

Metabolismo secundário em fungos e análises *in silico*: o papel da Bioinformática na predição de clusters de genes biossintéticos

Fungal Secondary Metabolism and *in silico* Analyses: the Role of Bioinformatics in the Prediction of Biosynthetic Gene Clusters

Nicole Anne Modena^{1*}, Fernanda Pessi de Abreu^{2*}, Pedro Lenz Casa^{3*}, Nikael Souza de Oliveira^{4*}, Julia Gabriele Dani^{5*}, Joséli Schwambach^{6*}, Scheila de Ávila e Silva^{7*}

¹namodena@ucs.br, ²fpabreu1@ucs.br, ³plcasa@ucs.br, ⁴nsoliveira4@ucs.br, ⁵jgdani@ucs.br, ⁶jschwambach@ucs.br, ⁷sasilva6@ucs.br

*Universidade de Caxias do Sul

Resumo

Os fungos filamentosos geram uma série de produtos não essenciais, dentre eles os metabólitos secundários. Esses, além de possuírem importância nas relações ecológicas, também são alvo de pesquisas na área da biotecnologia. Para a produção desses compostos, é muitas vezes necessária a atuação de clusters de genes biossintéticos (BGCs). O avanço das tecnologias de sequenciamento e o desenvolvimento de *softwares* de bioinformática tem tornado o uso de dados genômicos mais acessível. Assim, metodologias *in silico* permitem a inferência de produtos naturais. No presente trabalho foi exemplificada a predição de BGCs de metabólitos secundários a partir do genoma do fungo *Penicillium echinulatum*, utilizando a ferramenta antiSMASH. As famílias de metabólitos secundários mais encontradas para *P. echinulatum* incluíram *clusters* de terpenos, de peptídeos não ribossômicos e similares a peptídeos não ribossômicos. Adicionalmente, a abordagem utilizada permitiu a identificação e caracterização de 26 BGCs para *P. echinulatum*, dos quais destaca-se ácido clavárico, naftopirano, nidulanin A, oxaleimide C e phyllostictine A. Nesse sentido, é possível observar que as ferramentas de bioinformática são fundamentais para auxiliar na identificação de organismos produtores de compostos de interesse, visto que otimizam processos e reduzem custos.

Palavras-chave: *clusters* de genes biossintéticos, metabolismo secundário, fungos filamentosos, AntiSMASH, bioinformática.

Abstract

Secondary metabolism provides non-essential products for organisms. Besides playing an important role in ecological relationships, they may have an appealing biotechnological potential. Among the most studied microorganisms are fungi, which are known to synthesize a plethora of secondary metabolites. In order to produce these compounds, the activity of biosynthetic gene clusters (BGCs) is often necessary. The recent advance of DNA sequencing technologies has rendered the use of genomic data more accessible. Therefore, the use of *in silico* methodologies allows the inference of natural compound production. In this study we exemplify the prediction of secondary metabolism BGCs from the genome of the fungus *Penicillium echinulatum*, making use of the antiSMASH tool. The most abundant families of secondary metabolites found for *P. echinulatum* included synthetic clusters of

terpenes, non-ribosomal peptides (NRPs) and clusters similar to NRPs. In addition, the approach allowed for the identification of 26 BGCs for *P. echinulatum*, from which clavarinic acid, naphthopyrone, nidulanin A, oxaleimide C, and phyllostictine A are highlighted. In this sense, it is possible to observe that bioinformatics tools are fundamental in the identification of organisms that produce compounds of interest, since they optimize processes and reduce costs.

Keywords: biosynthetic gene clusters, secondary metabolism, filamentous fungi, AntiSMASH, bioinformatics.

Introdução

O metabolismo pode ser definido como o somatório dos processos e reações químicas que ocorrem em um organismo, pelos quais as células transformam moléculas de acordo com a demanda ambiental [1, 2]. Esse conjunto de eventos pode ser classificado em dois grupos: (i) metabolismo primário e (ii) metabolismo secundário. O metabolismo primário está relacionado com o fornecimento de macromoléculas essenciais à sobrevivência do organismo, como DNA, RNA, proteínas, lipídios e polissacarídeos [3]. Em contrapartida, o metabolismo secundário constitui na produção de moléculas orgânicas que não estão diretamente envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento. Contudo, a ausência de metabólitos secundários pode, a longo prazo, resultar em condições adversas devido ao comprometimento da capacidade de sobrevivência [4].

Nesse âmbito, a sobrevivência dos organismos está estreitamente relacionada com a produção de metabólitos secundários, visto que esses podem auxiliar, por exemplo, na disponibilidade de nutrientes e na proteção contra estressores ambientais. Antibióticos e moléculas de sinalização são produzidas por alguns organismos e estão envolvidas em interações competitivas. Outros compostos, como os flavonoides vegetais e os alcalóides, podem atuar como mecanismos de defesa. Ainda mais, os produtos gerados pelo metabolismo secundário apresentam diversas aplicações biotecnológicas, como: antibióticos, agentes antitumorais e antivirais, antipiréticos, alucinógenos, herbicidas, toxinas, e aditivos alimentares [5].

Os metabólitos secundários também podem ser chamados de produtos naturais, já que são gerados a partir de síntese biológica [3, 6]. Dentre os organismos que realizam esses processos há destaque para os fungos. Como exemplo de produto natural de origem fúngica, pode-se citar a penicilina, composto que revolucionou a indústria farmacêutica e a medicina [6]. Entretanto, por mais que existam aplicações benéficas, os metabólitos secundários também podem apresentar riscos à saúde humana; nessa perspectiva, as micotoxinas são produtos naturais com efeitos adversos em animais e plantas, podendo resultar em doenças ou perdas econômicas [7].

Existem diversas classes de produtos naturais, sendo os quatro grupos mais relevantes: (i) Alcalóides, (ii) Peptídeos Não Ribossômicos (NRPs), (iii) Policetídeos (PKs), e (iv) Terpenóides. Recentemente, foi identificada outra importante classe de metabólitos secundários, os Peptídeos Sintetizados por Ribossomos e Modificações Pós-tradução (RiPP). Essas moléculas são produzidas em todos os três domínios da vida [8]. Ademais, Alcalóides, NRPs, PKs e Terpenóides são polímeros construídos pela ação de dimetilalil-triptofano sintases, sintetases de peptídeos não-ribossomais (NRPSs), policetídeo sintases (PKSs) e terpeno sintases/ciclases, respectivamente [9]; sendo que também podem ser modificados por uma ampla diversidade de enzimas de adaptação, incluindo, principalmente, (des)hidratases, oxigenases, hidrolases e metilases [10].

Devido ao seu grande potencial na indústria farmacêutica e bioquímica, os metabólitos secundários são foco de estudo, com destaque, em especial, para trabalhos que buscam elucidar a base genética por trás de suas vias biossintéticas [11]. Entretanto, técnicas tradicionais de triagem e identificação de compostos de interesse requerem trabalho intensivo e tempo prolongado. Além disso, estão subordinadas às condições do meio de cultura, que podem propiciar um ambiente desfavorável para a produção de metabólitos ainda não conhecidos [11, 12].

Os genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários de fungos estão geralmente organizados em grupo. Em outras palavras, os genes que codificam enzimas atuantes no metabolismo secundário formam *clusters* de genes biossintéticos (BGCs) e tendem a ser co-regulados de acordo com sua função ecológica e demanda ambiental [13, 14]. Nesse sentido, o uso de metodologias *in silico* utilizando sequências genômicas é uma alternativa emergente para a atribuição e predição dos BGCs [11, 15, 16]. Diversos bancos de dados e softwares podem ser utilizados na predição de BGCs com base em informações genéticas [16], tais como: 2metDB [17], antiSMASH [18], ARTS [19], BAGEL [20], BIG-SCAPE [21], CASSIS and SMIPS [22], e CLUSEAN [23]. Desse modo, ferramentas de bioinformática compõem uma plataforma inicial indispensável no estudo de metabólitos secundários [11, 15, 16].

Entende-se que apenas uma parte das possíveis moléculas de interesse biotecnológico foram descobertas. De forma semelhante, um grande número de BGCs ainda não foi caracterizado. Sendo assim, muitos são os desafios a serem superados para a utilização da diversidade de produtos naturais [24]. Nessa conjuntura, o presente artigo teve como finalidade exemplificar o uso da ferramenta antiSMASH para predição de BGCs e análise *in silico* de metabólitos secundários de fungos.

Metodologia

Neste trabalho a predição *in silico* de BGCs foi realizada utilizando o *software* antiSMASH v.5.0 (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*), uma ferramenta de identificação, anotação e análise de agrupamentos de genes do metabolismo secundário de bactérias, fungos e plantas [18, 25].

O antiSMASH pode ser executado a partir de um servidor web (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) ou como uma versão *desktop* independente em um computador padrão. Os genes são preditos a partir da sequência de nucleotídeos do arquivo de entrada, e os *clusters* gênicos são identificados utilizando o modelo probabilístico pHMMs (*profile Hidden Markov Models*). O modelo detecta genes de assinatura espaçados em uma distância menor que 10 kb. Posteriormente, diferentes abordagens metodológicas podem ser realizadas: (i) análise e anotação do domínio NRPS/PKS; (ii) determinação da estrutura química do núcleo de PKSs e NRPSs; (iii) estudo comparativo de *clusters* de genes (*Cluster Blast*); e (iv) investigação da família de proteínas do metabolismo secundário smCOG. A saída é visualizada em uma página da *web* .xhtml interativa, e todos os detalhes são armazenados em um arquivo .embl para análise e edição adicional em um navegador de genoma. Um arquivo de planilha eletrônica com visão geral de todos os agrupamentos de genes detectados e seus detalhes também é gerado (Figura 1) [18, 25, 26].

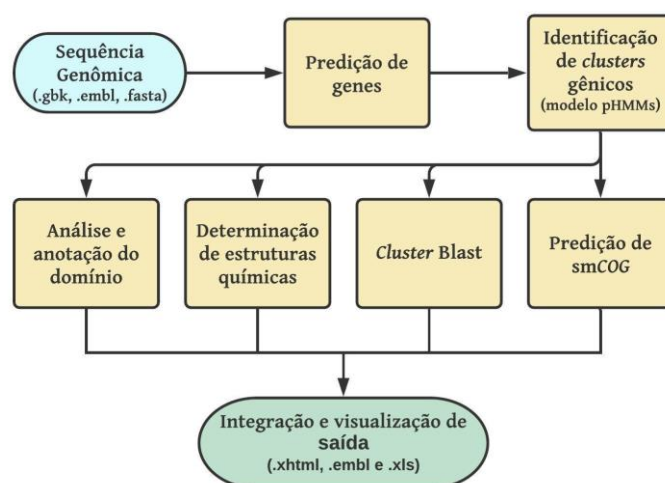


Figura 1: Pipeline de análise genômica de metabólitos secundários realizada por meio do antiSMASH. As cores azul e verde denotam a entrada e saída da ferramenta, respectivamente. A seção amarela apresenta o fluxo de funcionamento (adaptado de [26]).

Alguns conceitos introduzidos pela versão atual da ferramenta são importantes para compreender os resultados por ela apresentados (Tabela 1). A adaptação da ferramenta, demonstrada por essas definições, possibilitaram o aprimoramento da predição de BGCs híbridos, bem como a distinção de BGCs localizados lado a lado [25].

Tabela 1: Conceitos relacionados a análises do antiSMASH v.5.0

Conceito	Definição
Núcleo (core)	A área mínima que contém um ou mais genes que codificam enzimas para um único tipo de BGC, que são selecionados pelas regras de detecção determinadas manualmente. Esses genes não precisam ser contíguos, mas podem estar a uma certa distância de corte, conforme definido pela regra de detecção para o tipo de BGC em questão.
Vizinhança	Distância <i>upstream</i> e <i>downstream</i> do núcleo do cluster, usada para encontrar genes ou enzimas de adaptação.
Protocluster	Contém núcleo e vizinhanças em ambos os lados do núcleo; cada <i>protocluster</i> sempre terá um único tipo de produto (por exemplo, NRPS). <i>Protoclusters</i> podem sobrepor parcialmente ou completamente com outros <i>Protoclusters</i> .
Cluster candidato	Contém um ou mais <i>protoclusters</i> . <i>Clusters</i> candidatos podem sobrepor parcialmente ou completamente com outros <i>Clusters</i> candidatos.
Região	Contém um ou mais <i>clusters</i> candidatos. As Regiões não se sobrepõem umas às outras. Pelo menos um dos <i>clusters</i> candidatos contidos cobrirá a extensão completa da região.

Fonte: adaptado de [25].

Os dados a serem analisados foram provenientes do projeto genoma das linhagens 2HH e S1M29 do fungo *Penicillium echinulatum* depositadas no GenBank (CÓDIGOS OMITIDOS DEVIDO A REVISÃO CEGA, respectivamente). A sequência .gbk anotada de ambas as cepas foram inseridas na ferramenta, mantendo-se as configurações padrões: restritividade da detecção relaxada e funcionalidades adicionais de “*KnownClusterBlast*”, “*SubClusterBlast*” e “*ActiveSiteFinder*”. Os resultados obtidos pela ferramenta foram analisados manualmente. Adicionalmente, as análises foram complementadas com as informações obtidas no banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster*) [14].

Resultados

As análises do genoma de ambas as linhagens de *P. echinulatum* resultaram em uma predição de 26 *clusters* biossintéticos. De forma complementar, foi realizada uma comparação dessas linhagens com o fungo *P. oxalicum* 114-2, que possui similaridades genéticas apontadas anteriormente com as cepas utilizadas neste estudo [27]. Para essa segunda espécie fúngica foram identificados 46 *clusters* biossintéticos.

Famílias de Compostos de BGCs

Ao analisar os BGCs de acordo com as famílias dos metabólitos secundários, em *P. echinulatum*, aquelas com maior abundância foram *clusters* de terpenos, NRPSs e similares a NRPS (NRPS-like). Os terpenos são conhecidos como metabólitos odoríferos de plantas. No entanto, essa família de produtos naturais também é sintetizada por fungos. Em suma, todos os terpenos são constituídos por unidades de isopreno, podem ser lineares ou cíclicos, saturados ou insaturados e ainda modificados em diferentes vias. Já os NRPs, são derivados de aminoácidos proteinogênicos e de aminoácidos oriundos de NRPS (não proteinogênicos). Como exemplo desses compostos e enzimas

sintetizantes podemos apontar: a NRPS sintase de peptaibols em *Trichoderma virens*; o composto imunossupressor ciclosporina, NRP em *Tolypocladium niveum*; e o sideróforo ferricrocina em *Aspergillus nidulans*, que é sintetizado por uma NRPS [15].

A maioria dos metabólitos secundários de fungos são derivados de PKs e NRPs [12]. No entanto, enquanto NRPSs apresentaram uma maior abundância em *P. echinulatum*, *clusters* de PKs foram preditos em menor frequência. Os PKs são produtos naturais que possuem múltiplos grupos funcionais de beta-hidroxiketona ou beta-hidroxilaldeído [28]. Em fungos, os PKs melhor caracterizados geneticamente são o pigmento amarelo naftopirano, aflatoxinas (agentes carcinogênicos) e a lovastatina (composto utilizado para redução do colesterol) [15]. Adicionalmente, foram identificados em menor abundância *clusters* de PKS tipo I (T1PKS), híbridos entre NRPSs e T1PKS (NRPS-T1PKS), beta-lactona e sideróforo. O fungo *P. oxalicum* demonstrou um perfil similar ao de *P. echinulatum* para as famílias de compostos naturais, considerando a abundância de BGCs preditos. Ainda assim, foram encontrados BGCs para esse fungo pertencentes a famílias não preditas para *P. echinulatum*, incluindo: indol, T3PKS e outros *clusters* híbridos. A distribuição das famílias de metabólitos nos organismos analisados está representada na Figura 2.

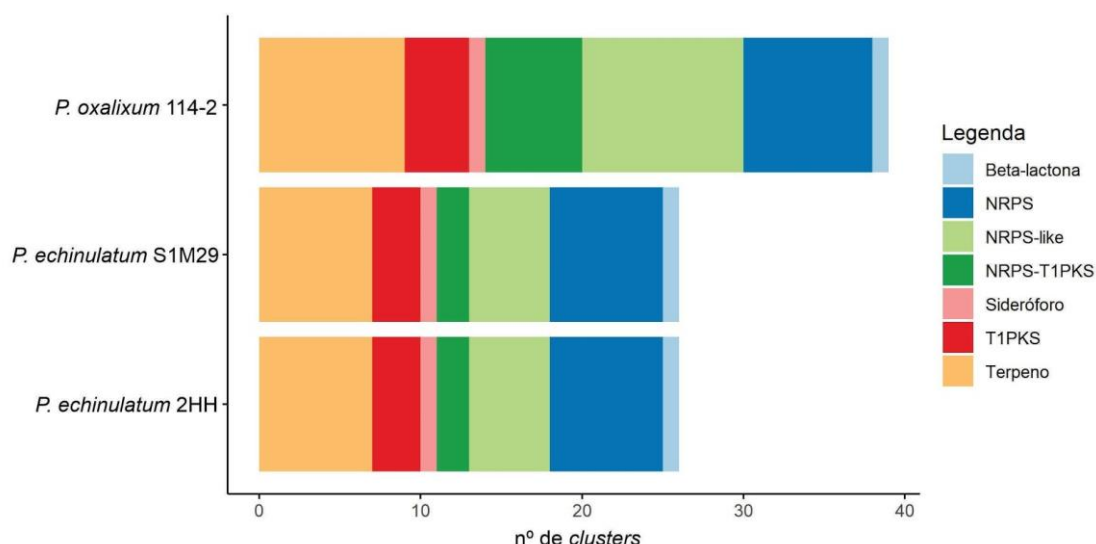


Figura 2: Distribuição dos *clusters* de metabólitos secundários preditos de acordo com o *backbone* proteico.

Descrição dos *clusters* de genes biossintéticos

Considerando que foi desenvolvida uma análise comparativa entre as linhagens selvagem e mutante do fungo *P. echinulatum*, foram identificadas seis regiões com alta similaridade no conteúdo gênico, essas contendo BGCs para: ácido clavárico, naftopirano, nidulanin A, oxaleimide C (2 *clusters*) e phyllostictine A (Figura 3). Adicionalmente, esses *clusters* foram comparados com os resultados para os organismos com maior similaridade, conforme sugerido pelo MIBiG.

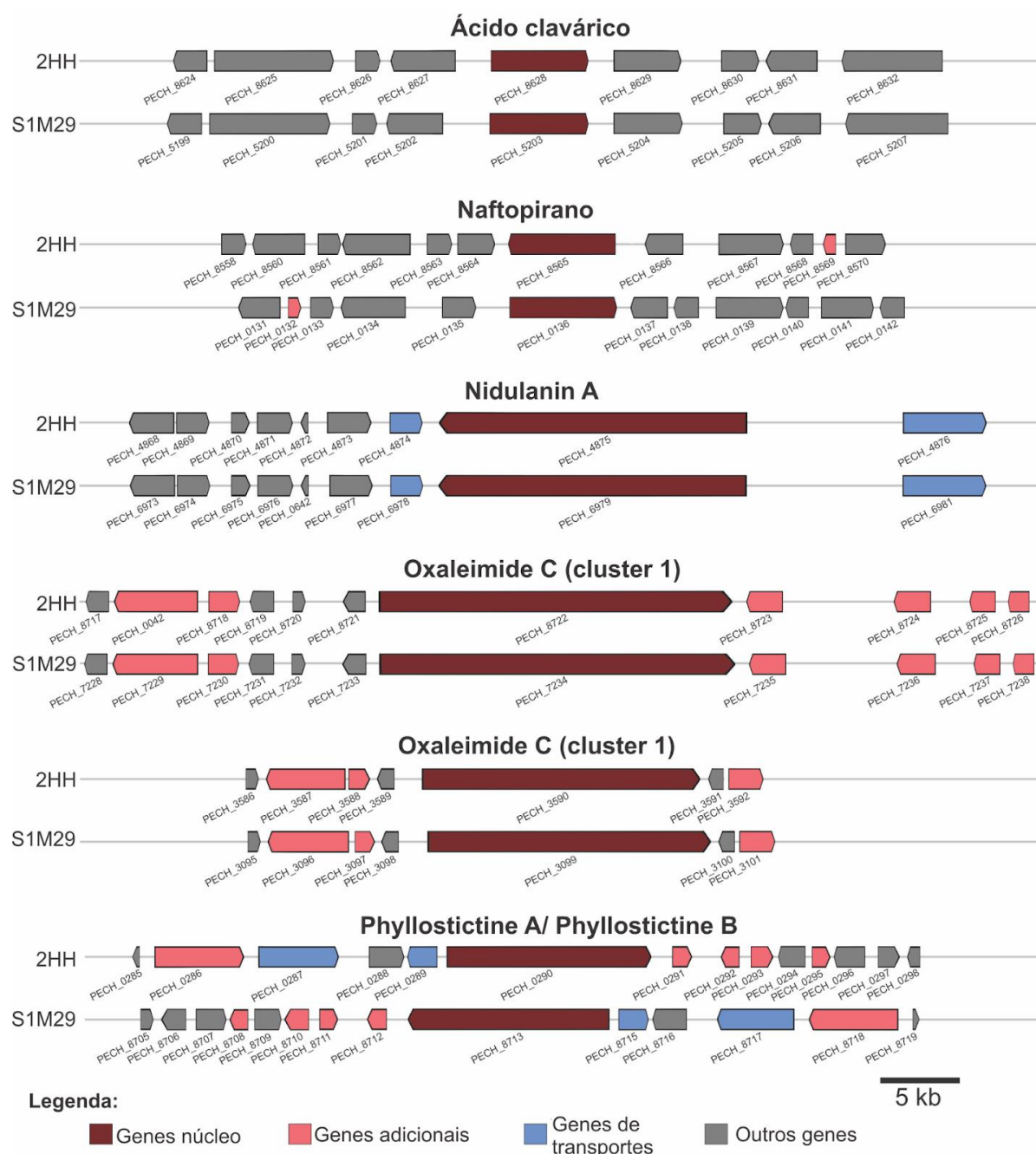


Figura 3: BGCs preditos para as linhagens 2HH e S1M29 do fungo *P. echinulatum* com o software antiSMASH.

O cluster biossintético do ácido clavárico foi identificado em comparação com o BGC de referência de *Hypholoma sublateritium* (Figura 4). Os clusters de *P. echinulatum* são formados por nove genes. Desses, um gene com similaridade de 100% foi identificado nos três organismos, o qual está relacionado com síntese da enzima oxidosqualene clavarinone cyclase em *H. sublateritium*. Essa enzima está envolvida na conversão de oxidoesqualeno para ácido clavárico [29]. O ácido clavárico é um triterpenoide descrito como um composto antitumoral devido a sua habilidade de inibir a farnesiltransferase (farnesyl-protease transferase - FPTase), um catalítico essencial para o desenvolvimento de tumores de origem oncogênica [29, 30].

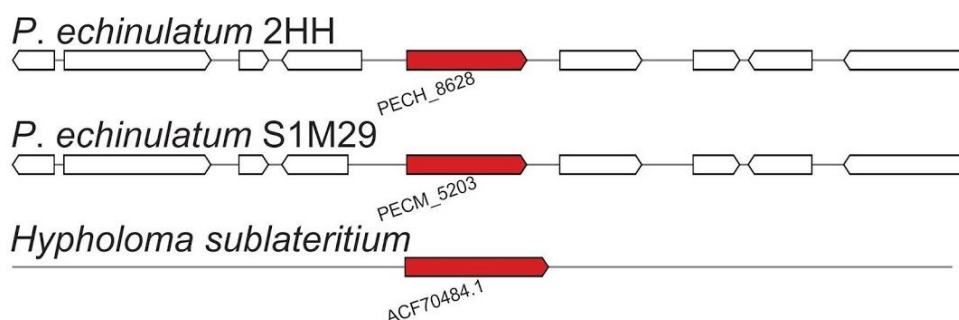


Figura 4: BGC do ácido clavárico e fórmula química do composto. O esquema de cor denota ortologia.

O naftopirano é um heptacetídeo envolvido na pigmentação de conídios [31]. Além disso, é precursor na síntese de 1,8-dihidroxi-naftaleno (1,8-DHN) melanina [32]. Tomando como referência o BGC de *A. nidulans* FGSC A4, foi possível identificar apenas um gene com 100% de similaridade entre os três organismos (Figura 5). Enquanto a estrutura do BGC de *P. echinulatum* é formada por 12 genes, em *A. nidulans* apenas um gene foi predito. Esse gene codifica uma PKS para o heptacetídeo de naftopirano [33]

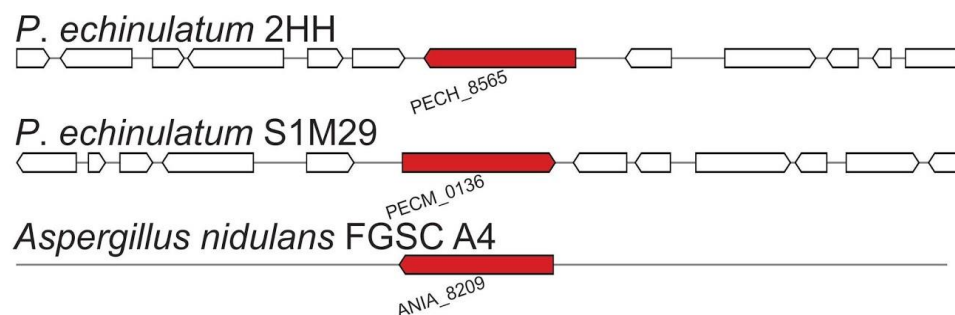


Figura 5: BGC do naftopirano e fórmula química do composto. O esquema de cor denota ortologia.

O BGC de nidulanin A é conservado em muitas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* [34]. Esse composto é um tetraciclopeptídeo/isopreno isolado e caracterizado originalmente em *A. nidulans* [35]. Dessa forma, a predição do BGC em *P. echinulatum* teve como referência *A. nidulans* FGSC A4, alcançando 75% de similaridade entre os genes comuns encontrados (Figura 6); sendo que o BGC de referência é formado por quatro genes. Entre esses, ANIA_1242, também conhecido como *nlsA*, apresentou ortologia em *P. echinulatum*. O gene em questão codifica uma enzima NRPS envolvida na síntese de nidulanin A e compostos derivados [10]. Atualmente, não existe uma propriedade ou função atribuída a esse metabólito. Contudo, a mesma enzima NRPS que está envolvida na síntese de nidulanin, também compõe a cascata metabólica resultante em fungisporina, produto natural que demonstra potencial atividade antibacteriana [34].

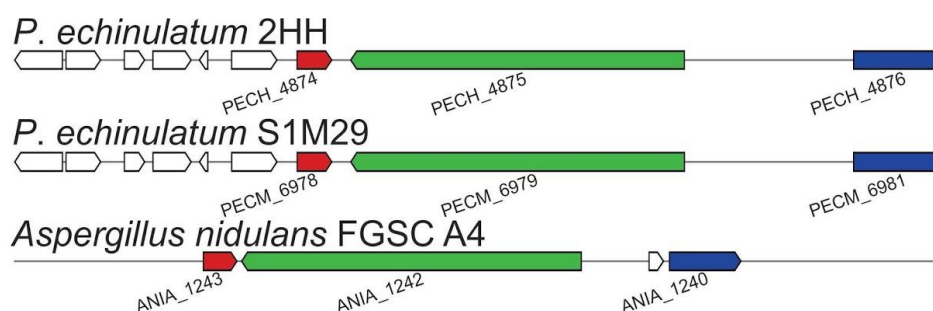


Figura 6: BGC da nidulanin A e fórmula química do composto. O esquema de cor denota ortologia.

Dois BGCs foram identificados para oxaleimide C em duas regiões distintas dos genomas de *P. echinulatum* 2HH e S1M29, aqui diferenciados como “Cluster A” e “Cluster B”. Ambos BGCs foram comparados com o *cluster* biossintético de *P. oxalicum* 114-2 (Figura 7). Em relação à similaridade, os *clusters* A e B apresentaram apenas 10% e 15% de similaridade, respectivamente, com o BGC de referência. De forma complementar, a oxaleimide possui como constituinte a maleimida, que apesar de ser um componente raro em produtos naturais, apresenta capacidade citotóxica [36].

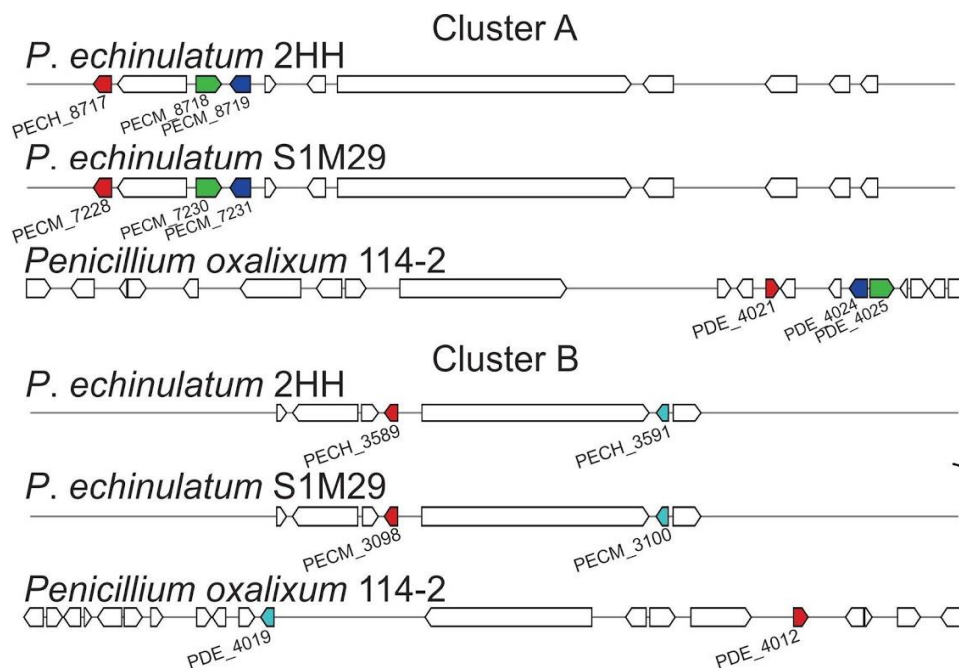


Figura 7: BGC da oxaleimide C e fórmula química do composto. O esquema de cor denota ortologia.

Na predição realizada (Figura 8), o BGC de referência identificado para phyllostictine A foi do organismo *Phyllosticta cirsii*. Phyllostictine A é produzida pelo fungo *P. cirsii*, que é patógeno da planta invasora *Cirsium arvense*. Esse metabólito possui atividade fitotóxica; assim, os primeiros estudos com esse composto foram voltados para o seu potencial como bioherbicida. Também foram identificadas três variantes nomeadas de phyllostictine B-D. No entanto, além das propriedades fitotóxicas, a phyllostictine A apresenta citotoxicidade em culturas celulares humanas, atividade antibacteriana e zootóxica [37, 38].

O BGC de referência possui dez genes, dos quais quatro apresentam ortologia com as linhagens selvagem e mutante de *P. echinulatum* (2HH e S1M29). Todos esses estão envolvidos na biossíntese de phyllostictine A. Desses, há ênfase para a predição de *PhyS* (produto ARP51711.1), visto que codifica uma enzima híbrida PKS-NRPS. Esses sistemas híbridos sintetizam uma diversidade de compostos, incluindo ácidos tetrâmicos, classe na qual se enquadra a phyllostictine [38, 39].

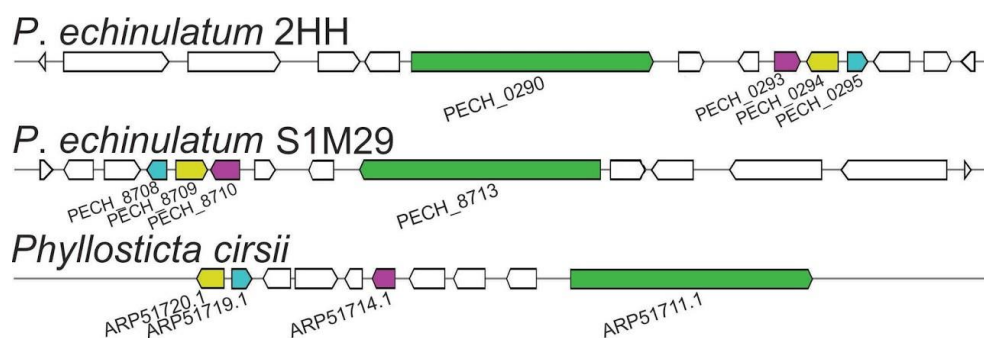


Figura 8: BGC da phyllostictine A e fórmula química do composto. O esquema de cor denota ortologia.

Análise de micotoxinas

Entre os metabólitos secundários há destaque para as micotoxinas, visto os efeitos adversos para a economia e saúde de plantas, humanos e outros animais [40]. Nesse sentido, é imprescindível a concretização de análises direcionadas para a identificação e caracterização desses compostos. O mapeamento de micotoxinas no presente trabalho comparou os BGCs de diferentes espécies de fungos filamentosos com os *clusters* preditos para *P. echinulatum*, levando em consideração ortologia. A análise incluiu 17 BGCs de micotoxinas secretadas por fungos filamentosos extraídos do banco de dados MIBiG (Figura 9).

Tabela 2: Comparação do número de genes em BGCs de micotoxinas por ortologia entre *P. echinulatum* e fungos filamentosos de referência. As micotoxinas identificadas foram anotadas de acordo com as informações disponíveis no MIBiG, podendo estarem fazendo alusão a um composto específico ou classe de composto.

Micotoxina	Organismo de referência	Nº de genes do BGC no organismo de referência	Nº de genes ortólogos do BGC em <i>P. echinulatum</i>
Acetylaranotin	<i>Aspergillus terreus</i> FGSC A1156	15	2
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> BN008	25	4
	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 56775	25	4
Aflatrem (cluster 1)	<i>Aspergillus flavus</i>	17	1
Aflatrem (cluster 2)	<i>Aspergillus flavus</i>	8	0
Citreoviridina	<i>Aspergillus terreus</i> FGSC A1156	7	1
	<i>Monascus purpureus</i> ATCC 16360	8	1
	<i>Monascus ruber</i> M7	16	3
	<i>Penicillium expansum</i> MD-8	8	1
Ácido ciclopiazônico	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	7	0
	<i>Aspergillus flavus</i>	6	0
Fumagilina	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	14	2
	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	9	1
Fumitremorgina	<i>Aspergillus fumigatus</i> FGSC A1163	9	1
	<i>Aspergillus fischerianus</i> ATCC 1020	9	1
Fumonisina	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	12	2
Gliotoxina	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	15	1
HC-Toxin	<i>Cochliobolus carbonum</i>	7	4
	<i>Penicillium chrysogenum</i> P2niaD18	7	6

	<i>Penicillium roqueforti</i> FM164	5	5
Ocratoxina A	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	5	1
	<i>Penicillium nordicum</i> DAOMC 185683	8	0
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> MD-8	15	1
	<i>Aspergillus clavatus</i> ATCC 1007	15	1
Penitrem A (cluster 1)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	15	5
	<i>Penicillium crustosum</i>	13	4
Penitrem A (cluster 2)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	5	0
	<i>Penicillium crustosum</i>	5	0
Toxina PR	<i>Penicillium roqueforti</i>	4	0
	<i>Penicillium roqueforti</i> FM164	4	0
	<i>Penicillium rubens</i> Wisconsin 54-1255	11	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i> P2niaD18	10	0
Roquefortina C	<i>Penicillium roqueforti</i>	4	0
	<i>Penicillium rubens</i> Wisconsin 54-1255	7	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i> P2niaD18	7	0
Micotoxina T-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC 24631	28	5

Ao relacionar os genes ortólogos entre os organismos, é possível observar que nenhum BGC encontrado para *P. echinulatum* apresenta a totalidade de genes contidos nos agrupamentos de referência. O BGC que apresentou a maior porcentagem de genes ortólogos foi o da micotoxina HC-toxina, atingindo 70%. Esse produto natural é um tretrapéptido cíclico inibidor de deacetilases de histonas em muitos organismos, e também possui atividade antitumoral [41, 42]. Nos demais *clusters*, a quantidade de genes com ortologia é igual ou inferior a 50%. Considerando a baixa quantidade de genes ortólogos presentes nos BGCs de *P. echinulatum*, podemos hipotetizar a inexistência de rotas biossintéticas completas para as micotoxinas analisadas. Todavia, estudos complementares com metodologias experimentais são pertinentes para averiguar os resultados obtidos.

Considerações Finais

Os fungos filamentosos secretam uma ampla diversidade de metabólitos secundários. Esses possuem diferentes estruturas químicas e funções biológicas, desempenhando um papel eminente para os organismos e suas relações com os ecossistemas. Os resultados *in silico* indicam que as cepas de *P. echinulatum* podem secretar diferentes produtos naturais de interesse biotecnológico, de acordo com os BGCs preditos pela ferramenta antiSMASH. Contudo, análises complementares são necessárias para ratificar a produção e secreção desses compostos. Por fim, os resultados aqui apresentados são uma

exemplificação do uso da ferramenta antiSMASH e não apresentam em sua integridade um panorama completo dos metabólitos secretados para as linhagens estudadas.

Referências

- [1] D. L. Nelson, M. M. Cox, “Lehninger Principles of Biochemistry”, 7th ed., Freeman, W. H. & Company, 2017.
- [2] G. J. Tortora, D. Bryan, “Princípios de Anatomia e Fisiologia”, 14th ed., Guanabara Koogan, 2016.
- [3] A.L. Demain, A. Fang, The natural functions of secondary metabolites, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 69 (2000) 1–39.
- [4] T. da S. Agostini-Costa, R.F. Vieira, H.R. Bizzo, D. Silveira, M.A. Gimenes, Secondary Metabolites, em “Chromatography and Its Applications”, IntechOpen, 2012.
- [5] R. Breitling, A. Cenicerós, A. Jankevics, E. Takano, Metabolomics for Secondary Metabolite Research, *Metabolites*, 3 (2013) 1076–1083.
- [6] K.C. Nicolaou, S. Rigol, Perspectives from nearly five decades of total synthesis of natural products and their analogues for biology and medicine, *Nat. Prod. Rep.*, 37 (2020) 1404–1435.
- [7] M.E. Zain, Impact of mycotoxins on humans and animals, *Journal of Saudi Chemical Society*, 15 (2011) 129–144.
- [8] P.G. Arnison, M.J. Bibb, G. Bierbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj, J.A. Camarero, D.J. Campopiano, G.L. Challis, J. Clardy, P.D. Cotter, D.J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P.C. Dorrestein, K.-D. Entian, M.A. Fischbach, J.S. Garavelli, U. Göransson, *et al.*, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.*, 30 (2013) 108–160.
- [9] J. Soltani, Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances, em “New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and Applications”, Elsevier, Amsterdam, 2016.
- [10] M.R. Andersen, J.B. Nielsen, A. Klitgaard, L.M. Petersen, M. Zachariasen, T.J. Hansen, L.H. Blicher, C.H. Gottfredsen, T.O. Larsen, K.F. Nielsen, U.H. Mortensen, Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110 (2013) E99-107.
- [11] T. Hautbergue, E.L. Jamin, L. Debrauwer, O. Puel, I.P. Oswald, From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, 35 (2018) 147–173.
- [12] A.A. Brakhage, Regulation of fungal secondary metabolism, *Nat. Rev. Microbiol.*, 11 (2013) 21–32.
- [13] N.P. Keller, Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery, *Nat. Rev. Microbiol.*, 17 (2019) 167–180.
- [14] M.H. Medema, R. Kottmann, P. Yilmaz, M. Cummings, J.B. Biggins, K. Blin, I. de Bruijn, Y.H. Chooi, J. Claesen, R.C. Coates, P. Cruz-Morales, S. Duddela, S. Düsterhus, D.J. Edwards, D.P. Fewer,

N. Garg, C. Geiger, J.P. Gomez-Escribano, A. Greule, M. Hadjithomas, *et al.*, Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster, *Nat. Chem. Biol.*, 11 (2015) 625–631.

[15] N.P. Keller, G. Turner, J.W. Bennett, Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 (2005) 937–947.

[16] T. Weber, H.U. Kim, The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production, *Synth. Syst. Biotechnol.*, 1 (2016) 69–79.

[17] B.O. Bachmann, J. Ravel, Methods for *In Silico* Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data, em “Methods in Enzymology”, Academic Press, 2009.

[18] M.H. Medema, K. Blin, P. Cimermanic, V. de Jager, P. Zakrzewski, M.A. Fischbach, T. Weber, E. Takano, R. Breitling, antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences, *Nucleic Acids Res.*, 39 (2011) W339–346.

[19] M.D. Mungan, M. Alanjary, K. Blin, T. Weber, M.H. Medema, N. Ziemert, ARTS 20: feature updates and expansion of the Antibiotic Resistant Target Seeker for comparative genome mining, *Nucleic Acids Res.*, 48 (2020) W546–W552.

[20] A.J. van Heel, A. de Jong, M. Montalbán-López, J. Kok, O.P. Kuipers, BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides, *Nucleic Acids Res.*, 41 (2013) W448–453.

[21] J.C. Navarro-Muñoz, N. Selem-Mojica, M.W. Mullowney, S.A. Kautsar, J.H. Tryon, E.I. Parkinson, E.L.C. De Los Santos, M. Yeong, P. Cruz-Morales, S. Abubucker, A. Roeters, W. Lokhorst, A. Fernandez-Guerra, L.T.D. Cappelini, A.W. Goering, R.J. Thomson, W.W. Metcalf, N.L. Kelleher, F. Barona-Gomez, M.H. Medema, A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity, *Nat. Chem. Biol.*, 16 (2020) 60–68.

[22] T. Wolf, V. Shelest, N. Nath, E. Shelest, CASSIS and SMIPS: promoter-based prediction of secondary metabolite gene clusters in eukaryotic genomes, *Bioinformatics*, 32 (2016) 1138–1143.

[23] T. Weber, C. Rausch, P. Lopez, I. Hoof, V. Gaykova, D.H. Huson, W. Wohlleben, CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters, *J. Biotechnol.*, 140 (2009) 13–17.

[24] F. Guzmán-Chávez, R.D. Zwahlen, R.A.L. Bovenberg, A.J.M. Driessen, Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products, *Front. Microbiol.*, 9 (2018) 2768.

[25] K. Blin, S. Shaw, K. Steinke, R. Villebro, N. Ziemert, S.Y. Lee, M.H. Medema, T. Weber, antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline, *Nucleic Acids Res.*, 47 (2019) W81–W87.

[26] K. Blin, M.H. Medema, D. Kazempour, M.A. Fischbach, R. Breitling, E. Takano, T. Weber, antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers, *Nucleic Acids Res.*, 41 (2013) W204–212.

- [27] A.R. Lenz, E. Galán-Vásquez, E. Balbinot, F.P. de Abreu, N. Souza de Oliveira, L.O. da Rosa, S. de Avila E Silva, M. Camassola, A.J.P. Dillon, E. Perez-Rueda, Gene Regulatory Networks of *Penicillium echinulatum* 2HH and *Penicillium oxalicum* 114-2 Inferred by a Computational Biology Approach, *Front. Microbiol.*, 11 (2020) 588263.
- [28] E.S. Gomes, V. Schuch, E.G. de Macedo Lemos, Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics, *Braz. J. Microbiol.*, 44 (2013) 1007–1034.
- [29] R.P. Godio, J.F. Martín, Modified oxidosqualene cyclases in the formation of bioactive secondary metabolites: biosynthesis of the antitumor clavaric acid, *Fungal Genet. Biol.*, 46 (2009) 232–242.
- [30] H. Jayasuriya, K.C. Silverman, D.L. Zink, R.G. Jenkins, M. Sanchez, F. Pelaez, D. Vilella, R.B. Lingham, S.B. Singh, Clavaric acid: a triterpenoid inhibitor of farnesyl-protein transferase from *Clavariadelphus truncatus*, *J. Nat. Prod.*, 61 (1998) 1568–1570.
- [31] A. Watanabe, I. Fujii, H. Tsai, Y.C. Chang, K.J. Kwon-Chung, Y. Ebizuka, *Aspergillus fumigatus* alb1 encodes naphthopyrone synthase when expressed in *Aspergillus oryzae*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 192 (2000) 39–44.
- [32] D. Gerin, L. González-Candelas, A.-R. Ballester, S. Pollastro, R.M. De Miccolis Angelini, F. Faretra, Functional Characterization of the alb1 Orthologue Gene in the Ochratoxigenic Fungus *Aspergillus carbonarius* (AC49 strain), *Toxins (Basel)*, 10 (2018) 120.
- [33] A. Watanabe, I. Fujii, U. Sankawa, M.E. Mayorga, W.E. Timberlake, Y. Ebizuka, Re-identification of *Aspergillus nidulans* wA gene to code for a polyketide synthase of naphthopyrone, *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 91–94.
- [34] E. Bignell, T.C. Cairns, K. Throckmorton, W.C. Nierman, N.P. Keller, Secondary metabolite arsenal of an opportunistic pathogenic fungus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 371 (2016) 20160023.
- [35] N. Raffa, N.P. Keller, A call to arms: Mustering secondary metabolites for success and survival of an opportunistic pathogen, *PLoS Pathog.*, 15 (2019) e1007606.
- [36] M. Sato, J.E. Dander, C. Sato, Y.-S. Hung, S.-S. Gao, M.-C. Tang, L. Hang, J.M. Winter, N.K. Garg, K. Watanabe, Y. Tang, Collaborative Biosynthesis of Maleimide- and Succinimide-Containing Natural Products by Fungal Polyketide Megasyntases, *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (2017) 5317–5320.
- [37] A. Evidente, A. Cimmino, A. Andolfi, M. Vurro, M.C. Zonno, C.L. Cantrell, A. Motta, Phyllostictines A–D, oxazatricycloalkenones produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol, *Tetrahedron*, 64 (2008) 1612–1619.
- [38] F. Trenti, R.J. Cox, Structural Revision and Biosynthesis of the Fungal Phytotoxins Phyllostictines A and B, *J. Nat. Prod.*, 80 (2017) 1235–1240.
- [39] M. Riemer, V.V. Uzunova, N. Riemer, G.J. Clarkson, N. Pereira, R. Napier, M. Shipman, Phyllostictine A: total synthesis, structural verification and determination of substructure responsible for plant growth inhibition, *Chem. Commun. (Camb.)*, 54 (2018) 7211–7214.

- [40] G. Perrone, A. Susca, *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins, *Methods Mol. Biol.*, 1542 (2017) 107–119.
- [41] J.D. Walton, HC-toxin, *Phytochemistry*, 67 (2006) 1406–1413.
- [42] W. Zhou, X. Chen, K. He, J. Xiao, X. Duan, R. Huang, Z. Xia, J. He, J. Zhang, G. Xiang, Histone deacetylase inhibitor screening identifies HC toxin as the most effective in intrahepatic cholangiocarcinoma cells, *Oncol. Rep.*, 35 (2016) 2535–2542.