

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Jan Kolek**

Mutační analýza biosyntézy manumycinových antibiotik  
Mutational analysis of manumycin antibiotics biosynthetic routes

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslav Petříček, CSc.

Praha 2011

Poděkování patří mému školiteli Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. za vlídné přijetí, trpělivost, velkou pomoc při zpracování této práce a mnohé cenné rady.

Mgr. Kateřině Petříčkové, PhD. za přátelský přístup, pomoc v laboratorní praxi a mnohé cenné rady.

Mé matce Evě Kolkové za dlouholetou podporu ve studiu i v životě a všem výše uvedeným upřímně

**Děkuji**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2011

Podpis:

## Seznam použitých zkratk:

AK	aminokyselina
PKS	polyketidsyntáza
FAS	„fatty acid synthase“, syntáza mastných kyselin
PKS I	polyketidsyntáza typu I
PKS II	polyketidsyntáza typu II
PKS III	polyketidsyntáza typu III
NRPS	„non-ribosomal peptide synthase“, neribozomální peptidsyntáza
KS	ketosyntáza
AT	acyltransferáza
ACP	acyl carrier protein
3,4-AHBA	3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina
3,5-AHBA	3-amino-5-hydroxybenzoová kyselina
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
ASA	aspartátsemialdehyd
CHC-CoA	cyklohexylkarbonyl-CoA
ICE	interleukin-1 $\beta$ -konvertující enzym
<i>wt</i>	„wild type“ – divoký typ
ROS	„reactive oxygen species“, kyslíkové radikály
TNF $\alpha$	„tumor necrosis factor-alfa“, nádorový nekrotický faktor-alfa
IL 1	interleukin-1
IKK	„I-kappa-B-kinase“, I-kappa-B-kináza
nSMase	neutrální sfingomyelináza
APP	„amyloid precursor protein“, amyloidový prekurzorový protein
$\beta$ A	„amyloid $\beta$ -peptid“, amyloidový peptid $\beta$

## Obsah:

<b>OBSAH:</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i></b> .....	<b>9</b>
<b>3. SKUPINA MANUMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK</b> .....	<b>11</b>
3.1. ZAŘAZENÍ MANUMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK .....	11
3.2. STRUKTURA A KLASIFIKACE.....	11
3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA MANUMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK .....	13
<b>4. BIOSYNTÉZA POLYKETIDŮ</b> .....	<b>16</b>
4.1. BIOSYNTÉZA POLYKETIDOVÝCH METABOLITŮ .....	16
4.2. PKS I.....	16
4.3. PKS II .....	17
4.4. PKS III (CHALKON SYNTÁZA).....	17
4.5. HYBRIDNÍ PKS – NRPS .....	18
<b>5. BIOSYNTÉZA MANUMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK</b> .....	<b>19</b>
5.1. BIOSYNTÉZA $mC_7N$ PODJEDNOTKY.....	19
5.2. BIOSYNTÉZA SPODNÍHO ŘETĚZCE A $C_5N$ PODJEDNOTKY .....	19
5.3. BIOSYNTÉZA HORNÍHO ŘETĚZCE .....	20
5.4. ČASOVÁNÍ BIOSYNTÉZY MANUMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK A POSLEDNÍ ÚPRAVY .....	20
<b>6. ANALÝZA BIOSYNTETICKÝCH DRAH MANUMYCINOVÝCH LÁTEK</b> .....	<b>22</b>
6.1. TECHNIKY VYUŽÍVAJÍCÍ ZNAČENÝCH PREKURZORŮ .....	22
6.2. MUTAČNÍ ANALÝZA .....	22
6.3. VYUŽITÍ POZNATKŮ MUTAČNÍ ANALÝZY PŘI PŘÍPRAVĚ NOVÝCH LÁTEK .....	23
6.4. KOMBINATORNÍ BIOSYNTÉZA PRO OBJASNĚNÍ KONTROLY DÉLKY ŘETĚZCŮ MANUMYCINŮ A VOLBY SUBSTRÁTŮ PKS .....	25
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>27</b>
<b>8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>28</b>

## Abstrakt

Manumycinová antibiotika jsou sekundární metabolity, které patří do velké skupiny polyketidových látek. Jsou produkována výhradně bakteriemi rodu *Streptomyces*. Manumycinová antibiotika jsou charakterizována dvěma lineárními polyketidovými řetězci, které jsou připojeny k centrální  $mC_7N$  podjednotce. Spodní řetězec je často zakončen  $C_5N$  podjednotkou. Manumyciny vykazují mnoho biologických aktivit. Byla u nich prokázána antimikrobiální aktivita výhradně vůči gram-pozitivním bakteriím. Dalšími pozorovanými aktivitami je například antimykotická, insekticidní nebo protizánětlivá aktivita. Manumycinové metabolity jsou také potencionálními kancerostatiky. Pro přípravu těchto látek fermentační cestou je důležitá znalost jejich biosyntetických drah. Mutační analýza je založena na technikách genového inženýrství. Je vhodná ke zkoumání biosyntetických drah sekundárních metabolitů a také genů zapojených do jejich genetického podkladu. Jejím výsledkem je komplexní přehled o biosyntetické dráze daného metabolitu. Tuto znalost lze použít např. v metodách kombinatorní biosyntézy nebo mutasyntézy k produkci nových metabolitů. Hybridní látky by se mohly v budoucnosti stát např. novými účinnými antibiotiky nebo kancerostatiky pro použití v lékařství.

**Klíčová slova:** manumycin, polyketidy, streptomycety, asukamycin

## Abstract

The manumycin antibiotics are secondary metabolites, which come from a big group of polyketide metabolites. They are produced by bacteria from genus *Streptomyces*. Manumycin antibiotics are characterized by two linear polyketide chains, which are connected to a central  $mC_7N$  moiety. The lower chain is often terminated by the  $C_5N$  moiety. Manumycin metabolites show many biological activities. They have antimicrobial activity, especially against gram-positive bacteria. Next, they possess antifungal, insecticidal or antiinflammatory activities. Manumycins are also potential anticancer agents. In order to prepare these compounds by the fermentation, the detailed knowledge of their biosynthetic routes is required. Mutational analysis is based on techniques of genetic engineering. Mutational analysis is a useful tool for analysis of biosynthetic pathways of secondary metabolites and the genes, which are involved in these pathways. This knowledge is essential for application of combinatorial biosynthesis for the design of new metabolites. The new hybrid compound could be used in future as new antibiotics or anticancer drugs.

**Keywords:** manumycin, polyketide, streptomyces, asukamycin

# 1. Úvod

Buněčný metabolismus lze rozlišit na primární a sekundární. Primární metabolismus zahrnuje všechny esenciální chemické přeměny a syntézy, bez kterých by daná buňka či organismus nemohly existovat. Jedná se především o metabolismus cukrů, tuků, aminokyselin a nukleových kyselin. Tyto děje se navzájem podobají u všech skupin organismů. Sekundární metabolismus je pro každý organismus či skupinu organismů jedinečný. Jedná se o produkci chemických látek, na kterých přímo nezávisí přežití jedince. Často mu však poskytuje nějakou výhodu, jako je zrychlení růstu a reprodukce či zvýšení šance na přežití v prostředí. Tyto látky jsou často produkovány unikátní biosyntetickou drahou, která jinde v přírodě nemá obdoby. Prekurzory pro tyto biosyntetické dráhy pochází často z primárního metabolismu. Typicky tento druh metabolismu nacházíme u hub, rostlin, ale hlavně u prokaryotických organismů (bakterie, sinice). Sekundární metabolity jsou zpravidla produkovány pouze v určité fázi životního cyklu. U bakterií to bývá často přechod do stacionární fáze růstu, kdy se v okolí snižuje koncentrace živin. Díky tomu stoupá konkurence mezi organismy a právě tvorba sekundárních metabolitů může organismu poskytovat oproti ostatním značnou výhodu. Hlavními produkty sekundárního metabolismu jsou signální molekuly (autoregulační nebo např. ovlivňující hostitele), pigmenty, toxiny atd.

Velkou skupinou sekundárních metabolitů jsou antibiotika. Ta poskytují organismu výhodu likvidací kompetičních mikroorganismů v okolí. Existuje několik druhů antibiotik a ne všechny pocházejí ze sekundárního metabolismu. Velkou skupinou antibiotik jsou polyketidy. Jsou to sekundární metabolity objevené u bakterií, hub i rostlin. Vznikají postupnou dekarboxylativní kondenzací acyl-CoA substrátů, kterou katalyzuje enzym polyketidsyntáza (PKS). Celý proces je velmi podobný syntéze mastných kyselin. Jedná se o strukturně velice rozmanitou skupinu látek, které mají různorodé biologické aktivity. Jednak sem patří již zmíněná antibiotika (tetracykliny, erythromycin), dále také např. kancerostatické látky (doxorubicin), antimykotika, insekticidy, kokcidiostatika nebo třeba látky účinné pro léčbu Alzheimerovy choroby, či pro snížení hladiny cholesterolu.

Významnými producenty sekundárních metabolitů jsou bakterie rodu *Streptomyces*. Jedná se o gram-pozitivní, vláknité, zpravidla půdní bakterie ze skupiny *Actinobacteria*. Ve srovnání s jinými bakteriemi (např. *Escherichia coli*) mají streptomycety mimořádně velký genom. Díky tomu mohou mít tyto bakterie tak bohatý metabolismus. Streptomycety během svého životního cyklu prochází složitým procesem diferenciací a jsou také jako model prokaryotické diferenciací intenzivně studovány. Mají mimořádně bohatý rejstřík sekundárních metabolitů a řada z nich je využívána biotechnologicky. Z bakterií rodu *Streptomyces* pochází asi 70 % všech známých antibiotik a tento výčet, jak se zdá, zdaleka není konečný.

Malou skupinou polyketidů, které jsou produkovány výhradně bakteriemi rodu *Streptomyces*, jsou manumycinová antibiotika. Jsou charakterizované dvěma lineárními polyketidovými řetězci (označované jako horní a spodní řetězec) a centrální šestičlennou skupinou, označovanou jako  $mC_7N$  podjednotka. Prvním objeveným manumycinovým antibiotikem byl v roce 1963 manumycin A z producenta *Streptomyces parvulus* Tü64 (Buzzetti *et al.* 1963), který dal také jméno celé skupině látek. Další objevenou látkou byl v roce 1976 asukamycin z producenta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (Omura *et al.* 1976). Velký rozvoj v objevování manumycinových látek nastal na konci 80. let 20. stol., kdy bylo do roku 1995 objeveno 11 nových manumycinových metabolitů. Obzvláště úspěšným rokem byl potom 1996, kdy bylo objeveno hned 10 nových zástupců. U manumycinových antibiotik byla popsána antimikrobiální aktivita a to výhradně vůči gram-pozitivním

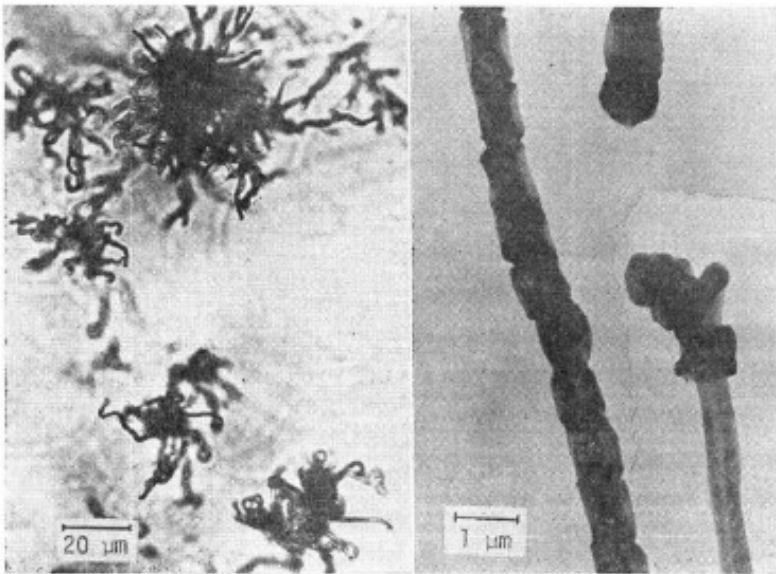
bakteriím, dále protizánětlivá, antikokcidiální, insekticidní, ale také protinádorová aktivita. V současnosti se pracuje na objasnění kompletní biosyntetické dráhy těchto látek.

Ke zkoumání biosyntetických drah lze použít různé přístupy. K vysvětlení některých aspektů biosyntézy manumycinových antibiotik přispěly v minulosti především techniky používající radioaktivně či jinak značené prekurzory. S rozvojem technik molekulární biologie, genomového inženýrství a sekvenace DNA je možné využívat mnohem jednodušších a cílenějších přístupů. Takovým je např. metoda mutační analýzy. Mutační analýza spočívá v izolaci a následném osekvenování úseku DNA, který je zodpovědný za biosyntetickou dráhu sledovaného metabolitu. Sekvence je následně porovnána s geny z jiných organismů. Tím je přiřazena každému genu jeho pravděpodobná funkce v biosyntéze. Do různých genů jsou poté postupně vnášeny mutace, které daný gen (geny) inaktivují. Ve finále jsou sledovány změny ve struktuře produkované molekuly. Z těchto změn lze usoudit, ve kterém stadiu biosyntézy je daný genový produkt aktivní a jakou má funkci. Celkově nám mutační analýza tedy poskytuje komplexní přehled o biosyntetické dráze dané látky. Tuto znalost lze dále použít např. v metodách kombinatorní biosyntézy či jiných přístupech, jejichž výsledkem by mohl být vývoj nových antibiotik nebo jiných látek s prospěšnou biologickou aktivitou. Ten může probíhat dvěma hlavními způsoby. Je to jednak úprava již známých molekul nebo vývoj molekul zcela nových.

V současné době je výzkum, který by mohl vést k produkci nových antibiotik, velice důležitý a sledovaný. Hlavním důvodem vývoje nových antibiotik je neustále se rozšiřující rezistence patogenních mikroorganismů ke známým preparátům. To vede k nárůstu případů nozokomiálních infekcí, častějšímu selhání léčby (a tudíž k vyšší mortalitě nemocných), ale také ke zvyšování nákladů vynaložených na léčbu antibiotiky (nutno používat větší množství antibiotik, či používat účinnější a dražší preparáty). Celkově se od 80. let dvacátého století (kdy byla objevena skupina monobaktamů) vývoj nových antibiotik zpomalil. Je to dáno jednak vyčerpáním známých cílových struktur, ale také finanční náročností výzkumu. Ke zlepšení situace by mělo přispět správné používání antibiotik, čímž bude minimalizováno vytvoření rezistence u bakterií a již zmíněný vývoj nových tříd antibiotik.

## 2. Charakteristika bakterií rodu *Streptomyces*

Vedle rostlin, hub a jiných bakterií je největší část polyketidových látek syntetizována bakteriemi z rodu *Streptomyces*. Fylogeneticky se tento rod řadí do třídy *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales*, čeledi *Streptomycetaceae*. Svě jméno dostal podle vláknitých hub, kterým se v některých ohledech velmi podobá. Streptomycety jsou gram-pozitivní, striktně aerobní, filamentární bakterie, které se přirozeně vyskytují především v půdě. Tvoří zde značnou část přirozené mikroflóry. Podílejí se významně na dekompozici organického materiálu a jsou zapojeny do koloběhu uhlíku. K životu v půdě a dekompozici jsou adaptovány tvorbou řady extracelulárních enzymů.



Obr. 1: Rostoucí mycelium bakterie rodu *Streptomyces* pod světelným a elektronovým mikroskopem. Převzato z Omura *et al.* 1976.

Ve srovnání s ostatními bakteriemi mají streptomycety mimořádně velký genom. Jeho průměrná velikost je 6-10 Mbp (pro srovnání: velikost genomu bakterie *Escherichia coli* je asi 4,5 Mbp). Zastoupení GC párů je asi 70 %. Genetickou informaci nese lineární chromozóm, popřípadě přídavné lineární či cirkulární plazmidy (Bentley *et al.* 2002). Lineární chromozóm je přitom pro bakterie velmi netypický, avšak vyskytuje se např. také u *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii* nebo *Agrobacterium tumefaciens*. Na koncích chromozómu jsou kovalentně vázané proteiny, které patrně slouží k syntéze posledního okazáho fragmentu na 5' konci a také k ochraně konců chromozómu (Kieser *et al.* 2000). Chromozóm streptomycet se skládá z centrální oblasti a dvou ramen. Geny centrální oblasti jsou mezi jednotlivými druhy streptomycet poměrně konzervované a obsahují esenciální geny pro primární metabolismus (Choulet *et al.* 2006, Ikeda *et al.* 2003, Ohnishi *et al.* 2008). Naopak geny ramen chromozómu nejsou konzervované mezi jednotlivými druhy a nesou především geny zodpovědné za produkci sekundárních metabolitů nebo extracelulárních enzymů (Dary *et al.* 2000, Choulet *et al.* 2006). V současné době je v genových databázích k dispozici kompletní genom šesti druhů bakterií z rodu *Streptomyces*. Jedná se o bakterii *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.* 2002), *Streptomyces avermilitis* (Ikeda *et al.* 2003), *Streptomyces griseus* (Ohnishi *et al.* 2008), *Streptomyces bingchengensis* (Wang *et al.* 2010), *Streptomyces*

*flavogriseus* a *Streptomyces scabiei* (Bignell *et al.* 2010). Na dalších kompletních genomech streptomycet se neustále pracuje.

Streptomycety prochází během svého životního cyklu složitou diferenciací. Po vyklíčení spory vyrůstá substrátové mycelium. Z něho později vzniká vzdušné mycelium, které lyzuje substrátové mycelium a živiny používá k vlastnímu růstu. Na koncích vzdušného mycelia se později tvoří řetízky exospor, které jsou postupně odlučovány do okolí (Ohnishi *et al.* 2002). Díky tomuto složitému životnímu cyklu se staly streptomycety dobrým modelovým organismem pro bakteriální diferenciaci a její regulace (Huang 2005).

Bakterie z rodu *Streptomyces* jsou velmi významnými producenty přírodních bioaktivních látek. Z jejich sekundárního metabolismu pochází asi 70 % ze všech známých antibiotik. Mezi nejznámější patří např. streptomycin, erythromycin, chloramfenikol nebo tetracykliny. Jednou ze skupin produkovaných antibiotik jsou také manumycinová antibiotika. S produkcí antibiotik je také spřažena syntéza struktur, které samotnou buňku chrání před účinkem produkovaných antibiotik. Tyto geny pro rezistenci jsou často vloženy přímo ve shluku genů pro biosyntézu daného antibiotika (Hopwood 2007). Kromě antibiotik jsou také producenty protinádorových látek (doxorubicin, potencionálně manumycin A), antimykotik, antiparazitik, herbicidů či imunosupresantů, apod.

### 3. Skupina manumycinových antibiotik

#### 3.1. Zařazení manumycinových antibiotik

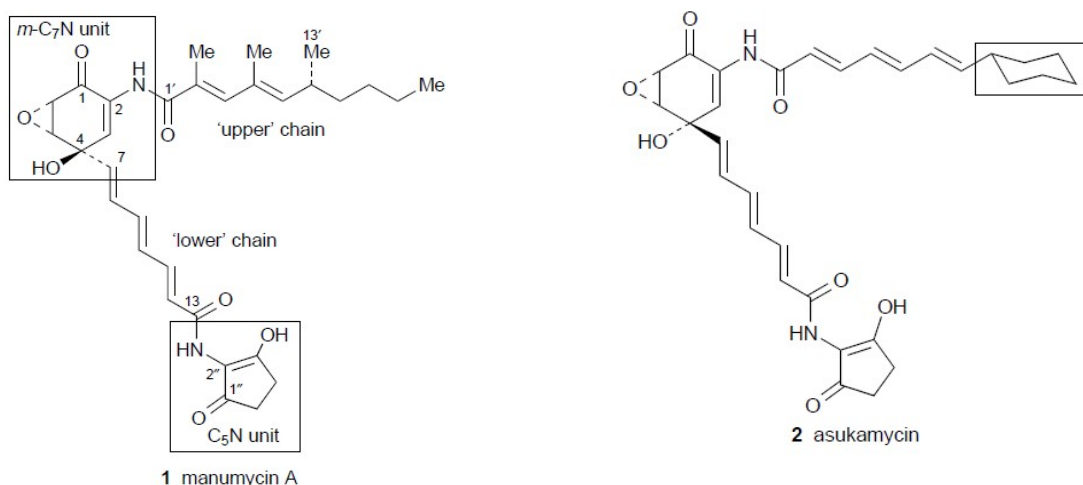
Antibiotika můžeme podle jejich struktury a biosyntézy rozdělit do několika hlavních skupin. Takovou skupinou jsou např.  $\beta$ -laktamová antibiotika, kam patří peniciliny a cefalosporiny. Ty jsou charakteristické přítomností „ $\beta$ -laktamového kruhu“ v molekule. Jejich prekurzory jsou aminokyseliny. Dalším skupinou jsou např. aminoglykosidy. Do této skupiny řadíme antibiotika, jako je neomycin nebo antibiotikum účinné proti mykobakteriím - streptomycin. Aminoglykosidy jsou složeny z dvou až čtyř sacharidů či aminosacharidů. Další velkou skupinou jsou glykopeptidy, kam řadíme např. vankomycin. Hlavní součástí je heptapeptidové jádro složené z běžných i exotických aminokyselin. Novější skupinou jsou lipopeptidová antibiotika, jako např. daptomycin. Dále existují menší skupiny antibiotik a chemoterapeutik s antimikrobiálním účinkem: amfenikoly (chloramfenikol), nitrofurany (nitrofurantoin), chinolony, nitroimidazoly, sulfonamidy a další.

Velkou rodinou antibiotik jsou polyketidová antibiotika. Do té se řadí samostatné skupiny, jako jsou tetracykliny (tetracyklin, chlortetracyklin), polyetherová antibiotika (monensin) nebo makrolidy (erythromycin, nystatin). Polyketidová antibiotika obsahují také několik menších podskupin, kam můžeme zařadit např. ansamycinová antibiotika (rifamycin) nebo manumycinová antibiotika.

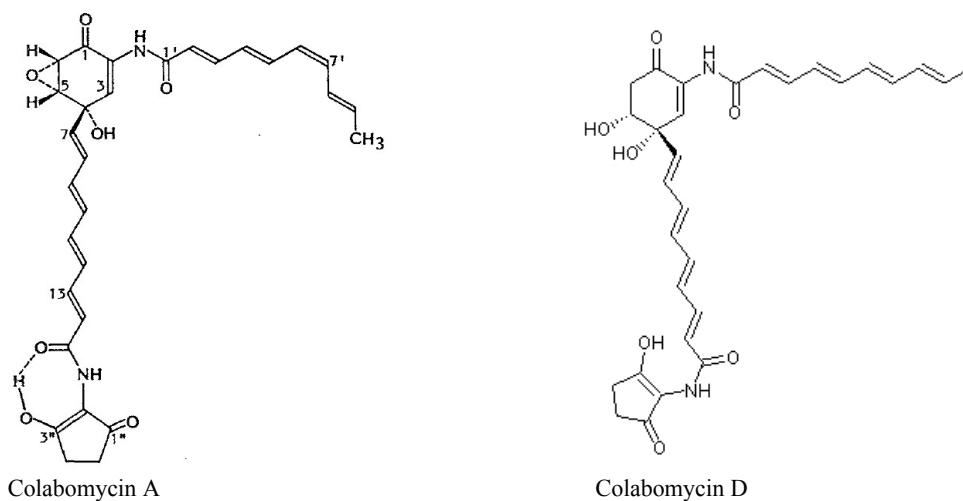
#### 3.2. Struktura a klasifikace

Manumycinová antibiotika se typicky skládají z centrální  $mC_7N$  podjednotky, na kterou je připojen horní a spodní polyketidový řetězec. Syntéza horního řetězce je iniciována různými chemickými skupinami. Tato skupina tvoří ve finální molekule zakončení horního řetězce. Spodní řetězec je často zakončen  $C_5N$  skupinou.

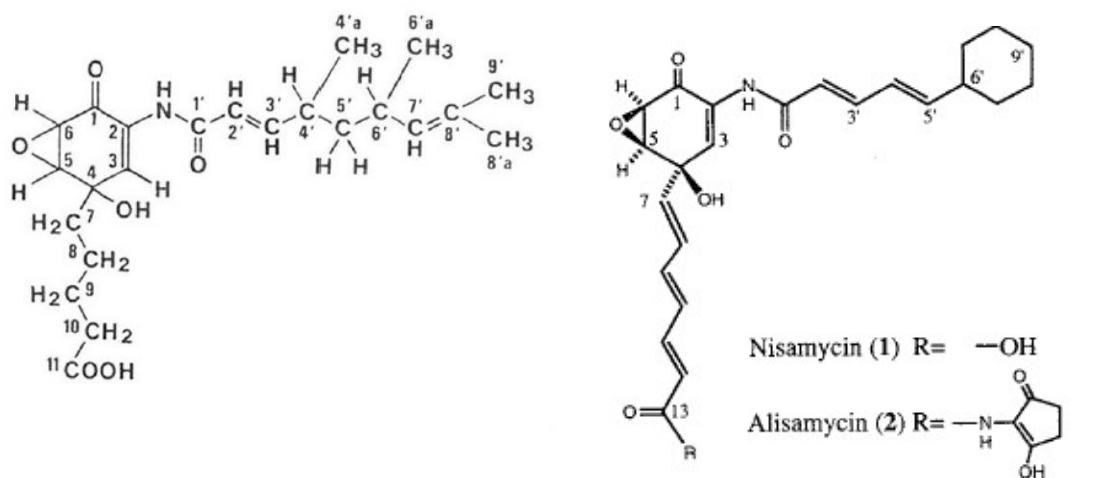
Nejcharakterističtější a zároveň nejvíce konzervovanou částí molekul manumycinových antibiotik je centrální 2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxycyklohex-2-enonová skupina, označovaná jako  $mC_7N$  (Obr. 2). Dle struktury  $mC_7N$  podjednotky se manumycinové látky rozdělují do skupin I a II. Manumyciny typu I mají v poloze C5/C6 epoxidovou (oxiranovou) skupinu, zatímco manumyciny typu II mají pouze hydroxylovou skupinu v poloze C5 (Obr. 3). Spodní řetězec je další konzervovanou strukturou manumycinových látek. Zpravidla se skládá z trans-trienového řetězce. Výjimku tvoří colabomycin A a D (Obr. 3), ty mají řetězec tetraenový a U-62162 (Obr. 4), který má ve spodním řetězci mezi uhlíkovými atomy pouze jednoduché vazby (Grote *et al.* 1988a; Slechta *et al.* 1982). Spodní řetězec je zpravidla zakončený  $C_5N$  podjednotkou (2-amino-3-hydroxycyclopentenonová skupina), která je další velmi konzervovanou skupinou manumycinových látek.  $C_5N$  podjednotku obsahuje většina manumycinových látek, kromě nisamycinu, U-62162 (Obr. 4) a U-56407, které jsou zakončeny karboxylovou skupinou. (Hayashi *et al.* 1994a; Slechta *et al.* 1982; Brodasky *et al.* 1983)



Obr. 2: Struktura manumycinu A a asukamycinu. Umístění  $mC_7N$  a  $C_5N$  podjednotky. Převzato z Sattler *et al.* 1997.



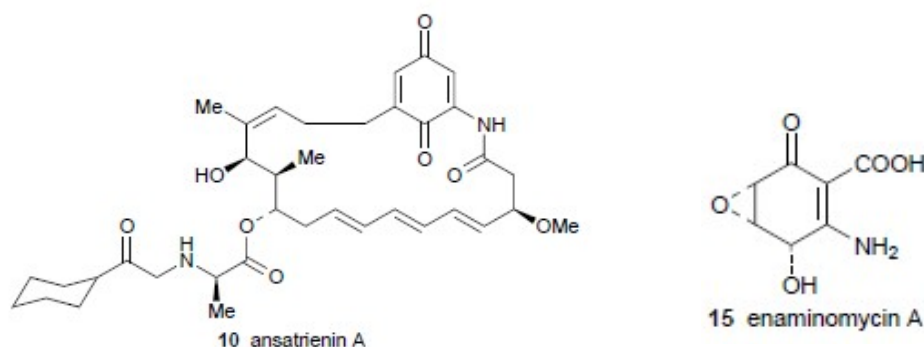
Obr. 3: Rozdíly mezi manumycinu typu I a II – colabomycin A a colabomycin D. Převzato z Grote *et al.* 1988a a Wei *et al.* 1999.



Obr. 4: Manumycinové látky bez  $C_5N$  podjednotky – U 62162 a nisamycin. Převzato z Slechta *et al.* 1981 a Hayashi *et al.* 1994.

Horní řetězec je nejméně konzervovanou částí manumycinových antibiotik, a tudíž je hlavním zdrojem rozmanitosti látek v celé skupině (poloha dvojných vazeb, délka, methylace atd.). Skládá se zpravidla z nenasycených mastných kyselin obsahujících od jedné (např. manumycin B, EI-1625-2) do pěti (colabomycin E) dvojných vazeb, přičemž uhlíky mohou být methylovány. Horní řetězec je zakončen nasycenou alifatickou nebo alicyklickou skupinou v rozmezí methylu až větveného hexanu či cyklohexanu (Sattler *et al.* 1998). Dle povahy horního řetězce se manumycinová antibiotika dále rozdělují do skupin A, B (popř. C). Do skupiny A se řadí manumycinové látky s lineárním horním řetězcem, zatímco do skupiny B látky s větveným (methylovaným) horním řetězcem. Do skupiny C potom zařazujeme látky se saturovaným spodním řetězcem. Při použití obou klasifikací potom rozlišujeme manumyciny na skupinu IA, kam řadíme asukamycin, alisamycin, colabomycin A, manumycin E, F, G, nisamicin a U-56407, dále typ IIA kam řadíme colabomycin D. Do skupiny IB řadíme manumycin A, B a C a do skupiny IIB manumycin D, TMC-1A, 1B, 1C. Do skupiny IC potom řadíme U-62162.

Strukturně nejbližší látky, které se podobají manumycinovým antibiotikům jsou především ansamyciny (např. ansatrienin A). Ansamyciny také obsahují  $mC_7N$  podjednotku. Existují také malé látky podobné manumycinovým antibiotikům tvořené bakteriemi rodu *Streptomyces*, které však postrádají  $C_5N$  skupinu i oba řetězce, jako je například MM-14201 nebo enaminomycin A (Obr. 5). Dalšími podobnými látkami je například epoxydon, sekundární metabolit produkovaný houbami nebo aranorosin, produkované druhem *Pseudoarachniotus*. (Sattler *et al.* 1998).



Obr. 5: Látky strukturně podobné manumycinovým antibiotikům- ansatrienin A ze skupiny ansamycinů a enaminomycin A. Převzato z Sattler *et al.* 1998.

### 3.3. Biologická aktivita manumycinových antibiotik

Manumycinové látky typu I, jako jsou manumycin A, asukamycin, U-56407, U-62162, Manumycin E, F, G, colabomycin A, alisamycin, nisamicin, EI-1511-3, EI-1511-5, EI-1625-2 vykazují antimikrobiální aktivitu vůči gram pozitivním bakteriím typu *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis* a *Bacillus subtilis*. Naopak nejsou aktivní vůči gram negativním bakteriím (Thiericke *et al.* 1987; Omura *et al.* 1976; Brodasky *et al.* 1983; Slechta *et al.* 1982; Shu *et al.* 1994; Grote *et al.* 1998b; Franco *et al.* 1991; Hayashi *et al.* 1994b; Tanaka *et al.* 1996). Pouze u manumycinu E, F, G byla pozorována slabá aktivita vůči gram negativní bakterii *Escherichia coli*. (Shu *et al.* 1994). Manumycinové látky typu II: TMC I A, B, C, D a manumycin D, které postrádají epoxydovou skupinu na  $mC_7N$  podjednotce

nevykazují žádnou antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům ani při koncentraci 100 µg/ml (Kohno *et al.* 1996). To ukazuje na skutečnost, že pro antimikrobiální aktivitu látky je esenciální přítomnost této epoxydové skupiny na  $mC_7N$  podjednotce.

Některé manumycinové metabolity vykazují také antimykotickou aktivitu: Manumycin A (Thiericke *et al.* 1987) a alisamycin (Franco *et al.* 1991) vůči *Candida albicans*, asukamycin proti *Trychophyton mentagrophyces* (Omura *et al.* 1976). Další slabší antimykotické účinky byly také pozorovány u nisamycinu (Hayashi *et al.* 1994b), či colabomycinu A (Grote *et al.* 1988b).

U asukamycinu byla také pozorována antikocidiální aktivita. Asukamycin podávaný čtyři dny starým kuřatům nakažených kokcií *Eimeria tenella* dokázal výrazně snížit jejich mortalitu (Omura *et al.* 1976).

V laboratorních i terénních testech byl pozorován insekticidní účinek manumycinu A vůči hmyzu ze skupiny *Lepidoptera* a *Coleoptera*. Dobrých výsledků bylo dosaženo sprejováním vajíček a larev *Pieris brassicae* a *Epilachna varietis* roztokem manumycinu A o nízké koncentraci (0,05 %) (Thiericke *et al.* 1987).

U některých manumycinových antibiotik byla pozorována inhibice Ras-specifické farnesyltransferázy (Hara *et al.* 1993). Ras proteiny jsou malé transmembránové G-proteiny, které se uplatňují při kontrole a regulaci buněčného růstu a dělení. Ras protein je výrazně posttranslačně modifikován. Nejprve dochází k farnesylaci cysteinového zbytku na jeho C-konci. Po této farnesylaci dojde k proteolytickému odštěpení tří koncových aminokyselin a nově vzniklý farnesyl-cysteinový zbytek je methylován. Takto modifikovaný Ras protein se může zakotvit do membrány a být funkční (Goodman *et al.* 1990). V aktivovaném stavu s navázaným GTP spouští kaskádu signálů, jejímž výsledkem je dělení a diferenciací buňky. Pokud je ve stavu inaktivním, s navázaným GDP, jsou tyto procesy zastaveny. Mutantní Ras protein není schopný hydrolyzovat GTP a zůstává tudíž neustále v aktivovaném stavu, což vede k nekontrolovatelnému dělení buňky a vzniku nádoru (Der *et al.* 1991; Gibbs *et al.* 1994; Tamanoi 1993). Předpokládá se, že mutace v RAS genech je zodpovědná za 20% všech nádorů, 90% nádorů pankreatu a více než 50% nádorů tlustého střeva (Gibbs *et al.* 1994). K tomu aby byl Ras protein aktivní, musí projít celou řadou posttranslačních modifikací a být ukotven do membrány. Ras farnesyltransferáza, která katalyzuje jeden z kroků posttranslační modifikace, se tedy jeví jako velmi nadějný cíl nádorové léčby. Pokud je Ras farnesyltransferáza inhibována, je Ras protein fyzicky oddělen od signální dráhy vedoucí k buněčné proliferaci a dochází k zastavení nádorového růstu. Inhibice Ras farnesyltransferázy byla pozorována u manumycinu A, B, C. Nejlepší aktivitu vykazuje jednoznačně manumycin A. Jeho další velkou výhodou je, že je takřka neaktivní vůči geranylgeranyl transferáze, která je fyziologicky používána k modifikacím řady proteinů v buňce. Tím má celkově nižší toxicitu než ostatní zkoumané látky s touto inhibiční aktivitou (Hara *et al.* 1993). Důležitou součástí molekuly při inhibici je epoxydovaná  $mC_7N$  podjednotka. Horní řetězec přispívá k této aktivitě pravděpodobně svojí podobností s methylovaným řetězcem farnesylpyrofosfátu. Spodní řetězec a  $C_5N$  podjednotka nejsou pro inhibici důležité (Hu 2000). Poslední výzkumy ukazují, že protinádorová aktivita manumycinu A nezávisí pouze na inhibici Ras farnesyltransferázy. Manumycin A je také schopný indukovat tvorbu ROS (kyslíkových radikálů) v nádorových buňkách, což vede k aktivaci kaspázové kaskády a apoptotické smrti nádorové buňky (Sears *et al.* 2008).

Některé manumycinové látky také vykazují přímou cytotoxickou in-vitro aktivitu vůči různým nádorovým buňkám. U manumycinu A a colabomycinu A byly popsány cytotoxické účinky na buňky myší leukémie L-1210 (Thiericke *et al.* 1987, Grote *et al.* 1988b). Manumycin E, F a G vykazuje slabou cytotoxicitu na buňky lidského karcinomu tlustého střeva (linie HCT-116) (Shu *et al.* 1994). TMC A, B, C, D a manumycin D inhibují

proliferaci buněk karcinomu a adenokarcinomu tlustého střeva, ovariálního adenokarcinomu, osteogenního sarkomu, promyeloidní leukémie, epiteloidního karcinomu či myších lymfoidních novotvarů (Kohno *et al.* 1996).

Další účinky vykazované některými zástupci z rodiny manumycinových antibiotik jsou například inhibice některých enzymů. U EI-1511-3, -5, EI-1625-2, alisamycinu, *ent*-alisamycinu, manumycinu B, C, G a U-56407 byla popsána aktivita při inhibici interleukin-1 $\beta$ -konverujícího enzymu (ICE). To je předurčuje jako potencionální protizánětlivé prostředky. Interleukin-1 (IL-1) je sekretovaný primárně aktivovanými monocyty nebo makrofágy při akutním či chronickém zánětu. Existuje ve dvou formách a sice IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , přičemž aktivní forma cytokinu (IL-1 $\beta$ ) vzniká proteolytickým štěpením IL-1 $\alpha$  právě katalýzou ICE (Tanaka *et al.* 1996). Další protizánětlivou aktivitou, kterou vykazuje manumycin A, je inhibice IKK kinázy. IKK kináza se skládá ze tří proteinů: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a IKK $\gamma$ . Při indukci cytokinem (TNF $\alpha$  a IL 1) se IKK aktivuje a fosforyluje transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který je důležitý pro kontrolu tvorby zánětu a onkogeneze. Manumycin A inhibuje aktivitu IKK $\beta$ , což vede k přerušení celé signální kaskády (Bernier *et al.* 2006).

Pozorovanou aktivitou manumycinu A je také inhibice nSMase (neutrální sfingomyelináza). Ta je zodpovědná za hydrolýzu sfingeomyelinu. Jejím produktem je ceramid, který funguje jako druhý posel při aktivaci enzymu BACE1 ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme). Aktivovaný BACE1 katalyzuje proteolýzu proteinu APP (amyloid precursor protein), ze kterého tak vzniká A $\beta$  (amyloid  $\beta$ - peptid), který se hromadí v mozku při Alzheimerově chorobě a je jeden z příčin vznikající demence. Manumycin A by se tedy mohl stát také účinnou látkou v léčbě Alzheimerovy choroby (Constantini *et al.* 2005).

## 4. Biosyntéza polyketidů

### 4.1. Biosyntéza polyketidových metabolitů

Polyketidy jsou syntetizované enzymem polyketidsyntázou (PKS), přičemž postup reakce je velmi podobný syntéze mastných kyselin. Ty jsou syntetizovány syntázou mastných kyselin (FAS). PKS i FAS katalyzují v opakujícím se cyklu dekarboxylativní kondenzaci různých acyl-CoA substrátů za vzniku dlouhého acylového řetězce (polyketid nebo mastná kyselina). FAS a PKS se od sebe liší ve dvou hlavních bodech. FAS využívá pro iniciaci především acetát, zředka i jiné podjednotky. Pro další prodlužování používá výhradně malonátové jednotky, zatímco PKS systémy mohou k iniciaci použít různé látky a stejně tak mohou i v elongačních cyklech použít jiné prekurzory (Simpson 1985). Každá podjednotka malonátu nese na svém  $\beta$ -uhlíku atom kyslíku, který je však v konečném produktu FAS odstraněn. Odstranění kyslíku probíhá součtem tří reakcí po každém připojení malonátu: ketoredukce (na hydroxyl), dehydratace (odstranění kyslíku) a další redukce vedoucí k saturaci řetězce. U syntézy polyketidů mohou být tyto kroky zcela vynechány nebo mohou proběhnout jen některé (např. jen ketoredukce). Ve finálním produktu mohou být tedy na uhlících navázané alkylové, enoylové, keto nebo hydroxylové skupiny (Bibb *et al.* 1989). V každém kroku elongace se tedy volí mezi těmito různými modifikacemi jejímž výsledkem je obrovská rozmanitost finálních látek.

Jeden elongační cyklus zahrnuje rozeznání substrátu, jeho transfer na PKS nebo FAS enzym a formace C-C vazby. Celý proces zajišťují tři proteiny nebo proteinové domény. V PKS systému jsou souhrně označovány jako minimální PKS a obsahují: ketosyntázu (KS), acyltransferázu (AT) a acyl carrier protein (ACP) (Bohm *et al.* 1998). Předtím než může syntéza začít, ACP protein je posttranslačně modifikován a konvertován z neaktivní apo formy do aktivní holo formy. To je zajištěno fosfopantetheinyl transferázou (PPTasa), která připojí fosfopanteteinovou skupinu odvozenou od koenzymu A na specifický serinový zbytek na ACP (Walsh *et al.* 1997). Navázání fosfopanteteinu umožňuje navázat substrát skrze thioesterovou vazbu. Biosyntéza začíná acyltransferázou, která je schopna rozeznat vhodný substrát a přenést ho na fosfopanteteinovou skupinu ACP. Vzniká tak substrát-S-ACP. Jakmile je substrát navázán na ACP, začíná ketosyntáza katalyzovat dekarboxylaci substrát-S-ACP a formovat C-C vazbu mezi novým prekurzorem a rostoucím polyketidovým řetězcem (Bibb *et al.* 1989). Během skládání, kdy je rostoucí řetězec upoutaný k ACP, může proběhnout spousta modifikací, které jsou zajištěny přídatnými enzymy nebo enzymovými doménami: Ketoreduktázy, dehydratázy, enoyl reduktázy, cyklázy či aromatazy (Zhang *et al.* 2009). Jakmile je polyketidový řetězec uvolněn z enzymu, může být dále modifikován např. glykosylací, methylací, oxidací, atd. pomocí tzv. „tailoring“ enzymů (Weissman 2009).

Samotná PKS může mít několik forem. Buďto pracuje jako jeden multidoméno-  
vý protein, tyto enzymy potom souborně označujeme jako polyketidsyntázy typu I (PKS I) nebo existuje ve formě několika menších monofunkčních proteinů. Takový enzym potom označujeme jako polyketidsyntázu typu II (PKS II) (Sherman *et al.* 1989).

### 4.2. PKS I

PKS typu I, jinak nazývané také modulární PKS, se účastní např. biosyntézy makrolidového antibiotika erythromycinu. Jedná se zpravidla o velký multimodulární enzym o velikosti cca 200-2000 kDa, ve kterém lze rozeznat jednotlivé moduly (acyltransferázy,

ACP, ketosyntázy), které odpovídají za konkrétní kroky polyketidové syntézy (Cane *et al.* 1999). Obvykle používaným prekurzorem pro PKS I systém je malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA a vzácně ethylmalonyl-CoA. Větší diverzitu prekurzorů pozorujeme u iniciace syntézy. Zde může být použit acetyl-CoA, propionyl-CoA, butyryl-CoA, benzoyl-CoA nebo i další -CoA (Weisman *et al.* 2004). Rozdílné moduly u mnoha PKS I mají na svém N nebo C konci krátké, nekonzervované aminokyselinové zbytky. Tyto zbytky zde fungují jako interpolypeptidové linkery. Spojují dva přilehlé PKS proteiny a umožňují tak sestavení multi-PKS komplexu. Bylo prokázáno, že tyto linkery jsou jednou z rozhodujících složek pro vlastní fungování PKS systému. Linkery jsou skupinou zhruba 80-130 AK na C konci, které interagují s 30-50 AK na N konci (Tsuji *et al.* 2001a; Tsuji *et al.* 2001b). Díky tomu, že sekvence PKS I je poměrně konzervovaná napříč organismy a existuje poměrně jasná spojitost mezi sekvencí polypeptidu PKS I a pořadím reakcí, lze poměrně dobře predikovat počet a typ domén výsledného enzymu. Celkově potom z pořadí AT (acyltransferáz) domén a vzhledu jejich aktivních míst lze predikovat prekurzor, který bude vložen a tím také celkovou strukturu výsledné látky.

### 4.3. PKS II

PKS typu II syntetizuje typicky aromatické látky, jako jsou např. tetracykliny, ale uplatňují se také právě v syntéze lineárních manumycinových řetězců. Na rozdíl od PKS I jsou enzymové aktivity rozloženy do jednotlivých polypeptidů s rozdělenými enzymatickými aktivitami. Tyto enzymy jsou zpravidla jedno až vícefunkční proteiny, z nichž každý nese jednu, či dvě enzymové aktivity (Hertweck *et al.* 2007). Tyto jednotlivé proteiny přechodně interagují a jsou používány opakovaně (iterativně) během celé biosyntézy. Minimální PKS typu II obsahuje: ketosyntázu (KS $\alpha$ ), tzv. „chain length factor“ (CLF, nazýván KS $\beta$ ), které jsou odpovědné za kondenzační reakci, a dále ACP. K nim mohou být dále přidruženy další enzymy, jako jsou cyklázy, ketoreduktázy či aromatázy. Ty spolupracují s minimální PKS a určují konečnou strukturu látky. (Weissman 2009). AT, která je u PKS I zodpovědná za volbu prekurzoru a její vazbu na ACP, ve shluku genů pro PKS II někdy může zcela chybět. Bylo dokázáno, že PKS systém typu II může také použít malonyl-CoA acyltransferázu kódovanou syntázou mastných kyselin (FAS) (Summers *et al.* 1995). Další rozdíl v PKS I a II je ve výběru prekurzoru. Jediný dosud známý prekurzor používaný PKS II je malonyl-CoA, což je také jediný prekurzor používaný FAS, proto se zde objevuje možnost využívat malonyl-CoA acyltransferázu FAS. Minimální PKS II opět spolupracuje s „tailoring“ enzymy, které modifikují vzniklý řetězec. Podjednotky PKS II se při tvorbě polyketidového řetězce uplatňují opakovaně a díky tomu je velmi těžké předvídat výslednou strukturu pouze na základě *in silico* analýzy biosyntetických genů (Hertweck *et al.* 2007).

### 4.4. PKS III (Chalkon syntáza)

Kromě typických enzymů polyketidových syntéz (PKS I a II) existuje ještě PKS typu III. Původně se předpokládalo, že se tento enzym uplatňuje pouze v rostlinách při syntéze chalkonu, esenciálního metabolitu antokyanových pigmentů nebo flavonoidů (Austin *et al.* 2003), ale později se ukázalo, že obdobné enzymy lze najít také v bakteriích nebo houbách. PKS III je relativně malý protein (40-47 kDa), který funguje jako homodimerní iterativní PKS. Substrát pro PKS typu III je obvykle malonyl-CoA, který je postupně kondenzován v tetraketidový intermediát, který je později cyklizovaný a modifikovaný specificky dle každé

syntázy (Tropf *et al.* 1995). Obě reakce – kondenzace i cyklizace je prováděna v jednom aktivním místě enzymu (Austin *et Noel* 2003). Oproti PKS I a II také nepoužívá PKS III ACP k aktivaci a přenos substrátu, ale začíná syntézu přímo na acyl-CoA (Shen 2003).

#### 4.5. Hybridní PKS – NRPS

NRPS (Non-Ribozomal Peptid Synthase) je velký multienzymatický polypeptid katalyzující kondenzaci různých AK v peptidech za spotřeby ATP. Touto cestou například vznikají antimikrobiální látky jako gramicidin a další sekundární metabolity. Hybridy jsou látky vzniklé spolupůsobením PKS a NRPS enzymů. Tento hybridní systém byl objeven v aktinomycetách (biosyntéza bleomycinu u producenta *Streptomyces verticillus*) nebo v myxobakteriích (myxothiazol u producenta *Stigmatella aurantiaca*). PKS-NRPS systémy jsou intenzivně studovány, protože nabízí další možnost při výrobě nových hybridních sloučenin (Du *et al.* 2001).

## 5. Biosyntéza manumycinových antibiotik

### 5.1. Biosyntéza $mC_7N$ podjednotky

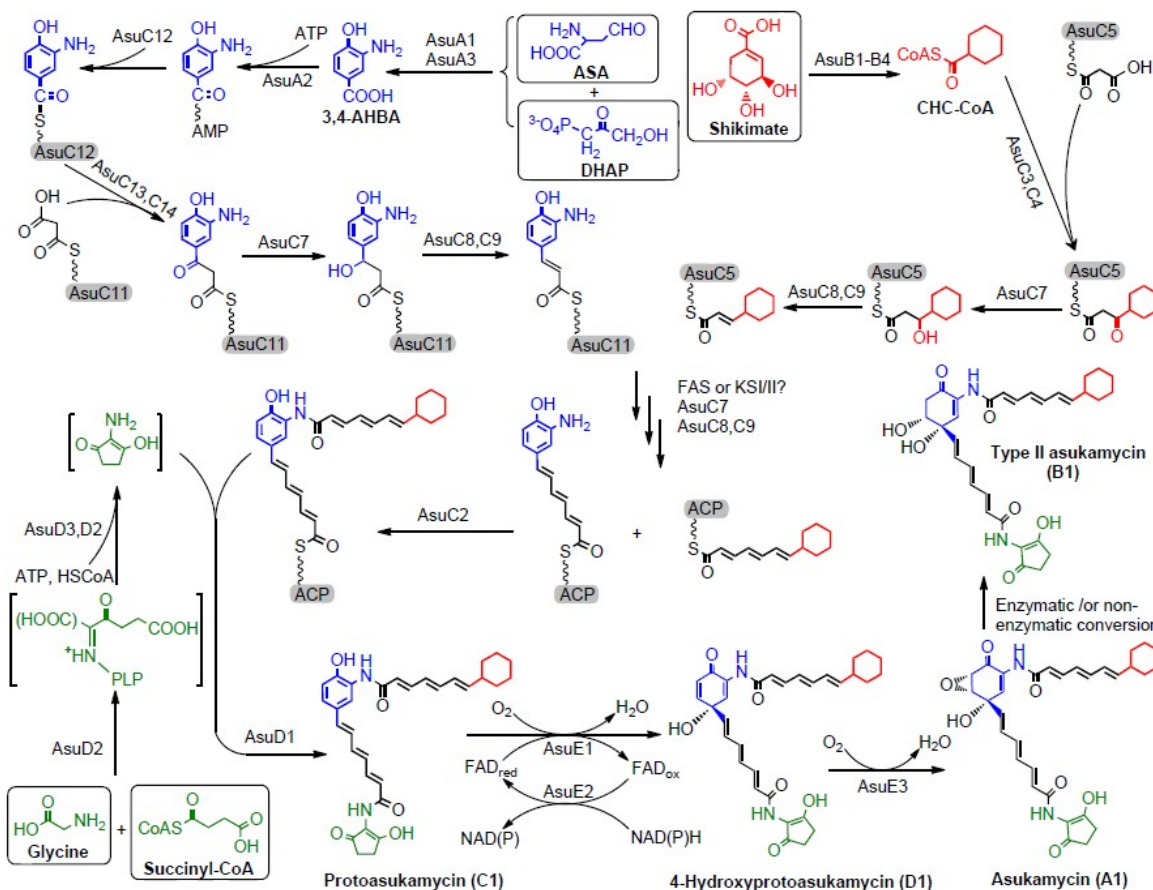
Biosyntéza manumycinových antibiotik byla nejlépe prostudována u manumycinu A (producenta *Streptomyces parvulus* Tü64) a asukamycinu (producenta *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*). Základem výzkumu byly především experimenty s radioaktivně značenými prekurzory a sledování jejich inkorporace do konečného produktu.

$mC_7N$  podjednotka (2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxycyklohex-2-enonová skupina) je strukturou typickou pro všechny zástupce manumycinových antibiotik (Obr. 1). Funguje také jako startovací jednotka pro syntézu spodního polyketidového řetězce. Strukturálně podobnou jednotku obsahují také například ansatrienin, rifamycin, či v aromatické podobě například pactamycin. Původně se dokonce předpokládalo, že manumycinové látky jsou skupinou ansamycinů s nekompletním řetězcem. Toto bylo později vyvráceno díky skutečnosti, že  $mC_7N$  podjednotka u manumycinových látek vzniká jinou dráhou než je tomu u ansamycinů (viz. kapitola 6.).  $mC_7N$  podjednotka manumycinových antibiotik vzniká v přírodě ojedinělou dráhou. Hlavním prekurzorem  $mC_7N$  podjednotky je 3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina (3,4-AHBA). Ta vzniká kondenzací a následnou cyklizací čtyřuhlíkaté podjednotky pocházející z Krebsova cyklu (1-aspartát-4-semialdehyd) a tříuhlíkaté podjednotky odvozené od cukru-triosy, kterou je dihydroxyaceton nebo jeho fosfát (Obr. 6) (Thiericke *et al.* 1990; Ohnishi *et al.* 2006). Epoxydová skupina, která se připojuje k hotové 3,4-AHBA je připojena v případě manumycinu A i asukamycinu ve dvou krocích pomocí monoxygenázy, přičemž připojovaný kyslík pochází z atmosférického kyslíku (Thiericke *et al.* 1989). Tak vznikají manumyciny typu I. Produkci manumycinů typu II vždy provází produkce alespoň malého množství nějakého manumycinu typu I. Bylo tedy usouzeno, že manumyciny typu II vznikají následnou úpravou homologní látky typu I. Tato deoxygenace může patrně probíhat enzymatickou nebo samovolnou konverzí (Hu 2000, Petříček *et al.* 2010).

### 5.2. Biosyntéza spodního řetězce a $C_5N$ podjednotky

Biosyntéza spodního řetězce probíhá ve dvou krocích. Za prvé je to iniciace startovací podjednotky, kterou je pro spodní řetězec 3,4-AHBA. Ta je navázána na ACP a konvertována na thioester-CoA. Za druhé je to vlastní polyketidová kondenzační reakce. Při ní jsou v postupných kondenzačních reakcích připojeny tři malonyl-CoA. (Thiericke *et al.* 1990). To platí pro manumycin A, asukamycin a většinu zbylých manumycinových látek. Jinou biosyntézou prochází tetraenový spodní řetězec colabomycinu nebo saturovaný spodní řetězec U-62162.

$C_5N$  podjednotka je velice konzervovanou skupinou a je obsažena ve většině manumycinových látek. Tuto podjednotku obsahují i některé další přírodní látky, jako je např. reductionimycin nebo moenomycin.  $C_5N$  podjednotka vzniká z kyseliny 5-aminolevulové. Při experimentech s radioaktivně značeným glycinem a sukcinátem bylo jasně ukázáno, že tyto látky stojí v roli stavebních kamenů. Kyselina 5-aminolevulová je tedy syntetizována ze sukcinyl-CoA a glycinu 5-aminolevulinát syntázou (Obr. 6) (Nakagawa *et al.* 1985; Thiericke *et al.* 1990; Petříček *et al.* 2006).



Obr. 6: Biosyntetická dráha asukamycinu a geny kódující jednotlivé enzymy. Převzato z Petříček *et al.* 2010.

### 5.3. Biosyntéza horního řetězce

Horní řetězec je nejvíce proměnlivou složkou manumycinových látek a je také největším zdrojem různorodosti látek této skupiny. Produkce manumycinového metabolitu je často v jednom organismu doprovázena tvorbou dalšího metabolitu, který se liší pouze strukturou horního řetězce, jako je tomu např. u *Streptomyces parvulus* Tü64, kdy vzniká vedle manumycinu A i malé množství manumycinu B a C (Sattler *et al.* 1993) nebo například u *Streptomyces* sp. WB-8376, kdy vzniká najednou manumycin E, F a G (Shu *et al.* 1994) a u mnoha dalších. Biosyntéza řetězce probíhá klasickou polyketidovou syntézou, stejně jako u spodního řetězce. K iniciaci syntézy horního polyketidového řetězce u manumycinu A slouží acetyl-CoA a je prodlužován připojením jednoho malonyl-CoA a tří methylmalonyl-CoA v elongačních krocích. Horní řetězec asukamycinu je iniciován startovací jednotkou obsahující cyklohexanový kruh a ta je elongována třemi malonyl-CoA. Startovací jednotka a přilehlý uhlík je odvozena od cyklohexankarboxylové kyseliny, který pochází ze šikimátové dráhy (Obr. 6) (Thiericke *et al.* 1990).

### 5.4. Časování biosyntézy manumycinových antibiotik a poslední úpravy

Biosyntézu manumycinových látek lze pomyslně rozdělit na tři hlavní dráhy. Za prvé je to biosyntéza  $mC_7N$  podjednotky a následné nasyntetizování spodního polyketidového

řetězce. Druhou částí je zformování  $C_5N$  podjednotky a poslední dráhou je zformování startovací jednotky pro horní řetězec (např. cyklohexanová startovací jednotka pro asukamycin, acetyl-CoA pro manumycin). Po vytvoření spodního řetězce dojde nejprve k připojení horního řetězce. Potom se připojí  $C_5N$  podjednotka a posledním krokem biosyntézy je dvoukroková monooxygenace, která epoxyduje  $mC_7N$  skupinu (Hu 2000; Petříček *et al.* 2010; Hu *et al.* 2004). Tak vznikají manumyciny typu I. Ty mohou následně přejít v typ II samovolnou, či enzymatickou redukcí.

## 6. Analýza biosyntetických drah manumycinových látek

### 6.1. Techniky využívající značených prekurzorů

V minulosti se pro analýzy biosyntetických drah používaly takřka výhradně techniky využívající radioaktivní, či jiné značení molekul. V těchto technikách se nabízí produkujícímu organismu značená látka (nejčastěji  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  nebo deuteriem), která by mohla být předpokládaným prekurzorem pro danou biosyntetickou dráhu a sleduje se následně její inkorporace ve finálním produktu. Často se začíná jednoduchými látkami (např. acetát), u kterých se předpokládá složení do složitějších struktur, které jsou již konkrétními prekurzory pro biosyntézu dané sloučeniny. Touto technikou byl například objasněn původ  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotky u manumycinových antibiotik (Gould *et al.* 1996, Hu 2000).

$m\text{C}_7\text{N}$  podjednotku nebo její homolog obsahují i jiné látky, jako je například ansatrienin a rifamycin. U těch bylo z předchozích výzkumů známo, že prekurzorem jejich  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotky je 3-amino-5-hydroxybenzoová kyselina (3,5-AHBA), která pochází ze šikimátové dráhy (Kim *et al.* 1996). Další látkou, která obsahuje  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotku je akarabóza. V tomto případě je jejím prekurzorem sedoheptulóza-7-fosfát, která pochází z fosfát pentózové dráhy (Mahmud *et al.* 1999; Mahmud *et al.* 2001). Nabízela se tedy domněnka, že  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotka manumycinových antibiotik by mohla také pocházet z jedné z těchto drah. Pokud však byly tyto prekurzory označeny a nabídnuty producentům manumycinu A a asukamycinu, nedošlo k jejich inkorporaci. To potvrdilo jednak, že tyto látky nejsou prekurzory  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotky pro manumycinové látky, ale také to, že manumyciny jsou samostatnou skupinou látek a nejedná se tedy o ansamyciny s porušeným či chybějícím řetězcem, jak bylo původně navrhováno (Thiericke *et al.* 1990).

Další látkou se strukturou podobnou  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotce, byl murayaanthrachinon producenta *Streptomyces murayamaensis*. Jejím prekurzorem je 3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina (3,4-AHBA). Značená 3,4-AHBA byla tedy nabídnuta producentům manumycinu A a asukamycinu a byla jimi v obou případech úspěšně inkorporována do molekuly manumycinu i asukamycinu. Tím bylo potvrzeno, že prekurzorem  $m\text{C}_7\text{N}$  podjednotky je právě 3,4-AHBA (Gould *et al.* 1996; Hu 2000).

### 6.2. Mutační analýza

Techniky využívající značených prekurzorů sice vedou k poměrně jasným výsledkům, jedná se však o metody časově zdlouhavé a při použití radioaktivních značení i značně technicky náročné.

S rozvojem molekulárně biologických technik, genového inženýrství a také s možností sekvenace DNA bylo možno využít těchto poznatků pro efektivnější zkoumání biosyntetických drah. Technika mutační analýzy spočívá v izolaci genového shluku pro daný metabolit. Že se jedná skutečně o geny zodpovědné za syntézu daného metabolitu může být ověřeno např. heterologní expresí v příbuzném organismu, který není producentem této látky. Tento shluk genů je následně osekvenován a sekvence jsou porovnány na základě strukturálních podobností s geny z jiných organismů v databázi. Takovým vyhledávačem je například BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který umožňuje najít geny kódující proteiny se stejnou nebo podobnou funkcí v jiném organismu (Altschul *et al.* 1990). Tím můžeme přiřadit

ke každému genu a jeho produktu jeho pravděpodobnou funkci (např. ACP, acyltransferáza, ketosyntáza atd.). Pokud máme přiřazeny funkce k jednotlivým genům, můžeme také přibližně usoudit, ve které části biosyntetické dráhy se konkrétní enzymatická aktivita bude vyskytovat. S touto znalostí jsou následně prováděny mutace v jednotlivých genech biosyntetické dráhy a následně jsou sledovány změny ve výsledném produktu. V některých případech stačí k zablokování funkce genu pouze bodová mutace, jak bylo provedeno např. u 5-aminolevulinát syntázy při syntéze C<sub>5</sub>N podjednotky asukamycinu (Petříček *et al.* 2010). Většinou je však výhodnější provést delecí celého genu nebo alespoň jeho velké části, abychom měli jistotu, že i jeho produkt nebude funkční. V tomto případě se musí počítat s možností, že takto upravený gen může ovlivňovat expresi okolních genů (tzv. polární efekt). Ideálně se tedy provádí *in-frame* delecce, ze zachováním krátké sekvence začátku a konce genu původního. Tím se minimalizuje možnost ovlivnění genů okolních. Takto upravená genetická informace se vloží do produkujícího organismu mechanismem homologní rekombinace DNA. Ta způsobí výměnu *wt* alely genu za mutantní. Mutantní kmen je následně podroben analýze. Nejčastěji používanými technikami v následných analýzách je HPLC (High Performance Liquid Chromatography), LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) a NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Z analytických dat získáme informace o produkovaných metabolitech a jejich intermediátech. Tuto techniku lze popsat na příkladu provedené mutační analýzy asukamycinu. Zde byla provedena mutace v genu *asuC13*. Ten ukazoval při srovnání s databází velkou podobnost s KS. Bylo proto předpokládáno, že se podílí na syntéze jednoho z řetězců. Výsledkem porušení tohoto genu bylo zastavení produkce asukamycinu a v mutantu se hromadila 3,4-AHBA, horní řetězec a C<sub>5</sub>N podjednotka. To potvrdilo, že gen *asuC13* je skutečně zodpovědný za syntézu spodního polyketidového řetězce a také to, že k připojení horního řetězce k mC<sub>7</sub>N podjednotce musí být nejprve nasynthetizován řetězec spodní. Kromě těchto produktů se objevily také v malém množství produkty zcela nové. Ty vznikly spojením C<sub>5</sub>N podjednotky přímo s horním řetězcem (Petříček *et al.* 2010).

Mutační analýzou nebyla však popsána pouze biosyntéza asukamycinu. Je základní technikou studia biosyntézy sekundárních metabolitů. Byla použita také např. pro popsání biosyntetické dráhy moenomycinu (Ostash *et al.* 2009), biosyntézy bleomycinu (Galm *et al.* 2008) a mnoha dalších látek. Celkově nám tedy mutační analýza podává kompletní přehled o biosyntetické dráze daného metabolitu. Tyto informace mohou být dále použity např. v metodách kombinatorní biosyntézy či v jiných postupech vedoucích k vývoji nových bioaktivních látek.

### 6.3. Využití poznatků mutační analýzy při přípravě nových látek

V minulosti byly hlavním zdrojem nových látek screeningové metody. Spočívají v izolaci čisté kultury, její kultivaci a následné analýze všech produkovaných látek. Produkce metabolitů může být do jisté míry upravována kultivačními podmínkami, jako je teplota, pH, složení média, atd. Po objevu penicilinu byly použity např. pro objev streptomycinu či aureomycinu. Screeningovými metodami byla objevena také manumycinová antibiotika jako asukamycin, manumycin A a většina dalších. Po dlouhou dobu se screeningové metody omezily především na bakterie rodu *Streptomyces* a houby. Poslední dobou byla tato skupina organismů rozšířena též o mikroorganismy ze specifických biotopů, jako jsou např. hlubokomořské mikroorganismy či mikroorganismy z horkých pramenů a slaných jezer. K tomu také výrazně přispěl rozvoj kultivačních technik, které umožnily s těmito organismy pracovat v laboratorních podmínkách. Hlavní nevýhodou screeningových metod je velká časová i finanční náročnost výzkumu a po letech také „znovuobjevování“ již známých látek.

Další velkou nevýhodou je, že touto cestou lze objevit pouze látky, které jsou fyziologicky produkovány volně žijícími organismy, a nedá se cíleně vyhledávat látka s určitými biologickými aktivitami.

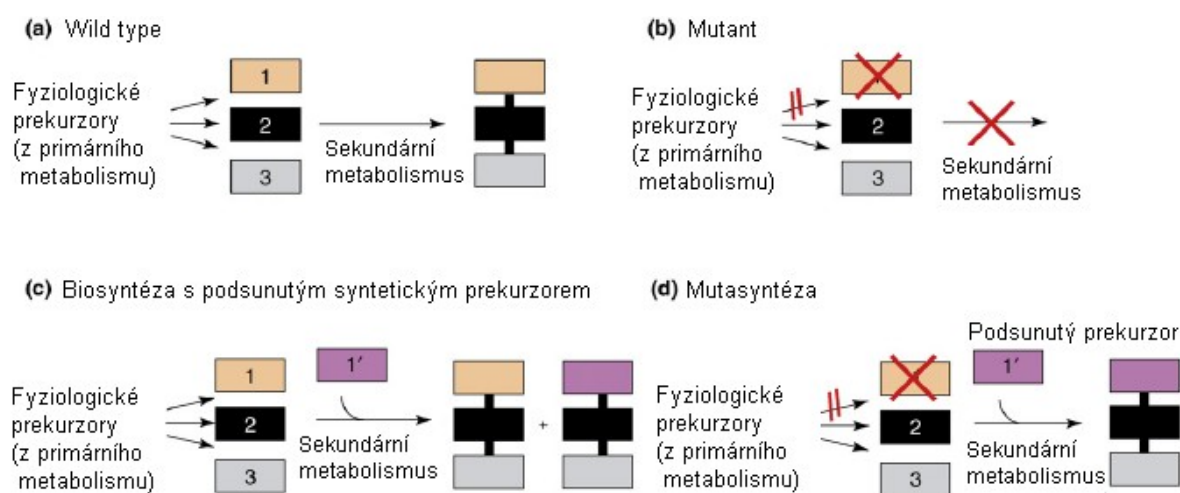
Na přelomu 80. a 90. let byla zavedena pro vývoj léků zcela nová metoda nazývaná kombinatorní chemická syntéza. Ta především umožnila pracovat najednou s ohromným množstvím sloučenin. Kombinatorní chemická syntéza spočívá ve vytvoření knihovny mnoha různých, ale přitom navzájem podobných látek. Toho lze dosáhnout postupnými reakcemi mezi dvěma, či více skupinami reaktantů. Všechny látky v jedné skupině mají stejný strukturní základ a liší se v tzv. bodech diverzity, což jsou vlastně různé substituenty na daných místech molekul. U všech látek vzniklé knihovny je následně provedena analýza jejich vlastností a jsou vybrány pouze látky s požadovanými biologickými aktivitami. K této analýze se nejčastěji využívá techniky HTC (High-Throughput Screening). HTC umožňuje stanovit v poměrně krátkém čase aktivitu různých chemických látek vůči mnoha biologickým cílům. Jedná se o automatizovanou metodu, která samostatně vyhodnocuje jednotlivé dílčí reakce a podává kompletní přehled o jednotlivých biologických aktivitách látek v celé knihovně. Metoda kombinatorní chemické syntézy je neustále často využívanou metodou farmaceutického průmyslu. Látky vzniklé čistou chemickou syntézou mají zpravidla lepší čistotu, jasně definovanou výrobu a nejsou ovlivňovány ostatními látkami organismu, což se může stát velkou výhodou při výzkumu a následných zkouškách nových léčiv. Ne všechny látky však lze vyrobit chemickou syntézou nebo je lze získat mnohem jednodušším způsobem za pomoci enzymových katalýz.

Znalost biosyntetických drah, které nám poskytují mutační analýzy, jsou nejlépe použitelné v metodě kombinatorní biosyntézy. Kombinatorní biosyntézu lze popsat jako užití metod genového inženýrství k vývoji modifikované finální látky, která může mít zcela jiné vlastnosti. Prvně byla použita pro výrobu hybridní látky mederhodinu A. To bylo provedeno přenesením genů ze *Streptomyces coelicolor* (producenta actinorhodinu) do producenta medermycinu. Ve výsledku syntetizoval hybridní kmen kromě medermycinu také velké množství nových analogů této látky (Hopwood *et al.* 1985). Tento experiment položil základ pro budoucí užívání kombinatorní biosyntézy ve výrobě nových bioaktivních látek. K současné kombinatorní biosyntéze existují v širším pojetí dva hlavní přístupy.

První přístup kombinatorní biosyntézy spočívá v podsouvání syntetických prekurzorů producentovi. Tento prekurzor musí být strukturně velmi podobný fyziologickému prekurzoru, aby mohlo dojít k jeho inkorporaci enzymem zodpovědným za biosyntézu daného metabolitu (např. methylované, hydroxylované nebo halogenované původní prekurzory). Nevýhodou je, že i při podání nového substrátu je obvykle fyziologický prekurzor používán s vyšší afinitou a tudíž vzniká jen malé procento látek s inkorporovaným syntetickým prekurzorem, popř. nevznikají vůbec. Často se tedy přistupuje k tzv. metodě mutasyntézy (Obr. 7), která je opět založena na metodách genového inženýrství. Pomocí mutace se inaktivuje gen, který je zodpovědný za syntézu fyziologického prekurzoru. Ten tedy není nadále syntetizován a vznikají pouze látky s inkorporovaným syntetickým prekurzorem. I tato drobná změna může dát finální molekule zcela novou biologickou aktivitu, či vylepšit tu stávající. Touto cestou byly například vyrobeny analogy protinádorové polyketidové látky rapamycinu, z nichž některé jsou dále zkoumány pro svoje eventuální využití v lékařství (Weissman 2007).

Druhým přístupem je změna biosyntetické dráhy pomocí metod genového inženýrství. Je změněn jeden nebo více genů v biosyntetickém shluku genů. Touto změnou je zpravidla nahrazen původního genu geny z jině biosyntetické dráhy, nejčastěji z jiného organismu. Někdy je také tento přístup označován jako biochemické (metabolické) inženýrství. Výsledkem je jeden nebo malé množství nových metabolitů. Právě tato metoda je s dobrými

výsledky používána pro vývoj nových látek ze skupiny polyketidů. S úspěchem bylo této kombinatorní biosyntézy použito například k modifikaci biosyntetické dráhy daunorubicinu a doxorubicinu, která vedla k přípravě nové protinádorové látky epirubicinu (Madduri *et al.* 1998). Dalším příkladem může být vývoj různých derivátů erythromycinu propojením genů z biosyntetické dráhy pro erythromycin a rapamycin. V tomto experimentu bylo vyrobeno více jak 100 nových analogů erythromycinu, z nichž některé jsou dále studovány pro jejich nové biologické aktivity (McDaniel *et al.* 1999). V případě manumycinových antibiotik by bylo do budoucna možno sestavit takový metabolit, který bude mít předem dané vlastnosti, jako je např. délka řetězců, jejich saturace, methylace, či další modifikace, epoxydace  $mC_7N$  podjednotky, přítomnost  $C_5N$  podjednotky atd. Kromě těchto modifikací lze přemýšlet i o nových a neobvyklých modifikacích, jako je například nahrazení kyslíku halogenem, nahrazení jednoho z řetězců zcela jinou strukturou atd.

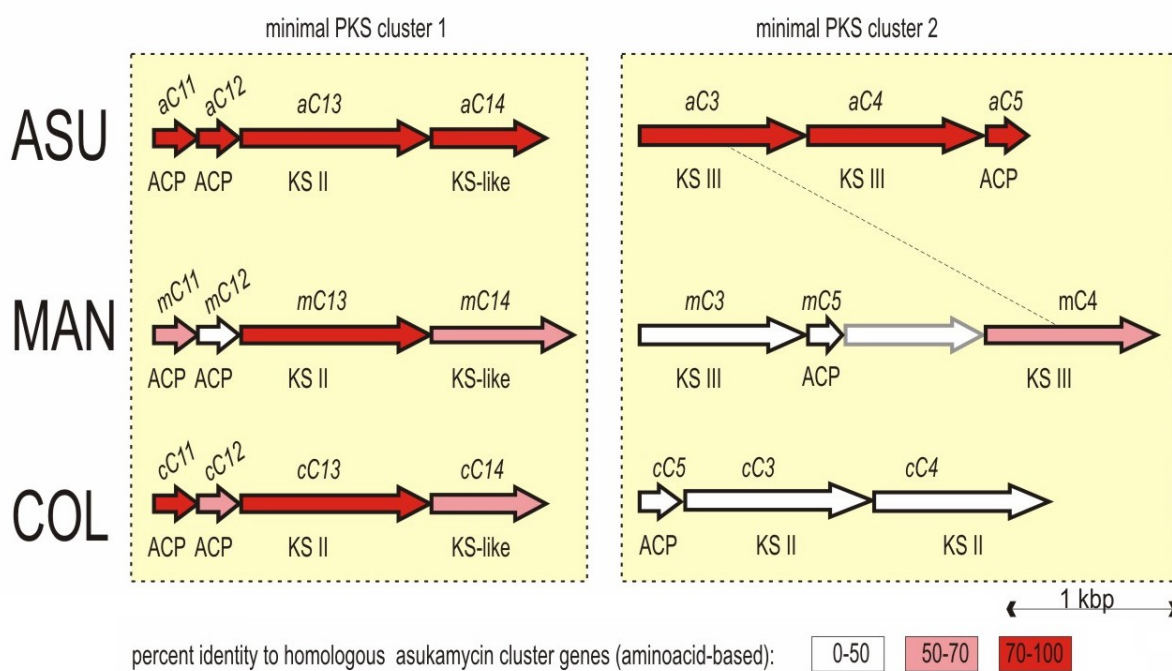
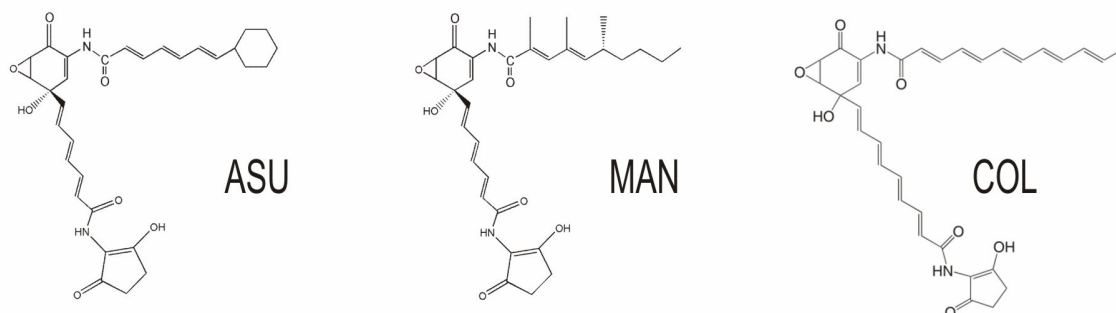


Obr. 7: Schéma mutasyntézy. Převzato z Weissman 2007.

#### 6.4. Kombinatorní biosyntéza pro objasnění kontroly délky řetězců manumycinů a volby substrátů PKS

K objasnění genu či genů zodpovědných za délku polyketidových řetězců a volbu substrátů pro jejich syntézu budou použity tři kmeny producentů: *Streptomyces parvulus* Tü64 (producent manumycinu A), *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (producent asukamycinu) a *Streptomyces* sp. SOK 1/5-4 (producent colabomycinu E). Manumycin A, asukamycin a colabomycin E se navzájem liší v délce a struktuře polyketidových řetězců (Obr. 8) i v prekurzorech používaných PKS pro jejich prodloužení. Pro syntézu horního řetězce asukamycinu je používán malonyl-CoA, zatímco pro manumycin A je to methylmalonyl-CoA (viz. kapitola 5.). Díky těmto rozdílům jsou vhodnými modely pro objasnění kontroly délky vznikajících řetězců a volby substrátů, použitých pro syntézu těchto řetězců pomocí kombinatorní biosyntézy. Každý z těchto producentů má dva operony kódující minimální PKS komplex. V jiných PKS II systémech je za určení délky syntetizovaného řetězce zodpovědný CLF. V genových shlucích pro syntézu manumycinových antibiotik byl identifikován gen pro ACP (*aC11a* *aC12* u asukamycinu, *mC11* a *mC12* u manumycinu a *cC11* a *cC12* u colabomycinu) a dále také gen pro KS (*a*, *m*, *cC13*) (Obr. 8). Nebyl zde však nalezen žádný gen pro CLF. Je podezření, že délku řetězců určuje v případě manumycinových antibiotik produkt genu *a*, *m*, *cC14* (Obr. 8). Ten vykazuje podobnost s KS, ale postrádá

aktivní katalytické jádro. Mohlo by se tedy jednat o zcela nový typ CLF. K objasnění kontroly délky řetězců budou pomocí metod genomického inženýrství prováděny výměny složek operonu mezi jednotlivými producenty. Vzhled výsledných produktů těchto upravených producentů by nám měl poskytnout dostatek informací o tom, zda je skutečně gen *a*, *m*, *cC14* zodpovědný za délku syntetizovaných řetězců popř. za výběr prekurzoru pro jejich syntézu.



Obr. 8: **Nahore:** Asukamycin (ASU), manumycin A (MAN) a colabomycin E (COL). Rozdíly v délce a struktuře polyketidových řetězců. **Dole:** Geny kódující komponenty minimální PKS pro všechny tři látky ve dvou operonech.

## 7. Závěr

S rozšiřující se rezistencí bakterií vůči antibiotickým preparátům ve světě neustále stoupá potřeba výzkumu a vývoje nových antibiotik. Těmi se mohou stát zcela nové, dosud neobjevené látky, nebo stávající látky, u kterých bude upravena struktura a tím i jejich antibiotická aktivita. Velmi nadějnými látkami do budoucna by mohla být právě manumycinová antibiotika ze skupiny polyketidů.

Výsledky mutačních analýz nám poskytují komplexní přehled o genech a jejich produktech, které se účastní biosyntetické dráhy daného metabolitu. V současnosti je již poměrně dobrá představa o biosyntéze manumycinových látek. Těchto poznatků lze využít v dalším výzkumu manumycinových antibiotik pro objasnění kompletní biosyntetické dráhy. Dále lze těchto poznatků využít při přípravě nových látek nebo analogů látek stávajících. Velmi výhodné jsou k produkci analogů i nových látek metody kombinatorní biosyntézy. S kompletními znalostmi o genech a jejich produktech zapojených v biosyntetických drahách by bylo možné vytvořit takový shluk genů, jehož produktem bude látka přesně definovaných vlastností, jako je např. délka řetězců, přítomnost  $C_5N$  podjednotky, epoxydace  $mC_7N$  nebo látka s vnesenými zcela novými strukturami (halogenace, nahrazení řetězce strukturou z jiného antibiotika atd.). Společně se znalostí biologických vlastností a molekulových struktur, které jsou za danou biologickou aktivitu zodpovědné, by bylo možné vytvořit nové látky, které budou například účinnými, netoxickými antibiotiky, antimykotiky, či skutečně účinnými protinádorovými léky. Manumycinová antibiotika rozhodně nejsou vyčerpanou skupinou látek a jejich další výzkum a použití slibuje velké možnosti.

## 8. Přehled použité literatury

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410

Austin M. B., Noel J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* **20**, 79-110

Bentley S. D., Chater A. M., Cerdeno-Tarraga G. L., Challis N. R., Thomson K. D., James K.D., Harris D. E., Quai 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., Rabbinowitsch 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**, 141-147

Bernier M., Kwon Y. K., Pandley S. K., Zhu T. N., Zhao R. J., Maciuk A., He H. J., Decabo R., Kole S. (2006). Binding of manumycin A inhibits I $\kappa$ B kinase beta activity. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 2551-2561

Bibb M. J., Biro S., Motamedi H., Collins J. F., Hutchinson C. R. (1989). Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* tcml genes provides key information about enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *The EMBO Journal* **8**, 2727-2736

Bignell D. R., Seipke R. F., Huquet-Tapia J. C., Chambers A. H., Parry R. J., Loria R. (2010). *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 161-175

Bohm I. W., Hlzbaur I. E., Hanefeld U., Cortes J., Staunton J., Leadlay P. F. (1998). Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alternation of the stereospecificity of polyketide chain extension. *Chemistry & Biology* **5**, 407-412

Brodasky T. F., Stroman D. W., Dietz A., Mizsak S. (1983). U-56,407, a new antibiotic related to asukamycin: isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* **36**, 950-956

Buzzetti F., Gäumman E., Hütter R., Keller-Schierlein W., Neipp L., Prelog V, Zähler H. (1963). [METABOLITES OF MICROORGANISM. 41. MAMUMYCIN.]. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **38**, 871-874.

Cane D. E., Walsh C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* **6**, 319-325

Constantini C., Weindruch R., Della V. G., Puglielli L. (2005). A Trk-A-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *The Biochemical Journal* **391**, 59-67

Dary A., Martin P., Wenner T., Decaris B., Leblond P. (2000). DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control. *Biochimie* **82**, 29-34

Der C. J., Cox A. D. (1991). Isoprenoid modification and plasma membrane association: critical factors for Ras oncogenicity. *Cancer Cell* **3**, 331-340

- Du L., Sanchez C., Shen B. (2001).** Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospect toward engineering novel molecules. *Metabolic Engineering* **3**, 78-95
- Franco C. M., Maurya R., Vijayakumar E. K., Chatterjee S., Blumbach J., Ganguli B. N. (1991).** Alisamycin, a new antibiotic of the manumycin group. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **44**, 1289-1293
- Galm U., Wang L., Wendt-Pienkowski E., Yang R., Liu W., Tao M., Coughlin J. M., Shen B. (2008).** In vivo manipulation of the bleomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 revealing new insights into its biosynthetic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 28236-28245
- Gibbs J. B., Oliff A., Kohl N. E. (1994).** Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* **77**, 175
- Goodman L. E., Judd S. R., Farnsworth Ch. C., Powers S., Gelb M. H., Glomset J. A., Tamanoi F. (1990).** Mutants of *Sachromyces cerevisiae* defective in the farnesylation of Ras proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9665-9669
- Gould S. J., Melville Ch. R., Cone M. C. (1996).** 3-amino-4-hydroxybenzoic acid is derived from the tricarboxylic acid cycle rather than shikimic acid pathway. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 9228-9232
- Grote R., Zeeck A., Beale J. M. (1988a).** Metabolic product of microorganism. 245. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. II. Structure of colabomycin A. *The Journal of Antibiotics* **41**, 1186-1195
- Grote R., Zeeck A., Drautz H., Zähler H. (1988b).** Metabolic product of microorganism. 244. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. I. Isolation, characterization and biological properties. *The Journal of Antibiotics* **41**, 1178-1185
- Hara M., Akasaka K., Akinaga S., Okabe M., Nakano H., Gomez R. Wood D., Uh M., Tamanoi F. (1993).** Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2281-2285
- Hayashi K., Nakagawa M., Fujita T., Tanimori S., Nakayama M. (1994a).** Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp. K 106. II. Structure determination and structure - activity relationships. *The Journal of Antibiotics* **47**, 1110-1115
- Hayashi K., Nakagawa M., Nakayama M. (1994b).** Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp. K 106. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics* **47**, 1104-1109
- Hertweck C., Luzhetskyy A., Rebets Y., Bechthold A. (2007).** Type II. polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural Product Reports* **24**, 162-190
- Hopwood D. A. (2007).** How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology* **63**, 937-940
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd B. A. M., Floss H. G., Omura S. (1985).** Production of „hybrid“ antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**, 642-644
- Hu Y. (2000).** The biosynthesis of manumycin type metabolites. *Dissertation - University of Washington*

- Hu Y., Floss H. G. (2004).** Further studies on the biosynthesis of the manumycin-type antibiotic, asukamycin, and the chemical synthesis of protoasukamycin. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 3837-3844
- Huang Y. (2005).** Actinomycete systematics and resources research group. *Microbiology*, 1939-1944
- Choulet F., Gallois A., Aigle B., Mangenot S., Gerbaud C., Truong C., Francou F. X., Fourrier C., Guérineau M., Decaris B., Barbe V., Pernodet J. L., Leblond P. (2006).** Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 2361-2369
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Schinse M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermilitis*. *Nature Biotechnology* **21**, 526-531
- Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics: *The John Innes Foundation*
- Kim Ch. G., Kirschning A., Bergon P., Zhou P., Su E., Sauerbrei B., Ning S., Ahn Y., Breuer M., Leistner E., Floss H. G. (1996).** Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC<sub>7</sub>N units in ansamycin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 7486-7491
- Kohno J., Nishio M., Kawano K., Nakanishi N., Suzuki S., Uchida T., Komatsubara S. (1996).** TMC-1 A, B, C and D, new antibiotics of the manumycin group produced by *Streptomyces* sp. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological properties. *The Journal of Antibiotics* **49**, 1212-1220
- Madduri K., Kennedy J., Rivola G., Inventi-Solari A., Filippini S., Zanuso G., Colombo A. L., Gewain K. M., Occi J. L., Hutchinson C. R., McNeil D. J. (1998).** Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nature Biotechnology* **16**, 69-74
- Mahmud T., Lee S., Floss H. F. (2001).** The biosynthesis of acarbose and validamycin. *The Chemical Record (New York, N.Y.)* **1**, 300-310
- Mahmud T., Tornus I., Egelkrout E., Wolf E., Uy Ch., Floss H. G., Lee S. (1999).** Biosynthetic studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: 2-*epi*-5-*epi*-valiolone is the direct precursor of the valienamine moiety. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 6973-6983
- McDaniel R., Thaimchaipenet A., Gustafsson C., Fu H., Betlach M., Ashley G. (1999).** Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel „unnatural“ natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1846-1851
- Nakagawa A., Wu T. S., Keller P. J., Lee P. J., Omura S., Floss H. G. (1985).** Biosynthesis of asukamycin. Formation of the 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone moiety. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **8**, 519-521
- 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**, 4050-4060
- Ohnishi Y., Seo J. W., Horinouchi S. (2002).** Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* **29**, 1-7

- Ohnishi Y., Suzuki H., Furusho Y., Sakuda S., Horinouchi S. (2006).** Novel benzene ring biosynthesis from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> primary metabolites by two enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 36944-36951
- Omura S., Kitao Ch., Tanaka H., Ōiwa R., Takanashi Y., Nakagawa A., Shimada M. (1976).** A new antibiotic, asukamycin, produced by *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics* **29**, 876
- Ostash B., Doud E. H., Lin C., Ostash I., Perlstein D. L., Fuse S., Wolpert M., Kahne D., Walker S. (2009).** Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway. *Biochemistry* **48**, 8830-8841
- Petříček M., Petříčková K., Havlíček L., Jürgen F. (2006).** Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *Journal of Bacteriology* **188**, 5113-5123
- Petříček M., Rui Z., Petříčková K., Škanta F., Pospíšil S., Yang Y., Chen Ch. Y., Tsai S. F., Floss H. G., Yu T. W. (2010).** Biochemical and genetic insights into asukamycin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 24915-24924
- Sattler I., Grone C., Zeeck A. (1993).** New compounds of the manumycin group of antibiotics and a facilitated route for their structure elucidation. *The Journal of Organic Chemistry* **58**, 6583-6587
- Sattler I., Thiericke R., Zeeck A. (1998).** The manumycin group metabolites. *Natural Product Reports* **15**, 221-240
- Sears K. T., Daino H., Carey G. B. (2008).** Reactive oxygen species- dependent destruction of MEK and Akt in manumycin stimulated death of lymphoid tumor and myeloma cell lines. *International Journal of Cancer* **22**, 1496-1505
- Shen B. (2003).** Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 285-295
- Sherman D. H., Malpartida F., Bibb Ma. J., Kieser M., Bibb Me. J., Hopwood D. A. (1989).** Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22. *The EMBO Journal* **8**, 2717-2725
- Shu Y. Z., Huanq S., Wang R. R., Lam K. S., Klohr S. E., Volk K. J., Pirnik D. M., Wells J. S., Fernandes P. B., Patel P. S. (1994).** Manumycins E, F and G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics* **47**, 324-333
- Simpson T. J. (1985).** The biosynthesis of polyketides. *Natural Product Reports* **2**, 321-347
- Slechta L., Ciadella J. I., Mizensak S. A., Hoeksema H. (1982).** Isolation and characterization of a new antibiotic U-62162. *The Journal of Antibiotics* **35**, 556-560
- Summers R. G., Ali A., Shen B., Wessel W. A., Hutchinson C. R. (1995).** Malonyl-coenzyme A: acyl carrier protein acyltransferase of *Streptomyces glaucescens*: a possible link between fatty acid and polyketide biosynthesis. *Biochemistry* **34**, 9389-9402
- Tamanoi F. (1993).** Inhibitors of Ras farnesyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 349-353
- Tanaka T., Tsukuda E., Uosaki Y., Matsuda Y. (1996).** EI-1511-3 and EI-1625-2, novel interleukin-1 beta converting enzyme inhibitors produced by *Streptomyces* sp. E-1511 and E-1625. III. Biochemical properties of EI-1511-3, -5 and EI 1625-2. *The Journal of Antibiotics* **49**, 1085-1090

- Thiericke R., Zeeck A., Nakagawa A., Omura S., Herrold R. E., Wu S. T. S., Beale J. M., Floss H. G. (1990).** Biosynthesis of the Manumycin Group Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **112**, 3979-3987
- Thiericke R., Zeeck A., Robinson J. A., Beale J. M., Floss H. G. (1989).** The biosynthesis of manumycin; origin of the oxygen and nitrogen atoms. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **7**, 402-403
- Thiericke R., Zeeck A., Schröder K., Frobel K., Grote R. (1987).** The structure of manumycin. I. Characterization, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **40**, 1530-1540
- Tropf S., Karcher B., Schröder G., Schroder J. (1995).** Reaction mechanism of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 7922-7928
- Tsuji S. Y., Cane D. E., Khosla C. (2001a).** Selective protein-protein interactions direct channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *Biochemistry* **40**, 2326-2331
- Tsuji S. Y., Wu N., Khosla C. (2001b).** Intermodular communication in polyketide synthases: comparing the role of protein-protein interactions to those in other multidomain proteins. *Biochemistry* **40**, 2317-2325
- Walsh C. T., Gehring A. M., Weinreb P. H., Quadri L. E., Flugel R. S. (1997).** Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Current Opinion in Chemical Biology* **1**, 309-315
- Wang X. J., Yan Y.J., Zhang B., An J., Wang J. J., Tian J., Jiang L., Chen Y. H., Huang S. X., Yin M., Zhang J., Gao A. L., Liu C. X., Zhu Z. X., Xiang W. S. (2010).** Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *Journal of Bacteriology* **192**, 4526-4527
- Wei X., Cronjé Grové J. J., Taylor R. J. K. (1999).** The first total synthesis of (±)-colabomycin D. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1143-1146
- Weissman K. J. (2004).** Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philosophical transactions of the Royal Society A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences* **362**, 2671-2690
- Weissman K. J. (2007).** Mutasyntesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends in Biotechnology* **25**, 139
- Weissman K. J. (2009).** Introduction to polyketide biosynthesis. *Methods in Enzymology* **459**, 3-16
- Zhang W., Tang Y. (2009).** In vitro analysis of type II polyketide synthase. *Methods in Enzymology* **459**, 367-393