



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Staš VRH

**GENSKE SKUPINE ZA BIOSINTEZO BIOLOŠKO
AKTIVNIH UČINKOVIN IZ SKUPINE POLIKETID
SINTAZE TIPA 2**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Staš VRH

**GENSKE SKUPINE ZA BIOSINTEZO BIOLOŠKO AKTIVNIH
UČINKOVIN IZ SKUPINE POLIKETID SINTAZE TIPA 2**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

TYPE 2 POLYKETIDE SYNTHASE GENE CLUSTERS

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Hrvoja Petkovića.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 04. 07. 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 604.4: 615.33(043.2)
KG	biotehnologija, poliketidi, biosinteza, PKS, aktinomicete
AV	VRH, Staš
SA	PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2018
IN	GENSKE SKUPINE ZA BIOSINTEZO BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN IZ SKUPINE POLIKETID SINTAZE TIPA 2
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 24 str., 2 pregl., 14 sl., 112 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Aktinomicete so glavni vir policikličnih aromatskih molekul, poznanih kot poliketidi tipa 2, med katerimi je tudi veliko klinično pomembnih antibiotikov in protirakastih učinkovin. Poliketidi tipa 2, kot so antraciklini, anguciklini in tetraciklini, tvorijo veliko skupino naravnih molekul z raznolikimi strukturami in biološkimi aktivnostmi. Sintetizirajo jih encimski kompleksi poliketid sintaze (PKS) tipa 2. Genske skupine PKS tipa 2 so sestavljene iz minimalnega PKS (ketosintazni heterodimer (K α in K β) in »acyl carrier« proteina (ACP)) in drugih genov, ki sodelujejo pri biosintezi skeleta, kot so ketoreduktaze, ciklaze, aromataze ter encimov, ki katalizirajo t. i. pozne stopnje v biosintezi teh sekundarnih metabolitov. Raznolikost in kompleksnost genskih skupin za biosintezo poliketidov je zahtevala razvoj posebnih bioinformatičnih orodij za identifikacijo, anotacijo in predikcijo kemijske strukture produkta genske skupine, za aktivacijo tihih genskih skupin pa so bile razvite posebne metode. Obstaja veliko primerov študij, ki potrjujejo, da neizkoriščeni viri kot so nekultivabilne bakterije predstavljajo bogat vir novih poliketidov. V obsegu te diplomske naloge smo povzeli potencialne pristope za študij genskih skupin za biosintezo poliketidov tipa 2.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 604.4: 615.33(043.2)
CX biotechnology, polyketides, biosynthesis, PKS, actinomyces
AU VRH, Staš
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2018
TI TYPE 2 POLYKETIDE SYNTHASE GENE CLUSTERS
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
NO VI, 24 p., 2 tab., 14 fig., 112 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Actinomycetes are rich source of polycyclic aromatic molecules, known as polyketides, which include many clinically important antibiotics and anticancer drugs. These polyketides, exemplified by anthracyclines, angucyclines and tetracyclines, are a large group of natural products with diverse structures and biological activities. They are synthesized by the so-called type-2 polyketide synthases (PKSs). Type 2 PKS gene clusters consist of the so-called minimal PKS (consisting of ketosynthase heterodimer (KS α and KS β) and an acyl carrier protein (ACP)) and keto-reductases, cyclases, aromatases and late tailoring enzymes designated as post-PKS enzymes. In recent years, numerous genome sequencing projects revealed the diversity and complexity of biosynthetic polyketide gene clusters. Bioinformatic approaches are needed in order to study gene cluster encoding type-2 PKS, and thus tailor-made bioinformatic approaches are needed to identify, annotate and predict the chemical output from their biosynthetic gene clusters. Gene cloning and expression technologies are being developed to allow the expression of silent biosynthetic gene clusters. Therefore, in the scope of this work we have carried review on potential approaches to study and identify novel type-2 PKS gene clusters.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 POLIKETIDI	2
2.1 POLIKETIDI, SINTETIZIRANI S POLIKETID SINTAZAMI TIPA 2	2
2.1.1 Antraciklini	2
2.1.2 Anguciklini	3
2.1.3 Tetraciklini	3
2.1.4 Aureolske kisline	3
2.1.5 Benzo(a)naftaceni	4
2.1.6 Benzoizokromokinoni	4
2.1.7 Tetracenomicini	5
2.1.8 Ostali poliketidi tipa 2	5
3 BIOSINTEZA POLIKETIDOV TIPA 2	7
3.1 MINIMALNI PKS	8
3.2 INICIACIJA TVORBE VERIGE	9
3.3 REDUKCIJA IN CIKLIZACIJA	9
3.4 POSTSINTEZNE MODIFIKACIJE	10
4 ORGANIZACIJA POLIKETID SINTAZ NA GENSKEM NIVOJU	11
5 STRATEGIJE ODKRIVANJA NOVIH AROMATSKIH POLIKETIDOV	12
5.1 AKTIVACIJA TIH GENSKIH SKUPIN	13
5.2 ANALIZA METAGENOMOV	14
5.3 ISKANJE GENSKIH SKUPIN V GENOMIH KULTIVABILNIH BAKTERIJ	14
5.4 IZRAŽANJE GENSKIH SKUPIN V HETEROLOGNIH GOSTITELJIH	16
5.5 KOMBINATORNA BIOSINTEZA	17
6 ZAKLJUČEK	18
7 VIRI	18

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekateri pomembnejši poliketidi tipa 2, njihov mikrobn vir in biološka aktivnost. Polsintezni derivati niso vključeni v tabelo.	6
Preglednica 2: Novoodkriti poliketidi tipa 2.	17

KAZALO SLIK

Slika 1: Aglikonski del antraciklinov (Fujiwara in sod., 1985).	2
Slika 2: Anguciklinski aglikon (Rohr in Thiericke, 1992).	3
Slika 3: Kemijska struktura tetraciklinov (Hertweck in sod., 2007).	3
Slika 4: Kemijska struktura sekundarnih metabolitov iz skupine aureolskih kislin (Rohr in sod., 1999).	4
Slika 5: Kemijska struktura pradimicinov (Walsh in Giri, 1997).	4
Slika 6: Kemijska struktura benzoizokromanokinonov (Naysmith in sod., 2017).	5
Slika 7: Kemijska struktura tetracenomicinov (Hertweck in sod., 2007).	5
Slika 8: Sestava minimalnega PKS tipa 2 (Hertweck in sod., 2007).	8
Slika 9: Sinteza poliketidne verige s PKS tipa 2 (Hertweck in sod., 2007).	8
Slika 10: Kemijska struktura enterocina z označeno začetno enoto (Hertweck in sod., 2007).	9
Slika 11: Način ciklizacije poliketidne verige tetracenomicina in anguciklina (Zhou in sod., 2010).	10
Slika 12: Organizacija genskih skupin za sintezo aktinorhodina, granaticina, frenolicina, grizeuzina, tetracenomicina, 3 pigmentov, oksitetraciklina, daunorubicina, nogalamicina, mitramicina, urdamicina, jadomicina in 3 do tedaj neznanih poliketidov. Prikazani so samo geni, vpleteni v sintezo aglikona (Hopwood, 1997).	11
Slika 13: Organizacija genske skupine za sintezo enterocina (Piel in sod., 2000)	12
Slika 14: Shematski prikaz strategij za odkrivanje novih biološko aktivnih učinkovin.	12

1 UVOD

Sodobne medicine si danes ne moremo predstavljati brez uporabe sekundarnih metabolitov, njihovih polsinteznih derivatov ali sinteznih analogov. Med drugim jih uporabljamo za zdravljenje infekcij, kot imunosupresorje in kot protirakaste učinkovine (Demain in Sanchez, 2009). Uporabljamo jih v veterini, kot fungicide, insekticide in herbicide pa tudi v poljedelstvu (Barbosa in Levy, 2000; Cantarell in sod., 2012). Največji problem uporabe sekundarnih metabolitov, je razvoj odpornosti pri tarčnih organizmih (Davies in Davies, 2010). Za premostitev te ovire so potrebne vedno nove učinkovine, proti katerim odpornost še ni bila razvita (Demain in Sanchez, 2009).

Pri odkrivanju biološko aktivnih učinkovin smo v preteklosti uporabljali dva različna pristopa. Najprej smo nove učinkovine iskali s presejalnimi testi bakterij, izoliranih iz narave in tako odkrili skoraj vse danes znane skupine sekundarnih metabolitov. Sčasoma je ta pristop postal neučinkovit in nadomestila ga je uporaba kemije s pomočjo katere smo modificirali že znane in sintetizirali nekaj popolnoma novih učinkovin (Walsh in Wencewicz, 2014). Kljub vsemu pa kemijska sinteza ne more ponuditi toliko novih spojin, da bi z njimi sledili hitrosti razvoja odpornosti in zato so potrebni novi pristopi (Fischbach in Walsh, 2009). Eden od novih pristopov je iskanje sekundarnih metabolitov v naravi, ki jih iz več razlogov v preteklosti nismo odkrili. Glavna vira še neodkritih biološko aktivnih učinkovin sta tako imenovani tihi operoni in nekultivabilni mikroorganizmi (Lewis, 2013). V preteklosti smo presejalne teste opravljali samo z bakterijami, ki smo jih znali gojiti, po nekaterih ocenah pa je to zgolj 1% vseh bakterij v naravi. Ostalih 99% bakterij torej še nismo podvrgli presejalnim testom in zato so možnosti, da pri njih najdemo nove sekundarne metabolite, zelo velike (Clardy in sod., 2006). Poleg tega je sekvenciranje genoma že znanih bakterij razkrilo, da te vsaj na genetskem nivoju razpolagajo z velikim številom sekundarnih metabolitov, ki jih še nikoli nismo odkrili. Razlog za to je neizražanje velikega števila genov sekundarnega metabolizma – tihih operonov (Bentley in sod., 2002; Lewis, 2013). Za izražanje tihih operonov je bilo uporabljenih že veliko metod, raziskovalci pa so tudi že testirali mnogo tako dobljenih molekul (Chiang in sod., 2011). Med vsemi bakterijami imajo aktinomicete daleč največje število različnih sekundarnih metabolitov in po nekaterih ocenah so bili do sedaj odkriti zgolj 3% vseh sekundarnih metabolitov iz aktinomicet (Baltz, 2005). Sekvenciranja genomov teh bakterij so pokazala, da ti vsebujejo veliko genskih skupin za sintezo poliketidov in neribosomalnih peptidov (Bentley in sod., 2002; Omura in sod., 2001), zato se je pri iskanju novih biološko aktivnih učinkovin iz obeh omenjenih virov najbolje omejiti na ti dve skupini.

Poleg poskusov gojenja nekultivabilnih bakterij in aktivacije tihih operonov pod stresnimi pogoji je eden od načinov odkrivanja novih sekundarnih metabolitov tudi sekvenciranje genoma ali metagenoma ter odkrivanje genskih skupin za njihovo sintezo z bioinformatičnimi orodji (Lewis, 2013). Tako odkrite genske skupine lahko nato kloniramo v primerne gostiteljske celice in jih tam izrazimo (Seow in sod., 1997; Komatsu in sod., 2010; Gomez-Escribano in Bibb, 2011). Da bi lahko na ta način učinkovito odkrivali nove genske skupine, moramo seveda čim bolje poznati njihove lastnosti (Ziemert in sod., 2016). V diplomski nalogi bom v ta namen najprej naredil skrben pregled biološko aktivnih učinkovin, pri čemer se bom omejil zgolj na genske skupine za biosintezo poliketidov tipa 2. Obravnaval bom njihovo kemijsko strukturo, biološke aktivnosti in biosintezo. V drugem delu pa bom predstavil genske skupine za njihovo biosintezo, strategije za njihovo odkrivanje in primere nedavno odkritih poliketidov tipa 2.

2 POLIKETIDI

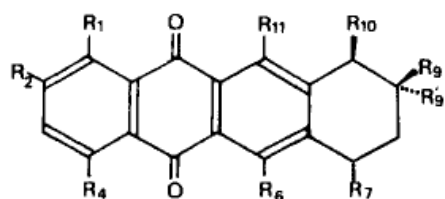
Poliketidi predstavljajo eno izmed najbolj raznolikih skupin bioloških molekul. V to skupino na primer sodijo tako molekule, kot so relativno enostavni aromatski metaboliti, kot tudi kompleksni makrociklični laktoni (Thomas, 2001). Sintetizirajo jih bakterije, glive, rastline (Hertweck, 2009) in tudi nekatere živali (Butcher in sod., 2017). Poliketidi se sintetizirajo s pomočjo skupine encimov oziroma encimskih sistemov, ki jih imenujemo poliketid sintaze (PKS). Glede na mehanizem sinteze poliketidov, poliketid sintaze delimo na več tipov. Poliketid sintaze tipa 1 najdemo pri bakterijah in glivah, poliketid sintaze tipa 2 samo pri bakterijah, poliketid sintaze tipa 3 pa pri nekaterih bakterijah in glivah, predvsem pa pri rastlinah (Hertweck, 2009).

2.1 POLIKETIDI, SINTETIZIRANI S POLIKETID SINTAZAMI TIP A 2

Poliketid sintaze (PKS) tipa 2 sintetizirajo večino policikličnih aromatskih biološko aktivnih učinkovin, ki jih uporabljamo kot protirakaste, protibakterijske, protiglivne, protivirusne in protiparazitske učinkovine (Das in Khosla, 2009). PKS tipa 2 najdemo večinoma pri aktinomycetah (Hertweck, 2009), znani pa so tudi primeri iz po Gramu negativnih bakterij (Brachmann in sod., 2007). Te učinkovine (pogosto imenovane tudi aromatski poliketidi zaradi posedovanja aromatskih obročev) lahko glede na kemijsko strukturo razdelimo v več skupin, in sicer med antracikline, angucikline, aureolske kisline, tetracikline, tetracenomicine, benzo(a)naftacene in benzoizokromanokinone (Hertweck in sod., 2007).

2.1.1 Antraciklini

Osnovo antraciklinov predstavlja aglikonski del, ki je v tem primeru sestavljen iz štirih obročev. Na aglikonski del se preko C-atomov vežejo različni substituenti (Slika 1). Sladkorne komponente se po navadi pripenjajo na C7 in C10, na ostale C-atome pa se večinoma pripenjajo hidroksilne, metoksilne, metilne in etilne skupine (Fujiwara in sod., 1985).

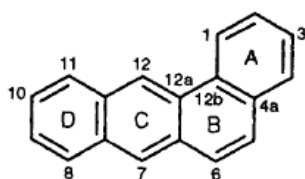


Slika 1: Aglikonski del antraciklinov (Fujiwara in sod., 1985).

Antraciklini se uporabljajo kot protirakaste učinkovine. Najbolj znani antibiotiki iz te skupine so doksorubicin, daunorubicin, epirubicin in idarubicin. Prva dva sta bila v šestdesetih izolirana iz *Streptomyces peucetius*, druga dva pa sta bila odkrita kasneje in sta nadomestila predhodnika, ki sta se izkazala za dokaj toksična. Mehanizem njihovega delovanja je zelo raznolik. Sprožajo namreč apoptozo celic, tvorijo proste radikale in vežejo se na DNK (Minotti in sod., 2004).

2.1.2 Anguciklini

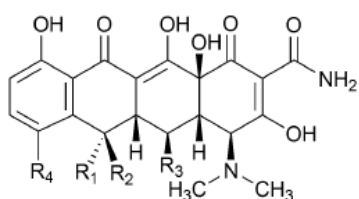
Tako kot antraciklini, imajo tudi anguciklini aglikonski del iz štirih obročev, vendar so ti pri slednjih drugače razporejeni, in sicer tako, da A obroč tvori kot s preostalimi tremi (Slika 2). Na C-atome se tako kot pri antraciklinih vežejo različni substituenti, ki so najpogosteje sladkorji, oziroma verige sladkorjev, hidroksilne skupine, metilni radikali, metoksi radikali in drugi. Tudi pri tej skupini je mehanizem delovanja precej raznolik. Večinoma sprožajo apoptozo in inhibirajo encime. Sintetizirajo jih aktinomycete (Rohr in Thiericke, 1992). Med najpomembnejšimi antibiotiki iz te skupine so landomicini, ki imajo protirakasto delovanje (Ostash in sod., 2009).



Slika 2: Anguciklinski aglikon (Rohr in Thiericke, 1992).

2.1.3 Tetraciklini

Tetraciklini so sestavljeni iz linearnega aglikonskega dela iz štirih obročev na katerega se pripenjajo različni radikali. Za aktivnost teh molekul je ključna prisotnost dimetilamino skupine. Na ostalih C-atomih se pogosto nahajajo druge skupine, kot so metilna in hidroksilna. Tetraciklini se vežejo na 30S podenoto ribosoma in tako onemogočajo sintezo proteinov. Delujejo na po Gramu pozitivne in negativne bakterije (Griffin in sod., 2010). Kot prva tetraciklina sta bila v poznih štiridesetih odkrita klorotetraciklin, ki ga proizvaja *S. aureofaciens*, in oksitetraciklin, ki ga proizvaja *S. rimosus*. Kasneje so bili odkriti še drugi, ki jih sintetizirajo bakterije iz rodu *Streptomyces* ali pa so proizvedeni s polysintezo (Chopra in Roberts, 2001).

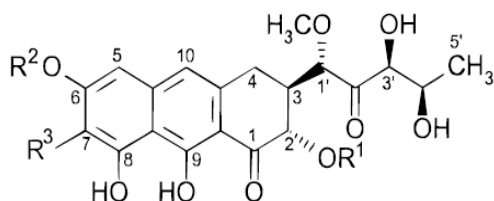


Slika 3: Kemijska struktura tetraciklinov (Hertweck in sod., 2007).

2.1.4 Aureolske kisline

Sekundarni metaboliti iz te skupine imajo aglikonski del iz treh obročev na katerega se pripenjata dve verigi sladkorjev različnih dolžin (R1 in R2 na sliki 4) ter metilna skupina (R3), na C3-atom pa je vezana dihidroksi-metoksi-okso-pentilna alifatska veriga (Slika 4). V to skupino poliketidov sodijo mitramicin, ki je bil prvi odkrit antibiotik iz te skupine, kromomicin, olivomicin in nekateri drugi. Uporabljajo se kot protirakaste učinkovine, čeprav imajo tudi protimikrobno delovanje. Delujejo tako, da se vežejo na DNK in s tem

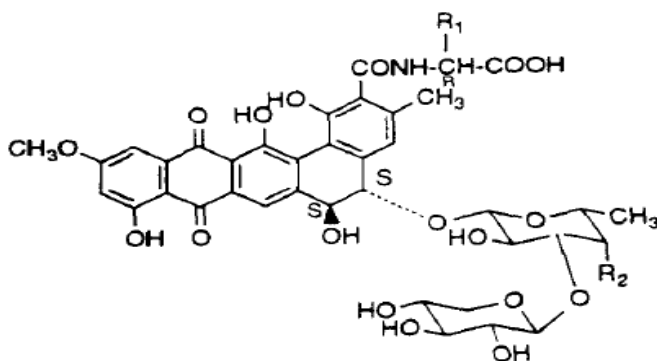
onemogočijo transkripcijo. Večino sekundarnih metabolitov iz te skupine sintetizirajo bakterije iz rodu *Streptomyces* (Lombó in sod., 2006).



Slika 4: Kemijska struktura sekundarnih metabolitov iz skupine aureolskih kislin (Rohr in sod., 1999).

2.1.5 Benzo(a)naftaceni

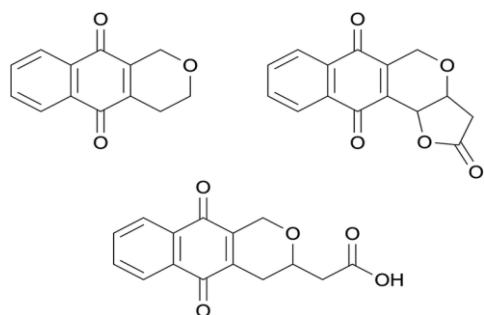
Benzo(a)naftaceni so po strukturi zelo podobni anguciklinom, zato jih lahko smatramo kot njihovo podvrsto. V to družino poliketidov spadajo, benastatini, jadomicini in drugi, najpomembnejši pa so pradimicini (Hertweck in sod., 2007) Pradimicinska molekula je sestavljena iz aglikona, ki je dihidroksibenzo (alfa) naftacenekion, na katerega je vezana D-aminokislina in veriga, sestavljena iz dveh heksoz. Pradimicini se med seboj razlikujejo po substitutih na aminokislini in heksozi (Slika 5). Sintetizirajo jih bakterije iz rodu *Actinomadura*. Pradimicini delujejo protiglivo. Vežejo se na manozne ostanke v celični steni, tvorijo kompleks in tako porušijo integriteto membrane (Walsh in Giri, 1997). Ugotovljena pa je bila tudi protivirusna aktivnost. Pradimicini namreč lahko interagirajo z glikoproteini na virusni ovojnici in preprečijo njegov vstop v celico (Balzarini in sod., 2007).



Slika 5: Kemijska struktura pradimicinov (Walsh in Giri, 1997).

2.1.6 Benzoizokromokinoni

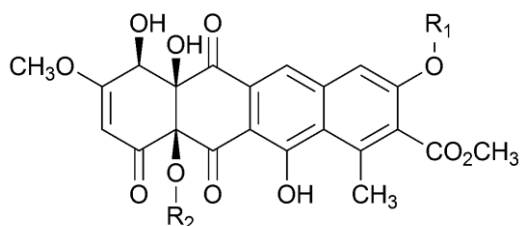
Kemijska struktura benzoizokromokinonov je dokaj raznolika. Osnovno strukturo predstavlja benzopiran-5,10-dion (Slika 6, zgoraj levo), dodatno pa je na osnovno strukturo lahko vezan tudi odprt ali zaprt γ -lakton (slika 6 zgoraj desno in spodaj). Molekule iz te družine imajo na osnovnem skeletu različne skupine, ki so vezane na aromatski ali na piranski obroč. Delujejo protiglivo, protibakterijsko in protirakasto. V to skupino sodijo na primer aktinorhodin, frenolocin in grizeuzin. Proizvajajo jih bakterije iz rodu *Streptomyces* (Naysmith in sod., 2017).



Slika 6: Kemijska struktura benzoizokromanokinonov (Naysmith in sod., 2017).

2.1.7 Tetracenomicini

Tetracenomicini tvorijo podvrsto tetracikličnih antibiotikov. Po kemijski strukturi so zelo podobni tetraciklinom in antraciklinom, tako da jih veliko avtorjev prišteva med slednje, vendar za razliko od tetraciklinov nimajo dimetilamino skupine in amidne skupine, od antraciklinov pa se razlikujejo po mestu pripenjanja sladkorne komponente (R2 na sliki 8) in drugih radikalov. Poleg tetracenomicinov, ki jih sintetizira *S. glaucescens*, v to skupino sodijo tudi eloramycin, ki jih sintetizira *S. olivaceus*. Obe skupini antibiotikov imata protimikrobno delovanje (Hertweck in sod., 2007).



Slika 7: Kemijska struktura tetracenomicinov (Hertweck in sod., 2007).

2.1.8 Ostali poliketidi tipa 2

Poleg vseh že omenjenih poliketidov obstajajo tudi aromatski poliketidi, ki jih ne moremo uvrstiti v nobeno izmed zgoraj opisanih skupin. Takšni so na primer kartreuzin ter elzamicin, ki imata pentaciklični aglikon, imenovan kartinin, rezistomicin, ki ima prav tako pet obročev, vendar v drugačni formaciji, β -rubromicin, grizeorhodin ter frederikamicin A, ki imajo na začetnih stopnjah podobno sintezo kot pradimicini, nato pa so podvrženi številnim modifikacijam, in enterocin, ki je najbolj modificiran od vseh. Vse našteje poliketide proizvajajo bakterije iz rodu *Streptomyces*, delujejo pa protirakasto, protiglivno in protibakterijsko (Hertweck in sod., 2007).

Preglednica 1: Nekateri pomembnejši poliketidi tipa 2, njihov mikrobn vir in biološka aktivnost. Polsintezni derivati niso vključeni v preglednico.

Družina	Učinkovina	Produksijski organizem	Aktivnost	Vir
antraciklini	aklacinomicin	<i>S. galilaeus</i>	protirakasta	(Hori in sod., 1977)
	daunorubicin	<i>S. peucetius</i>	protirakasta	(Grimm in sod., 1994)
	doksorubicin	<i>S. peucetius</i>	protirakasta	(Grimm in sod., 1994)
	stefimicin	<i>S. steffisburgensis</i>	protirakasta	(Gullón in sod., 2006)
anguciklini	urdamicin	<i>S. fradiae</i>	protibakterijska (Gram+), protirakasta	(Drautz in sod., 1986)
	oviedomicin	<i>S. antibioticus</i>	protirakasta	(Lombó in sod., 2004)
	ravidomicin	<i>S. ravidus</i>	protirakasta	(Kharel in sod., 2010)
	krizomicin	<i>S. albaduncus</i>	protirakasta	(Kharel in sod., 2010)
	landomicin	<i>S. cyanogenus</i>	protirakasta	(Westrich in sod., 1999)
tetraciklini	klorotetraciklin	<i>S. aureofaciens</i>	protibakterijska (Gram+ in Gram-)	(Duggar, 1947, cit. po Griffin in sod., 2010)
	oksitetraciklin	<i>S. rimosus</i>	protibakterijska (Gram+ in Gram-)	(Kim in sod., 1994)
	daktilociklin	<i>Dactylosporangium</i> sp.	protibakterijska (Gram+)	(Tymiak in sod., 1993)
	SF2575	<i>Streptomyces</i> sp. SF2575	protirakasta	(Pickens in sod., 2009)
aureolske kisline	mitramicin	<i>S. argillaceus</i>	protirakasta, protibakterijska (Gram+)	(Lombó in sod., 1996)
	kromomicin	<i>S. griseus</i>	protirakasta	(Menéndez in sod., 2004)
	olivomicin	<i>S. olivoreticuli</i>	protirakasta	(Brazhnikova in sod., 1962, cit. po Gause 1967)
benzo(a)naft aceni	jadomicin	<i>S. venezuelae</i>	protibakterijska (Gram+ in Gram-)	(Ayer in sod., 1991; Jakeman in sod., 2009)
	pradimicin	<i>Actinomodura hibisca</i> in <i>A. spinosa</i>	protiglivna, protivirusna	(Oki in sod., 1988; Balzarini in sod., 2007)
	pluramicin	<i>S. pluricolineus</i>	protibakterijska (Gram+ in Gram-)	(Hansen in Hurley, 1996)
	arenimicin	<i>Salinospora arenicola</i>	protibakterijska (Gram+), citotoksična	(Aslokar in sod., 2010)
	benastatin	<i>Streptomyces</i> sp. MI384-DF12	protibakterijska (Gram+), citotoksična	(Aoyagi in sod., 1992)

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 1

Družina	Učinkovina	Produksijski organizem	Aktivnost	Vir
benzoizok romanokini	aktinorhodin	<i>S. coelicolor</i>	protibakterijska (Gram+)	(Mak in Nodwell, 2017)
	frenolicin	<i>S. roseofulvus</i>	protibakterijska (Gram+), protiglivna	(Bibbin sod., 1994)
	medermicin	<i>Streptomyces</i> sp. AM-7161	protirakasta	(Ichinose in sod., 2003)
	granaticin	<i>S. violaceoruber</i>	protibakterijska (Gram+)	(Ichinose in sod., 1998)
	grizeuzin	<i>S. griseus</i>	protiglivna, protirakasta, protibakterijska (Gram+)	(Yu in sod., 1994)
tetracenomycin	tetracenomycin	<i>S. glaucescens</i>	protirakasta, protibakterijska (Gram+)	(Motamedi in Hutchinson, 1987)
	eloramycin	<i>S. olivaceus</i>	protirakasta, protibakterijska (Gram+)	(Drautz in sod., 1985)
ostali	poliketomicin	<i>S. diastatochromogenes</i>	protibakterijska (Gram+), protirakasta	(Daum in sod., 2009)
	R1128	<i>Streptomyces</i> sp. R1128	protirakasta	(Marti in sod., 2000)
	frederikamicin	<i>S. griseus</i>	protirakasta	(Wendt-Pienkowski in sod., 2005)
	enterocin	<i>S. maritimus</i>	protibakterijska (Gram+ in Gram-)	(Piel in sod., 2000)
	rubromycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Protibakterijska (Gram+ in Gram-), protirakasta	(Puder in sod., 2000)

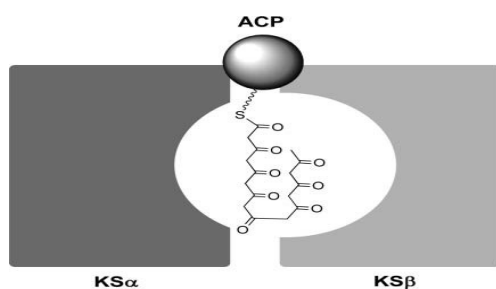
3 BIOSINTEZA POLIKETIDOV TIP 2

Biosinteza poliketidov je zelo podobna biosintezi maščobnih kislin, poleg tega pa je tudi homologija med proteini, vpletenimi v biosintezo obeh skupin molekul, visoka. Na podlagi teh dveh dejstev lahko sklepamo, da so se geni za biosintezo poliketidov razvili iz genov za biosintezo maščobnih kislin (Hapwood in Sherman, 1990). Tako kot pri biosintezi maščobnih kislin, tudi pri biosintezi poliketidov sodeluje več encimov. Pri biosintezi osnovne verige poliketidov tipa 2 sodelujejo najmanj trije encimi: ketosintaza alfa (KS_{α}), ketosintaza beta (KS_{β}) in »acyl carrier protein« (ACP). Ti trije encimi tvorijo tako imenovan minimalni PKS in omogočijo proces nastajanja poliketidne verige (Staunton in Weissman, 2001). Ko govorimo o poliketidih tipa 2, osnovna veriga v vseh primerih nastane s pomočjo minimalnega PKS. K veliki raznolikosti molekul iz te družine pa pripomorejo encimi, ki delujejo v kasnejših fazah in to verigo ciklizirajo ter modificirajo. Encimi, ki delujejo v kasnejših fazah, se namreč med seboj razlikujejo po načinu delovanja, delovanje različnih

encimov na isto oziroma podobno verigo pa rezultira v zelo raznolikih produktih. Ti encimi so ketoreduktaze, ciklaze, aromataze, oksigenaze, metiltransferaze, glikoziltransferaze in drugi (Hertweck in sod., 2007; Zhan, 2009).

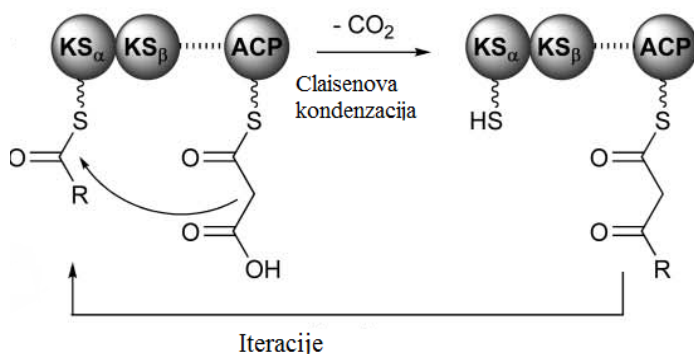
3.1 MINIMALNI PKS

Encimi minimalnega PKS tipa 2 tvorijo multiencimski kompleks. Tvorijo ga trije encimi - KS_{α} in KS_{β} , ki tvorita heterodimer, ter ACP. KS_{α} katalizira nastanek C-C vezi med verigo in podaljševalno enoto, medtem ko je vloga KS_{β} manj jasna (Hertweck in sod., 2007). KS_{β} je nedvomno ključni faktor, ki določa dolžino poliketidne verige, zato nekateri avtorji ta encim imenujejo tudi CLF («chain length factor») (Staunton in Weissman, 2001). Čeprav ta protein res najbolj vpliva na dolžino verige, ta vpliv ni izključen, saj deloma na dolžino verige vpliva tudi KS_{α} . Dolžina verige je torej odvisna od heterodimera, ki ga sestavljata ta dva encima, poleg tega pa imata določen vpliv tudi na način ciklizacije nastale verige (Staunton in Weissman, 2001; Hertweck in sod., 2007). KS_{β} naj bi vsaj v nekaterih primerih tudi katalizirala dekarboksilacijo malonil-CoA in tako zagotovila začetno enoto za gradnjo verige (Bisang in sod., 1999).



Slika 8: Sestava minimalnega PKS tipa 2 (Hertweck in sod., 2007).

ACP služi kot element, ki nosi nastajajočo poliketidno verigo in sprejema osnovne gradnike, ki so večinoma tioestri malonata in koencima A. Cikel podaljševanja verige poteka tako, da ACP veže malonil-CoA, čemur sledi tvorba C-C vezi s Claisenovo kondenzacijo med malonil-ACP in delom že nastale verige, ki je vezan na KS_{α} . Pri reakciji se sprosti molekula CO_2 , podaljšana veriga pa je po reakciji vezana na ACP. V zadnjem koraku ACP odda nastajajočo verigo KS_{α} in tako je spet sposoben vezati malonil-CoA ter ponoviti cikel (Staunton in Weissman, 2001; Hertweck in sod., 2007).



Slika 9: Sinteza poliketidne verige s PKS tipa 2 (Hertweck in sod., 2007).

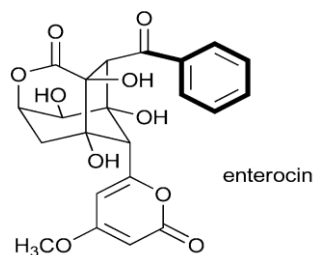
3.2 INICIACIJA TVORBE POLIKETIDNE VERIGE

Iniciacija tvorbe verige oziroma »priming« lahko poteka na tri načine. Najpogostejši je »priming« z acetatom, ki je produkt dekarboksilacije malonata. Druga dva načina omogočata iniciacijo sinteze verige z vgradnjo drugih začetnih enot, kot so na primer propionat, butirat in benzoat. Drugačne začetne enote se lahko vgradijo s pomočjo posebnega modula, sestavljenega iz KSIII in ACP, ali pa z direktnim nalaganjem s koencimom A aktivirane gradbene enote na KS_{α} , pri čemer je udeležena aciltransferaza (Hertweck in sod., 2007).

Po eni od hipotez »priming« z acetatom poteka tako, da se malonil-CoA veže na ACP, nato pa KS_{β} (oziroma CLF) katalizira dekarboksilacijo malonata. Tako nastali acetat se nato prenese na KS_{α} (Bissang in sod., 1999). Ta način iniciacije sinteze poliketidne verige se uporablja na primer pri sintezi aktinorhodina in tetracenomicina (Bao in sod., 1998; Hitchman in sod., 1998).

Pri vgradnji neobičajnih začetnih enot poliketidne verige velikokrat sodeluje tako imenovani iniciacijski modul, ki ga za razliko od običajnega sestavljata samo KSIII in ACP. Ta modul ima večjo afiniteto do alternativnih začetnih enot, ki se med različnimi poliketidi tudi razlikujejo. Začetna enota se naloži na KSIII in se s Claisenovo kondenzacijo z acetatom poveže v diketid, ki se nato prenese na običajni modul (Das in Khosla, 2009). Pri biosintezi R1128 se na primer s pomočjo iniciacijskega modula kot začetna enota preferenčno vgrajuje propionil-CoA, vgrajujejo pa se lahko tudi izobutiril-CoA in nekatere druge (Meadows in Khosla, 2001).

Alternativne začetne enote se lahko ob delovanju acil-CoA ligaz in aciltransferaz nalagajo tudi neposredno na običajni modul (minimalni PKS). Acil-CoA ligaze najprej z dodajanjem CoA aktivirajo začetno enoto, aciltransferaze pa aktivirane enote naložijo na KS_{α} (Hertweck in sod., 2007). Pri biosintezi auracina se na primer na zgoraj opisan način kot začetna enota vgrajuje antranilat (Jackson in sod., 2015), pri biosintezi enterocina pa benzoat (Izumikawa in sod., 2006).



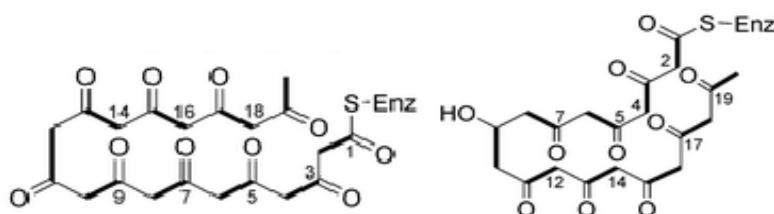
Slika 10: Kemijska struktura enterocina z označeno začetno enoto (Hertweck in sod., 2007).

3.3 REDUKCIJA IN CIKLIZACIJA

Ko je poliketidna veriga sintetizirana nanjo najprej delujejo ketoreduktaze, ki reducirajo keto skupine do hidroksilnih skupin. V nekaterih primerih ketoreduktaze delujejo že med nastajanjem verige, v nekaterih pa šele po ciklizaciji. V veliko primerih predhodna redukcija sploh omogoči ciklizacijo (Hertweck in sod., 2007). Pri poliketidih iz družin tetraciklinov, antraciklinov in benzoizokromanokinonov poteče redukcija na devetem C-atomu. C-atom

tako preide v sp^3 hibridizacijsko stanje, kar omogoči tvorbo prvega obroča in posledično vpliva na strukturo končnega produkta (Rawlings, 1999).

Za ciklizacijo oziroma tvorbo aromatskih obročev iz poliketidne verige so odgovorne aromataze in ciklaze (ARO/CYC). Ciklaze delujejo brez kofaktorjev in podobno kot šaperoni zgolj zagotavljajo pravilno konformacijo verige, da pride do pravilne spontane ciklizacije z aldolno kondenzacijo. Aromataze katalizirajo dehidracijo cikličnih alkoholov, s tem pa nastanejo aromatski obroči (Hertweck in sod., 2007). Najprej poteče ciklizacija prvega obroča. Ta ciklizacija je najpomembnejša, saj določa strukturo celotnega aglikona. Pri ciklizaciji prvega obroča se najpogosteje tvori vez C7-C12 ali pa C9-C14. Tovrstne ciklizacije vodijo do nastanka tetraciklinov, antraciklinov, benzoizokromanokinonov, anguciklinov in tetracenomicinov. Nadaljnje ciklizacije pogojujejo obliko molekule, ki je lahko linearna (tetraciklini, tetracenomicini...) ali pa nelinearna (anguciklini, pradimicini...) (Zhou in sod., 2010).



Slika 11: Način ciklizacije poliketidne verige tetracenomicina (levo) in anguciklina (desno) (Zhou in sod., 2010).

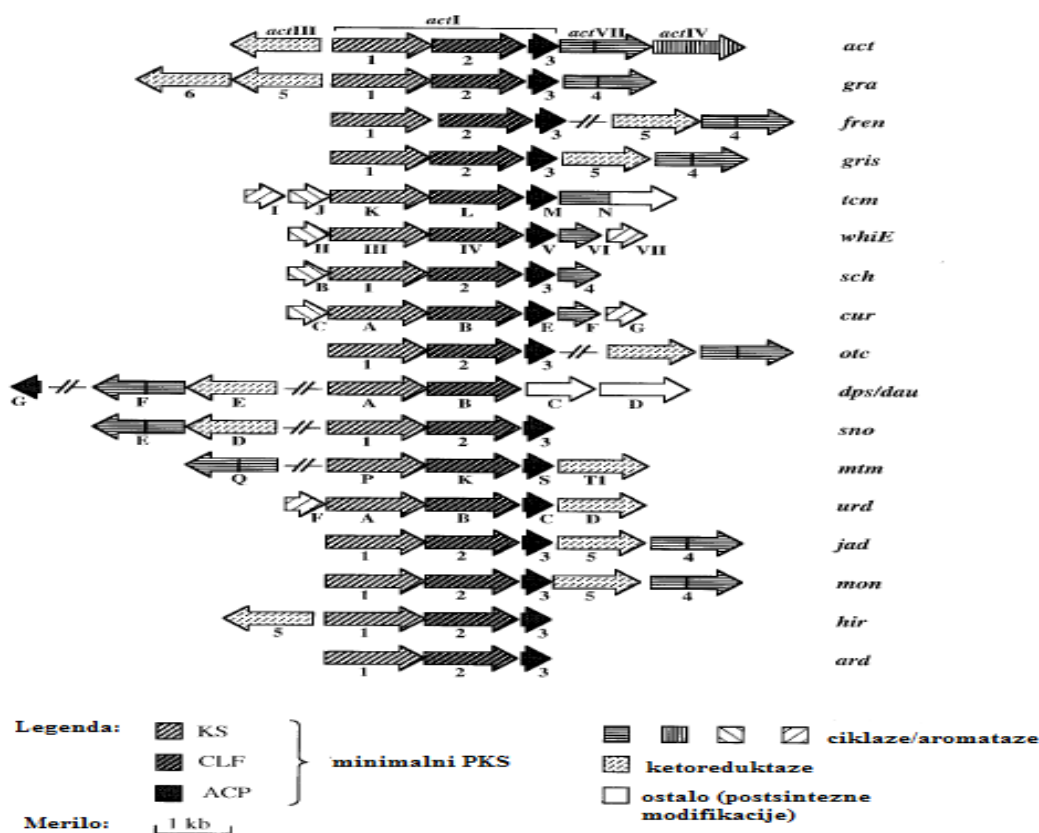
3.4 POZNE STOPNJE BIOSINTEZE – MODIFIKACIJA OSNOVNEGA SKELETA

Ko je osnovni skelet formiran, sledijo še dodatne modifikacije z različnimi encimi, ki na molekulo dodajajo različne skupine ali pa reducirajo oziroma oksidirajo že obstoječe funkcionalne skupine. Pozne stopnje biosinteze pomembno vplivajo na strukturno raznolikost in biološko aktivnost poliketidov (Olano in sod., 2010). Najpogostejše postsintezne modifikacije so oksidacije oziroma redukcije, ki jih katalizirajo različne oksidoreduktaze (oksidaze, oksigenaze, peroksidaze, reduktaze, dehidrogenaze). Ti encimi na poliketidne molekule dodajajo funkcionalne skupine, ki vsebujejo kisik (hidroksilne, keto, aldehydne in epoksi skupine), ali pa oksidirajo oziroma reducirajo že obstoječe funkcionalne skupine s kisikom. Tovrstne modifikacije imajo velik vpliv na topnost in biološko aktivnost, hkrati pa omogočajo pripenjanje drugih radikalov na molekulo (Rix in sod., 2002).

Naslednjo veliko skupino postsinteznih encimov predstavljajo transferaze. Transferaze na poliketidni aglikon dodajajo različne kemijske skupine. Najpomembnejše so glikoziltransferaze, ki na aglikon dodajajo sladkorne komponente, ki so lahko mono-, di- ali oligosaharidi. Sladkorne komponente so velikokrat udeležene v interakciji med molekulo in tarčo (Olano in sod., 2010). Metiltransferaze dodajajo metilno skupino. Metilna skupina se lahko doda na N-, O- ali C-atom, ki je bodisi del aglikona, bodisi del sladkorne komponente (Rix in sod., 2002; Hertweck in sod., 2007). Včasih pa v postsinteznih reakcijah sodelujejo tudi aciltransferaze, ki na molekulo dodajajo krajše ali daljše acilne skupine, preniltransferaze, ki dodajajo alilne radikale in aminotransferaze, ki dodajajo amino skupine (Olano in sod., 2010).

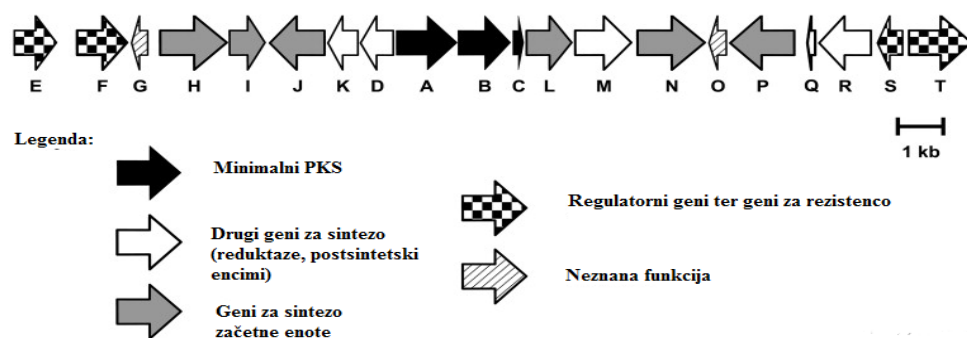
4 ORGANIZACIJA POLIKETID SINTAZ NA GENSKEM NIVOJU

Do danes najbolj proučen aromatski poliketid je verjetno aktinorhodin, ki ga sintetizira *Streptomyces coelicolor* A3(2). Odkrivanje organizacije genskih skupin za sintezo aromatskih poliketidov se je začelo prav na primeru tega benzoizokromanokinona. Leta 1986 sta namreč Malpartida in Hopwood dokazala, da se vsi geni za biosintezo tega poliketida nahajajo v isti genski skupini, ki je dolga okoli 26 kb. Ugotovila sta tudi, da se poleg genov za biosintezo v isti genski skupini nahajajo tudi regulatorni geni in verjetno tudi geni za rezistenco na ta antibiotik (Malpartida in Hopwood, 1986). Študije, opravljene na primerih drugih aromatskih poliketidov, so pokazale, da je organizacija genskih skupin pri vseh zelo podobna, kot je to ugotavljal Hopwood v preglednem članku (Slika 12) (Hopwood, 1997).



Slika 12: Genske skupine za sintezo aktinorhodina, granaticina, frenolicina, grizeuzina, tetracenomicina, 3 pigmentov, oksitetraciklina, daunorubicina, nogalamicina, mitramicina, urdamicina, jadamocina in 3 do tedaj neznanih poliketidov. Prikazani so samo geni, vpleteni v sintezo aglikona. (Hopwood, 1997).

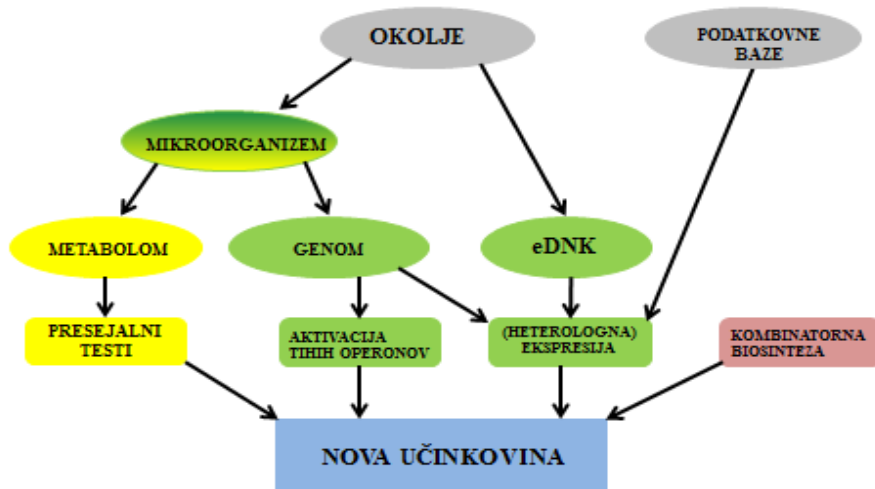
Glavna značilnost genov za sintezo aromatskih poliketidov je torej, da so na kromosomu locirani skupaj in tvorijo gensko skupino, katere velikost se giblje med 25 in 40 kb. Kot je razvidno iz slik (Slika12 in Slika13), se geni, ki kodirajo encime minimalnega PKS znotraj genske skupine, vedno nahajajo skupaj in so locirani blizu sredine genske skupine. Lokacija oziroma razporeditev ostalih genov se med posameznimi primeri razlikuje. Genske skupine za sintezo aromatskih poliketidov torej vsebujejo gene vseh encimov, potrebnih za sintezo (glej poglavje 3), kot tudi regulatorne gene ter gene za rezistenco na sintetiziran antibiotik. V primerih, ko so za sintezo neobičajne začetne gradbene enote potrebni dodatni encimi, se tudi njihovi geni nahajajo v genski skupini (Slika 13).



Slika 13: Organizacija genske skupine za sintezo enterocina (Piel in sod., 2000).

5 STRATEGIJE ODKRIVANJA NOVIH AROMATSKIH POLIKETIDOV

Strategije odkrivanja novih biološko aktivnih učinkovin se med različnimi vrstami učinkovin skorajda ne razlikujejo, zato bi lahko to poglavje posplošili na vse vrste biološko aktivnih učinkovin, vendar se bomo tu omejili zgolj na aromatske poliketide. Obstaja več načinov oziroma strategij, s katerimi odkrivamo oziroma pridemo do novih biološko aktivnih učinkovin. V grobem jih lahko razdelimo v tri skupine.



Slika 14: Shematski prikaz strategij za odkrivanje novih biološko aktivnih učinkovin.

Najstarejši in najenostavnejši način je uporaba presejalnih testov, ki so usmerjeni v iskanje sekundarnih metabolitov, ki učinkujejo na izbrano tarčo. Ta pristop se danes umika novejšim, saj se je izkazalo, da smo njegov potencial skoraj že izčrpali in je za odkritje nove učinkovine danes treba v presejalne teste vključiti veliko več mikroorganizmov kot na začetku uporabe te metode (Lewis, 2013). Kljub navedenim težavam pa je ta pristop še vedno uporaben, saj današnja tehnologija omogoča izvajanje visokozmogljivih presejalnih testov, s katerimi na letni ravni lahko pregledamo na milijone mikroorganizmov. Poleg tega se je izkazalo, da je potencial neraziskanih okolij kot je na primer (globoko)morski sediment še dokaj neizkoriščen (Baltz, 2007). S to metodo je bil v zadnjem obdobju na primer odkrit nov

aromatski poliketid arenimicin, ki ga proizvaja morska bakterija *Salinispora arenicola* (Asolkar in sod., 2010).

Druga skupina metod za odkrivanje novih učinkovin izkorišča dosežke pri sekvenciranju. Osnovna ideja te skupine pristopov je sekvenciranje celotnih genomov mikroorganizmov in metagenomov oziroma eDNK (»okoljske« DNK, ang.: environmental DNA), čemur sledi »genomsko rudarjenje« (iskanje genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov) (Rutledge in Challis, 2015; Katz in sod., 2016). Enak pristop lahko uporabimo tudi na sekvencah iz podatkovnih baz (Yadav in sod., 2009). Ko je genska skupina za biosintezo odkrita, sledijo metode za aktivacijo te genske skupine. Identificirana genska skupina je lahko v laboratorijskih pogojih neizražena (»tih/kriptični operon«) in jo je potrebno aktivirati tako, da spremenimo pogoje kulture ali pa da jo v celoti prenesemo in izrazimo v gostiteljskem organizmu (Rutledge in Challis, 2015). Prenos v gostiteljski organizem je prav tako potreben v primeru, ko imamo opravka z eDNK (Katz in sod., 2016).

V tretjo skupino metod za generiranje novih učinkovin sodi kombinatorna biosinteza. S to metodo pridobimo nove učinkovine tako, da encime, ki so odgovorni za sintezo različnih učinkovin kombiniramo med seboj, kar rezultira v drugačnih neobičajnih molekulah (Wong in Khosla, 2012).

5.1 AKTIVACIJA TIH GENSKIH SKUPIN

Sekvenciranja celotnih genomov aktinomicet in nitastih gliv so razkrila, da ti kodirajo veliko več sekundarnih metabolitov, kot jih organizmi dejansko proizvajajo. Genom bakterije *Streptomyces coelicolor* A3(2), ki je bil objavljen leta 2002, vsebuje genske skupine za biosintezo dvajsetih sekundarnih metabolitov, medtem ko bakterija dejansko proizvaja zgolj tri (Bentley in sod., 2003). Do aktivacije neizraženih operonov ne pride zato, ker so ti pod strogo regulacijo in laboratorijski pogoji očitno ne morejo zagotoviti potrebnih stimulusov, ki niso zgolj pomanjkanje hranil, ampak tudi prisotnost oziroma odsotnost določenih signalnih molekul (van Wezel in McDowall, 2011).

Obstaja veliko načinov za aktivacijo tih operonov, in sicer spreminjanje ravnih pogojev, spreminjanje transkripcijskih in translacijskih mehanizmov (RNA polimeraza in ribosomi), manipulacija globalnih in specifičnih regulatorjev, mutageneza (in selekcija mutant s pomočjo reporterja) in zamenjava promotorja (Rutledge in Challis, 2015). Z aktivacijo tih operonov je bilo odkritih tudi nekaj aromatskih poliketidov. Metsä-Ketelä in sodelavci so s homologno rekombinacijo inaktivirali represorski gen ter tako omogočili aktivacijo genske skupine za sintezo anguciklina, ki so jo odkrili s hibridizacijo gena za KS_{α} , čemur je sledilo sekvenciranje genske skupine in anotacija (Metsä-Ketelä in sod., 2004). Zhang in sodelavci so z namenom aktivacije identificirane neizražene genske skupine za biosintezo aromatskega poliketida uporabili metodo CRISPR/Cas9, s pomočjo katere so pred gensko skupino vstavili nov promotor. Tako spremenjena bakterija *Streptomyces viridochromogenes*, je proizvajala nov benzo(a)naftacenski poliketid. To je prvi primer uporabe metode CRISPR/Cas9 za aktivacijo tihega operona (Zhang in sod., 2017).

5.2 ANALIZA METAGENOMOV

Analiza metagenomov oziroma DNK, izolirane iz okolja (eDNK), ima pri odkrivanju novih učinkovin dve ključni prednosti. Za razliko od ostalih strategij s to metodo namreč detektiramo genske skupine za biosintezo biološko aktivnih učinkovin iz nekultivabilnih bakterij, ki naj bi predstavljale kar 99% vseh bakterij (Clardy in sod., 2006), in tudi genske skupine kultivabilnih bakterij, ki pa se pri laboratorijskih pogojih ne izražajo. Pri tem pristopu najprej iz vzorca iz okolja izoliramo vso prisotno DNK, ki jo nato analiziramo z namenom, da odkrijemo genske skupine za biosintezo novih učinkovin. Analize lahko potekajo na več načinov. Izolirano DNK lahko ligiramo v vektor s katerim transformiramo gostiteljske celice in tako pripravimo metagenomsko knjižnico. Sledi detekcija transformant, ki vsebujejo genske skupine za biosintezo sekundarnih metabolitov. Detekcija lahko poteka tako, da spremljamo fenotip transformant ali pa z metodami, ki temeljijo na sekvenciranju. Odrbane klone nato namnožimo in genske skupine v celoti sekvenciramo in anotiramo. eDNK pa lahko tudi neposredno sekvenciramo in nato izvedemo *in silico* analizo (Handelsman in sod., 1998; Katz in sod., 2016).

V primeru, ko za analizo eDNK uporabljamo metode, ki temeljijo na sekvenciranju, moramo najprej namnožiti tiste fragmente, ki potencialno vsebujejo genske skupine za biosintezo biološko aktivnih učinkovin. To največkrat izvedemo s PCR pri čemer uporabimo degenerirane začetne oligonukleotide, ki nalegajo na ohranjene biosintezne domene (v primeru poliketidov tipa 2 so to geni minimalnega PKS). Namnožene fragmente nato sekvenciramo in analiziramo (Katz in sod., 2016). Analizo izvedemo z računalniškimi programi, ki sekvenco gena minimalnega PKS (običajno je to gen za KS_{β}) primerjajo z že znanimi sekvencami in ga umestijo v filogenetsko drevo. Samo za gene, ki imajo dovolj majhno homologijo z že znanimi, se predvideva, da so del še neodkrite genske skupine (Reddy in sod., 2014; Kang, 2017). Za tovrstno analizo sta bila razvita programa NaPDoS (Ziemert in sod., 2012) in eSNaPD (Reddy in sod., 2014). Iz vzorcev eDNK, v katerih so bili odkriti novi geni minimalnega PKS nato pripravimo metagenomsko knjižnico (če tega nismo izvedli že prej z vsemi vzorci), temu pa sledi izbor transformant, ki vsebujejo dele domnevno novoodkrite genske skupine in v zadnji fazi sestavljanje celotne genske skupine v gostitelju za heterologno ekspresijo (Katz in sod., 2016).

Raziskovalci so potencial metagenoma izkoriščali že pred razvojem zmogljivejšega sekvenciranja. V tistih časih so v eDNK iskali samo posamezne gene iz še neodkritih genskih skupin, ki so jih nato uporabili pri kombinatni biosintezi (Seow in sod., 1997). V zadnjih letih je bilo z analizo metagenomov odkritih kar nekaj novih aromatskih poliketidov. Kallifidas in sodelavci so leta 2012 s heterologno ekspresijo genske skupine iz eDNK v *Streptomyces albus* odkrili do takrat neznano protibakterijsko učinkovino tetarimicin A. Na podoben način so bili odkriti tudi fluostatini F, G in H (Feng in sod., 2010), kaliksantomicin A ter arenimicina C in D (Kang in Brady, 2014a) ter ariksantomicini A, B in C (Kang in Brady, 2014b).

5.3 ISKANJE GENSKIH SKUPIN V GENOMIH KULTIVABILNIH BAKTERIJ

Sekvenciranje prvega genoma bakterij iz rodu aktiomiket je razkrilo, da ta vsebuje veliko več genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov, kot jih dejansko proizvaja (Bentley in sod., 2003), enako pa se je izkazalo tudi pri drugih streptomicetah (Ikeda in sod., 2003;

Ohnishi in sod., 2008). Zato je smiselno, da nove biološko aktivne učinkovine iščemo tudi v genomih že znanih bakterij, do katerih lahko dostopamo preko podatkovnih baz, kot je na primer GenBank. Namesto klasičnih presejalnih testov, ki so se izkazali za vse manj učinkovite, pa lahko ta pristop uporabimo tudi pri manj znanih ali pa novoodkritih bakterijah, ki jim moramo v ta namen najprej sekvencirati genom.

Pri tem pristopu je uporaba bioinformatičnih orodij bistvenega pomena, saj moramo pregledati ogromno količino podatkov. Za odkrivanje genskih skupin za sintezo sekundarnih metabolitov je bilo razvitih že veliko programov kot so antiSMASH (Medema in sod., 2011), NP.searcher (Li in sod., 2009), NaPDoS (Ziemert in sod., 2012), eSNaPD (Reddy in sod., 2014) in PKMiner, ki je namenjen identifikaciji poliketidov tipa 2 (Kim in Yi, 2012). Detekcija nove genske skupine je razdeljena v tri korake. Najprej je potrebna identifikacija vseh genskih skupin za sintezo določene družine sekundarnih metabolitov v genomu. To izvedemo tako, da ortolog proteina, ki je del iskane genske skupine, uporabimo kot vprašanje proti genomski sekvenci. Kot ortolog je običajno uporabljen najbolj ohranjen encim znotraj biosintezne poti (pri poliketidih tipa 2 je to običajno ketosintaza) (Boddy, 2014). Programi, ki sem jih navedel zgoraj pa za detekcijo uporabljajo skriti model Markova, ki je zmogljivejša metoda, saj ne sloni izključno na poravnavi dveh sekvenc, temveč na statističnem modelu, generiranem iz vseh znanih sekvenc (Eddy, 2004). Sledi drugi korak, pri katerem identificiramo gene celotne genske skupine. Ker se vsi geni genske skupine nahajajo skupaj, programi običajno v ta namen preiščejo del genoma v okolici že odkritega gena ter tam identificirajo gene, ki kodirajo encime. Zadnji korak je identifikacija genskih skupin, ki kažejo največje razlike v primerjavi z že odkritimi. Pri tem se uporabljata dva glavna pristopa, in sicer lahko uporabimo poravnavo proteinskih sekvenc (poravnava nukleotidnih sekvenc se je izkazala za manj primerno predvsem zaradi različnih vsebnosti GC baznih parov v genomih različnih vrst) ali pa naredimo filogenetsko analizo encimov biosintezne poti, ki nam prav tako da informacijo o podobnosti genske skupine v primerjavi z že znanimi (Boddy, 2014). Za filogenetsko analizo lahko uporabimo platformo Phylogeny.fr (Dereeper in sod., 2008)

Poravnavo proteinskih sekvenc uporablja na primer program antiSMASH. Ta program na podlagi poravnave proteinskih sekvenc določi podobnost med odkrito gensko skupno in genskimi skupinami iz podatkovne baze NCBI. Manjša kot je podobnost, večja je verjetnost da genska skupina kodira do zdaj neznano učinkovino. Program PKMiner pa za detekcijo neodkritih genskih skupin uporablja filogenetsko analizo (Medema in sod., 2011).

Ko odkrijemo gensko skupino in potrdimo, da se glede na sekvenco razlikuje od že znanih, sledi (heterologna) ekspresija, še prej pa lahko opcijsko opravimo predikcijo kemijske strukture sekundarnega metabolita zgolj na podlagi sekvence. Za ta namen se lahko pri genskih skupinah za sintezo poliketidov tipa 2 uporabi program PKMiner. Predikcija kemijske strukture temelji na dejstvu, da je zastopanost različnih podskupin encimov za sintezo poliketidov tipa 2 pri učinkovinah iz različnih družin specifična. Pri biosintezi anguciklina na primer sodeluje ciklaza iz podskupine a, medtem ko pri sintezi anguciklinov sodeluje ciklaza iz podskupine c. Program na podlagi sekvenc encime proučevane biosintezne poti razvrsti v podskupine in na podlagi kombinacije podskupin različnih encimov napove kemijsko strukturo produkta, še posebej pa so zanimive genske skupine, ki imajo še neodkrito kombinacijo podskupin encimov (Kim in Yi, 2012).

Zgoraj opisan pristop je le posplošitev tega, kar se v praksi dejansko izvaja. Vsaka raziskovalna skupina ima pri odkrivanju novih učinkovin iz mikroorganizmov seveda nekoliko drugačen pristop. Sun in sodelavci so na primer odkrili nov analog jadomicina B tako, da so iz tkiva rdeče korale *Scleronephthya* sp. izolirali aktinomicete, iz katerih so nato izolirali DNK in izvedli PCR z degeneriranimi začetnimi nukleotidi, ki naj bi nalegali na gen za KS α in anguciklino ciklazo. Tarčni geni so bili pomnoženi v 6 od 8 sevov bakterije *Micromonospora* sp.. Te seve so nato gojili pri pogojih, za katere je znano, da pri *Streptomyces venezuelae* spodbudijo produkcijo jadomicina B. Pri teh pogojih je *Micromonospora* sp. proizvajala analog jadomicina B, ki še ni bil odkrit (Sun in sod., 2012). Ogasawara in sodelavci (2015) pa so pri pregledu vseh takrat dostopnih nukleotidnih sekvenc iz podatkovne baze NCBI odkrili genske skupine, ki naj bi kodirale encime za sintezo še neodkritih aromatskih poliketidov. Za anotacijo genskih skupin za biosintezo poliketidov tipa 1 in 2 ter neribosomalnih proteinov (NRPS) so razvili program Dynamite. Odkrita genska skupina je pripadala genomu aktinomicete *Frankia* sp. EAN1pec. To bakterijo so nato gojili in iz brozge izolirali nov aromatski poliketid, ki so ga poimenovali frankiamicin A.

5.4 IZRAŽANJE GENSKIH SKUPIN V HETEROLOGNIH GOSTITELJIH

Kot smo že videli, je heterologno izražanje oziroma ekspresija v gostiteljskem organizmu izjemno pomembna metoda pri odkrivanju in proučevanju genskih skupin za biosintezo biološko aktivnih učinkovin. Raziskovalci se heterologne ekspresije poslužujejo v primerih, ko izvorni organizem, ki sicer ima gensko skupino za biosintezo neke učinkovine, te ne proizvaja (tih operon) (Stevens in sod., 2013), ko je genska skupina odkrita v eDNK in je izvorni organizem neznan (Feng in sod., 2010; Kallifidas in sod., 2012) in ko želijo s pomočjo te metode dodatno proučiti gensko skupino (Ichinose in sod., 1998; Gullón in sod., 2006).

Za heterologno ekspresijo genskih skupin za biosintezo poliketidov tipa 2 se v večini primerov uporabljajo *S. albus* (Feng in sod., 2010; Kallifidas in sod., 2012), *S. lividans* (Motamedi in Hutchinson, 1987; Binnie in sod., 1989) in *S. coelicolor* (McDaniel in sod., 1994). V nekaterih primerih se uporabljajo tudi bakterije iz drugih rodov (največkrat *E. coli*), vendar je ekspresija genov iz streptomicet v tujih gostiteljih zaradi visoke vsebnosti GC baznih parov v njihovih genomih in uporabe specifičnih kodonov problematična (Stevens in sod., 2013). Poleg tega je v gostitelju potrebno zagotoviti pravilno zvite in posttranslacijsko modificirane encime, kar se je v primeru uporabe bakterije *E. coli* prav tako izkazalo za problematično (Lambalot in sod., 1996).

Heterologna ekspresija pa je bila pred napredkom sekvenciranja uporabljana tudi kot metoda za odkrivanje novih učinkovin. Metoda je temeljila na kloniranju koščkov DNK, izoliranih iz okolja, v BAC (ang.: Bacterial artificial chromosome) vektorje s katerimi so transformirali *E. coli*. Gostiteljske celice so nato gojili in z njimi izvajali običajne presejalne teste (Handelsman in sod., 1998). Zaradi zgoraj opisanih omejitev pri ekspresiji genskih skupin iz streptomicet ta metoda pri odkrivanju poliketidov tipa 2 ni bila posebej učinkovita. V zadnjem obdobju je bila razvita nova podobna metoda, ki pa temelji na ekspresiji BAC vektorjev v *S. lividans*. Avtorji opisujejo to metodo kot visokozmogljivo in primerno za industrijsko avtomatizacijo. Po njihovem mnenju bi lahko predstavljala alternativo današnjim metodam, ki temeljijo na *in silico* analizah (Xu in sod., 2016).

5.5 KOMBINATORNA BIOSINTEZA

Kombinatorna biosinteza je učinkovit način za pridobivanje novih biološko aktivnih učinkovin, ki sicer v naravi niso prisotne, ter za optimizacijo biosintetskih poti z namenom doseganja višjih donosov (Bode in Müller, 2005). V zadnjih letih je bilo s kombinatorno biosintezo pridobljenih že kar nekaj aromatskih poliketidov. Nekaj najvidnejših primerov so v preglednem članku povzeli Zhang in sodelavci (2017). Lešnik in sodelavci (2015) so z dodajanjem genov za aminotransferazo in aciltransferazo iz genske skupine za biosintezo oksitetraciklina iz *S. rimosus* v producenta kelokardina (CHD) dosegli, da je ta namesto kelokardina začel sintetizirati amido-kelokardin (CDCHD), ki v naravi še ni bil odkrit in ima v primerjavi s kelokardinom veliko boljšo aktivnost.

Preglednica 2: Novoodkriti poliketidi tipa 2.

Učinkovina	Mikrobni vir	Metoda	Vir
arenimicin	<i>Salinispora arenicola</i>	presejalni testi	(Asolkar in sod., 2010)
UWM6 in rabelomicin (znano že prej)	<i>Streptomyces</i> sp. PGA64	aktivacija tihega operona	(Metsä-Ketelä in sod., 2004)
neimenovani benzo(a)naftacen	<i>S. viridochromogenes</i>	aktivacija tihega operona	(Zhang in sod., 2017)
tetarimicin	neznan	heterologna ekspresija eDNK v <i>S. albus</i>	(Kallifidas in sod., 2012)
fluostatini F, G in H	neznan	heterologna ekspresija eDNK v <i>S. albus</i>	(Feng in sod., 2010)
kaliksantomicin A	neznan	heterologna ekspresija eDNK v <i>S. albus</i>	(Kang in Brady, 2014a)
arenimicina C in D	neznan	heterologna ekspresija eDNK v <i>S. albus</i>	(Kang in Brady, 2014a)
ariksantomicini A, B in C	neznan	heterologna ekspresija eDNK v <i>S. albus</i>	(Kang in Brady, 2014b)
frankiamicin A	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	pregled sekvenc iz NCBI	(Ogasawara in sod., 2015)
analog jadomicina A	<i>Micromonospora</i> sp.	detekcija genov za KS α z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi	(Sun in sod., 2012)
neznan anguciklin (amikomicin B ali njegov analog)	<i>S. anulatus</i> S71	detekcija genov za KSalfa z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi	(Li in sod., 2015)
CDCHD	<i>Arphia sulphurea</i>	kombinatorna biosinteza	(Lešnik in sod., 2015)

6 ZAKLJUČEK

Spoznali smo, da so poliketidi tipa 2 izjemno raznolika družina biološko aktivnih učinkovin. Glede na kemijsko strukturo jih lahko namreč delimo v veliko različnih skupin, pri čemer si avtorji še zdaleč niso enotni, imajo pa tudi zelo različne biološke aktivnosti. Najbolj znane so učinkovine s protirakastim in protibakterijskim delovanjem. Zanimanje za iskanje novih učinkovin iz te družine se je pojavil predvsem zaradi njihovega protibakterijskega delovanja. Glavni problem pri uporabi antibiotikov je namreč razvoj odpornosti pri bakterijah, kar nas sili v uporabo vedno novih učinkovin. Iskanje novih poliketidov tipa 2 je v zadnjih letih ponudilo kar nekaj novih učinkovin z različnimi biološkimi aktivnostmi. Kot dober vir novih poliketidov tipa 2 so se izkazala predvsem različna morska okolja, še posebej mikrobiom nižje razvitih morskih živali, ki je bil zaradi nekultivabilnosti bakterij do nedavnega še povsem neizkoriščen. Za najbolj produktivno strategijo odkrivanja se je glede na število novoodkritih učinkovin izkazala analiza metagenomske DNK, ki bo verjetno tudi v prihodnosti glavna metoda za odkrivanje novih biološko aktivnih učinkovin. V zadnjih letih so se raziskovalci pri iskanju novih učinkovin v metagenomskih sekvencah začeli opirati predvsem na bioinformatična orodja, ki naj bi identificirala vse prisotne genske skupine za sintezo iskanih sekundarnih metabolitov. Kot smo videli, pa je sinteza poliketidov tipa 2 zelo zapleten in še ne povsem pojasnjen proces in enako velja tudi za genske skupine za njihovo sintezo. Iz tega razloga iskanje genskih skupin s pomočjo bioinformatičnih orodji, kljub nekaj dobrim rezultatom v zadnjih letih, danes še zdaleč ni tako učinkovito kot bi si želeli. V prihodnosti torej pričakujemo razvoj zmogljivejših bioinformatičnih orodji, ki bi omogočila učinkovitejše iskanje novih genskih skupin za sintezo biološko aktivnih učinkovin. Dobro alternativo *in silico* analizi sicer predstavlja nedavno objavljena visokozmogljiva metoda, ki temelji na heterologni ekspresiji. Gre za prvo tovrstno metodo, ki jo lahko avtomatiziramo, kar bo v prihodnosti zagotovo pripeljalo do odkritja novih biološko aktivnih učinkovin.

7 VIRI

- Aoyagi T., Aoyama T., Kojima F., Matsuda N., Maruyama M., Hamada M., Takeuchi T. 1992. Benastatins A and B, new inhibitors of glutathione s-transferase, produced by *Streptomyces* sp. MI384-DF12. *The Journal of Antibiotics*, 45, 9: 1385-1390
- Asolkar R. N., Kirkland T. N., Jensen P. R., Fenical W. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of Antibiotics*, 63, 1: 37-39
- Ayer S. W., McInnes A. G., Thibault P., Walter J. A., Doull J. L., Parnell T., Vining L. C. 1991. Jadomycin, a novel 8H-benz [b] oxazolo [3, 2-f] phenanthridine antibiotic from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Tetrahedron Letters*, 32, 44: 6301-6304
- Baltz R. H. 2005. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *Sim News*, 55: 186-196
- Baltz R. H. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe-American Society For Microbiology*, 2, 3: 125-131
- Balzarini J., Van Laethem K., Daelemans D., Hatse S., Bugatti A., Rusnati M., Igarashi Y., Oki T., Schols D. 2007. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compound

- for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 81, 1: 362-373
- Bao W., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R. 1998. Reconstitution of the iterative type II polyketide synthase for tetracenomycin F2 biosynthesis. *Biochemistry*, 37, 22: 8132-8138
- Barbosa T. M., Levy S. B. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 3, 5: 303-311
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A.-M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 6885: 141-147
- Bibb M. J., Sherman D. H., Ōmura S., Hopwood D. A. 1994. Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin. *Gene*, 142, 1: 31-39
- Binnie C., Warren M., Butler M. J. 1989. Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 171, 2: 887-895
- Bisang C., Long P. F., Corte J., Westcott J., Crosby J., Matharu A. L., Russell J. C., Thomas J. S., James S., Leadlay P. F. 1999. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, 401, 6752: 502
- Boddy C. N. 2014. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41, 2: 443-450
- Bode H. B., Müller R. 2005. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 42: 6828-6846
- Brachmann A. O., Joyce S. A., Jenke-Kodama H., Schwär G., Clarke D. J., Bode H. B. 2007. A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chembiochem*, 8, 14: 1721-1728
- Butcher R. A., Feng L., Shou Q. 2017. Discovery and biosynthesis of hybrid polyketide-nonribosomal peptides in nematodes. *The FASEB Journal*, 31, 1: 121-126
- Cantrell C. L., Dayan F. E., Duke S. O. 2012. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 6: 1231-1242
- Chiang Y. M., Chang S. L., Oakley B. R., Wang C. C. 2011. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 1: 137-143
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260
- Clardy J., Fischbach M. A., Walsh C. T. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, 24, 12: 1541-1550
- Das A., Khosla C. 2009. Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Accounts of Chemical Research*, 42, 5: 631-639
- Daum M., Peintner I., Linnenbrink A., Frerich A., Weber M., Paululat T., Bechthold A. 2009. Organisation of the biosynthetic gene cluster and tailoring enzymes in the biosynthesis of the tetracyclic quinone glycoside antibiotic polyketomycin. *ChemBioChem*, 10, 6: 1073-1083
- Davies J., Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 3: 417-433

- Demain A. L., Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62, 1: 5-16
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J. -F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.-M., Gascuel O. 2008. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36, 2: 465-469
- Drautz H., Reuschenbach P., Zähler H., Rohr J., Zeeck A. 1985. Metabolic products of microorganisms. 225 Elloramycin, a new anthracycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. *The Journal of Antibiotics*, 38, 10: 1291-1301
- Drautz H., Zähler H., Rohr J., Zeeck A. 1986. Metabolic Products of Microorganisms. 234 Urdamycins, New Angucycline Antibiotics from *Streptomyces Fradiae*. *The Journal of Antibiotics*, 39, 12: 1657-1669
- Eddy S. R. 2004. What is a hidden Markov model? *Nature Biotechnology*, 22, 1315
- Feng Z., Kim J. H., Brady S. F. 2010. Fluostatins produced by the heterologous expression of a TAR reassembled environmental DNA derived type II PKS gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 34: 11902-11903
- Fischbach M. A., Walsh C. T. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325, 5944: 1089-1093
- Fu H., McDaniel R., Hopwood D. A., Khosla C. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketides: stereochemical course of two reactions catalyzed by a polyketide synthase. *Biochemistry*, 33, 31: 9321-9326
- Fujiwara A., Hoshino T., Westley J. W. 1985. Anthracycline antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3, 2:133-157
- Gause G. F. 1967. Chromomycin, olivomycin and mithramycin. V: Antibiotics. Gottlieb D., Shaw P. D. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 246-258
- Gomez-Escribano J. P., Bibb M. J. 2011. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4, 2: 207-215
- Griffin M. O., Fricovsky E., Ceballos G., Villarreal F. 2010. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299, 3: 539-548
- Grimm A., Madduri K., Ali A., Hutchinson C. R. 1994. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene*, 151, 1: 1-10
- Gullón S., Olano C., Abdelfattah M. S., Braña A. F., Rohr J., Méndez C., Salas J. A. 2006. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6: 4172-4183
- Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5, 10: 245-249
- Hansen M. R., Hurley L. H. 1996. Pluramycins. Old drugs having modern friends in structural biology. *Accounts of Chemical Research*, 29, 5: 249-258
- Hertweck C. 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 26: 4688-4716
- Hertweck C., Luzhetskyy A., Rebets Y., Bechthold A. 2007. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural Product Reports*, 24, 1: 162-190
- Hitchman T. S., Crosby J., Byrom K. J., Cox R. J., Simpson T. J. 1998. Catalytic self-acylation of type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *Chemistry & Biology*, 5, 1: 35-47
- Hopwood D. A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97, 7: 2465-2498

- Hopwood D. A., Sherman D. H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 24, 1: 37-62
- Hori S., Shirai M., Hirano S., Oki T., Inui T., Tsukagoshi S., Ishizuka M., Takeuchi T., Umezawa H. 1977. Antitumor activity of new anthracycline antibiotics, aclacinomycin-A and its analogs, and their toxicity. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 68, 5: 685-690
- Ichinose K., Bedford D. J., Tornus D., Bechthold A., Bibb M. J., Revill W. P., Floss H. G., Hopwood D. A. 1998. The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chemistry & Biology*, 5, 11: 647-659
- Ichinose K., Ozawa M., Itou K., Kunieda K., Ebizuka Y. 2003. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanequinone gene clusters. *Microbiology*, 149, 7: 1633-1645
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Ōmura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 21, 5: 526-531
- Izumikawa M., Cheng Q., Moore B. S. 2006. Priming type II polyketide synthases via a type II nonribosomal peptide synthetase mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 5: 1428-1429
- Jackson D. R., Tu S. S., Nguyen M., Barajas J. F., Schaub A. J., Krug D., Pistorius D., Luo R., Müller R., Tsai, S. C. 2015. Structural Insights into Anthranilate Priming during Type II Polyketide Biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 11, 1: 95-103
- Jakeman D. L., Bandi S., Graham C. L., Reid T. R., Wentzell J. R., Douglas S. E. 2009. Antimicrobial activities of jadomycin B and structurally related analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3: 1245-1247
- Kallifidas D., Kang H. S., Brady S. F. 2012. Tetarimycin A, an MRSA-active antibiotic identified through induced expression of environmental DNA gene clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 48: 19552-19555
- Kang H. S. 2017. Phylogeny-guided (meta) genome mining approach for the targeted discovery of new microbial natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44, 2: 285-293
- Kang H. S., Brady S. F. 2014a. Mining soil metagenomes to better understand the evolution of natural product structural diversity: pentangular polyphenols as a case study. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 52: 18111-18119
- Kang H. S., Brady, S. F. 2014b. Arixanthomycins A–C: Phylogeny-guided discovery of biologically active eDNA-derived pentangular polyphenols. *ACS Chemical Biology*, 9, 6: 1267-1272
- Katz M., Hover B. M., Brady S. F. 2016. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43, 2-3: 129-141
- Kharel M. K., Nybo S. E., Shepherd M. D., Rohr, J. 2010. Cloning and characterization of the ravidomycin and chrysomycin biosynthetic gene clusters. *ChemBioChem*, 11, 4: 523-532
- Kim E. S., Bibb M. J., Butler M. J., Hopwood D. A., Sherman D. H. 1994. Sequences of the oxytetracycline polyketide synthase-encoding *otc* genes from *Streptomyces rimosus*. *Gene*, 141, 1: 141-142
- Kim J., Yi G. S. 2012. PKMiner: a database for exploring type II polyketide synthases. *BMC Microbiology*, 12, 1: 169
- Komatsu M., Uchiyama T., Ōmura S., Cane D. E., Ikeda H. 2010. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 6: 2646-2651

- Lambalot R. H., Gehring A. M., Flugel R. S., Zuber P., LaCelle M., Marahiel M. A., Reid R., Khosla C., Walsh C. T. 1996. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 3, 11: 923-936
- Lešnik U., Lukežič T., Podgoršek A., Horvat J., Polak T., Šala M., Jenko B., Harmrolfs K., Ocampo-Sosa A., Martínez-Martínez L., Herron R. R., Fujs Š., Kosec G., Hunter I. S., Müller R., Petković H. 2015. Construction of a new class of tetracycline lead structures with potent antibacterial activity through biosynthetic engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 13: 3937-3940
- Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 12, 5: 371-387
- Li M. H., Ung P. M., Zajkowski J., Garneau-Tsodikova S., & Sherman D. H. 2009. Automated genome mining for natural products. *BMC Bioinformatics*, 10, 1: 185, doi: 10.1186/1471-2105-10-185: 10 str.
- Li Z., Sun W., Zhang F., He L., Loganathan K. 2015. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity and potential for aromatic polyketides discovery. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1048, doi: 10.3389/fmicb.2015.01048: 15 str.
- Lombó F., Blanco G., Fernández E., Méndez C., & Salas J. 1996. Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene*, 172, 1: 87-91
- Lombó F., Braña A. F., Salas J. A., Méndez C. 2004. Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chembiochem*, 5, 9: 1181-1187
- Lombó F., Menéndez N., Salas J. A., Méndez C. 2006. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1: 1-14
- Mak S., Nodwell J. R. 2017. Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular Microbiology*, 106, 4: 597-613
- Malpartida F., Hopwood D. A. 1986. Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular and General Genetics MGG*, 205, 1: 66-73
- Marti T., Hu Z., Pohl N. L., Shah A. N., Khosla C. 2000. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist insights into an unusual priming mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 43: 33443-33448
- Meadows E. S., Khosla C. 2001. In vitro reconstitution and analysis of the chain initiating enzymes of the R1128 polyketide synthase. *Biochemistry*, 40, 49: 14855-14861
- Medema M. H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M. A., Weber T., Takano E., Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39, 2: 339-346
- Menéndez N., Nur-e-Alam M., Braña A. F., Rohr J., Salas J. A., Méndez C. 2004. Biosynthesis of the antitumor chromomycin A3 in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chemistry & Biology*, 11, 1: 21-32
- Metsä-Ketelä M., Ylihonko K., Mäntsälä P. 2004. Partial activation of a silent angucycline-type gene cluster from a rubromycin β producing *Streptomyces* sp. PGA64. *The Journal of Antibiotics*, 57, 8: 502-510
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56, 2: 185-229

- Motamedi H., Hutchinson C. R. 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 13: 4445-4449
- Naysmith B. J., Hume P. A., Sperry J., Brimble M. A. 2017. Pyranonaphthoquinones— isolation, biology and synthesis: an update. *Natural Product Reports*, 34, 1: 25-61
- Ogasawara Y., Yackley B. J., Greenberg J. A., Rogelj S., Melançon III C. E. 2015. Expanding our understanding of sequence-function relationships of type II polyketide biosynthetic gene clusters: bioinformatics-guided identification of frankiamicin A from *Frankia* sp. EAN1pec. *PloS One*, 10, 4: e0121505, doi: 10.1371/journal.pone.0121505: 25 str.
- Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 190, 11: 4050-4060
- Oki, T., Konishi M., Tomatsu K., Tomita K., Saitoh K. I., Tsunakawa M., Nishio M., Miyaki T Kawaguchi H. 1988. Pradimicin, a novel class of potent antifungal antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 41, 11: 1701-1704
- Olano C., Méndez C., Salas J. A. 2010. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, 27, 4: 571-616
- Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 21: 12215-12220
- Ostash B., Korynevska A., Stoika R., Fedorenko V. 2009. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 9: 1040-1051
- Pickens L. B., Kim W., Wang P., Zhou H., Watanabe K., Gomi S., Tang Y. 2009. Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 48: 17677-17689
- Piel J., Hertweck C., Shipley P. R., Hunt D. M., Newman M. S., Moore B. S. 2000. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate '*Streptomyces maritimus*': evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chemistry & biology*, 7, 12: 943-955
- Rawlings B. J. 1999. Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Natural Product Reports*, 16, 4: 425-484
- Reddy B. V. B., Milshteyn A., Charlop-Powers Z., Brady S. F. 2014. eSNaPD: a versatile, web-based bioinformatics platform for surveying and mining natural product biosynthetic diversity from metagenomes. *Chemistry & Biology*, 21, 8: 1023-1033
- Rix U., Fischer C., Remsing L. L., Rohr J. 2002. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, 19, 5: 542-580
- Rohr J., Méndez C., Salas J. A. 1999. The biosynthesis of aureolic acid group antibiotics. *Bioorganic Chemistry*, 27, 2: 41-54
- Rohr J., Thiericke R. 1992. Angucycline group antibiotics. *Natural Product Reports*, 9, 1: 103-137
- Rutledge P. J., Challis G. L. 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 8: 509-523
- Seow K. T., Meurer G., Gerlitz M., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R., Davies J. 1997. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 179, 23: 7360-7368

- Staunton J., Weissman K. J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 18, 4: 380-416
- Sun W., Peng C., Zhao Y., Li Z. 2012. Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp. *PLoS One*, 7, 8: e42847, doi: 10.1371/journal.pone.0042847: 11 str.
- Thomas R. 2001. A Biosynthetic Classification of Fungal and Streptomyces Fused-Ring Aromatic Polyketides. *ChemBioChem*, 2, 9: 612-627
- Tymiak A. A., Aklonis C., Bolgar M. S., Kahle A. D., Kirsch D. R., O'Sullivan J., Porubcan A.M., Principe P., Trejo, W. H. 1993. Dactylocyclines: novel tetracycline glycosides active against tetracycline-resistant bacteria. *The Journal of Organic Chemistry*, 58, 3: 535-537
- van Wezel G. P., McDowall K. J. 2011. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural Product Reports*, 28, 7: 1311-1333
- Walsh C. T., Wenczewicz T. A. 2014. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *The Journal of Antibiotics*, 67, 1: 7-22
- Walsh T. J., Giri N. 1997. Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16, 1: 93-97
- Wendt-Pienkowski E., Huang Y., Zhang J., Li B., Jiang H., Kwon H., Hutchinson, Shen B. 2005. Cloning, Sequencing, Analysis, and Heterologous Expression of the Fredericamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces griseus*. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 47: 16442-16452
- Westrich L., Domann S., Faust B., Bedford D., Hopwood D. A., Bechthold A. 1999. Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 2: 381-387
- Wong F. T., Khosla C. 2012. Combinatorial biosynthesis of polyketides—a perspective. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16, 1-2: 117-123
- Xu M., Wang Y., Zhao Z., Gao G., Huang S. X., Kang Q., He X., Lin S., Pang X., Deng Z., Tao M. 2016. Functional Genome Mining for Metabolites Encoded by Large Gene Clusters through Heterologous Expression of a Whole-Genome Bacterial Artificial Chromosome Library in *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 19: 5795-5805
- Yadav G., Gokhale R. S., Mohanty D. 2009. Towards prediction of metabolic products of polyketide synthases: an in silico analysis. *PLoS Computational Biology*, 5, 4: e1000351, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000351: 14 str.
- Yu T. W., Bibb M. J., Reville W. P., Hopwood D. A. 1994. Cloning, sequencing, and analysis of the griseusin polyketide synthase gene cluster from *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 176, 9: 2627-2634
- Zhan J. 2009. Biosynthesis of bacterial aromatic polyketides. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 17: 1598-1610
- Zhang M. M., Wong F. T., Wang Y., Luo S., Lim Y. H., Heng E., Yeo W. L., Cobb R. E., Enghiad B., Ang E. L., Zhao H. 2017. CRISPR–Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology*, 13, 6: 607-609
- Zhang Z., Pan H. X., Tang G. L. 2017. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis. *F1000Research*, 6, 172, doi: 10.12688/f1000research.10466.1: 12 str.
- Zhou H., Li Y., Tang Y. 2010. Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 27, 6: 839-868
- Ziemert N., Alanjary M., Weber T. 2016. The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural Product Reports*, 33, 8: 988-1005
- Ziemert N., Podell S., Penn K., Badger J. H., Allen E., Jensen P. R. 2012. The natural product domain seeker NaPDoS: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PloS One*, 7, 3: e34064, doi: 10.1371/journal.pone.0034064: 9 str.