativado pelo grupo enzimático e propuseram que este maquinário estaria composto por um conjunto de módulos formados por subunidades catalíticas, cada uma das quais seria responsável pela incorporação de um aminoácido.^{50,51}

Com a chegada das técnicas de sequenciamento do DNA, o grupo do Prof. Marahiel, em 1988, sequenciou o *cluster* de genes que codifica para a biossíntese de gramicidina S produzida por espécies de *Bacillus*, confirmando a hipótese de um mecanismo regido por enzimas modulares, proposta anteriormente por Lipmann e colaboradores.⁵²⁻⁵⁴ Esses complexos multienzimáticos foram denominados sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS).

As NRPS formam um maquinário eficiente para a biossíntese de moléculas e são constituídas por diferentes módulos. Como cada módulo é responsável pela incorporação de um único aminoácido, as NRPS são complexos grandes, como por exemplo, a envolvida na biossíntese da ciclosporina A, produzida por *Tolypocladium niveum*, que possui 1,6 MDa de tamanho.²³ Cada módulo de NRPS é subdividido em vários domínios

que catalisam reações específicas, que permitem o alongamento da cadeia e formação dos precursores de metabólitos.^{18,29,55,56}

O primeiro módulo da NRPS, denominado módulo de iniciação, é formado por um domínio de adenilação (A) e um domínio de tioação (T), também conhecido como proteína carreadora de peptídeo (PCP). Então, seguem os módulos de alongação da cadeia que contém, obrigatoriamente, um domínio de condensação (C) seguido de um domínio de adenilação e outro de tioação (Figura 1). Como parte destes módulos de alongação, podem ser encontradas enzimas acessórias como as epimerases (E), metiltransferases (MT) e ciclasas (Cy). No módulo final, encontra-se um domínio de tioesterase (TE) que tem a função de catalisar a liberação do produto final, o qual ainda pode sofrer modificações posteriores promovidas por enzimas pós-NRPS, como as glicosiltransferases, as quais catalisam reações de glicosilação e tem particular relevância nas últimas etapas da biossíntese de antibióticos glicopeptídicos, como a vancomicina.^{18,57-60}

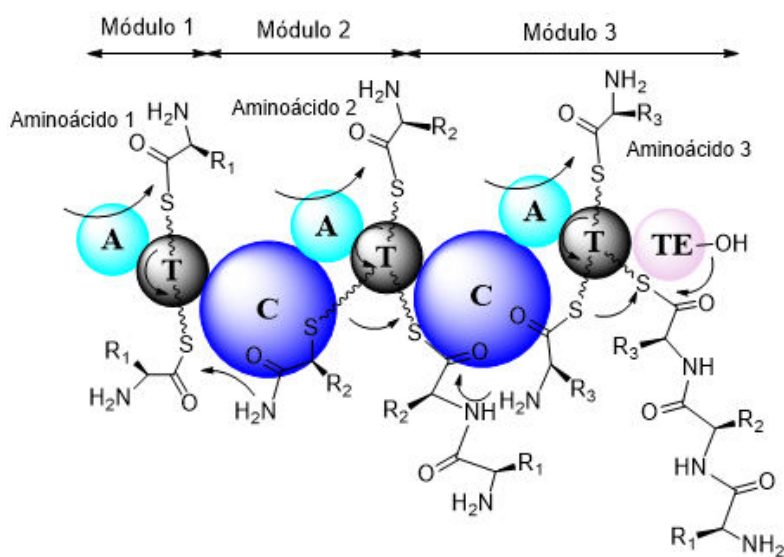


Figura 1. Representação da biossíntese de peptídeos não ribossomais nas NRPS⁵⁶

Para entendermos a biossíntese dos NRP tomemos como exemplo a biossíntese da tirocidina por *B. brevis* (Figura 2). A tirocidina é um decapeptídeo cuja biossíntese é mediada por 10 módulos separados em 3 sintetases denominadas TycA, TycB e TycC. O primeiro módulo em TycA não apresenta um domínio de condensação por não haver um aminoácido precedente ao qual condensar, e apresenta um domínio de epimerização que atua na conversão da L-fenilalanina em D-

fenilalanina, logo após a biossíntese é estendida ao segundo módulo em TycB ao qual se condensa um resíduo de prolina seguido de duas fenilalaninas onde ocorre novamente a epimerização da última L-fenilalanina incorporada. Assim novos aminoácidos são condensados até o décimo módulo onde um domínio de tioesterase catalisa a condensação do primeiro aminoácido com o último formando sua estrutura cíclica.^{5,61}

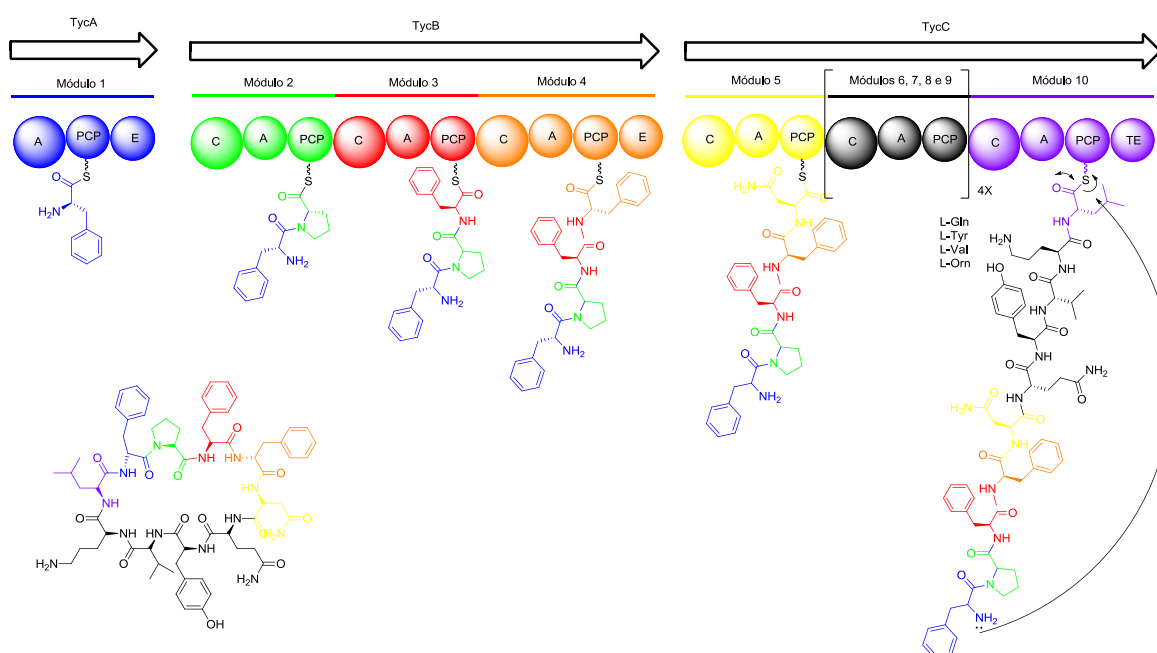


Figura 2. Biossíntese do decapeptídeo Tirocidina em *Bacillus brevis*, cada módulo é responsável pela inserção e modificação de um único aminoácido. A: adenilação, PCP: proteína carreadora de peptídeo, C: condensação, E: epimerização, TE: tioesterase⁶¹

5. Estratégias para gerar diversidade estrutural em peptídeos não ribossomais

A obtenção de diversidade estrutural dos produtos naturais, assim como o melhoramento nas técnicas de obtenção destes compostos, incluindo os NRP, tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa no mundo. Embora NRP tenham grande destaque pela ampla variedade de propriedades farmacológicas, estes raramente são produzidos em quantidades

suficientes para aplicações em larga escala. Além disso, muitos NRP apresentam propriedades terapêuticas interessantes, porém apresentam alta toxicidade ou baixa biodisponibilidade, por exemplo, e por isso análogos destes compostos são desejáveis para a criação de bibliotecas de compostos derivados.^{60,62}

A motivação em se produzir compostos análogos biossintéticos aos NRPs é que aumenta a quantidade de metabólitos diferentes que podem ser produzidos com estruturas alteradas, esclarecendo por exemplo dúvidas em relação a estrutura-atividade que é essencial para o

desenvolvimento de fármacos e compostos relevantes. Outro motivo é que existe a alta incidência de re-isolamento de substâncias já conhecidas quando se faz prospecções de diversos organismos, o surgimento dessas bibliotecas é uma forma de inibir a repetição dessas estruturas.^{62,63}

O conhecimento específico da enzimologia dessas NRPS permite realizar inserções, deleções, desativações de sequências e conseqüentemente promover alterações estruturais que permitem potencializar a atividade do NRP, como foi o caso dos análogos do lipopeptídeo daptomicina que se mostraram ativas frente as bactérias patogênicas como *S. aureus* (resistente a metilina).⁶⁴⁻⁶⁶

As técnicas mais utilizadas para obter diversidade estrutural em NRP são aquelas relacionadas com a manipulação genética de bactérias e fungos produtores. Estas estratégias têm sido utilizadas há mais de 40 anos e permitiram o acúmulo de conhecimento acerca da biossíntese de diversos metabólitos secundários. Contudo, estas metodologias da era pré-genômica apresentam grandes limitações por serem muito demoradas e aleatórias na procura das modificações requeridas.^{7,62,67}

A primeira metodologia empregada para a manipulação genética de organismos produtores de NRP foi a mutassíntese. Esta técnica começou a ser aplicada no final da década de 1960 e consistia na inserção de mutações em linhagens selvagens, com a finalidade de inativar algumas vias metabólicas e aumentar a aceitação por precursores diferentes aos naturais e, assim, biossintetizar novos compostos.^{60,67,68}

A chegada da era pós-genômica permitiu a introdução de novas técnicas de biologia molecular para a geração de mutações genéticas dirigidas (e não somente aleatórias, como inicialmente), conseqüentemente a mutassíntese teve uma reformulação total do desenho dos experimentos. De igual importância neste ressurgimento é o avanço da síntese orgânica convencional que permite

hoje ter acesso a um maior número de reagentes com alta pureza enantiomérica para serem usados como precursores não-naturais.^{41,67,68}

Posteriormente, na década de 80, a introdução de técnicas de clonagem molecular em bactérias facilitou o isolamento de *clusters* de genes associados com a biossíntese de alguns dos antibióticos mais utilizados até o momento, motivando o desenvolvimento das primeiras técnicas de química combinatória para a obtenção de compostos híbridos, resultantes da combinação de genes provenientes de diferentes rotas biossintéticas.^{62,69} Este grupo de técnicas também foi aperfeiçoado com o avanço e conhecimento dos genomas dos organismos produtores, porém as limitações e desvantagens nestas metodologias são grandes quando comparadas às técnicas de mutassíntese e biologia sintética para a obtenção de NRP. Estas limitações surgem principalmente do pouco controle das interações proteína-proteína nas regiões intermódulos das NRPS, levando a baixos rendimentos dos produtos obtidos após a inserção, deleção ou inativação de genes pela biossíntese combinatória.^{41,60,62}

Mais recentemente, as técnicas de biologia sintética tiveram um incremento bastante significativo na sua utilização para o estudo, modificação e obtenção de produtos naturais, incluindo peptídeos não ribossomais. Entre estas técnicas, a expressão de genes em organismos heterólogos, *Gibson-assembly*⁷⁰ e edição de genes com a metodologia CRISPR⁷¹ representam as mais recentes estratégias para diminuir as limitações provenientes do trabalho com sistemas *in vivo*, como competição por substratos, expressão conjunta, entre outras.^{60,62}

5.1. Mutassíntese para inserir substratos não-naturais

A técnica da mutassíntese surgiu visando

o melhoramento da metodologia da biossíntese precursor-dirigida (PDB), a qual apresentava muitas limitações devido à competição entre os precursores não naturais e naturais, o que evidentemente favorecia o precursor natural, resultando em baixos rendimentos.^{67,68,72} Para resolver esses problemas, foi desenvolvida uma metodologia na qual uma etapa chave na biossíntese do precursor era inativada, levando a incorporação apenas do substrato não natural (Figura 3c). Esta técnica foi denominada mutassíntese e foi utilizada pela primeira vez no ano 1969 por Shier *et al.*⁷³ para obter 4 novos antibióticos análogos à neomicina e produzidos por *Streptomyces fradiae*. A inativação em uma etapa da rota biossintética era feita através da exposição da linhagem selvagem a agentes

mutagênicos, como o 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina, para obter mutantes que não fossem capazes de incorporar o precursor natural (mutassintons). Posteriormente, os mutantes obtidos eram testados para verificar quais tinham a rota biossintética alvo bloqueada e eram capazes de incorporar o precursor não natural. Este mutassinton, como no caso da PDB, era obtido por síntese orgânica, sendo muitas vezes a etapa mais desafiante da aplicação do processo.^{67,68,74} Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa publicou um trabalho com uma análise mais detalhada da técnica e sugeriram uma aplicação mais abrangente para a obtenção de compostos análogos aos produzidos naturalmente por microorganismos, mediante a geração de mutantes.⁷⁴

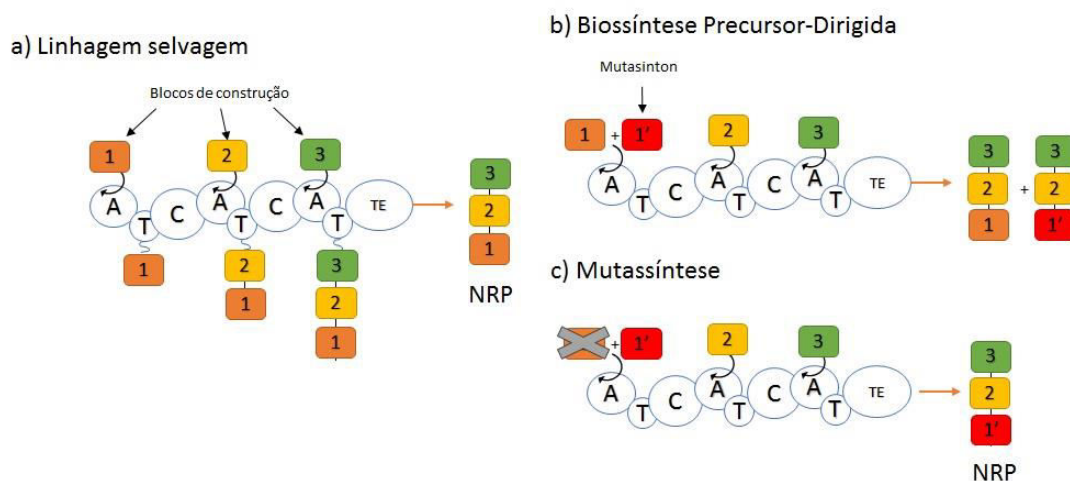


Figura 3. Esquema de obtenção de peptídeos não ribossomais quando utilizadas: a) as linhagens selvagens, b) a técnica de biossíntese precursor-dirigida e c) mutassíntese⁶⁸

Mutassíntese em bactérias: derivados dos antibióticos balhimicina, tiomarinol e cahuitamicina

Embora a técnica de mutassíntese fora empregada por mais de 40 anos, a mesma foi reformulada após os avanços da era genômica e tornou-se uma das técnicas mais promissoras para a incorporação de diferentes substratos para a obtenção de peptídeos não ribossomais com maior

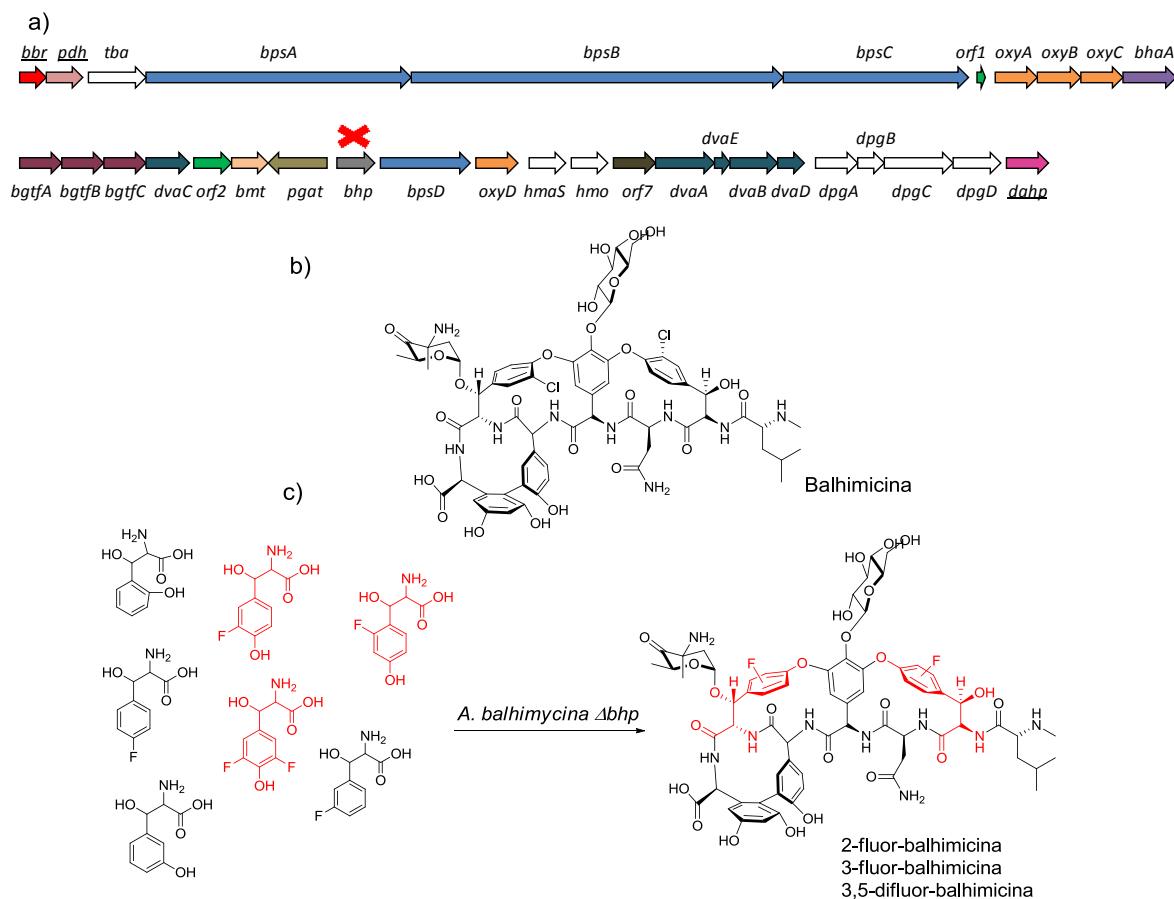
diversidade estrutural.

No começo da década de 2000 foram realizados experimentos de mutassíntese com genes relacionados à biossíntese da balhimicina, um antibiótico do tipo glicopeptídico biossintetizado por uma NRPS, cujo *cluster* biossintético é composto por 4 genes, *bpsA*, *bpsB*, *bpsC* e *bpsD*, codificando 8 módulos.^{29,55} Mutantes da linhagem *Amycolaptosis balhimycina*, responsável pela produção do antibiótico, foram obtidos a partir de deleções *in frame* do gene *bhp*, que

codifica a biossíntese do precursor β -hidroxitirosina. Aos cultivos destes mutantes foram adicionados os compostos análogos 2-fluor- β -hidroxitirosina, 3-fluor- β -hidroxitirosina e 3,5-difluor- β -hidroxitirosina, levando à formação dos primeiros antibióticos fluorados análogos à vancomicina, alguns dos quais apresentaram atividade antibacteriana (Esquema 1).⁷⁵⁻⁷⁷ Em contrapartida, outro grupo de precursores não foi aceito, demonstrando a alta seletividade que apresentam os blocos enzimáticos das NRPS na incorporação de substratos e evidenciando uma das

desvantagens do uso da mutassíntese.

Apesar das limitações nos experimento de adição dos mutassintons, o trabalho da balhimicina foi pioneiro na utilização da mutassíntese na era pós-genômica para a obtenção de análogos de um NRP e, permitiu vislumbrar um uso mais abrangente da técnica e, como consequência, pesquisadores começaram a realizar experimentos mais elaborados, adicionando dois mutassintons na mesma cultura, em uma variante da técnica chamada de “mutassíntese combinatória”.^{78,79}



Esquema 1. a) Organização do *cluster* biossintético da balhimicina.⁸⁰ b) Estrutura da balhimicina. c) Estrutura dos mutassintons adicionados para a reação de mutassíntese do antibiótico. As estruturas em vermelho correspondem aos blocos não naturais incorporados durante a biossíntese enquanto as estruturas em preto correspondem aos não incorporados⁷⁵⁻⁷⁷

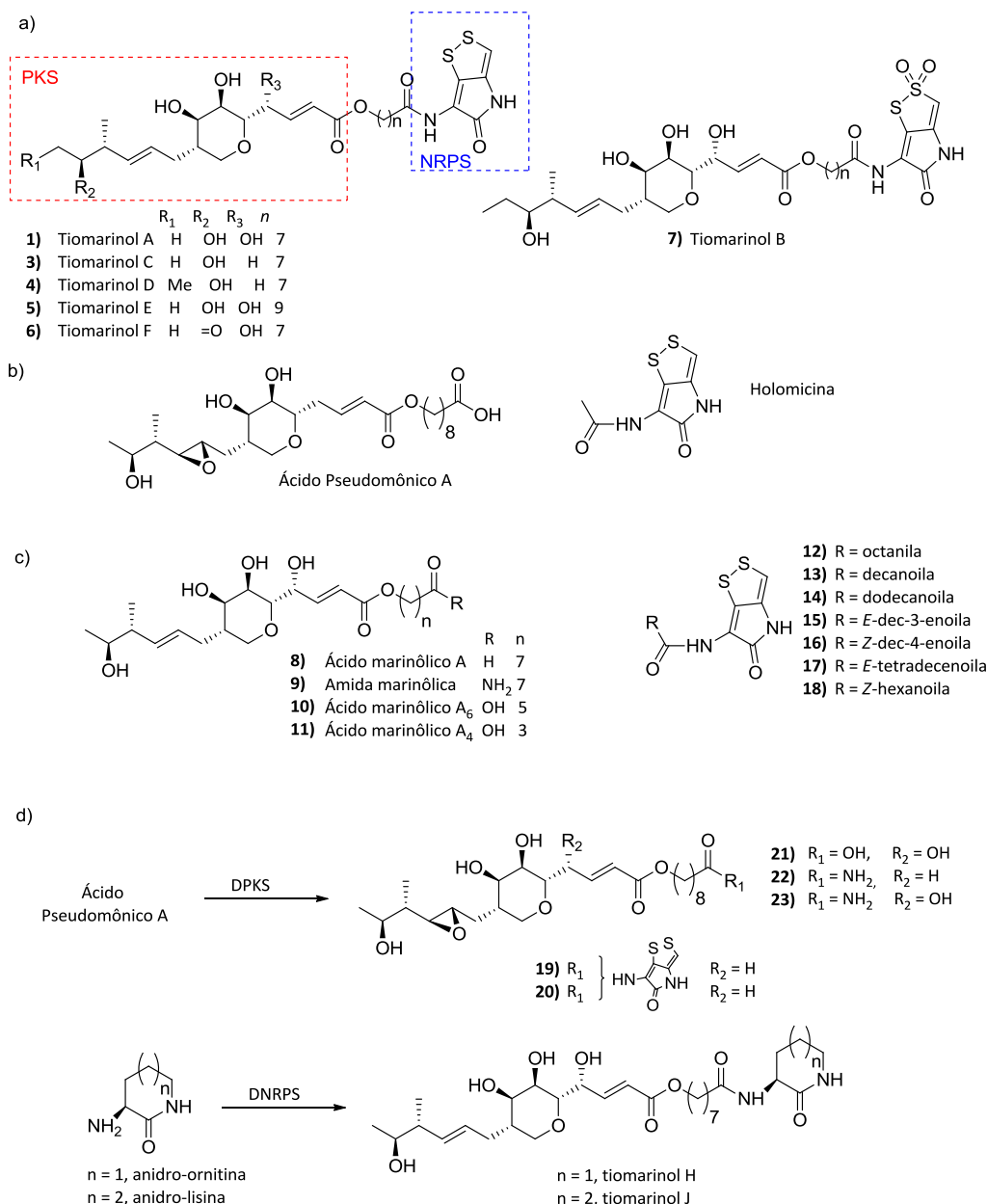
Os tiomarinóis, produzidos por bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, são antibióticos de grande interesse de estudo devido suas estruturas híbridas formadas por uma porção similar aos antibióticos da classe das holomicinas e outra semelhante aos da classe das mupirocinas, como o ácido pseudomônico A (Esquema 2a e 2b). A linhagem *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390, principal produtora, biossintetiza um conjunto de 7 tiomarinóis através de sintases de policetídeo (PKS) homólogas às da mupirocina em conjunto a NRPS homólogas às da holomicina.⁸¹⁻⁸³

No ano 2011, Murphy *et al.*⁸⁴ realizaram um estudo inicialmente voltado à confirmação do papel da PKS e da NRPS na biossíntese dos tiomarinóis, assim como de uma enzima pós-PKS, denominada TmlU prevista por catalisar a ligação entre as duas unidades na formação do híbrido. Mutantes Δ PKS, Δ NRPS com deleções nos segmentos dos genes correspondentes, assim como Δ TmlU, foram testados. Os resultados revelaram que a produção do tiomarinol pelos mutantes era abolida, porém produtos análogos à mupirocina (compostos 8-11) e à holomicina (compostos 12-18) eram recuperados nas culturas de Δ PKS e Δ NRPS, respectivamente (Esquema 2c). Estes mutantes foram utilizados em experimentos de mutassíntese e nas culturas do mutante Δ TmlU observou-se a produção dos dois tipos de compostos, porém não foi observada a formação de tiomarinóis, confirmando que TmlU catalisa a reação de ligação das duas unidades na biossíntese dos híbridos. Por outro lado, os experimentos de mutassíntese

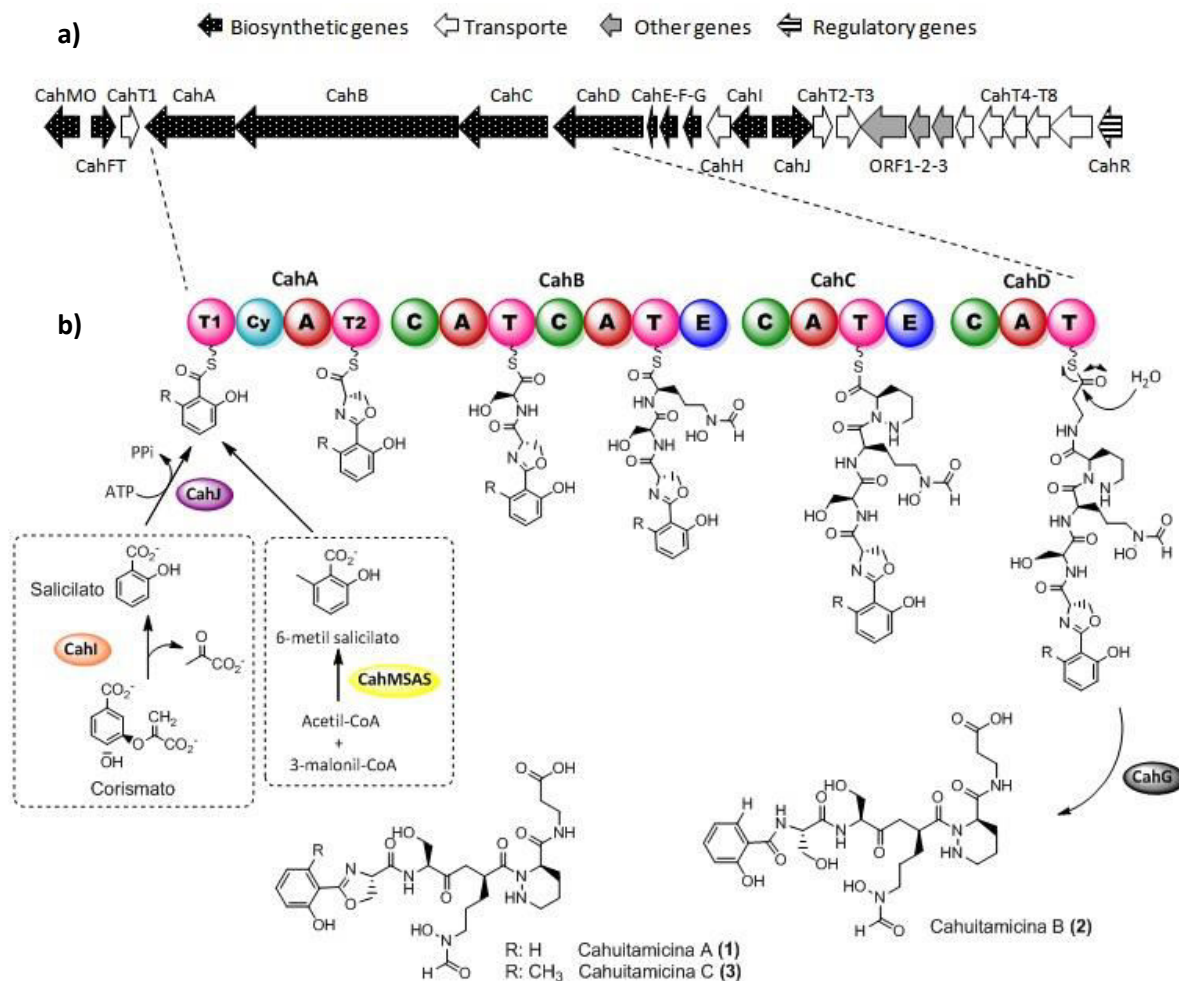
demonstraram que o mutante Δ PKS era capaz de incorporar o ácido pseudomônico A para a formação de compostos análogos ao tiomarinol (compostos 19-23; Esquema 3c). Da mesma forma, o mutante Δ NRPS foi capaz de incorporar aminas anidro-ornitina e anidro-lisina, sendo observada a formação de dois compostos denominados tiomarinol H e J, respectivamente (Esquema 2d).⁸⁴

Adicionalmente, os cultivos da linhagem selvagem *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390 também foram suplementados com anidro-ornitina, em um experimento de biossíntese precursor-dirigida, resultando na obtenção dos compostos tiomarinóis A e H, revelando que anidro-ornitina é um competidor do precursor natural. Os testes de tiomarinol H e J mostraram que os dois compostos apresentam atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilinas, mas em níveis mais baixos quando comparados com tiomarinol A-G, demonstrando o potencial da mutassíntese para produção racional de novos compostos com atividade terapêutica.⁸⁴

Os antibióticos denominados cahitamicinas A, B e C produzidos pela bactéria *Streptomyces gandocaensis* representam um dos exemplos mais recentes da utilização da técnica de mutassíntese para a obtenção de compostos inéditos. As cahitamicinas foram testadas como inibidores da formação de biofilmes da bactéria *Acinetobacter baumannii*, espécie patogênica responsável por muitas infecções hospitalares.⁸⁵



Esquema 2. Experimentos de mutassíntese da linhagem *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390 produtora dos antibióticos tiomarinois. a) Estruturas dos antibióticos tiomarinois A-G. b) Estrutura dos antibióticos ácido pseudomônico A, da classe das mupirocinas e holomicinas. c) Compostos obtidos pelos mutantes Δ PKS e Δ NRPS. d) Compostos obtidos após os experimentos de mutassíntese com os mutantes Δ PKS e Δ NRPS⁸⁴



Esquema 3. a) Cluster de genes que codifica para a biossíntese das Cahuitamicinas. b) Esquema de biossíntese das Cahuitamicinas A, B e C. Os genes codificando para a biossíntese estão divididos em 4 módulos (CahA-B-C-D) subdivididos em 4 principais domínios de condensação (C), adenilação (A), tioilação (T) e epimerases (E)⁸⁵

A biossíntese das cahuitamicina (Esquema 3) acontece via uma NRPS, cujo primeiro domínio de adenilação é capaz de incorporar como precursor o composto salicilato ou 6-metilsalicilato, para formar as cahuitamicinas A(1) e C(3) ou B(2), respectivamente. Com o intuito de estudar este mecanismo de biossíntese, o grupo de pesquisa desenhou um experimento de mutassíntese, no qual mutantes da linhagem *S. gandocaensis* com deleções no gene responsável pela síntese do

precursor salicilato foram cultivados em meios suplementados com derivados de ácido benzóico. A incorporação de um dos mutassíntons, o 5-metil ácido salicílico, resultou na obtenção de duas novas cahuitamicinas D e E (Figura 4), de forma surpreendente, as duas apresentavam uma atividade inibitória contra biofilmes de *Acinetobacter baumannii* maior que aquela medida nas cahuitamicinas produzidas pela linhagem selvagem.⁸⁵

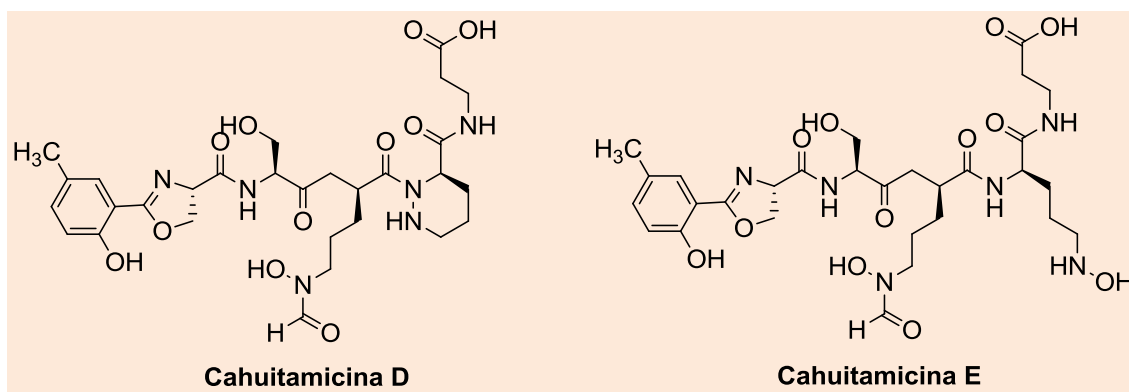


Figura 4. Estruturas dos análogos D e E da Cahuitamicina⁸⁵

Mutassíntese em fungos: derivados do antibiótico beauvericina

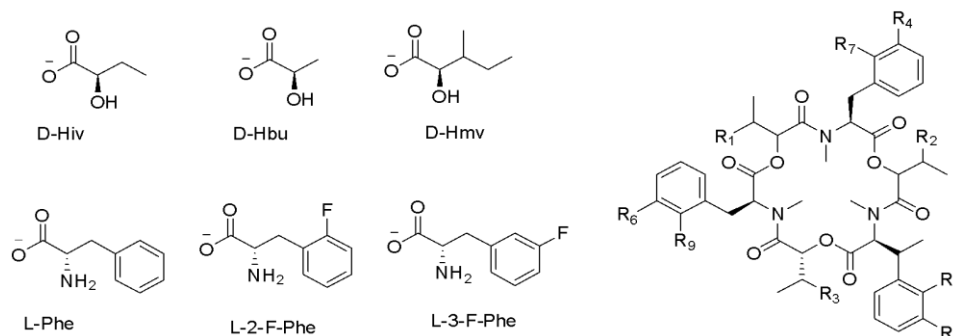
A mutassíntese tem sido amplamente utilizada na obtenção de compostos produzidos por bactérias, porém são poucos os exemplos da utilização da técnica em fungos, principalmente para obtenção de peptídeos não ribossomais. Um dos exemplos mais recentes foi o trabalho que Xu *et al* reportaram em 2009,⁷⁹ aplicando a mutassíntese combinatória para obtenção de derivados de beauvericina, utilizando mutantes do fungo *Beauveria bassiana*.

A beauvericina é um agente antibiótico e antifúngico do tipo depsipeptídeo ciclo-oligômero e sua estrutura é formada por três monômeros *D*-Hiv-*N*-metil-*L*-fenilalanina dipeptídeo. A unidade *D*-Hiv (*D*-hidroxiisovalerato) atua como um dos precursores da biossíntese, sendo formado a partir da redução quiral de 2-cetoisovalerato (Kiv) promovida pela enzima KIVR, uma 2-cetoisovalerato redutase. Mutantes $\Delta kivr$ da linhagem *B. bassiana* foram utilizados para

experimentos de mutassíntese e as culturas foram suplementadas com análogos do *D*-Hiv e do aminoácido *L*-Phe.^{29,55,78,79}

Quando utilizado 2-hidroxi-butirato (*D*-Hbu) a produção da beauvericina G_3 teve sucesso e o rendimento foi relativamente alto, 8 mg mL⁻¹, enquanto a produção de beauvericina C foi obtida a partir de *D,L*-2-hidroxi-3-metilvalerato (*D,L*-Hmv). De forma mais ambiciosa, este grupo de pesquisadores realizou dois experimentos de mutassíntese adicionando dois mutassintons simultaneamente, no primeiro o *D*-Hbu e *D,L*-Hmv e no segundo dois análogos aos *L*-Phe, o 3-fluor-*L*-Phe e o 2-fluor-*L*-Phe, levando à formação de beauvericinas com diferentes substituintes (Tabela 2).⁷⁹

Este experimento mostrou-se de grande relevância por apresentar pela primeira vez um trabalho de mutassíntese que levou à formação de diferentes beauvericinas não naturais, através técnicas de fermentação que poderiam ser aplicadas em trabalhos de grande escala.⁷⁹

Tabela 2. Estruturas dos análogos à beauvericina obtidos quando adicionados diferentes mutassintons⁷⁷

Mutassintons	Composto obtido	Rendimento mg L ⁻¹	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
-	beauvericina	20	M e	M e	M e	H	H	H	H	H	H
D-Hbu	beauvericina G ₃	8	H	H	H	H	H	H	H	H	H
D-Hmv	beauvericina C	12	Et	Et	Et	H	H	H	H	H	H
D-Hbu + L-3-F-Phe	beauvericina G ₃ H ₁	3	H	H	H	F	H	H	H	H	H
D-Hbu + L-3-F-Phe	beauvericina G ₃ H ₂		H	H	H	F	F	H	H	H	H
D-Hbu + L-3-F-Phe	beauvericina G ₃ H ₃		H	H	H	F	F	F	H	H	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina G ₃ l ₁	1	H	H	H	H	H	H	F	H	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina G ₃ l ₂	1	H	H	H	H	H	H	F	F	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina G ₃ l ₃	1	H	H	H	H	H	H	F	F	F
D-Hmv + L-3-F-Phe	beauvericina CH ₁	1	Et	Et	Et	F	H	H	H	H	H
D-Hbu + L-3-F-Phe	beauvericina CH ₂	2	Et	Et	Et	F	F	F	H	H	H
D-Hbu + L-3-F-Phe	beauvericina CH ₃	1	Et	Et	Et	F	F	H	H	H	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina Cl ₁	3	Et	Et	Et	H	H	H	F	H	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina Cl ₂		Et	Et	Et	H	H	H	F	F	H
D-Hbu + L-2-F-Phe	beauvericina Cl ₃		Et	Et	Et	H	H	H	F	F	F
D-Hmv + D-Hbu	beauvericina BG ₁	8	Et	Et	H	H	H	H	H	H	H
D-Hmv + D-Hbu	beauvericina AG ₁	5	Et	H	H	H	H	H	H	H	H

5.2. Biologia sintética e produção em organismo heterólogo

Embora a mutassíntese tenha sido utilizada com sucesso na modificação de NRP, a técnica ainda apresenta limitações relacionadas aos organismos selvagens produtores, como baixo rendimento e dificuldade nos cultivos dos micro-organismos. Tendo em vista essas limitações, cada vez mais grupos de pesquisas na área dos NRP estão aplicando a biologia sintética para criar sistemas mais eficientes para a produção de metabólitos secundários. Estes sistemas utilizam métodos genéticos para a inserção de *clusters* de genes de rotas biossintéticas dos organismos produtores naturais em organismos heterólogos já geneticamente modificados para tais finalidades, resultando na obtenção do metabólito alvo sem as desvantagens associadas à utilização do micro-organismo selvagem. Assim como na mutassíntese, as ferramentas de bioinformática constituem uma parte fundamental da biologia sintética, destacando servidores de uso público como o antiSmash¹¹ ou NRPSpredictor¹² que possibilitam a comparação entre as sequências genômicas alvo de estudo e as depositadas nas bases de dados em busca de *clusters* de genes associados às rotas biossintéticas de metabólitos secundários de interesse.^{7,62}

Sistema Red/ET para expressão heteróloga

Uma das alternativas que oferecem a biologia sintética na produção de metabólitos em organismo heterólogos é a recombinação homóloga. A metodologia deste tipo mais conhecida é a recombinação mediada por fago Red/ET referida ao uso de proteínas expressas pelo *operon* do fago Red λ (Red α , Red β , Red γ) ou pelo profago Rac no sistema equivalente Rec/ET da bactéria *Escherichia coli* para promover a recombinação entre um

fragmento linear do DNA alvo e outro circular do organismo heterólogo (Figura 5a). Este procedimento é conhecido como recombinação homóloga linear-circular (LCHR *linear-circular homologous recombination*).⁸⁶ Um tipo de recombinação homóloga mais recentemente estudado, pode ser promovido pelo sistema Rec/ET e, contrário à LCHR, é utilizado no caso de recombinações homólogas entre dois fragmentos lineares (LLHR *linear-linear homologous recombination*).⁸⁷ Nos dois casos é indispensável a existência de regiões de homologia formadas por sequências curtas nas extremidades tanto do segmento do DNA alvo como no vetor de clonagem. Estas regiões são denominadas “braços de homologia”.

LCHR tem sido utilizada desde 2000 na expressão heteróloga de *cluster* de genes de produtos naturais, mas apenas em 2006 foi aplicada na produção de NRP. Neste trabalho pioneiro, realizado pela empresa de biotecnologia americana Cubist Pharmaceuticals,⁶⁵ a técnica LCHR foi usada para obter derivados do antibiótico lipopeptídico daptomicina produzido por *Streptomyces roseosporus*, permitindo trocar módulo(s) da subunidade DptBC da NRPS responsável pela biossíntese da daptomicina para inserir modificações no núcleo da molécula.⁶⁵ Adicionalmente, os pesquisadores combinaram esta técnica com a inativação do gene da enzima acessória ácido glutâmico 3-metiltransferase e obtiveram uma biblioteca de 120 análogos à daptomicina, alguns dos quais apresentavam propriedades terapêuticas, resultado de grande importância por ser este um dos antibióticos aprovados para uso em infecções na pele ocasionadas por bactérias *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina.

Mais recentemente, Fu *et al.*⁸⁷ testaram com sucesso o sistema RecE juntamente com RecT para promover a recombinação LLHR na clonagem de 10 *clusters* de genes de PKS/NRPS desconhecidos com 10-52 kb de *Photorhabdus luminescens* em vetores de

expressão e, posteriormente, 2 dos *clusters* foram expressos em *E. coli*, resultando na identificação dos metabolitos luminmicina A e luminmida A/B (Figura 5b).⁷¹ Embora esta estratégia tenha resultado em um incremento da eficiência da clonagem a partir

do DNA genômico quando comparado com LCHR, a mesma ainda está restrita ao tamanho dos *clusters* alvo, sendo que para *clusters* de genes maiores que 60 kb é necessário aplicar a técnica em duas etapas.^{60,87}

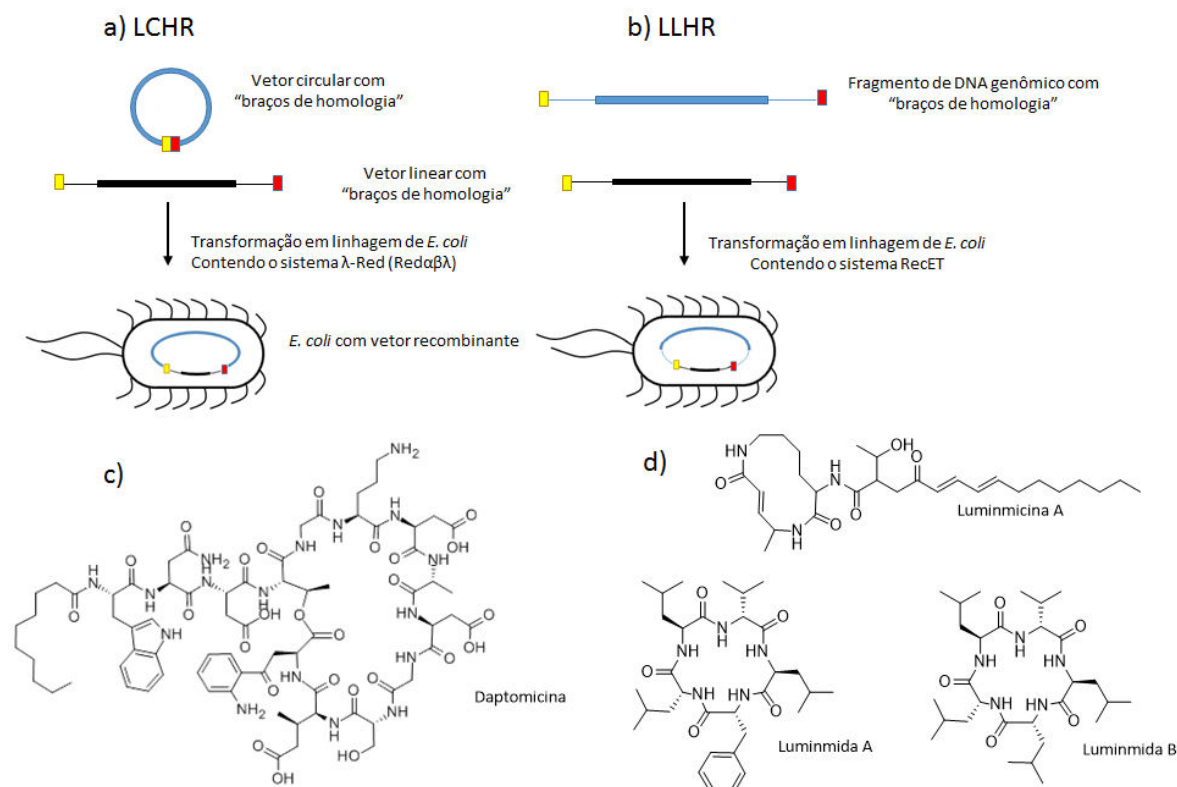


Figura 5. a) Representação da Recombinação homóloga linear-circular e estrutura do antibiótico daptomicina. b) Representação da Recombinação homóloga linear-linear e estrutura dos metabolitos luminmicina A e luminmida A e B⁷¹

Expressão heteróloga sistema TAR

Devido às limitações nos tamanhos dos *clusters* de genes que conseguem ser clonados pelos sistemas Rec/ET e Red/ET, os pesquisadores estão constantemente em busca de sistemas de expressão heteróloga mais adequados. Entre esses sistemas alternativos, destaca-se o de recombinação associada a transformação (TAR *transformation-associated recombination*). Diferentemente à recombinação Red/ET, a TAR tem vantagens por utilizar um organismo eucarioto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para a captura de fragmentos de

DNA genômico maiores e provenientes de micro-organismos, plantas e mamíferos.⁸⁸

A clonagem baseada na metodologia TAR foi utilizada com sucesso na captura de um fragmento de 67 kb responsável pela biossíntese do antibiótico lipopeptídico diclorado taromicina A em um trabalho realizado por Yamanaka *et al.* em 2014.⁸⁹ O grupo de pesquisa não conseguiu expressar a taromicina A em cultivos do micro-organismo produtor, o actinomiceto *Saccharomonospora* sp. CNQ-490, pelo que desenvolveram uma metodologia partindo de um vetor de captura específico pACR01, desenhado pelo mesmo grupo. Como

resultado da utilização do TAR foi produzida a taromicina A, o qual se mostrou muito semelhante estruturalmente ao já aprovado antibiótico daptomicina e representa uma alternativa de se obter novos produtos naturais a partir de cluster de genes que não são expressos pelas linhagens selvagens.⁸⁹

Uma nova adaptação da recombinação TAR foi recentemente proposta por Ross *et al.*⁹⁰ na captura e caracterização de um cluster de genes de 34 kb associado à produção de lipopeptídeos alterocromidas pela bactéria marinha *Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779. O cluster de genes alvo incluía aqueles codificantes a uma NRPS, além de uma enzima flavina-halogenase pouco usual na rotas biossintéticas de lipopeptídeos e associada com compostos bromados produzidos pelo micro-organismo.⁹¹ O grupo de pesquisas utilizou o mesmo vetor de captura paCR01⁸⁹ e realizou a clonagem com TAR na levedura *S.*

cerevisiae, de modo o DNA genômico da bactéria, previamente digerido, pudesse ser isolado através do vetor. Em seguida, o vetor de captura já contendo o cluster de genes alvo foi transformado em *E. coli* conjuntamente com um vetor contendo um gene que codifica para a enzima fosfopanteteinil transferase de uma linhagem relacionada

Pseudoalteromonas luteoviolacea 2ta16, para funcionalizar o domínio PCP da NRPS; adicionalmente, o meio de cultivo foi suplementado com KBr.^{91,92} Deste modo, foi possível identificar 3 compostos bromo-alterocromidas, além de estabelecer uma estratégia inovadora para a identificação e caracterização de novos peptídeos não ribossomais aproveitando as vantagens da captura de clusters de genes mediante TAR e de utilizar o sistema de expressão em *E. coli*, organismo hospedeiro versátil e de fácil manipulação genética (Figura 6).^{60,90}

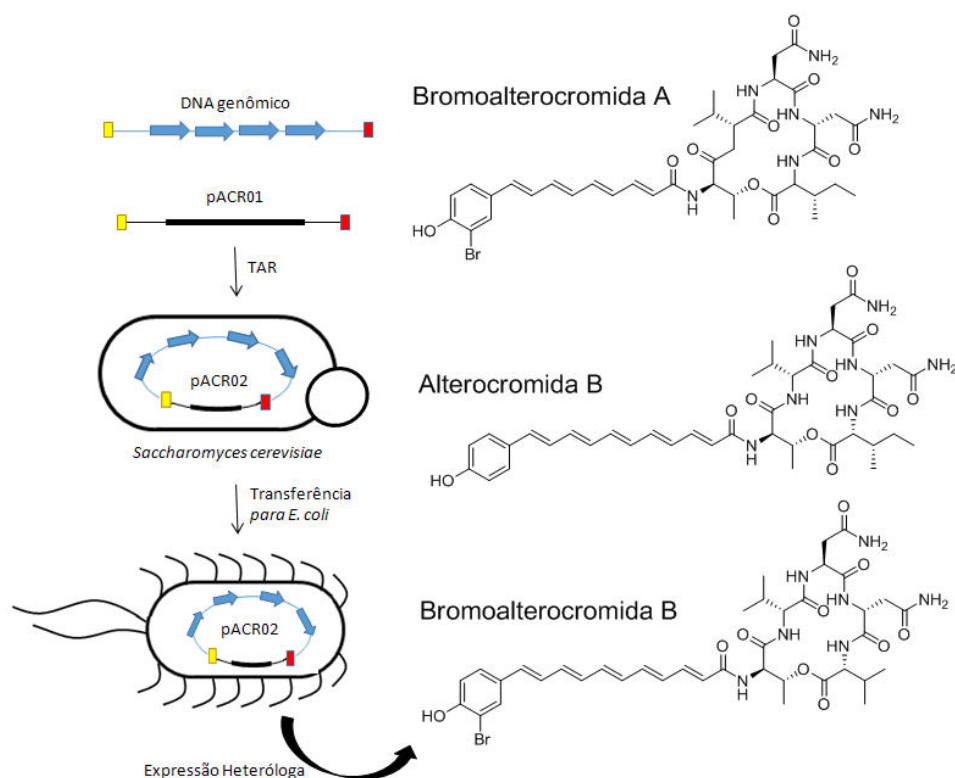


Figura 6. Representação do sistema TAR e posterior expressão em *E. coli* para a identificação dos compostos bromoalterocromida A e B e alterocromida B.⁹⁰

6. Conclusões e perspectivas

Os NRP representam uma das classes de produtos naturais mais promissoras para a descoberta de novos agentes terapêuticos, porém são poucos os estudos descritos na literatura para esses compostos, se comparados com outras classes de produtos naturais, como os policetídeos, dos quais se tem vasta literatura descrevendo a caracterização *in vivo*, *in vitro* e *in silico* das rotas biossintéticas.

As técnicas de bioinformática contribuíram muito para o avanço das pesquisas que envolvem a produção de NRP, tornando-se cada vez mais uma ferramenta indispensável. Importante destacar o papel da estratégia genoma-guiada na procura de metabólitos secundários, comparando sequências desconhecidas com aquelas depositadas nas bases de dados públicas mediante o uso de servidores como o antiSMAH,¹¹ NRSPredictor¹² e MIBiG.¹³

Dentre as limitações na produção de NRP estão o baixo rendimento na obtenção de metabólitos de interesse pelas linhagens selvagens, principalmente pela dificuldade de reproduzir o meio natural de crescimento destes organismos. No caso específico da mutassíntese, as desvantagens estão associadas à obtenção de compostos análogos aos precursores naturais para serem utilizados como mutassintons. Nas últimas décadas, a síntese orgânica tem criado novas rotas sintéticas para a obtenção de moléculas parecidas com as naturais, porém as dificuldades encontradas tornam a síntese dos mutassintons tão desafiante quanto a própria mutassíntese. Já na utilização da biologia sintética para a obtenção de NRP as restrições estão sobretudo relacionadas ao tamanho do *cluster* de genes a ser clonado no sistema heterólogo, incentivando a busca por novos sistemas de expressão, cada um deles com suas próprias vantagens e limitações. Apesar destas restrições, a biologia sintética está

entre as ferramentas mais promissoras para o isolamento de produtos naturais da linhagem selvagem, assim como para manipulação genética e obtenção de produtos naturais modificados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2015-010134, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 130933/2015-5 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem aos Professores Fábio Gozzo e Luciana Gonzaga de Oliveira pelo apoio e sugestões.

Referências Bibliográficas

- ¹ Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **1929**, *10*, 226. [PubMed]
- ² Butler, M. S.; Buss, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology* **2006**, *71*, 919. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2013**, *1830*, 3670. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* **2000**, *287*, 1960. [PubMed]
- ⁵ Felnagle, E. A.; Jackson, E. E.; Chan, Y. A.; Podevels, A. M.; Berti, A. D.; McMahon, M. D.; Thomas, M. G. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 191. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Li, J. W.-H.; Vederas, J. C. Drug discovery

- and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* **2009**, *325*, 161. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14*, 111. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, *75*, 311. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Andersson, D. I.; Hughes, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews* **2011**, *35*, 901. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em: 15 dezembro 2016.
- ¹¹ Weber, T.; Blin, K.; Duddela, S.; Krug, D.; Kim, H. U.; Bruccoleri, R.; Lee, S. Y.; Fischbach, M. a.; Muller, R.; Wohlleben, W.; Breitling, R.; Takano, E.; Medema, M. H. antiSMASH 3.0--a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Röttig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O. NRPSpredictor2 - A web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Research* **2011**, *39*, 362. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ MIBiG: Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. Disponível em: <<http://mibig.secondarymetabolites.org/index.html>>. Acesso em: 15 dezembro 2016.
- ¹⁴ Aziz, R. K.; Bartels, D.; Best, A. A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Osterman, A. L.; Overbeek, R. A.; McNeil, L. K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 75. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Khaldi, N.; Seifuddin, F. T.; Turner, G.; Haft, D.; Nierman, W. C.; Wolfe, K. H.; Fedorova, N. D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* **2010**, *47*, 736. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Boddy, C. N. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2014**, *41*, 443. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Doyle, S. Em *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 2* 2009.
- ¹⁸ Marahiel, M. a.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 2651. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Fischbach, M. a.; Walsh, C. T. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3468. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Wang, H.; Fewer, D. P.; Holm, L.; Rouhiainen, L.; Sivonen, K. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 9259. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ van Wageningen, A. A.; Kirkpatrick, P. N.; Williams, D. H.; Harris, B. R.; Kershaw, J. K.; Lennard, N. J.; Jones, M.; Jones, S. J. M.; Solenberg, P. J. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chemistry & Biology* **1998**, *5*, 155. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Miao, V.; Coeffet-LeGal, M. F.; Oise, Brian, P.; Brost, R.; Penn, J.; Whiting, A.; Martin, S.; Ford, R.; Parr, I.; Bouchard, M.; Silva, C. J.; Wrigley, S. K.; Baltz, R. H. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, *151*, 1507. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Weber, G.; Schorgendorfer, K.; Schneider-Scherzer, E.; Leitner, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is

- encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Current Genetics* **1994**, *26*, 120. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports* **2010**, *27*, 637. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **2007**, *71*, 413. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Tripathi, A.; Schofield, M. M.; Chlipala, G. E.; Schultz, P. J.; Yim, I.; Newmister, S. A.; Nusca, T. D.; Scaglione, J. B.; Hanna, P. C.; Tamayo-Castillo, G.; Sherman, D. H. Baulamycins A and B, broad-spectrum antibiotics identified as inhibitors of siderophore biosynthesis in staphylococcus aureus and bacillus anthracis. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 1579. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Lee, J. Y.; Janes, B. K.; Passalacqua, K. D.; Pflieger, B. F.; Bergman, N. H.; Liu, H.; Hakansson, K.; Somu, R. V.; Aldrich, C. C.; Cendrowski, S.; Hanna, P. C.; Sherman, D. H. Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from Bacillus anthracis. *Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, 1698. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Cheung, J.; Beasley, F. C.; Liu, S.; Lajoie, G. A.; Heinrichs, D. E. Molecular characterization of staphyloferrin B biosynthesis in Staphylococcus aureus. *Molecular Microbiology* **2009**, *74*, 594. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Dewick, P. M. Em *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2009.
- ³⁰ Johnson, B. A.; Anker, H.; Meloney, F. L. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the B. subtilis group. *Science*. **1945**, *102*, 376. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Walton, J. D. HC-toxin. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1406. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Gaumann, E.; Roth, S.; Ettliger, L.; Plattner, P. A.; Nager, U. Enniatin, einneues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. *Experientia* **1946**, *III*, 202. [CrossRef]
- ³³ Ding, X.; Boney-montoya, J.; Owen, B. M.; Bookout, A. L.; Coate, C.; Mangelsdorf, D. J.; Kliever, S. A. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination, and biological activities. *The Journal of Antibiotics* **2013**, *16*, 387. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E.; Hodges, R. S. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *International journal of peptide and protein research* **1996**, *47*, 460. [PubMed]
- ³⁵ Berg, T. L.; Froholm, L. O.; Laland, S. G. the Biosynthesis of Gramicidin S in a Cell-Free System. *Biochemical Journal* **1965**, *96*, 43. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Herr, E. B.; Redstone, M. O. Chemical and physical characterization of capreomycin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1966**, *135*, 940. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Zavascki, A. P.; Goldani, L. Z.; Li, J.; Nation, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, *60*, 1206. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁸ Daniels, M. J. Studies of the biosynthesis of polymyxin B. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1968**, *156*, 119. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁹ Mann, J. Natural products as immunosuppressive agents. *Natural product reports* **2001**, *18*, 417. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Hubbard, B. K.; Walsh, C. T. Vancomycin Assembly: Nature's Way. *Angewandte Chemie* **2003**, *42*, 730. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Giessen, T. W.; Marahiel, M. A. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Letters* **2012**, *586*, 2065. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Reddy, T. B. K.; Thomas, A. D.; Stamatis, D.; Bertsch, J.; Isbandi, M.; Jansson, J.; Mallajosyula, J.; Pagani, I.; Lobos, E. A.; Kyrpides, N. C. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, D1099. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 dezembro 2016.

- ⁴⁴ Mach, B.; Reich, E.; Tatum, E. L. Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1963**, *50*, 175. [PubMed]
- ^{45 45} Borowska, Z.; Tatum, E. Biosynthesis of edeine by *Bacillus brevis* Vm4 in vivo and in vitro. *Biochimica et biophysica acta* **1966**, *113*, 206. [PubMed]
- ^{46 46} Spaeren, U.; Froholm, L. O.; Laland, S. G. Further studies on the biosynthesis of gramicidin S and proteins in a cell-free system from *Bacillus brevis*. *Biochemical Journal* **1967**, *102*, 586. [PubMed]
- ^{47 47} Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Lipmann, F. The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1968**, *60*, 269. [PubMed]
- ^{48 48} Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Lipmann, F. Peptidyl transfer in Gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, *63*, 1335. [PubMed]
- ^{49 49} Roskoski, R.; Kleinkauf, H.; Gevers, W.; Lipmann, F. Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. *Biochemistry* **1970**, *9*, 4846. [CrossRef] [PubMed]
- ^{50 50} Lee, S. G.; Roskoski, R.; Bauer, K.; Lipmann, F. Purification of the polyenzymes responsible for tyrocidine synthesis and their dissociation into subunits. *Biochemistry* **1973**, *12*, 398. [CrossRef] [PubMed]
- ^{51 51} Lipmann, F. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates. *Accounts of Chemical Research* **1973**, *6*, 361. [CrossRef] [PubMed]
- ^{52 52} Mittenhuber, G.; Weckermann, R.; Marahiel, M. A. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetases 1 and 2 from *Bacillus brevis*: Evidence for an operon. *Journal of Bacteriology* **1989**, *171*, 4881. [PubMed]
- ^{53 53} Weckermann, R.; Furbass, R.; Marahiel, M. A. Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Research* **1988**, *16*, 11841. [PubMed]
- ^{54 54} Kratzschmar, J.; Krause, M.; Marahiel, M. A. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *Journal of Bacteriology* **1989**, *171*, 5422. [PubMed]
- ⁵⁵ Hughes, A. B. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry 2: Modified Amino Acids, Organocatalysis and Enzymes (pages 616-695)* 2009.
- ⁵⁶ Li, Y.; Weissman, K. J.; Muller, R. Insights into multienzyme docking in hybrid PKS-NRPS megasynthetases revealed by heterologous expression and genetic engineering. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1069. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁷ Finking, R.; Marahiel, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology* **2004**, *58*, 453. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁸ Keating, T. A.; Walsh, C. T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 598. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁹ Walsh, C. T.; Chen, H.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel, H. M. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, 525. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁰ Winn, M.; Fyans, J. K.; Zhuo, Y.; Micklefield, J. Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines. *Natural product reports* **2016**, *33*, 317. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶¹ Meier, J. L.; Burkart, M. D. The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 2012. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶² Kim, E.; Moore, B. S.; Joon Yoon, Y. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 649. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶³ Zotchev, S. B.; Sekurova, O. N.; Katz, L. Genome-based bioprospecting of microbes

- for new therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology* **2012**, *23*, 941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Gu, J.; Nguyen, K. T.; Gandhi, C.; Rajgarhia, V.; Baltz, R. H.; Brian, P.; Chu, M. Structural Characterization of Daptomycin Analogues A21978C₁₋₃(d-Asn₁₁) Produced by a Recombinant *Streptomyces roseosporus* Strain. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Nguyen, K. T.; Ritz, D.; Gu, J.-Q.; Alexander, D.; Chu, M.; Miao, V.; Brian, P.; Baltz, R. H. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 17462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Baltz, R. H. Combinatorial Biosynthesis of Cyclic Lipopeptide Antibiotics: A Model for Synthetic Biology To Accelerate the Evolution of Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways. *ACS Synthetic Biology* **2014**, *3*, 748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Weist, S.; Süßmuth, R. D. Mutational biosynthesis - A tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, *68*, 141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Weissman, K. J. Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends in Biotechnology* **2007**, *25*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Hopwood, D. A.; Malpartida, F.; Kieser, H. M.; Ikeda, H.; Duncan, J.; Fujii, I.; Rudd, B. A.; Floss, H. G.; Omura, S. Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering. *Nature* **1985**, *314*, 642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **2009**, *6*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Sander, J. D.; Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* **2014**, *32*, 347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷² Kirschning, A.; Taft, F.; Knobloch, T. Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering. *Organic & biomolecular chemistry* **2007**, *5*, 3245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷³ Shier, W. T.; Rinehart, K. L.; Gottlieb, D. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, *63*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Rinehart, K. L. Mutasynthesis of new antibiotics. *Pure and Applied Chemistry* **1977**, *49*, 1361. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁵ Weist, S.; Bister, B.; Puk, O.; Bischoff, D.; Pelzer, S.; Nicholson, G. J.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Süßmuth, R. D. Fluorobalhimycin - A new chapter in glycopeptide antibiotic research. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41*, 3383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁶ Pfeifer, V.; Nicholson, G. J.; Ries, J.; Recktenwald, J.; Schefer, A. B.; Shawky, R. M.; Schröder, J.; Wohlleben, W.; Pelzer, S. A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis. The biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 38370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁷ Weist, S.; Kittel, C.; Bischoff, D.; Bister, B.; Pfeifer, V.; Nicholson, G. J.; Wohlleben, W.; Süßmuth, R. D. Mutasynthesis of Glycopeptide Antibiotics: Variations of Vancomycin's AB-Ring Amino Acid 3,5-Dihydroxyphenylglycine. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁸ Yu, D.; Xu, F.; Zi, J.; Wang, S.; Gage, D.; Zeng, J.; Zhan, J. Engineered production of fungal anticancer cyclooligomer depsipeptides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **2013**, *18*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁹ Xu, Y.; Wijeratne, E. M. K.; Espinosa-Artiles, P.; Gunatilaka, A. A. L.; Molnar, I. Combinatorial mutasynthesis of scrambled beauvericins, cyclooligomer depsipeptide cell migration inhibitors from *Beauveria bassiana*. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁰ Shawky, R. M.; Puk, O.; Wietzorrek, A.; Pelzer, S.; Takano, E.; Wohlleben, W.; Stegmann, E. The Border Sequence of the Balhimycin Biosynthesis Gene Cluster from

- Amycolatopsis balhimycina* contains *bbr*, encoding a StrR-Like Pathway-Specific Regulator. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2007**, *13*, 76. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸¹ Li, B.; Walsh, C. T. Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 19731. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸² Fukuda, D.; Haines, A. S.; Song, Z.; Murphy, A. C.; Hothersall, J.; Stephens, E. R.; Gurney, R.; Cox, R. J.; Crosby, J.; Willis, C. L.; Simpson, T. J.; Thomas, C. M. A natural plasmid uniquely encodes two biosynthetic pathways creating a potent anti-MRSA antibiotic. *PLoS One* **2011**, *6*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸³ El-Sayed, A. K.; Hothersall, J.; Cooper, S. M.; Stephens, E.; Simpson, T. J.; Thomas, C. M. Characterization of the Mupirocin Biosynthesis Gene Cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 419. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁴ Murphy, A. C.; Fukuda, D.; Song, Z.; Hothersall, J.; Cox, R. J.; Willis, C. L.; Thomas, C. M.; Simpson, T. J. Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagenesis and mutasynthesis of pseudoalteromonas SANK73390. *Angewandte Chemie - International Edition* **2011**, *50*, 3271. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁵ Park, S. R.; Tripathi, A.; Wu, J.; Schultz, P. J.; Yim, I.; McQuade, T. J.; Yu, F.; Arevang, C.-J.; Mensah, A. Y.; Tamayo-Castillo, G.; Xi, C.; Sherman, D. H. Discovery of cahuitamycins as biofilm inhibitors derived from a convergent biosynthetic pathway. *Nature Communications* **2016**, *7*, 10710. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁶ Zhang, Y.; Muyrers, J. P.; Testa, G.; Stewart, a F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology* **2000**, *18*, 1314. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁷ Fu, J.; Bian, X.; Hu, S.; Wang, H.; Huang, F.; Seibert, P. M.; Plaza, A.; Xia, L.; Müller, R.; Stewart, a F.; Zhang, Y. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nature biotechnology* **2012**, *30*, 440. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁸ Kouprina, N.; Larionov, V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution. *Nature reviews. Genetics* **2006**, *7*, 805. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸⁹ Yamanaka, K.; Reynolds, K. a; Kersten, R. D.; Ryan, K. S.; Gonzalez, D. J.; Nizet, V.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 1957. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹⁰ Ross, A. C.; Gulland, L. E. S.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S. Targeted Capture and Heterologous Expression of the Pseudoalteromonas Alterochromide Gene Cluster in *Escherichia coli* Represents a Promising Natural Product Exploratory Platform. *ACS Synthetic Biology* **2015**, *4*, 414. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹¹ Agarwal, V.; El Gamal, A. a; Yamanaka, K.; Poth, D.; Kersten, R. D.; Schorn, M.; Allen, E. E.; Moore, B. S. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria. *Nature chemical biology* **2014**, *10*, 640. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹² Rypien, K. L.; Ward, J. R.; Azam, F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environmental Microbiology* **2010**, *12*, 28. [CrossRef] [PubMed]