

**GENOME MINING APPROACH TO  
*Streptomyces* sp. GMR22 (TERRESTRIAL) AND GMY01 (MARINE)  
FROM INDONESIA AS A PRODUCER OF NEW POTENTIAL  
ANTICANCER COMPOUNDS**

**ABSTRACT**

One of the modalities of cancer therapy is chemotherapy. It is effective for metastatic cells, but has a lot of side effects. The development of effective chemotherapy agents with less side effects and safe for normal cells is indispensable. *Streptomyces* is a major source of microbes that have potentials to produce bioactives than any other microbes. The conventional inventive methods of secondary metabolites of *Streptomyces* still have so many difficulties in finding new drugs eventhough already using high-throughput screening and also have a high difficulty getting back secondary metabolites found previously. *Streptomyces* whole genome sequencing is less expensive and will continue to be applied in a regular basis to replace the conventional technique based on a genomic library in identifying desired groups of genes. Natural product discovery efforts based on genomics revealed not only new compounds but also allied biosynthetic pathways and new insights in natural products biosynthesis. The purpose of this study is to develop an effective chemotherapy agent of Indonesian *Streptomyces* sp. GMR22 (terrestrial) and GMY01 (marine) through genome mining approach.

In this research, genome sequencing performed on *Streptomyces* sp. GMR22 and GMY01 with Next Generation Sequencing Platform (NGS) using 454 pyrosequencing technology (454 GS FLX) and HiSeq1000 (Illumina). Genome sequence released from *Streptomyces griseus* IFO13350 was used as a reference. GeneMarkS tRNAscan-SE and RNAmmer were used to predict protein-coding genes, tRNA and rRNA. GSP software was used to estimate the genome size and GMY01 GMR22. Complete genome annotation and comparative genome carried by RAST Prokaryotic Genome Annotation Server. Whole-genome phylogenetic was analysed with Neighbour-joining algorithm to show relationship GMR22, GMY01 and 19 *Streptomyces* known sequence of its genome. Phylogeny tree created using CVtree with a k-value of 6 with *Bacillus subtilis* natto BEST195 as out group and visualized by MEGA 6:06. Identification, annotation and analysis of gene cluster involved in the biosynthesis of secondary metabolites were conducted with antiSMASH 3.0 available on <http://antismash.secondarymetabolites.org>. To confirm the genome mining results, GMY01 isolation was selected to test the cytotoxicity in cancer cell models (MCF7 and T47D). GMY01 extract cytotoxicity assay and cell cycle analysis conducted on breast cancer cells T47D and MCF7 with normal NIH3T3 cells used as controls. Cytotoxicity assay performed using the MTT assay and cell cycle analysis conducted with selected extracts that have the highest cytotoxicity with propidium iodide as a dye solution and analyzed by FACS Calybour flowcytometer tool.

The results showed that the size of the genome of GMR22 and GMY01 were 11,42 and 7.97 Mbp respectively, and the genome homology of GMR22 and

GMY01 was low, as well as the evolution of genomes GMR22 was faster than GMY01. There were 2394 same enzyme subsystem in GMR22 and GMY01, specifically owned by GMR22 270 and 128, which specifically owned by GMY01. Based on genome mining, it could be seen that the secondary metabolites that potentially produced by GMR22 was 63 dominated by a group of polyketide synthetase (PKS), whereas at GMY01 was 28 dominated by non-ribosomal peptide synthase (NRPS). PKS and NRPS have been known to have great potential as a chemotherapeutic agent. Cytotoxicity assay and cell cycle analysis showed that the compounds of secondary metabolites produced by GMY01 were mainly in fractions of ethyl acetate and methanol which had the potential for inhibiting breast cancer cell line T47D and MCF7, but did not inhibit normal cells (NIH3T3). The mechanism of inhibitory possibility was through the induction of apoptosis without affecting cell cycle. The results of this study indicated that GMR22 and GMY01 have a huge potential to produce compounds that can be developed as a safe and effective anticancer chemotherapeutic agent.

**Keywords:** Genome mining, *Streptomyces*, anticancer chemotherapeutic agents, genome sequence

## **PENDEKATAN GENOM MINING TERHADAP *Streptomyces* sp GMR22 (DARAT) DAN GMY01 (LAUT) ASAL INDONESIA SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIKANKER BARU YANG POTENSIAL**

### **INTISARI**

Salah satu modalitas terapi kanker adalah kemoterapi. Kemoterapi efektif untuk sel yang telah bermetastasis, namun memiliki efek samping yang cukup banyak. Pengembangan agen kemoterapi yang efektif dengan efek samping yang rendah dan aman terhadap sel normal sangat diperlukan. *Streptomyces* merupakan sumber mikroba utama yang memiliki potensi menghasilkan senyawa bioaktif terbanyak dibandingkan mikroba lainnya. Metode penemuan senyawa metabolit sekunder dari *Streptomyces* secara konvensional masih banyak mengalami kesulitan dalam menemukan obat-obatan baru meskipun sudah menggunakan penapisan *high-throughput*, dan memiliki kesulitan tinggi mendapatkan kembali metabolit sekunder yang telah ditemukan sebelumnya. Sekuensing genom *Streptomyces* secara lengkap lebih ekonomis, dan secara rutin akan terus diterapkan untuk menggantikan teknik konvensional yang berbasis pada pustaka genomik dalam mengidentifikasi kelompok gen yang diinginkan. Upaya penemuan produk alami yang berbasis pada genomik telah mengungkapkan tidak hanya senyawa baru tetapi juga jalur biosintesis yang serumpun dan wawasan baru dalam biosintesis produk alami. Tujuan penelitian ini adalah memanfaatkan pendekatan *genome mining* untuk mengungkap potensi *Streptomyces* sp. GMR22 (darat) dan *Streptomyces* sp. GMY01 (laut) asal Indonesia sebagai penghasil senyawa antikanker yang potensial

Pada penelitian ini, sekuensing genom dilakukan pada GMR22 dan GMY01 dengan *platform Next Generation Sequencing* (NGS) menggunakan 454 *pyrosequencing technology* (454 GS FLX) dan HiSeq1000 (Illumina). Sekuen genom yang telah dirilis dari *Streptomyces griseus* IFO13350 digunakan sebagai acuan. GeneMarkS tRNAscan-SE dan RNAmmer dipergunakan untuk memprediksi gen penyandi protein, tRNA, dan rRNA. Perangkat lunak GSP digunakan untuk memperkirakan ukuran genom GMR22 dan GMY01. Anotasi genom lengkap dan perbandingan genom dilakukan dengan *RAST Prokaryotic Genome Annotation Server*. Analisis *whole genome phylogenetic* dibuat berdasarkan algoritma *Neighbour-joining* untuk menunjukkan hubungan kekerabatan GMR22, GMY01 dan 19 *streptomyces* yang telah diketahui sekuen genomnya. Pohon phylogeni dibuat menggunakan CVtree dengan *k-value* 6 dengan *Bacillus subtilis* natto BEST195 sebagai *out group*, dan divisualisasi dengan MEGA 6.06. Identifikasi, anotasi dan analisis kluster gen yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder dilakukan dengan antiSMASH 3.0 yang tersedia pada <http://antismash.secondarymetabolites.org>. Uji sitotoksitas isolat GMY01 dan analisis daur sel dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF7, dan sel normal NIH3T3 digunakan sebagai kontrol. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan *MTT assay* dan analisis daur sel dilakukan dengan ekstrak terpilih

yang memiliki sitotoksisitas tertinggi dengan larutan propidium iodida sebagai pewarna dan dianalisis dengan alat flow cytometer FACS Calybour.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran genom dan sekuen genom GMR22 sebesar 11.42 Mbp dan GMY01 sebesar 7.97 Mbp, berbeda satu sama lain, dan memiliki hubungan kekerabatan jauh, serta evolusi genom GMR22 lebih cepat dibanding GMY01. Pada GMR22 dan GMY01 terdapat 2394 *subsystem* enzim yang sama, 270 spesifik hanya dimiliki GMR22 dan 128 yang secara spesifik hanya dimiliki GMY01. Berdasarkan *genome mining* dapat diketahui bahwa metabolit sekunder yang secara potensial dihasilkan oleh GMR22 ada 63 yang didominasi oleh senyawa kelompok *poliketide sintetase* (PKS), sedangkan pada GMY01 ada 28 yang didominasi *non-ribosomal peptide sintase* (NRPS). PKS dan NRPS telah diketahui memiliki potensi yang besar sebagai agensia kemoterapi. Uji sitotoksisitas dan analisis daur sel menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan GMY01 terutama pada fraksi etil asetat dan metanol memiliki potensi menghambat sel kanker payudara T47D dan MCF7, namun tidak menghambat sel normal (NIH3T3). Mekanisme penghambatan yang terjadi besar kemungkinan melalui induksi apoptosis tanpa mempengaruhi daur sel. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa GMR22 dan GMY01 memiliki potensi yang besar menghasilkan senyawa antikanker yang dapat dikembangkan sebagai agen kemoterapi yang efektif dan aman.

**Kata Kunci:** *Genome mining, Streptomyces, antikanker, agen kemoterapi, sekuen genom*