

**Syöpälääkkeenä käytettävien antrasykliinien
tuotto *Escherichia coli* -bakteerissa BioBrick-
menetelmällä**

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Molekyylibiotieteet, Biokemia
Maaliskuu 2023

Jenni Peuhkurinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

JENNI PEUHKURINEN: Syöpälääkkeinä käytettävien antrasykliinien tuotto

Pro gradu -tutkielma, 67 s. *Escherichia coli* -bakteerissa BioBrick-menetelmällä

Maaliskuu 2023

Luonnontuotteet ja niiden johdannaiset ovat tärkeitä antibioottien ja syöpälääkkeiden lähteitä. Suuri osa näistä bioaktiivisista sekundaarimetaboliiteista tuotetaan jonkin *Streptomyces*-tuotantokannan avulla. Yhdisteiden tuottaminen *Escherichia coli* -bakteerin, eli kolibakteerin, avulla on kuitenkin yleensä nopeampaa, ja tuotantoreittien muokkaamiseen ja suunnitteluun käytettävät menetelmät yksinkertaisempia ja mahdollisuuksiltaan monipuolisempia. Tästä johtuen kolibakteerien hyödyntämistä luonnontuotteiden tuotannossa onkin tutkittu paljon. Sen hyödyntäminen lääketieteellisesti tärkeiden luonnontuotteiden, kuten tyypin II polyketidien tuotannossa on kuitenkin vielä alkutekijöissään.

Antrasykliinit ovat tyypin II polyketidien alaluokka. Niiden rakenteet ovat monimutkaisia ja niiden muodostukseen liittyy useita eri tekijöitä. Antrasykliinien biosynteesiin osallistuu tyypillisesti 30-30 proteiinia. Vaikka tuotannon eri vaiheista ja mekanismeista tiedetään paljon, näiden muodostamassa kokonaisuudessa on edelleen avonaisia kysymyksiä. Tutkielman tarkoitus oli tuottaa nogalamysinonin synteesireitin polyketidejä kolibakteerissa fermentoimalla hyödyntäen *Streptomyces nogalaterin* geenejä. Tutkimuksen aikana kävi selväksi, ettei tämä reaktiotie toimi kuten odotettua, jolloin päädyin käyttämään homologisia geenejä aklasinomysiinin ja daunorubisiinin synteesireiteiltä. Daunorubisiinin fermentointitulokset vaikuttivat UPLC-tulosten perusteella lupaavilta. Nämä tulokset tulisi kuitenkin vielä varmentaa laajan mittakaavan kasvatuksissa ja NMR-mittauksilla.

Tutkielman yksi tärkeimmistä päätelmistä on, että polyketidien tuotanto kolibakteerien avulla sen kaikki työkalut hyödyntäen on mahdollista. Polyketidien tuotanto kolibakteereissa on ollut haaste vuosikymmeniä, ja tulee varmasti olemaan vielä tulevaisuudessakin. Vaikka polyketidien tuotto kolibakteerien avulla vaatii vielä paljon tutkimusta ja lääkeaineiden tuoton teolliset sovellukset ovat edelleen kaukana, viime aikaiset tutkimustulokset ovat antaneet viitteitä, että tämä on mahdollista.

Avainsanat: antrasykliinit, polyketidit, nogalamysiini, BioBrick, *Escherichia coli*

KIITOKSET

Kiitos ohjaajalleni professori Mikko Metsä-Ketelälle kärsivällisyydestä, tuesta ja neuvoista koko opinnäytetyöprosessin ajan. Kiitos ohjaajalleni Magdalena Niemczuralle ohjauksesta laboratoriossa, viisaista sanoista ja ajasta, jonka tulen muistamaan aina. Kiitos lisäksi koko ABE-ryhmälle (Antibiotic biosynthesis engineering), jossa sain tämän tutkimustyön toteuttaa.

Kiitos perheelleni, jonka tuki on ollut korvaamatonta koko opintojeni ajan. Eriyiskiitos pojalleni, joka on aina tarvittaessa antanut minulle työrauhan ja kärsivällisesti odottanut, kun sitä on tarvittu. Yhdessä vietetty aika on toiminut myös hyvänä vastapainona opinnoille. Kiitos puolisolleni kärsivällisyydestä, ymmärryksestä ja kokonaisvaltaisesta tuesta opintojeni aikana.

Tutkielma on omistettu kaksi vuotta sitten aggressiiviseen syöpään menehtyneelle äidilleni. Ilman sinua en olisi tässä. Osasit aina kannustaa meitä niin, että uskalsimme kokeilla niitäkin asioita, jotka eivät ihan heti tuntuneet omilta vahvuuksiltamme. Se on ollut hyvä tie itsensä kehittämiseen.

Sisällys

LYHENTEET	3
1 KIRJALLISUUSKATSAUS	5
1.1 Luonnontuotteet	5
1.2 Streptomykeetit	5
1.2.1 Streptomykeettien elinkaari	6
1.2.2 Sekundaarimetaboliittien tuotto	7
1.3 Polyketidit	9
1.3.1 Tyypin I PKS	12
1.3.2 Tyypin II PKS	12
1.3.3 Tyypin III PKS	15
1.4 Antrasykliinit	16
1.4.1 Daunorubisiini	18
1.4.2 Nogalamysiini	20
1.4.3 Aklasinomysiini	20
1.4.4 Antrasykliinien toimintamekanismi	21
1.5 Antrasykliinien biosynteesi	22
1.5.1 Aglykoneista antrasykliineiksi	25
1.5.2 Deoksisokereiden biosynteesi	26
1.6 Kolibakteerit	27
1.6.1 Yhdisteiden tuottaminen kolibakteereissa	28
1.6.2 Kloonaus kolibakteereissa	31
1.6.3 Polyketidituotanto kolibakteereissa	33
2 TUTKIELMAN TAVOITTEET	36
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	37
3.1 Kloonaus	37
3.2 Polyketidien tuotto ja eristäminen	38
3.3 Laajan mittakaavan kasvatukset	40
3.4 Polyketidien analysointi	40
4 TULOKSET	42
4.1 Polyketidikantojen kloonaus	42
4.2 Polyketidien tuottokokeet	43
4.2.1 Minimaalinen polyketidisyntaasi	48

4.2.2	Ketoreduktaasit	49
4.2.3	Aromataasit	51
4.2.4	Reaktioreitin seuraavat vaiheet	54
5	TULOSTEN TARKASTELU	55
5.1	MinPKS:n kasvatuskokeet	55
5.2	Ketoreduktaasien kasvatuskokeet	57
5.3	Aromataasien kasvatuskokeet	57
6	PÄÄTELMÄT	58
	Lähteet	61

LYHENTEET

ACP	Asyylinkantajaproteiini (acyl carrier protein)
ARO	Aromataasi
AT	Asyylitransferaasi
BGC	Biosynteettinen geeniklusteri (biosynthetic gene cluster)
BI	Takainsertti (back insert)
BV	Takavektori (back vector)
CLF	Ketjunpidennyksen lopetusfaktori (chain length determination factor)
co	Kodonioptimoitu <i>E. coli</i> lle (codone optimized)
CYC	Syklaasi
DH	Dehydrataasi
ER	Enoyylireduktaasi
FI	Etuinseritti (front insert)
FV	Etuvektori (front vector)
HPLC	Korkean suorituskyvyn nestekromatografia
IPTG	Isopropyyli- β -D-1-tiogalaktopyranosidi
KoA	Koentsyymi-A (coenzyme A)
KR	Ketoreduktaasi
KS	Ketosyntaasi
KS α	Ketosyntaasi- α
KS β	Ketosyntaasi- β (toiselta nimeltään CLF)
LA	Luria agar -kasvatusalusta
LB	Luria broth -kasvatusmediumi

LC-MS	Nestekromatografia-massaspektrometria
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
MCAT	Malonyyli-KoA-ACP-transasyklaasi
MET	Metyylitransferaasi
minPKS	Minimaalinen polyketidisytaasi
OXY	Oksygenaasi
PK	Polyketidi
PKS	Polyketidisytaasi
PPTase	Fosfopanteteinyylitransferaasi
UPLC	Erittäin suorituskykyinen nestekromatografia

1 KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 Luonnontuotteet

Luonnontuotteet ja niiden johdannaiset ovat tärkeitä antibioottien ja syöpälääkkeiden lähteitä. Vuoteen 2019 mennessä hyväksytyistä antibiooteista lähes 70 % oli luonnontuotteita tai niiden johdannaisia. (Newman ja Cragg 2020.) Niiden valtavan määrän lisäksi ne ovat lääketieteellisesti merkittäviä tutkimuskohteita myös muilla tavoin: ne inspiroivat synteettisten ja analyttisten kemiallisten tuotteiden suunnittelussa ja antavat lisää tietoa merkittävistä biologisista prosesseista. On myös huomioitava, että läheskään kaikkia luonnontuotteita ei vielä tunneta, joten niihin liittyvä tutkimustyö on merkittävässä roolissa vielä tulevaisuudessakin. (Walsh ja Fischbach 2010.)

Suuri osa näistä bioaktiivisista sekundaarimetaboliiteista tuotetaan jonkin *Streptomyces*-tuotantokannan eli streptomykeettien avulla (Liu ja muut 2020). Vaikka evoluution kannalta ajateltuna streptomykeettien tuottamien sekundaarimetaboliittien suurin hyöty on lajin suojelussa ja kilpailukyvyyn parantamisessa ympäristöä vastaan, jotkin näistä metaboliiteista toimivat myös isäntäorganismien morfologisten prosessien signaaleina (Hopwood ja Sherman 1990).

1.2 Streptomykeetit

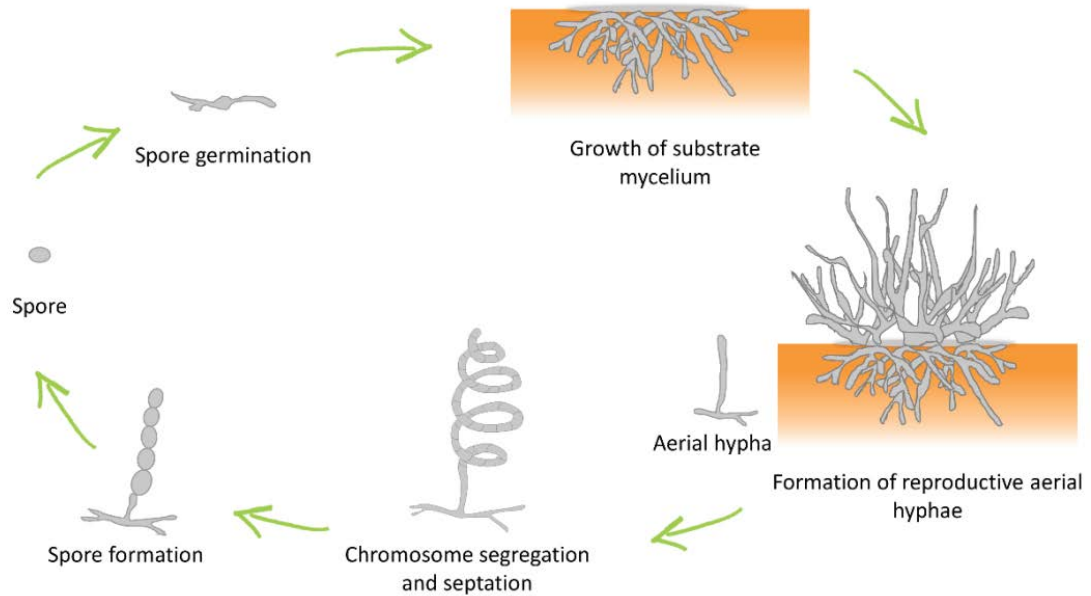
Streptomykeetit ovat yksi parhaiten tunnettuja aktinobakteerien sukuja. Streptomykeetit ovat gram-positiivisia bakteereja, jotka lisääntyvät sienten kaltaisesti itiöimällä. (Waksman ja Henrici 1943.) Streptomykeetit ovat kuitenkin geneettisesti eri alkuperää. Lisäksi streptomykeeteillä on sieniä kehittyneempiä mekanismeja ympäristöärsykkeisiin (Flärdh ja Buttner 2009). Streptomykeettejä esiintyy hyvin erilaisissa ympäristöissä, kuten maaperässä ja vesistöissä (Waksman ja Henrici 1943). Niiden ehkä kiinnostavin ominaisuus on niiden kyky tuottaa sekundaarimetaboliitteja, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi ihmisten ja eläinten lääketieteessä ja agrikulttuurisesti (Ōmura ja muut 2001). Lisäksi streptomykeetit hyödyntävät tehokkaasti ympäristön tarjoaman ravinnon, ovat aerobisia ja niillä on lukematon määrä geenejä ja mekanismeja, joita hyödyntää sekundaarimetaboliittien tuotannossa (Lee ja muut 2005).

Streptomykeettien kromosomi on ainutlaatuinen rakenteeltaan ja kooltaan. Streptomykeeteillä on kaikki organismit huomioiden poikkeuksellisen korkea kromosomin GC-pitoisuus (yli 70 %) (Ōmura ja muut 2001). Niillä saattaa olla yli 50 kromosomikopiota solussaan (deLima ja muut 2012). Streptomykeettikantojen kromosomien on osoitettu olevan lineaarisia (Huang ja muut 1998), pituudeltaan noin 6–12 megaemästä (Mb, megabase) (Caisedo-Montoya ja muut 2021) pitkiä dna-molekyylejä, joiden päädyissä on käänteisiä toistoalueita ja 5'-päädyssä kovalenttisesti kiinnittyneitä proteiineja. Streptomykeettien kromosomien koko on suhteellisen kookas verrattuna muihin bakteereihin (Ōmura ja muut 2001). Esimerkiksi kolibakteerien koko on vain noin 4,6 megaemästä (Holmes ja Cozzarelli 2000) ja *Bacillus subtilixen* 4,2 megaemästä (Piggot 2009).

1.2.1 Streptomykeettien elinkaari

Streptomykeeteillä on bakteereille erikoinen, monimutkainen monisolainen elinkaari. Streptomykeettien itiöt muodostavat oikeissa olosuhteissa kasvualustalleen haaroittuneita vegetatiivisia rihmastoja. (Waksman ja Henrici 1943.) Mikäli kasvualusta muuttuu kasvua rajoittavaksi, streptomykeeteillä on kaksi toimintamekanismia: ilmarihmastojen muodostus sekä antibioottien ja sekundaarimetaboliittien tuotto (Ōmura ja muut 2001). Joillain streptomykeeteillä nämä ovat itsenäisiä mekanismeja, joillakin ne kytkeytyvät toisiinsa (de Lima ja muut 2012).

Ilmarihmastot voivat muodostaa jopa 100 µm pitkiä aseptaattisia eli väliseinättömiä kärkiosia, jotka sisältävät usein kymmeniä kopioita genomista (Chater & Chandra 2006). Tätä kärkiosaa pidetään tärkeimpänä proteiinien ja lipidien erityisalueena (Flärdh ja Buttner 2009). Kun kärkiosa lopettaa kasvunsa, se erilaistuu yksigenomisiksi esi-itiöiden ketjuksi. Näiden esi-itiöiden erilaistuessa itiöiksi, niiden soluseinä paksuuntuu, pyöristyy ja kerää mahdollisesti myös itiöpigmenttiä, jonka jälkeen ne vapautuvat ympäristöön (Kuva 1). Streptomykeettien itiöt eivät ole erityisen lämmönkestäviä, mutta ne selviytyvät hyvin esimerkiksi kuivuudessa ja kulkeutuvat pitkienkin matkojen päähän ilmvirtausten, veden ja eläinten mukana. Itiöiden kestävyys on selitetty johtuvan niiden sisältämistä pigmenteistä ja aromista. (Chater & Chandra 2006.)

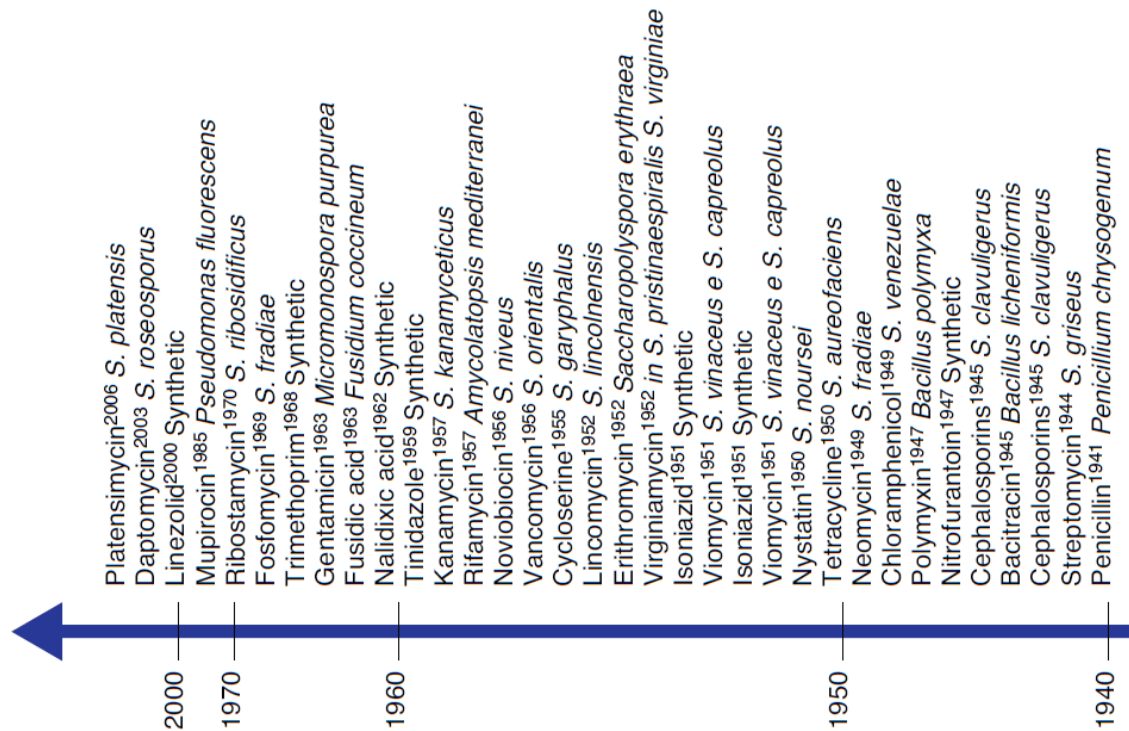


Kuva 1. Streptomykeettien elinkaari. Sykli alkaa itiöstä, joka muodostaa kasvualustaansa haaroittunutta rihmastoa. Ympäristöärsykkeiden läsnäollessa, kuten kasvua rajoittavissa olosuhteissa, streptomykeetit aloittavat monimutkaisen kehityskaarensa kasvattamalla ilmarihmastoa ja tuottamalla mahdollisesti myös sekundaarimetaboliitteja. Ilmarihmasto erilaistuu vaihteittain genominsa sisältämiksi esi-itiöiksi ja lopulta itiöketjuiksi. (Law ja muut 2019.)

1.2.2 Sekundaarimetaboliittien tuotto

Streptomykeetit ovat kiinnostava tutkimuskohde, sillä niillä on kyky tuottaa yksinkertaisista solun lähtöaineista, kuten aminohapot, sokerit ja rasvahapot, hyvin monipuolisesti erilaisia sekundaarimetaboliitteja, kuten antibiootteja (Kuva 2) ja muita bioaktiivisia yhdisteitä. Näitä metaboliitteja on rakenteellisesti ja vaikutukseltaan erilaisia, kuten patogeenejä ja tuumoreita ehkäiseviä, immuunipuolustusjärjestelmään, verenpaineeseen ja veren kolesterolipitoisuuteen vaikuttavia yhdisteitä. (Ōmura ja muut 2001.)

Streptomykeettien sekundaarimetaboliittien tuotantoa ja morfologista erilaistumista kontrolloivat samanaikaisesti erilaiset säätelymekanismit, joihin vaikuttavat erilaiset ympäristöärsykkeet. Näistä oleellisimpia ovat ympäristön ravinteet, kuten hiili, typpi, fosfori ja hivenaineet. (Chi ja muut 2011). Säätelymekanismit ovat streptomykeeteille elintärkeitä. Mikäli itiöiden muodostus alkaa liian aikaisin, myös streptomykeetin mahdollinen biomassan kerääminen ja kasvaminen pysähtyy liian aikaisin. Toisaalta taas liian myöhäinen aloitus, ja itiöiden muodostukseen vaadittavat ravinteet loppuvat liian aikaisin. (Rigali ja



Kuva 2. Antibiootteja ja niiden löytövuosia. Kuvasta käy ilmi streptomyykeettien merkitys antibioottien tuotannossa kautta aikojen. Muokattu kuvasta de Lima ja muut 2012.

muut 2008.) Suurin osa streptomyykeettisen tuottamista sekundaarimetaboliiteista on lajikohtaisia, ja niistä on hyötyä lähtökohtaisesti itse tuottajakannalle. Niiden pääasiallinen tarkoitus onkin suojella isäntää ympäristöltään. (de Lima ja muut 2020.)

Kaikkia säätelymekanismeja ja niihin liittyviä säätelytekijöitä ei täysin tunneta. Monet niistä tunnetaan kuitenkin hyvinkin tarkasti. (Zhu ja muut 2014.) Pleiotrooppinen säätelytekijä (pleiotropic atoregulatory factor, A-factor, 2-isokapriloyyli-3R-hydroksimetyylylgammabutyrolaktoni) laukaisee sekä morfologisen että fysiologisen erilaistumisen (Horinouchi ja muut 1984). Korkeiden N-asetyyli-glukosamiinipitoisuuksien (N-acetylglucosamine, GlcNAc) on osoitettu estävän yhtä tutkituimmista streptomyykeeteistä, *S. coelicolor* A3(2):a, aloittamasta ilmarihmaston tuotantoa (Rigali ja muut 2008). Streptomyykeettien on osoitettu myös hajoittavan vegetatiivista rihmastoan lyttisesti, jonka jälkeen ne aloittavat monimutkaisen morfologisen itiöidenmuodostusprosessin ja hyödyntävät tässä prosessissa aiemmin syntyneitä ravintoaineita (Fernandez ja Sanchez 2002).

Perinteisin tapa luokitella streptomykeettien tuottamat sekundaarimetaboliitit on jakaa ne niiden kemiallisten ominaisuuksien mukaan luokkiin: polyketidit, peptidit, oligosakkaridit, terpeoidit ja alkaloidit. Jokaisen sekundaarimetaboliittiluokan tuottajan genomissa on sekä kaikille yhteisiä että yksittäisen yhdisteen tuotolle ainutlaatuisia geenejä. (Boucher ja muut 2001.) Näiden sekundaarimetaboliittien tuotannossa mukana olevat geenit ovat yleensä ryhmittyneenä streptomykeettien genomissa niin kutsuttuina biosynteettisinä geeniklustereina (biosynthetic gene clusters, BGCs). Tämän ryhmittyneisyyden vuoksi näiden geenien tutkiminen on ollut suhteellisen yksinkertaista. (Walsh ja Fischbach 2010.) Lisäksi nykyiset sekvensointimenetelmät ovat niin kehittyneitä (Loman ja Pallen 2015), että streptomykeettien sekundaarimetaboliittien tuotannosta vastaavat geenit tunnetaan hyvin.

Vaikka uusien ja mahdollisesti parempien antibioottien tuotannosta vastuussa olevia BGC:a tunnetaan paljon, ne ovat usein hiljennettyjä laboratorio-olosuhteissa (Walsh ja Fischback 2010). Tästä johtuen niiden ilmentäminen luonnontuotteiden tutkimustyön yhteydessä on usein haastavaa ja/tai metaboliittien tuotantomäärät alhaisia havainnoitaviksi. Tähän ratkaisuna on usein kyseisten geenien ilmentäminen toisessa organismissa. (Liu ja muut 2020.) Tämä ei kuitenkaan ole välttämättä ihan yksinkertaista. Yhdisteiden muodostus tapahtuu eri organismeissa usein hieman eri tavoin ja niiden tuotannossa saattaa olla mukana myös vielä tuntemattomia säätelymekanismeja. Näin ollen laboratorio-olosuhteissa voi olla hankalaa toteuttaa kaikkia näitä luonnollisia ympäristöärsykeitä, joita BGC:den ilmentäminen vaatii. (Zhu ja muut 2014.)

1.3 Polyketidit

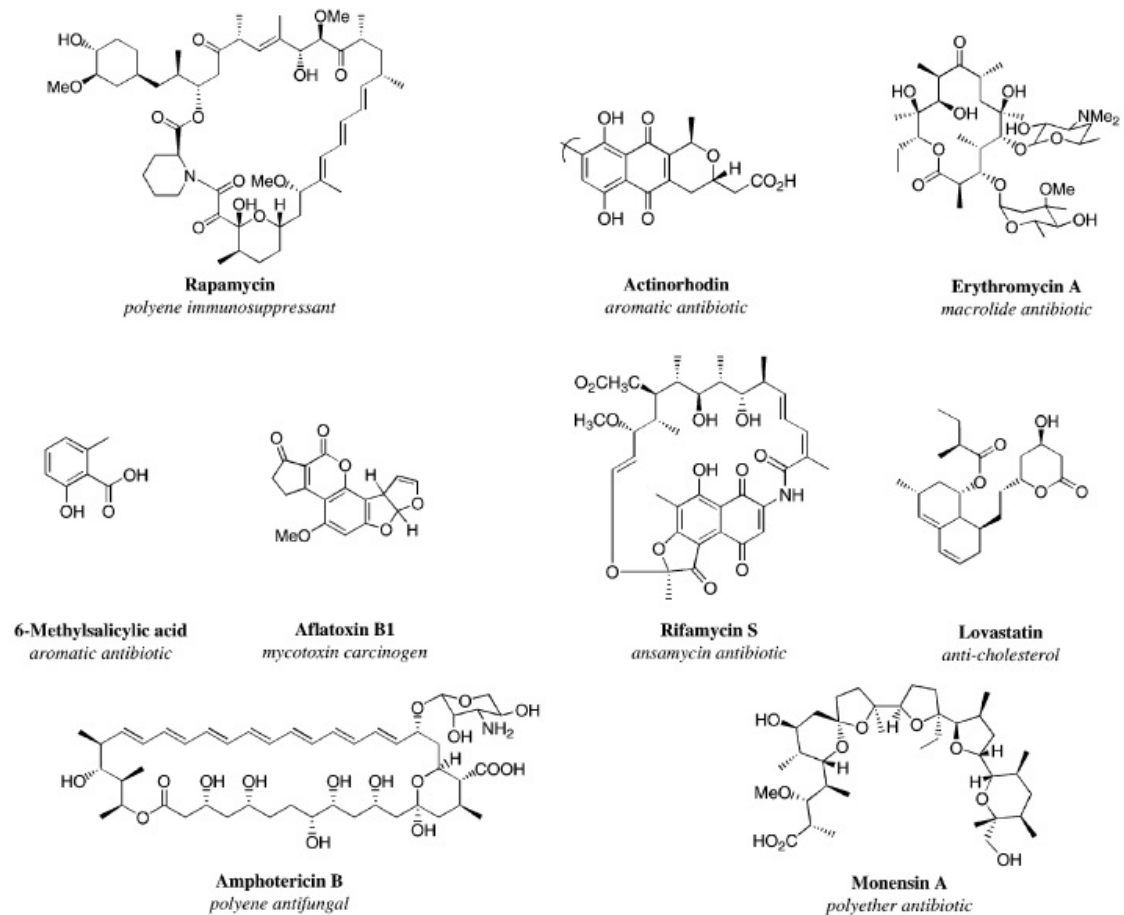
Biologisesti aktiivisia metaboliitteja, jotka ovat joko polyketidejä tai niiden johdannaisia, on valtava määrä. Niiden tuottajakanta on yleensä rihmastollinen bakteeri (aktinobakteeri), sieni tai kasvi. (Hopwood ja Sherman 1990.) Polyketideillä on monenlaisia lääketieteellisiä käyttötarkoituksia. Ne toimivat esimerkiksi syöpiä, sieniä ja parasitteja vastaan sekä antibiootteina. (Staunton ja Weissman 2001.) Lisäksi polyketidejä löytyy osana kasvien tuottamia väri- ja makuaineita ja ne suojelevat kasveja muun muassa sieni-infektioilta (Hopwood ja Sherman 1990).

Ensimmäiset polyketiditutkimukset (Collie ja Myers 1893) on tehty jo yli 100 vuotta sitten, mutta siltikään niiden rakenteesta ja toiminnasta ei tiedetä vielä kaikkea (Liu ja muut 2020). Niistä tiedetään kuitenkin valtavasti: satojen polyketidien molekyyli rakenne tunnetaan tarkasti, niiden rakentumiseen liittyvät entsyymit on pystytty valtaosin tunnistamaan ja eristämään, ja lisäksi näiden entsyymien tuottamiseen liittyvät geenit on pystytty tunnistamaan ja kloonamaan. (Staunton ja Weissman 2001.)

Kuvassa 3 on esitelty erilaisia polyketidirakenteita ja niiden käyttökohteita (Staunton ja Weissman 2001). Polyketidit ovat rakenteiltaan hyvinkin erilaisia. Kaikille polyketideille on kuitenkin yhteistä niiden rakenteen muodostava hiilirunko, joka rakentuu peräkkäisillä kondensaatioreaktioilla lyhytketjuisista karboksyylihapoista, kuten asetaatti, propionaatti ja butyraatti. Jokainen karboksyylihapoyksikkö pidentää ketjua kahdella hiiliatomilla muodostaen lineaarisen hiiliketjun, jossa β -hiileen on kiinnittyneenä ketoryhmä. Tyypillisesti nämä ketoryhmät muokataan hydroksyyliiryhmiksi ja toisinaan ne poistetaan kokonaan. Juuri näiden hiilirungossa esiintyvien ketoryhmien mukaan polyketidit ovat saaneet nimensä. (Hopwood ja Sherman 1990.)

Toisessa kasvavaan polyketidiketjuun liittyvien karboksyylihappojen hiilistä on erilaisia funktionaalisia ryhmiä riippuen ketjuun liittyvästä karboksyylihapposta. Mikäli tämä on asetaatti, on hiileen kiinnittyneenä vain vety, ja mikäli tämä on propionaatti tai butyraatti, on hiileen kiinnittyneenä metyyli- tai etyyli-ryhmä. Tämä sivuketjujen ja ketoryhmien vaihtelu, jokaisen ketjun hiiliryhmän mahdollinen kiraalisuus sekä koko ketjun mahdollinen kokonaispituus (6-50 hiiltä) tekevät polyketidien perusrakenteesta hyvin monipuolisen molekyylin. (Hopwood ja Sherman 1990.)

Polyketidien kemialliseen monipuolisuuteen vaikuttavat perusrakenteen muodostuksen lisäksi perusrakenteen katalysoinnin jälkeen tapahtuvat reaktiot, kuten aromaattisen tai muun rengasrakenteen muodostus, muiden funktionaalisten ryhmien lisäys, poisto tai muokkaus. Polyketidien perusrakenteen muodostavia reaktioita katalysoivat polyketidisyntaasit (polyketide synthases, PKSs), jotka muistuttavat rasvahapposyntaaseja (fatty acid synthases, FASs). (Hopwood ja Sherman 1990.)



Kuva 3. Esimerkkejä polyketidituotteista ja niiden lääketieteellisistä käyttökohteista. Muokattu kuvasta Staunton ja Weissman 2001.

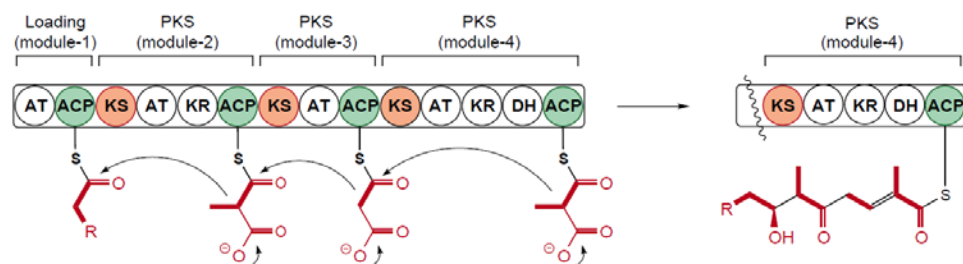
Tyypillisesti rasvahapposyntaasit katalysoivat täyden pelkistysyökin: ketotuotteiden pelkistys, dehydraatio ja enoyylipelkistys. Polyketidisyntaasit voivat olla rasvahapposyntaaseja spesifisempiä lyhentämällä tai jättämällä pois jotain rasvahapposyntaasin katalysoimia reaktioita. Koska kasvava polyketidiketju voidaan näin ollen muodostaa lukemattoman monella eri tavalla, on haluttujen lopputuotteiden tuottamiseksi tärkeää tuntea tarkasti, miten polyketidisyntaasi toimii. (Crum ja muut 1997.)

Eri eliölajien PKS:t ovat rakenteellisesti toisistaan poikkeavia. (Hopwood ja Sherman 1990). Bakteerien PKS:t voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään: tyyppi I, II ja III polyketidit, riippuen siitä, miten polyketidien perusrakenteen tuottava polyketidisyntaasi (PKS) rakentuu ja minkälaisia tuotteita syntyy. Rakenteellisista ja mekanistisista eroista huolimatta kaikki PKS:t syntetisoivat polyketidejä dekarboksylatiivisen kondensoinnin (ketonoinnin) avulla asyyli-KoA-aloitusyksiköstä (koentsyymi-A, coenzyme A), ja ketosyntaasidomeeni tai -

yksikkö (ketosynthase, KS) katalysoi hiili-hiilidoksen muodostumista. (Shen 2003.)

1.3.1 Tyypin I PKS

Tyypin I PKS löytyy pääasiassa bakteereilta (Hopwood ja Sherman 1990). Tyypin I PKS:a kutsutaan myös modulaariseksi PKS:ksi, koska sen muodostavat proteiinit ovat usein järjestäytyneet ikään kuin moduuleittain, joissa jokaisella moduulilla on oma roolinsa polyketidien ketjunpidennysreaktiossa (Kuva 4). Jokaisessa moduulissa on yleensä vähintään asyyliitransferaasi (acyltransferase, AT), ketosyntaasi (ketosynthase, KS) ja asyylinkantajaproteiini (acyl carrier protein, ACP), jotka yhdessä katalysoivat hiili-hiilidoksen muodostusta. Myös muita entsyymejä saattaa olla läsnä, kuten ketoreduktaasi (ketoreductase KR), dehydrataasi (dehydratase, DH) ja enoyyliireduktaasi (enoylreductase, ER), jotka osallistuvat mahdollisiin pelkistysreaktioihin. Joskus mukana on myös malonyyliasetyyliitransferaasi (malonyl-acetyl transferase, MAT), joka osallistuu asetaatti- ja malonaattiyksiköiden siirtoon ketjunpidennysreaktion yhteydessä. Lähtökohtaisesti jokainen moduuli osallistuu ketjunpidennysreaktioihin vain kerran. Tyypin I PKS:n tuottamia polyketidejä ovat esimerkiksi Kuvassa 3 esiintyvät rapamysiini, aktinorodiini ja erytromysiini A. (Staunton ja Weissman 2001.)



Kuva 4. Tyypin I PKS:n toiminta. Jokainen moduuli pidentää syntyvää polypeptidiketjua yhdellä karboksyylihapolla, eli osallistuu katalyysireaktioon lähtökohtaisesti vain kerran. Muokattu kuvasta Shen 2003.

1.3.2 Tyypin II PKS

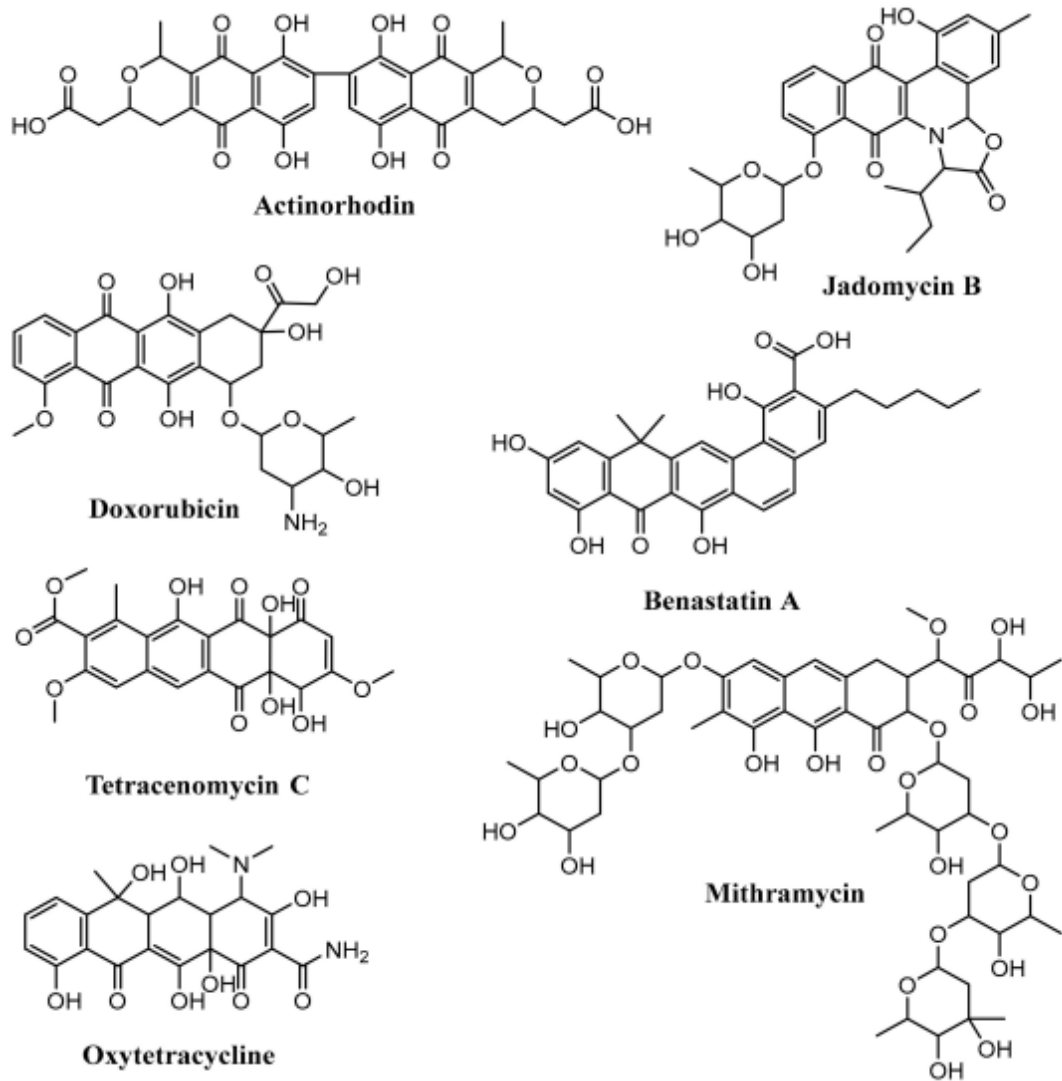
Tyypin II PKS löytyy pääasiassa bakteereilta (Hopwood ja Sherman 1990). Ne ovat multientsyymikomplekseja, jotka ovat vastuussa aromaattisten polyketidien synteesistä. Tyypin II PKS:n pääasialliset tuotteet voidaan jaotella niiden polyfenolisen rengasrakenteen ja biosynteettisen reaktiotien mukaan

seuraavasti: antrasykliinit, angusykliinit, aureolihapot, tetrasykliinit, tetrasenomysiinit, pradimisiinityypin polyfenolit ja bentsoisokromaanikinonit (Hertweck ja muut 2007).

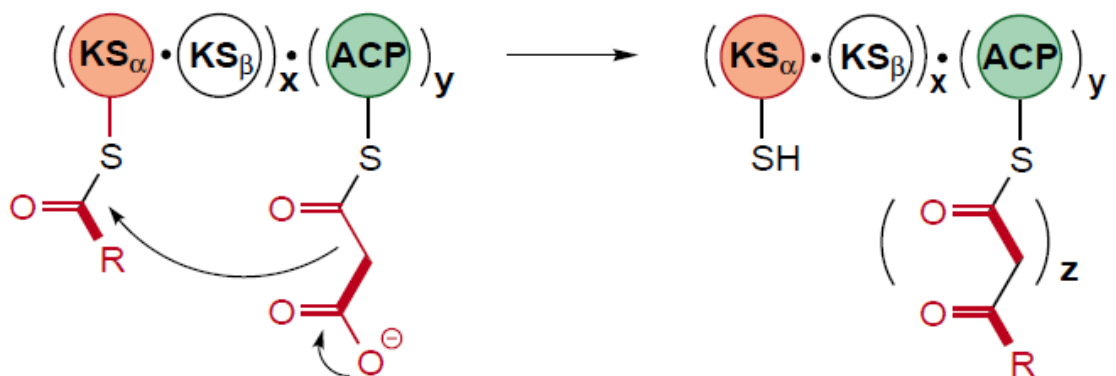
Kuvassa 5 on esiteltyä pääasialliset tyypin II PKS:n tuottamat rakenteet esimerkkiyhdistein. Antrasykliineillä (doksorubisiini) on lineaarinen tetrasyklinen rengasrakenne, jossa on kinoni-hydrokinoniryhmät renkaissa B ja C. Angusykliineillä (jadomysiini B) on kulmikas (angular) tetrasyklinen rengasrakenne. Aureolihapoilla (mitramysiini) on kolmirenkainen kromoforirakenne (chromophore). Tetrasykliineillä (okxytetrasykliini) on lineaarinen tetrasyklinen rakenne ilman kinoni-hydrokinoniryhmiä. Tetrasenomysiineillä (tetrasenomysiini-C) on lineaarinen tetrasyklinen rakenne, jossa on kinoniryhmä renkaassa B. Pradimisiinityypin polyfenolit (benastatiini-A) ovat pidennettyjä angusykliinejä. Bentsoisokromaanikinonit (aktinorodiini) sisältävät kinonijohdannaisen isokromaanirakenteesta. (Risidian ja muut 2019.)

Tyypin II PKS, joka tunnetaan myös nimellä minimaalinen PKS, rakentuu kolmesta eri ydinkomponentista: hiiliketjun synteestistä vastuussa olevista ketoasyylisyntaasista ($KS\alpha$) ja ketjunpidennysfaktorista ($KS\beta$), jotka muodostavat heterodimeerin ($KS\alpha/KS\beta$), sekä ACP:sta, johon muodostuva hyvin reaktiivinen poly- β -ketoyhdiste on sitoutuneena hyvin joustavan fosfopanteteinylioson avulla. (Metsä-Ketelä ja muut 2003.) Muutamaa poikkeusta lukuunottamatta kaikkien kolmen proteiinin geenit ovat ryhmittyneenä yhteen (Hertweck ja muut 2007). $KS\beta$ tunnetaan myös nimellä ketjunpidennyksen lopetusfaktori (CLF, chain length determination factor), mutta nimeä on päivitetty, sillä nykyään tiedetään, että sekä $KS\alpha$ että $KS\beta$ osallistuvat ketjunpidennykseen (Meurer ja muut 1997). Aromaattisen polyketidiketjun muodostus (Kuva 6) alkaa asyylialoitussyksiköstä (asetyyli- tai propionyyli-KoA), johon minPKS katalysoi toistuvan dekarboksylatiivisen kondensaation avulla malonyyli-KoA-pidennussyksiköitä (Hertweck ja muut 2007).

Kolmen ydinkomponentin lisäksi minPKS:ssa on usein mukana myös malonyyli-KoA:ACP-malonyylitransferaasin (MCAT). Polyketidisynteessin ensimmäisessä vaiheessa ACP malonyloidaan tämän entsyymin toimesta. ACP:n on osoitettu kykenevän myös itseasylaatioon, jolloin tämän entsyymin läsnäolo ei aina ole välttämätöntä. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)



Kuva 5. Esimerkkejä aromaattisista polyketideistä (Risidian ja muut 2019).

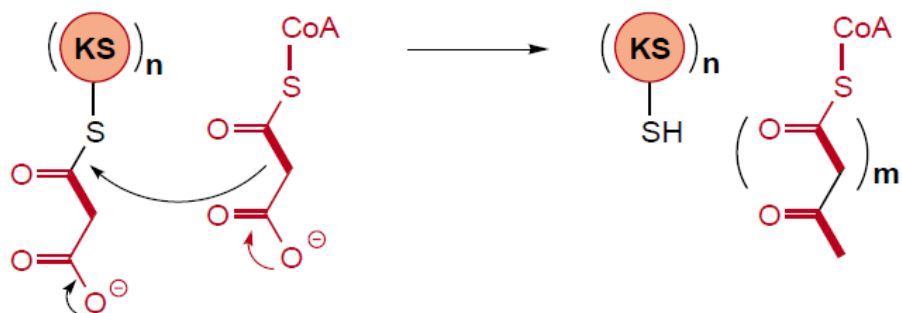


Kuva 6. Aromaattisten polyketidien biosynteesin perusmekanismi. Asyylinkantajaproteiini ACP toimii kasvavan polyketidiketjun ankkurina, ketosyntaasiheterodimeeri katalysoi ketjunpidennysreaktiota. Muokattu kuvasta Shen 2003.

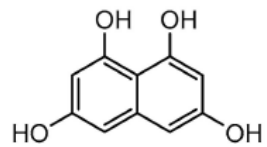
MinPKS:n muodostama poly- β -ketoyhdiste laskostetaan aromaattiseen muotoonsa eri KR:n, syklaasien (CYC) ja aromataasien (ARO) avulla. Lopullisen muodon syntyvä rakenne saa räätälöivien reaktioiden jälkeen, joita katalysoivat erilaiset oksygenaasit (OXY), metylaasit (MET) ja reduktaasit, sekä jotkin reaktiot, joihin eivät osallistu mitkään katalyytit. (Metsä-Ketelä ja muut 2003.)

1.3.3 Tyypin III PKS

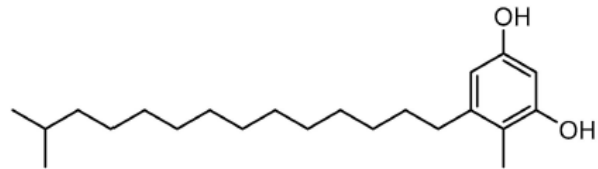
Tyypin III PKS:t, jotka tunnetaan myös nimellä kalkonisyntaasin kaltaiset PKS:t, ovat lähtökohtaisesti yksinkertaisempia kuin kaksi muuta PKS-tyyppiä. Tyypin I ja II PKS:t hyödyntävät ACP:a asyyli-KoA-substraattien aktivoimiseen ja kasvavan poyketidi-intermediaatin ohjaamiseen, kun taas tyypin III PKS:t toimivat ilman ACP:a ja toimivat homodimeereinä. (Shen 2003.) Näin ollen ketjunpidennysreaktiosta puuttuvat myös muissa reaktioissa mukana toimivat ACP:n 4'-fosfopanteteiiniosat. Tyypin III PKS:t käyttävät substraatteina vapaita asyyli-KoA:ita (Kuva 7). Koska tyypin III PKS:t toimivat homodimeereinä, ne katalysoivat iteratiivisesti (toistuvasti) useampia reaktioita, kuten ketjunpidennystä, syklaatiota ja polyketidien hienosäätöä. Bakteerien tyypin III PKS:t on tunnistettu vasta vuonna 1999. Ennen tätä kyseinen mekanismi oli tuttu vain kasveilla. Tyypin III tuottamia polyketidejä on esitetty Kuvassa 8. (Risidian ja muut 2019.)



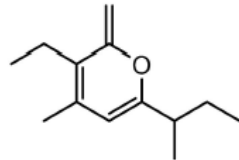
Kuva 7. Tyypin III PKS:t katalysoivat suoraan KoA-tioestereitä, eivätkä hyödynnä reaktiossa ACP:a kahden muun tyypin tavoin. Mukattu kuvasta Shen 2003.



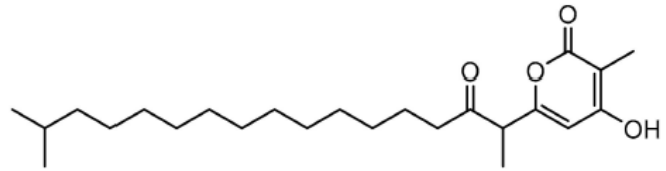
Tetrahydroxynaphthalene (THN)



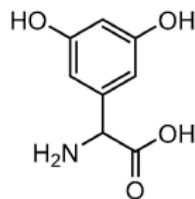
Alkylresorcinol



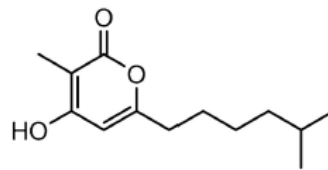
Germicidin A



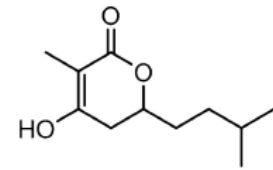
Alkylpyrone



Dihydroxyphenylglycine



Presuficidin A



Alkyldihydropyrone A

Kuva 8. Esimerkkejä Tyypin III tuottamista polyketideistä (Risidian ja muut 2019).

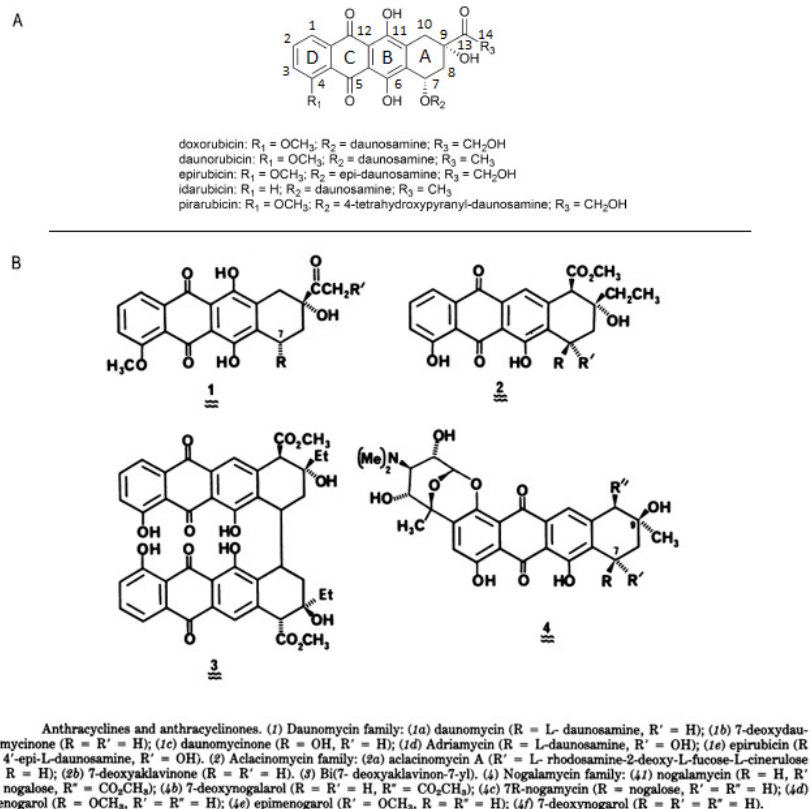
1.4 Antrasykliinit

Antrasykliinit ovat tyypin II polyketidien alaluokka. Antrasykliinien perusrakenne on lineaarinen tetrasyklinen 7,8,9,10-tetrahydro-5,12-naftasenokinoni, johon on kiinnittyneenä yleensä yksi tai useampi amiinisokeri (Brockmann ja Brockmann 1963). Kolme tunnetuinta antrasykliiniperhettä ovat: daunomysiini-, aklasinomysiini- ja nogalamysiiniperhe (Abdella ja Fisher 1985). Antrasykliinien aglykonirakenteessa (Kuva 9) on kinoni-hydrokinoniryhmät renkaissa C ja B, metoksisubstituentti renkaassa D, lyhyt sivuketju hiilessä yhdeksän ja karbonyyliryhmä hiilessä 13. Kullekin antrasykliinille ominainen sokeriryhmä (daunosamiini) on kiinnittynä hiileen 7 renkaassa A. (Minotti ja muut 2004.)

Antrasykliineistä tekee bioaktiivisen niiden aglykonirakenteeseen lisättävät sokeriosat ja muut rakenteen muokkaukset. Erilaisia sivuketjuvaihtoehtoja on lukuisia (Kuva 9). Suurin substituenttirepertuaari on hiilessä yhdeksän: sivuketjun pituus, mahdolliset modifikaatiot ja stereokemia vaihtelee laajasti. Aklasinomysiinillä kyseinen sivuketju on etyyliiryhmä, nogalamysiinillä taas metyyliiryhmä. Daunorubisiinilla tämä sivuketju on näistä monimutkaisin: sivuketjun etyyliiryhmällä on oksoryhmä hiilessä 13 ja metyyliiryhmä hiilessä 14.

Aglykonirakennemodifikaatioita nähdään usein myös hiilissä 10, 4 ja 11. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

Antrasykliinit ovat parhaiten tunnettuja niiden syöpäsoluja tuhoavista ominaisuuksistaan, vaikka niiden on alun perin ajateltu olevan potentiaalisia antibiootteja. Näitä antibiootteja tutkittaessa niiden havaittiin sattumalta tuhoavan myös syöpäsoluja. (Weiss 1992.) Antrasykliinejä on käytetty syöpähoitona jo yli 50 vuotta, ja niillä hoidetaan yli miljoonaa syöpäpotilasta vuosittain (Hulst ja muut 2022).



Kuva 9. A. Antrasykliinien perusrakenne, renkaat nimetty kirjaimin ja hiilet numeroituna. Eri antrasykliineillä on erilaisia sivuketjuja R. Muokattu kuvasta Hertweck ja muut 2007. B. Antrasykliinejä. Kuvassa esiteltynä tunnetuimmat antrasykliiniperheet (daunomysiini-, aklasinomysiini- ja nogalamysiiniperheet). Kuva havainnollistaa erilaisten aglykonirakenteiden (antrasyklinoni) ja niihin liittyneiden sokeriosien variaatioita. Muokattu kuvasta Abdella ja Fisher 1985.

Parhaiten tunnettuja antrasykliinejä ovat daunorubisiini ja doksorubisiini (Weiss 1992). Daunorubisiini on niin kutsuttuja ensimmäisen sukupolven antrasykliinejä, josta on johdettu useita toisen sukupolven antrasykliinejä. Näistä lääkehoidossa on käytössä esimerkiksi epirubisiini ja idarubisiini. (Minotti ja muut 2004.) Muita kiinnostavia lääketutkimuksissa vuosien aikana mukana olleita antrasykliinejä

ovat esimerkiksi pirarubisiini, akklarubisiini ja nogalamysiini (Hertweck ja muut 2007).

Vaikka antrasykliinit ovatkin tehokkaita monenlaisia syöpäsoluja vastaan, ne ovat valitettavasti toksisia myös muille soluille. Erityisesti kardiotoksisuus on näiden lääkeaineiden suuri ongelma, ja pääasiallinen syy uusien antrasykliinien kehitystyön taustalla. (Weiss 1992.) Etsittäessä parempaa antibioottia tai syöpälääkettä, yksi mahdollisuus on käyttää jo tunnettua bioaktiivista yhdistettä suunnittelun pohjana, ja muuttaa tämän bioaktiivisia osia, jolloin voidaan löytää yhdiste, jolla on samat positiiviset vaikutukset ja mahdollisesti lievemmat haittavaikutukset. (Hulst ja muut 2022.) Kardiotoksisuuteen voidaan kuitenkin vaikuttaa säännöstelemällä annoksen koko sellaiseksi, että siitä on mahdollisimman vähän haittaa potilaalle ja mahdollisimman suuri hyöty hoidon kannalta. (Weiss 1992.)

Antrasykliinit ovat sytotoksisia myös niiden tuottajakannalle. Tästä johtuen niiden tuotanto onkin tiukasti säädeltyä, ja yleensä niiden tuotantoon yhdistyy usein resistanssigeenien ilmentäminen. Streptomykeetit kuljettavat antrasykliinit yleensä ulos ABC-transporttereiden avulla. Näin niiden toksisuus itse tuottajakannalle vähenee. (Hulst ja muut 2022.)

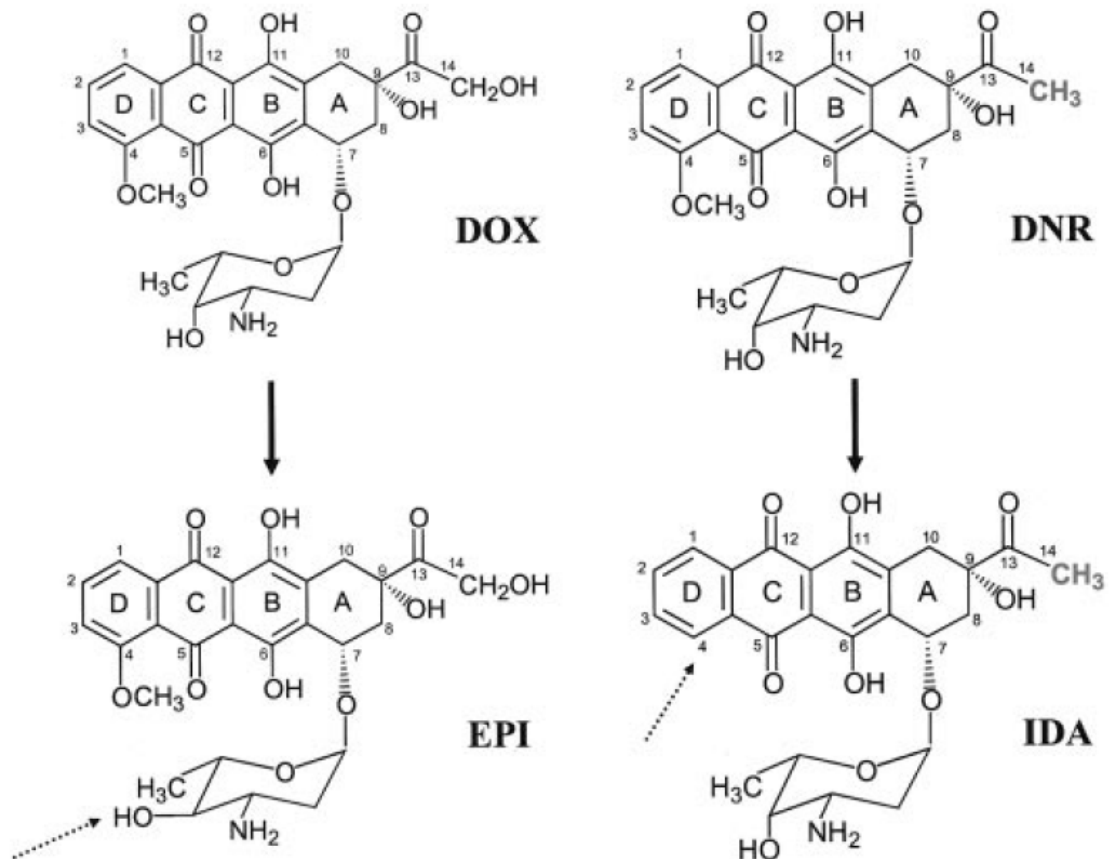
1.4.1 Daunorubisiini

Daunorubisiinilla, joka tunnetaan myös nimellä daunomysiini, on tetrasyklinen aglykonirakenne (Kuva 10), jossa on vierekkäiset kinoni-hydrokinonirenkaat C-B, metoksiryhmä hiilessä neljä, renkaassa D ja lyhyt sivuketju hiilessä yhdeksän sekä karbonyyliryhmä hiilessä 13. Daunosamiinisokeri, 3-amino-2,3,6-trideoksi-L-fukosyyli on kiinnittyneenä glykosididoksella hiileen seitsemän renkaassa A. (Minotti ja muut 2004.)

Daunorubisiini on eristetty jo 1960-luvun alussa *Streptomyces peucetiuksesta* (Di Marco ja muut 1981). Doksorubisiini on daunorubisiinin johdannainen. Vaikka daunorubisiinilla ja doksorubisiinilla on vain pieni rakenteellinen eroavaisuus sivuketjussa R3 (Kuva 9), sillä on suuri vaikutus aktiivisuuteen. Doksorubisiini on tehokas rintasyöpää ja aggressiivista lymfoomaa vastaan, kun taas daunorubisiini on tehokas akuuttia lymfoplastista tai myeloplastista leukemiaa vastaan. (Minotti ja muut 2004.) Koska yhdisteet ovat todella kardiotoksisia, niiden annostus on

tarkasti säädeltyä. Ne ovat toisaalta myös tehokkaita, minkä vuoksi on tehty jatkuvaa tutkimustyötä vastaavan lääkkeen löytämiseksi paremmilla ominaisuuksilla. (Weiss 1992.)

Daunorubisiinista on johdettu tuhansia analogeja. Näistä toisen sukupolven antrasykliineistä on hyväksytty kliniseen käyttöön vain muutama. Esimerkkeinä daunorubisiinista johdettu idarubisiini (Borchman ja muut 1997), josta on poistettu metoksyryhmä hiilestä neljä renkaassa D (Kuva 10) ja doksorubisiinista johdettu epirubisiini (Robert 1993), jota on muokattu daunosamiiniryhmän (sokeriosa) C4-hiilen hydroksyyliiryhmän epimerisaatiolla (akσιαalisesta ekvatoriaaliseksi). (Minotti ja muut 2004.)

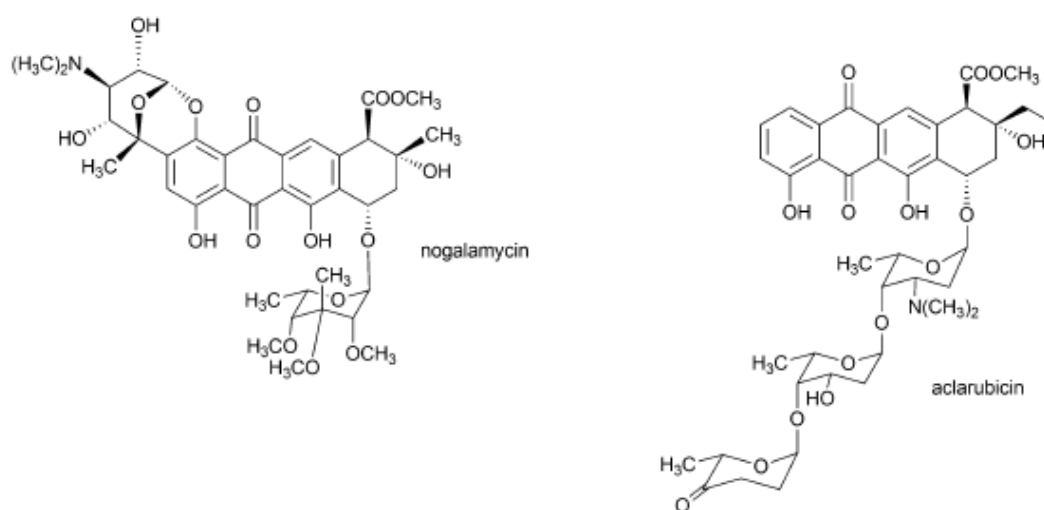


Kuva 10. Doksarubisiinin (DOX) ja daunorubisiinin (DNR) rakenteet, sekä näistä johdettujen toisen sukupolven antrasykliinien, epirubisiinin (EPI) ja idarubisiinin (IDA) rakenteet. DNR:n ja IDA:n sivuketjun metyyliiryhmä merkitty harmaalla eroavaisuuden korostamiseksi. Nuolilla merkitty EPI:n ja IDA:n rakenteellista eroa verrattuna DOX:n ja DNR:n. Muokattu kuvasta Minotti ja muut 2004.

1.4.2 Nogalamysiini

Nogalamysiinillä on antrasykliineille tyypillinen lineaarinen tetrasyklinen perusrakenne, aglykoniydin nimeltään nogalamysinoni, johon on kiinnittyneenä kaksi sokeriosaa: L-rhodasamiini (amiinisokeri) ja L-nogaloosi (Kuva 11) (Li ja Krueger 1991). Nogalamysiinistä tekee bioaktiivisen ja samalla myös mielenkiintoisen tutkimuskohteen sen kaksi sokeriosaa: 7-O-glykosidisesti liittynyt L-nogaloosi ja C5"-C2-hiili–hiilidoksella liittynyt L-nogalamiini, joka muodostaa epoksioksasiinirenkaan (epoxyoxacin ring) (Siitonen ja muut 2016).

Nogalamysiini on eristetty *Streptomyces nogalaterista* jo 1960-luvulla. Vaikka nogalamysiinillä onkin syöpäsoluihin vaikuttavia ominaisuuksia, se ei ole varsinaisessa lääkekäytössä syöpähoitona sen kardiotoxisuuden vuoksi. (Bhuyan ja Smith 1975.) Sen on kuitenkin osoitettu viime vuosien aikana olevan tehokas myös muita sairauksia, kuten Lymen tautia eli borrelioosia (Feng ja muut 2015) ja Huntingtonin tautia (Lee ja muut 2017), vastaan. Tämän vuoksi nogalamysiini ja sen analogit ovatkin yhä edelleen kiinnostava tutkimuskohde.



Kuva 11. Nogalamysiinin ja akklarubisiinin perusrakenteet. Muokattu kuvasta Hertweck ja muut 2007.

1.4.3 Aklasinomysiini

Akласinomysiineillä on tetrasyklinen aglykonirakenne, johon on kiinnittyneenä trisakkaridi hiileen seitsemän. Trisakkaridin kaksi ensimmäistä sokeriosaa ovat rodosamiini ja 2-deoksifukoosi ja kolmas sokeriosa vaihtelee eri akласinomysiinien välillä. Akласinomysiini N:llä se on rodinoosi, akласinomysiini

A:lla sineruloosi, aklasinomysiini Y:llä L-akuloosi ja aklasinomysiini B:llä sineruloosi B. (Alexeev ja muut 2007.)

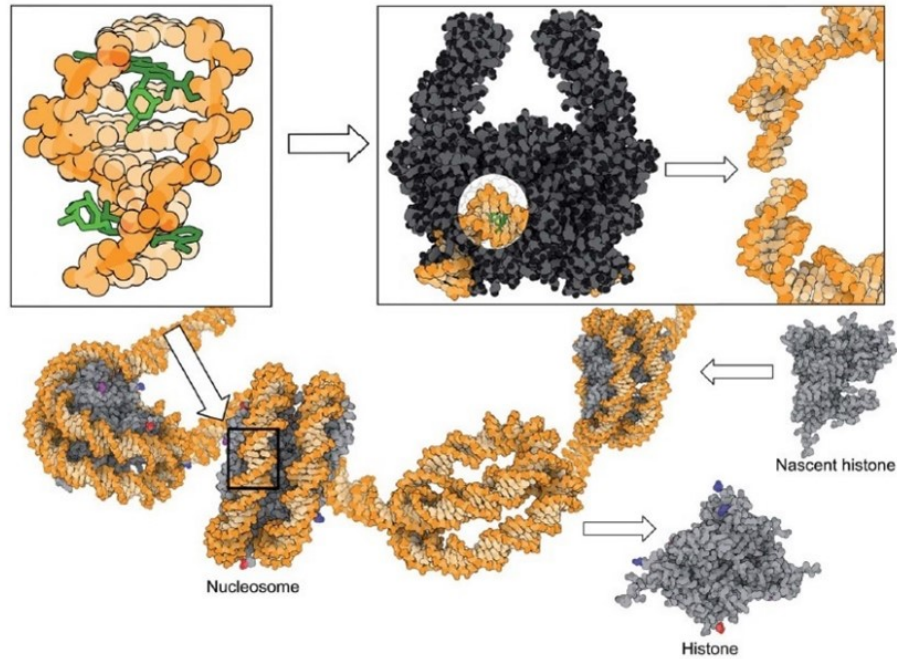
Aklasinomysiinit ovat hyvin tutkittuja aromaattisia polyketidejä, joita tuotetaan useiden eri streptomykeettien avulla. Yksi tutkituimpia aklasinomysiinejä on *Streptomyces galilaeuksen* tuottama aklasinomysiini A (Kuva 11), joka tunnetaan myös nimellä akklarubisiini. (Oki ja muut 1975.) Sitä käytetään akuutin leukemian sekä Non-Hodgin-lymfooman hoitoon (Alexeev ja muut 2007).

1.4.4 Antrasykliinien toimintamekanismi

Antrasykliineillä on kaksi pääasiallista toimintamekanismia: ne joko sitoutuvat DNA-kaksoiskierteeseen lamauttaen topoisomeraasi II:n (nogalamysiinin tapauksessa topoisomeraasi I:n) ja/tai poistavat DNA:han sitoutuneet histonit (Kuva 12). Tämä johtaa yleensä DNA:n hajoamiseen ja apoptoosiin. (Lorico ja Long 1993.)

Mielenkiintoista kyllä, on myös havaittu, että kardiotoksisuutta ei yleensä esiinny antrasykliineillä, jotka vaikuttavat vain toisella näistä toimintamekanismeista. Yksi antrasykliinien tehokkuudesta nimenomaan syöpäsoluja vastaan perustuu sille, että nopeasti kasvavat solut, kuten syöpäsolut, ovat erityisen alttiita DNA:n hajoamiselle. Peruuttamattomia muutoksia aiheutuu kuitenkin, kun myös muut nopeasti kasvavat solut tuhoutuvat. (Hulst ja muut 2022.)

Antrasykliinit voivat vaikuttaa myös muodostamalla vapaita radikaaleja. Antrasykliinirenkaan entsyymattinen pelkistys tuottaa semikinonivapaan radikaalin, joka johtaa hydroksyylivapaan radikaalin muodostukseen. Antrasykliinimolekyylin hydrokinonin konjugaatio solunsisäisellä ferriraudalla saatta johtaa vapaiden radikaalien ei-entsyymattiseen tuotantoon. Vapaiden radikaalien aiheuttamaa vahinkoa esiintyy terveissä ja kasvainkudoksissa solukalvon lipidien peroksidaation yhteydessä. Tällä vapaiden radikaalien muodostuksella on lähinnä kardiotoksisia vaikutuksia. Monet terveet kudokset sisältävät kuitenkin vapaita radikaaleja estäviä entsyymejä, jolloin antrasykliinien vapaat radikaalit vaikuttavat pääasiassa kasvainkudoksissa. Valitettavasti sydämen kudoksilta nämä entsyymit puuttuvat, jolloin nämä kudokset ovat alttiita vapaille radikaaleille. (Hortobágyi 1997.)

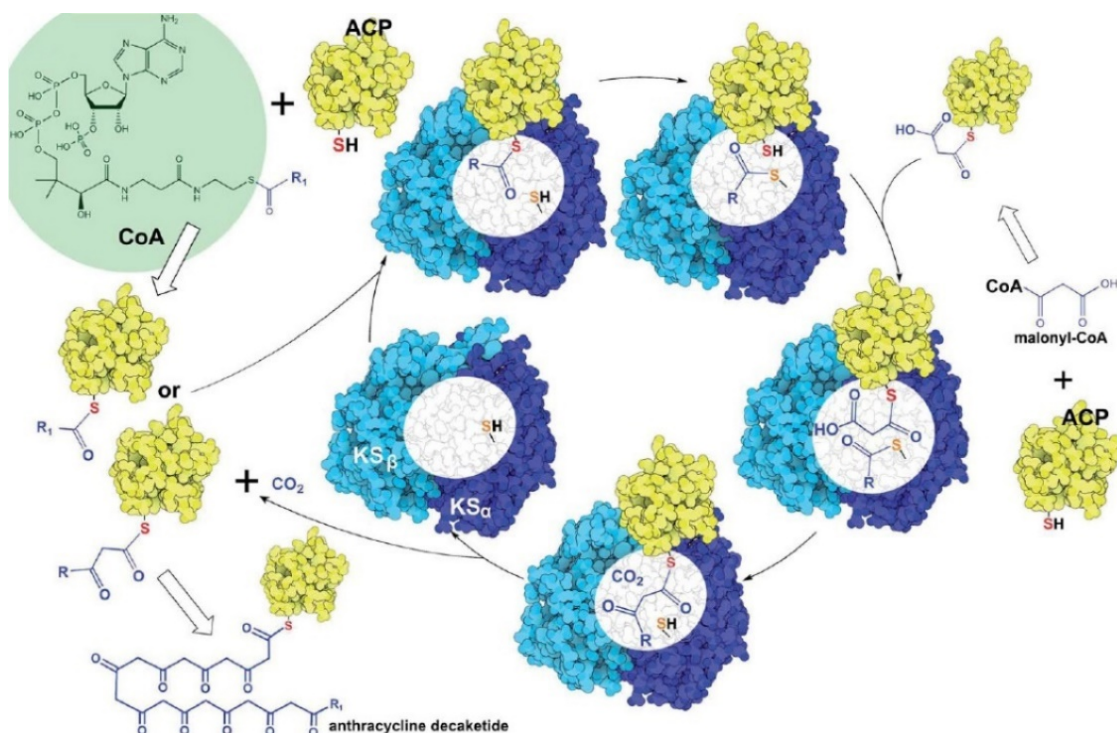


Kuva 12. Antrasykliinien toimintamekanismi. Antrasykliinien (doksorubisiini, vihreä) aglykoniosa asettuu DNA kaksoiskierteen väliin. Topoisomeraasi II (musta) myrkyttyy ja johtaa kaksoiskierteen hajoamiseen. Antrasykliinit voivat myös vaikuttaa vapauttamalla histoneita (harmaa) nukleosomista. Tämä muuttaa DNA:n saavutettavuutta ja vaikuttaa geenien transkriptioon. Histonien korvautuminen uusilla (Nascent histone) johtaa epigeneettisen informaation häviämiseen. Muokattu kuvasta Hulst ja muut 2022.

1.5 Antrasykliinien biosynteesi

Antrasykliinien synteesireitti alkaa tyypin II polyketidisyntaasin, minimaalisen polyketidisyntaasin (minPKS) avulla hyvin yksinkertaisista osista: yhdestä asetyyli- tai propionyyli-KoA-aloitusyksiköstä ja yhdeksästä malonyyli-KoA-pidennysyksiköstä. Antrasykliinien, joilla on etyyliryhmä hiilessä yhdeksän, aloitusyksikkönä toimii pidempi propionyyli-KoA (daunorubisiini ja aklasinomysiini). Ennen pidennysreaktion alkua apo-muodossa oleva ACP tulee muuttaa holo-muotoon liittämällä siihen fosfopanteteiiniiryhmä holo-ACP-syntaasin avustamana. Tämän jälkeen malonyyli-KoA:n malonyyliryhmä yhdistetään ACP:hen MCAT:n avustamana. Malonyyli-ACP:n yhdistyminen $KS\alpha$ / $KS\beta$ -heterodimeeriin aloittaa pidennysreaktion (Kuva 13), joka tapahtuu yhdeksän kertaa rasvahapposynteesiä muistuttavalla Claisenin kaltaisella kondensaatioreaktiolla (Claisen-like condensation reaction). Malonyyliryhmän karboksylaatiosta seuraava asetyyliryhmän siirto $KS\alpha$:n aktiiviseen kohtaan johtaa syntaasin virittymiseen ja pidennysreaktio jatkuu, kunnes lopputuloksena

on hyvin reaktiivinen 20-hiilinen polyketidien poly- β -keto-perusrakenne. (Metsä-Ketelä ja muut 2003.)

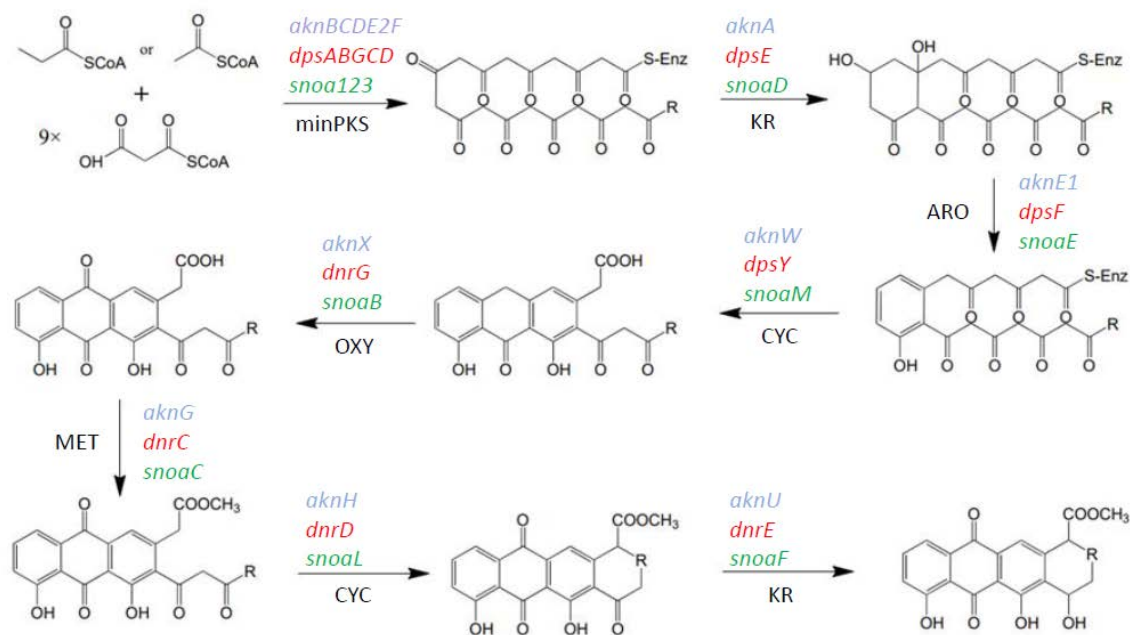


Kuva 13. Minimaalisen polyketidisyntaasin toimintamekanismi. Biosynteesi alkaa asyyli- tai propionyyliyhdyntämällä ACP:in (keltainen). Katalyyttisen syklin aikana kasvava polyketidi siirretään ACP:lta KS α :n (violetti) aktiivisella alueella sijaitsevalle kysteiinille. ACP siirtää myös malonyyliyksiköt ketosyntaasille. KS β katalysoi reaktiota, ja polyketidi kasvaa joka reaktiolla aina kahdella hiilellä. Samanaikaisesti polyketidi siirretään takaisin ACP:lle. Tätä jatkuu yhdeksän kierrosta. Muokattu kuvasta Hulst ja muut 2022.

Pidennysreaktiota katalysoiva minPKS koostuu aina vähintään ACP:sta ja KS α /KS β -heterodimeeristä, mutta tuottajakannasta riippuen mukana voi olla myös muita entsyymejä (Räty ja muut 2002). Daunorubisiin biosynteesissä toimii minPKS:n yhteydessä myös kaksi muuta entsyymiä: DpsC ja DpsD (Grimm ja muut 1994). DpsC on kolibakteereissa toimivan rasvahapposynteesin aloittavan ketosyntaasin (KSIII) homologi, ja DpsD on usean asyyli transferasin homologi. Samaten aklasinomyysiin biosynteesissä on mukana kyseisten entsyymien homotologit, AknE2 ja AknF. (Räty ja muut 2002.)

Mikäli reaktioreitin seuraavia entsyymejä ei ole läsnä, minPKS:n muodostamasta erittäin epävakaasta 20-hiilisestä polyketidirakenteesta muodostuu useiden sykliisaatioiden kautta hyvin monenlaisia ja monin eri tavoin laskostuneita

polyketidejä. Valtaosa antrasykliineistä kuuluu pelkistettyihin polyketideihin, joiden hiilessä yhdeksän oleva ketoryhmä on pelkistetty ensimmäisen renkaan muodostuksen jälkeen ketoreduktaasin (KR) avustamana (Kuva 14). Tämä ketopelkistys on mukana kaikissa antrasykliinireaktioteissa steffimysiiniä lukuunottamatta, jolla tämän vaiheen puuttuminen johtaa hydroksyyliiryhmään hiilessä kaksi. (Metsä-Ketelä ja muut 2003.)



Kuva 14. Aglykonirenkaan muodostus. Kuvassa esiteltynä kaikki renkaiden muodostukseen vaadittavat entsyymit, sekä entsyymien ilmentämiseen vaadittavat geenit kolmesta tunnetuimmasta antrasykliiniperheestä: aklasinomysiini (*akn*) daunorubisiini (*dnr*) ja nogalamysiini (*snoa*). (Räty ja muut 2002; Metsä-Ketelä ja muut 2003; BioCyc ID: PWY-7352)

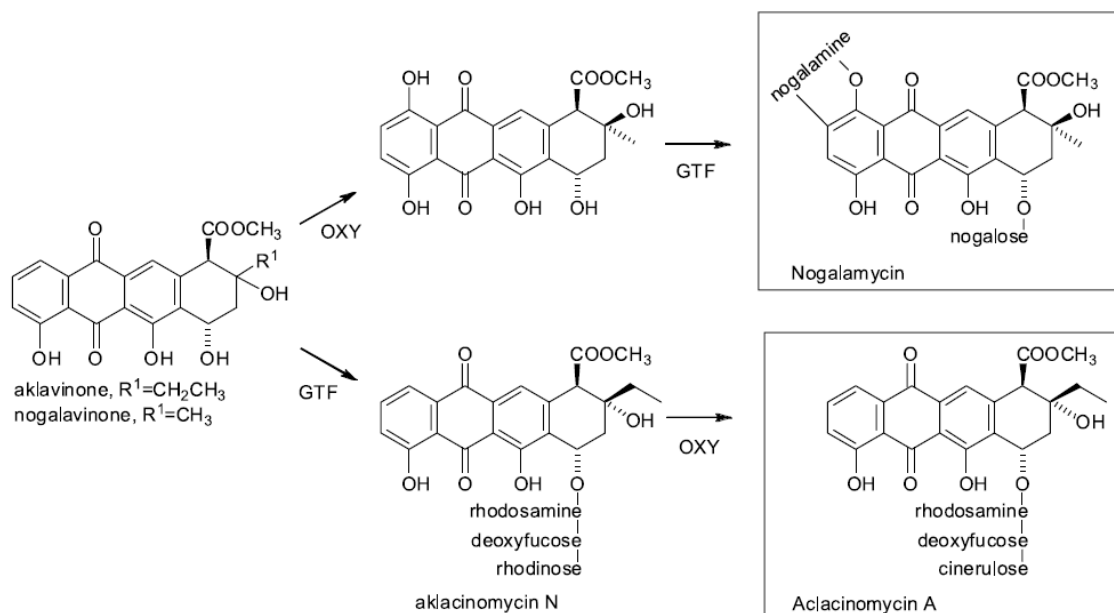
Pelkistysreaktion jälkeen polyketidin ensimmäinen rengas aromatisoidaan aromataasin (ARO) avustamana, jota seuraa toisen ja kolmannen renkaan syklisaatiot syklaasin (CYC) avustamana. Ensimmäinen vakaa välituote, aklanoni- tai nogalonihappo, syntyy, kun hiili 12 hapetetaan mono-oksygenaasin (OXY) avustamana. Tämän jälkeen karboksiryhmä metyloidaan S-adenosyyli-L-metioniini-riippuvaisen (SAM) metyyli transferaasin MET) avustamana ja muodostetaan viimeinen rengasrakenne esterisyklaasin (CYC) avustamana lukuunottamatta steffimysiiniä, jolla nogalonihaposta muodostuu suoraan dekarboksylatiivisen syklisaation kautta nelirenkainen aglykonirakenne. Lopuksi kaikkien antrasykliinien ketoryhmä hiilessä seitsemän pelkistetään NAD(P)H-

riippuvaisen ketoreduktaasin (KR) avustamana antrasykliinien perusrakenteeksi, aklavinoniksi tai nogalavinoniksi. Polyketidien muodostus on hyvin konservoitunutta. Mikäli jokin näistä entsyymeistä puuttuu, lopullista neljärenkaista aglykoniydintä ei synny. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

Antrasykliineistä tekee bioaktiivisia niiden aglykoniosaan liitettävät sokeriosat ja muut aglykoniosan muodostuksen jälkeiset muokkaukset. Aklavinoni ja nogalavinoni ovat antrasykliinien biosynteesireittien tärkeitä välituotteita. Aklavinoneista muodostetaan aklasinomysiiniä ja daunorubisiinia liittämällä rakenteeseen tarpeelliset sokeriosat. Nogalavinonista muodostetaan nogalamysiinien aglykoniperusrakenne C-1-hydroksylaation avulla, jonka jälkeen rakenteeseen liitetään tarpeelliset sokeriosat nogalamysiinin muodostamiseksi. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

1.5.1 Aglykoneista antrasykliineiksi

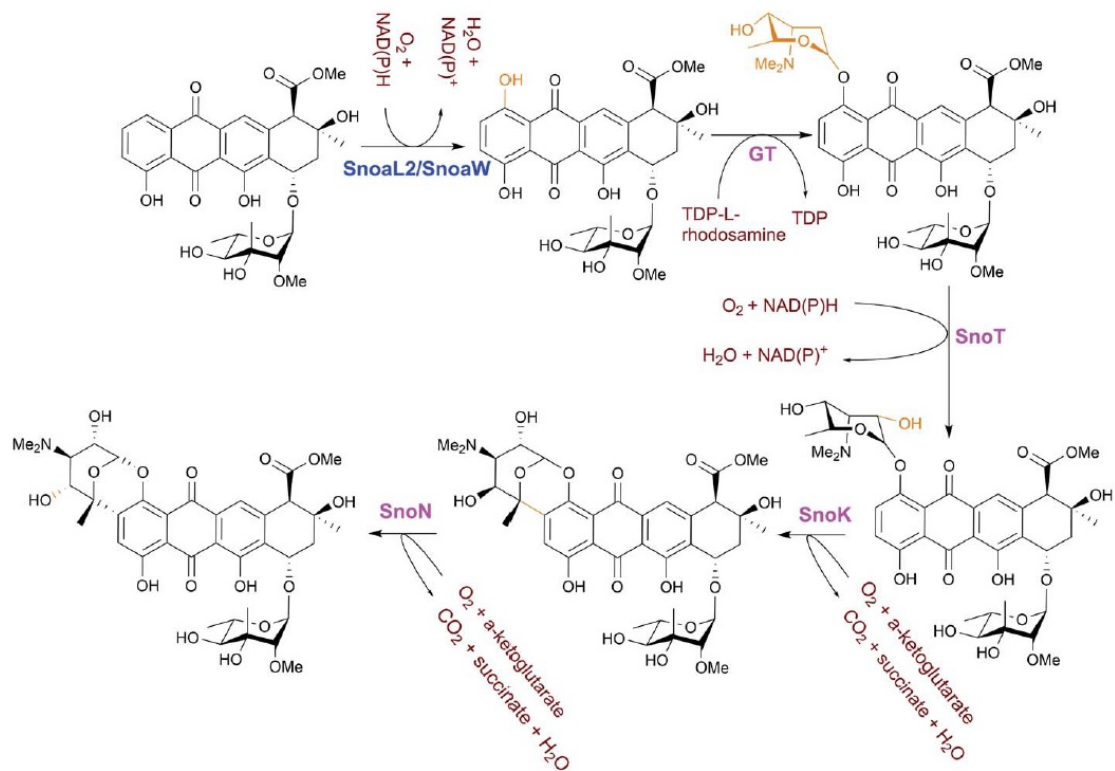
Antrasykliinien lopullisen rakenteen muodostukseen vaikuttavista muokkauksista merkittävin on glykosylaatio, jossa D-glukoosi-6-fosfaatista johdetut deoksisokeriosat liitetään aglykonirakenteeseen (Kuva 15). Daunorubisiinilla kyseinen sokeriosa on L-daunosamiini ja se on liitettynä hiileen seitsemän. Nogalamysiinin sokeriosa on liitettynä samaan hiileen, mutta sokerina on L-



Kuva 15. Nogalamysiinin ja aklasinomysiinin muodostus aklavinonista ja nogalavinonista oksygenaasien (OXY) ja glykosyylitransferaasien (GTF) avustamana. Muokattu kuvasta Metsä-Ketelä ja muut 2008.

nogaloosi. Aklasinomysiini A:lla hiileen seitsemän on liittyneenä trisakkaridi: L-rhodosamiini, L-2-deoksifukoosi ja L-sineruloosi. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

Nogalamysiinillä on lisäksi ainutlaatuinen rengasrakenne: L-nogalamiini on kiinnittyneenä aglykonirakenteeseen kahdella eri sidoksella, O-glykosylaatiolla hiileen yksi ja hiilten kaksi ja viisi välisellä hiili-hiilisidoksella. Nogalamysiinin sokeriosien substraatteina toimivat TDP-L-nogaloosi ja TDP-L-rhodosamiini, ja ne liitetään aglykonirakenteeseen glykosyyli transferaasien avustamana. SnogD-glykosyyli transferaasi vastaa L-nogaloosin glykosylaatiosta aglykonirakenteeseen. L-nogalamiinin epoksioksasiinirenkaan muodostukseen osallistuu viisi eri entsyymiä tai entsyymikompleksia (Kuva 16): SnoaL2/SnoaW-hydroksylaasi, SnoT-hydroksylaasi, SnoK-oksigenaasi ja SnoN-oksigenaasi. (Siitonen ja muut 2016; Nji Wandu ja muut 2021.)



Kuva 16. Nogalamysiinin epoksioksasiinirenkaan muodostus. Muokattu kuvasta Hulst ja muut 2022.

1.5.2 Deeksisokereiden biosynteesi

Antrasykliinien sokeriosien biosynteesin entsyymattisten vaiheiden tutkiminen on ollut hankalaa aktivoitujen hiilihydraattisubstraattien saavuttamisen vuoksi. Näiden multikiraalisten yhdisteiden kemiallinen synteesi on monimutkainen,

eivätkä niiden intermediaatit ole yleensä stabiileja. Niistä tiedetään kuitenkin tästä huolimatta jo paljon nykyisten kehittyneempien tutkimusmenetelmien, kuten kristallografian vuoksi. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

Deoksisokeriosien biosynteesi alkaa glukoosi-1-fosfaatin aktivoimisella dTDP-D-glukoosiksi, jota seuraa muunto dTDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoosiksi 4,6-dehydrataasin katalysoimana. Tästä sokeri-intermediaatista muokataan suuri osa antrasykliinien 2,6-dideoksi- ja 2,3,6-trideoksiheksooseiksi erilaisilla reaktioyhdistelmillä, kuten eliminaatiolla, pelkistyksellä, isomerisaatiolla, epimerisaatiolla ja amino- ja metyyliiryhmien siirtoreaktioilla. (Metsä-Ketelä ja muut 2008.)

1.6 Kolibakteerit

Kolibakteeri eli *Escherichia coli* on gram-negatiivinen bakteeri, jonka saksalainen lääkäri Theodor Escherich on alun perin löytänyt ihmisen suolistosta vuonna 1885 (Feng ja muut 2002). Se on siis ollut tutkimuksen kohteena hyvin kauan, ja tästä johtuen sen biologiset ominaisuudet ja fysiologia tunnetaan hyvin. Yleisimmät tutkimuksessa käytettävät kolibakteerikannat on lähtökohtaisesti luokiteltu vaarattomiksi. Jotkin kannat vaativat varovaisempaa käsittelyä, ja riippuen tutkimuksesta, tulee niitä käsitellä alueen laatiman lainsäädännön vaatimalla tavalla. Tämä ei kuitenkaan ole lähtökohtaisesti kynnyskysymys valittaessa tutkimustarkoituksiin sopivaa tuottajakantaa. (Pontrelli ja muut 2018.)

Kolibakteerikantoja on suhteellisen yksinkertaista kasvattaa: solupopulaation kaksinkertaistumiseen kuluva aika on lyhyt (alle 30 minuuttia), ja ne kasvavat hyvinkin erilaisissa kasvuolosuhteissa (Taulukko 1). Niiden geneettinen muokkaus on yksinkertaista ja siihen on kehitetty lukemattomat määrät erilaisia työkaluja. Yhdisteiden tuotto on myös yleensä nopeaa, jopa alle vuorokauden. Kaikki nämä edellä mainitut syyt selittävät sen, miksi kolibakterien käyttö tuottajakantana tutkimuksessa ja teollisuudessa on yleensä kannattava vaihtoehto ja parhaassa tapauksessa madaltaa myös kustannuksia. (Francis ja Page 2010.)

Vuonna 1998 sekvensoitiin K-kanta, MG-1655, joka on tähän päivään mennessä yksi käytetyimmistä kolibakteerikannoista. Myös B-kanta, BL21, ja sen johdannainen, BL21 (DE3), ovat yleisiä rekombinanttien proteiinien tuotannossa.

(Pontrelli ja muut 2018.) Myös tässä tutkielmassa tuottokokeissa käytettävä kanta, BAP1 (BL21(DE3) Δ prpRBCD::*T7prom-sfp*, *T7prom-prpE*), on B-kannan johdannainen.

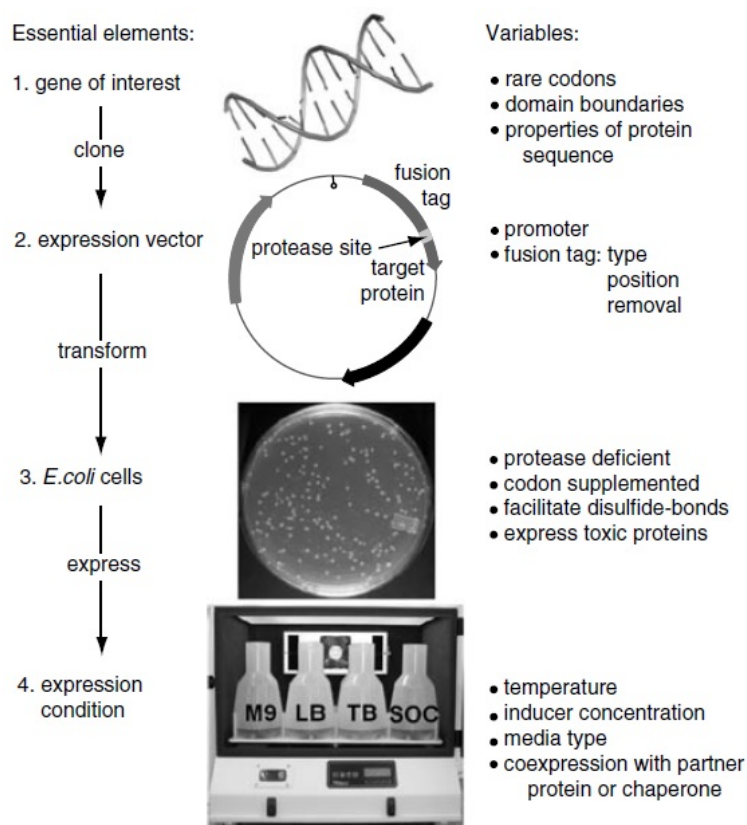
Taulukko 1. Rekombinanttien proteiinien tuottokantojen vertailutaulukko (Francis ja Page 2010).

	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells	Cell-free ^a (<i>E. coli</i>)	Cell-free ^a (wheat germ)
Average time of cell division	30 min	90 min	18 hr	24 hr	N/A	N/A
Cost of expression	Low	Low	High	High	High	High
Expression level	High	Low-High	Low-High	Low-Moderate	Low-High	Low-High
Success rate (% soluble)	40-60	50-70	50-70	80-95	Variable	Variable
Advantages	Simple, low cost, rapid, robust, high yield, easy labeling for structural studies	Simple, low cost	Post-translational modifications	Natural protein configuration, post-translational modifications	High yield, fast, flexible, disulfide-bonded and membrane proteins, easy labeling for structural studies	Fast, flexible, disulfide-bonded and membrane proteins, post-translational modifications
Disadvantages	No post-translational modifications, insoluble protein, production of disulfide-bonded and membrane proteins is difficult	Less post-translational modifications, production of membrane proteins is difficult	Slow, higher cost, production of membrane proteins is difficult	Slow, high cost, lower yield	High cost, less post-translational modifications, efficient production requires highly-specialized setup	High cost, lower yield than <i>E. coli</i> cell-free system, efficient production requires highly specialized setup

Kolibakteereilla on myös heikkouksia tuottajakantana. Niiden avulla ei voi tuottaa glykosyloituja biofarmaseuttisia tuotteita, monimutkaisia rakenteita sisältäviä translaationjälkeistä muokkausta vaativia proteiineja (joille kolibakteereista ei löydy sopivia entsyymejä) tai proteiineja, joilla on suuri määrä disulfididisidoksia. Ne eivät myöskään siedä hyvin matalaa tai korkeaa pH:ta, korkeaa suolapitoisuutta eikä korkeita lämpötiloja. Näissä olosuhteissa voidaan saavuttaa hyötyä esimerkiksi kontaminaatioiden ehkäisyssä ja tietyissä erityisolosuhteita vaativissa bioprosesseissa. (Pontrelli ja muut 2018.)

1.6.1 Yhdisteiden tuottaminen kolibakteereissa

Haluttujen geenien ilmentäminen, ja sitä kautta toivotun tuotteen tuottaminen kolibakteereissa vaatii neljä asiaa: kiinnostuksen kohteena olevien geenien geenisekvenssit, ekspressiovektorin, ilmentämiseen käytettävän solulinjan ja solukasvatusvälineistön ja -materiaalit (Kuva 17) (Francis ja Page 2010). Ensin tutkittavat geenit kloonataan valikoituun ilmentämisvektoriin. Tämän jälkeen tämä vektori transformoidaan käytettävään kolibakteerikantaan. Seuraavaksi tätä kantaa kasvatetaan tuotettavan proteiinin kannalta sopivissa olosuhteissa, kunnes se on kasvun kannalta valmis proteiinituotantoon, jolloin

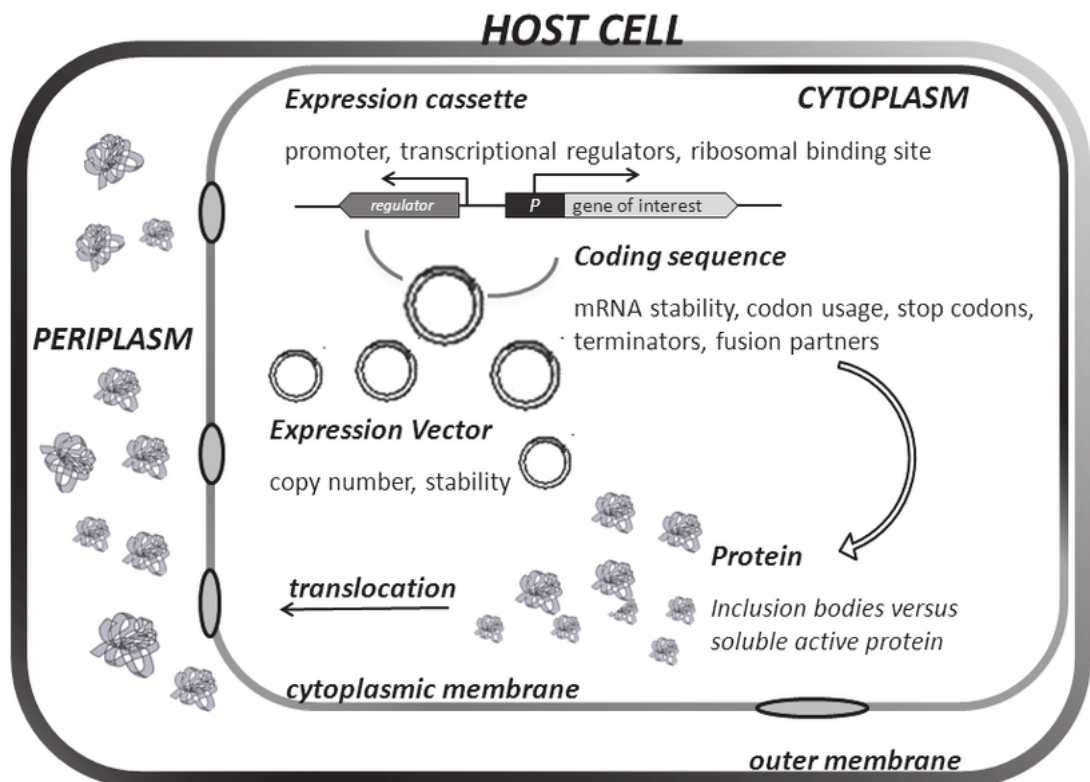


Kuva 17. Proteiinituotannon vaiheet ja tarvittavat elementit (Francis ja Page 2010).

proteiinituotanto käynnistetään jollakin indusoidilla (tässä tutkimuksessa IPTG, isopropyyl- β -D-1-tiogalaktopyranosidi). Tuotannon jälkeen proteiinit tai proteiinien tuottamat yhdisteet eristetään siihen sopivalla menetelmällä, jonka jälkeen ne voidaan analysoida kvalitatiivisesti ja/tai kvantitatiivisesti siihen sopivalla laitteistolla. (Francis ja Page 2010.) Kolibakteerien proteiiniexpressiosysteemi koostuu ilmentämiskasetista (promoottori, transkription säätelijät, ribosomien sitoutumisalue), koodattavasta sekvenssialueesta ja ilmentämisvektorista (Kuva 18). Näiden avulla solu voi tuottaa toivottuja proteiineja, jotka siirretään sytoplasmasta soluseinän välitilaan (periplasma). Mikäli tutkitaan tuotettujen proteiinien sijaan näiden proteiinien tuottamia yhdisteitä, eikä ole täysin selvää, siirtyvätkö tuotetut yhdisteet solun ulkopuolelle, on hyvä analysoida sekä solumassa että kasvatusliuos erikseen. (Pettersen 2012.)

Tutkittavaa geenisekvenssiä suunniteltaessa on kannattavaa huomioida, että on järkevää optimoida käytettävien geenien kodonit kolibakteereille sopiviksi siten, että geenisekvenssit eivät sisällä kolibakteereille harvinaisia kodoneita. Kun

valitaan tutkimukseen sopivaa vektoria, tulee huomioida, että valittava vektori sisältää kaikki elementit, jotka ohjaavat kohdegeenien transkriptiota ja translaatiota. Näitä elementtejä ovat muun muassa: promoottorit, säätelysekvenssit, Shine-Dalgarno alue, transkriptionaaliset terminaattorit ja replikaation aloituskohta, sekä selektiomarkkeri, kuten antibioottilääkettä resistenssigeeni. Mikäli tarkoitus on eristää proteiinit, tulee mukana olla myös fuusiomerkki (fusion tag), jonka avulla proteiinit saadaan eristettyä kasvatusliuoksesta. (Francis ja Page 2010.)



EXTRACELLULAR SPACE medium composition, pH, temperature, oxygen availability

Kuva 18. Kolibakteerien geeniekspressiosysteemi (Pettersen 2012).

Vektorien valinnassa tulee myös huomioida, että DNA:n replikaatio alkaa replikaation aloituskohdasta. Se myös määrittää vektorin kopioluvun. Kopiolut vaihtelevat väliltä 2-20 (matala) yli sataan (korkea). (Boros ja muut 1984.) Yleensä suositaan korkean kopioluvun vektoria, sillä se usein johtaa korkeisiin saantoihin. Mikäli käytetään useampaa plasmidia samassa organismissa, replikaation aloituskohdat tulee myös ottaa huomioon. Replikaation aloituskohtien tulee erota, jotta solu tukee kummankin vektorin ekspressiota. (Francis ja Page 2010.)

Myös ilmentämiskasettiin kuuluvan promoottorin valinnalla voi vaikuttaa proteiinituotantoon. RNA-polymeraasin sitoutuminen promoottoriin aloittaa mRNA:n synteesin. Polymeraasin sitoutumisen tehokkuus riippuu täysin promoottorin ominaisuuksista. Oikeanlaisen promoottorin avulla transkription aloituksen säätely on kontrolloitavissa, helppoa ja jopa edullista. Toksisten proteiinien tuottoon valitaan yleensä heikommin ilmentävä promoottori ja proteiinituotannon maksimoimiseen yleensä tehokas promoottori. (Francis ja Page 2010.)

1.6.2 Kloonaus kolibakteereissa

Yksi tärkeimmistä synteettisen biologian päämääristä on helpottaa biologista suunnitteluprosessia. Tähän on olemassa standardoituja työkaluja ja menetelmiä, joiden avulla geneettisten systeemien suunnittelu ja luominen on yksinkertaisempaa. Rebatchouk työryhmineen kehitti jo vuonna 1996 nukleiinihappo-osasten kloonaukseen sopivan standardoidun menetelmän, mutta se ei vielä tuolloin levinnyt kovinkaan laajaan käyttöön. Myöskään vuonna 1999 Arkinin ja Endyn julkaisema standardoitu kloonausmenetelmä ei saavuttanut tiedemaailman huomiota. Vuonna 2003 Knightin julkaisema BioBrick-menetelmä kuitenkin sai erilaisen vastaanoton ja se on nykyään käytössä laajalti tiedeyhteisöissä. BioBrickin tärkein innovaatio on, että sen avulla voidaan yhdistää mitkä tahansa kaksi BioBrick-osaa, ja tuloksena on yksi yhtenäinen BioBrick-osa, joka voidaan taas tarvittaessa yhdistää uuteen BioBrick-osaan. Standardoidun menetelmän etuna on, että tutkimuksen optimointi on yksinkertaista ja nopeaa. (Shetty ja muut 2008.)

Menetelmä hyöyntää standardoitujen biologisten osien kirjastoa. Jokainen BioBrick-osa löytyy tästä kirjastosta ja on nimetty ykstyiskohtaisella numerosarjalla (esim. BBa_151020). Rekisteristä löytyy kyseisen osan kaikki tarpeellinen tieto: sekvenssi, tarkoitus ja mahdollinen käyttäjäkokemus. Kaikki nämä biologiset osat säilötään ja jaetaan kolibakteerien plasmidipohjaisissa vektoreissa. (Shetty ja muut 2008.)

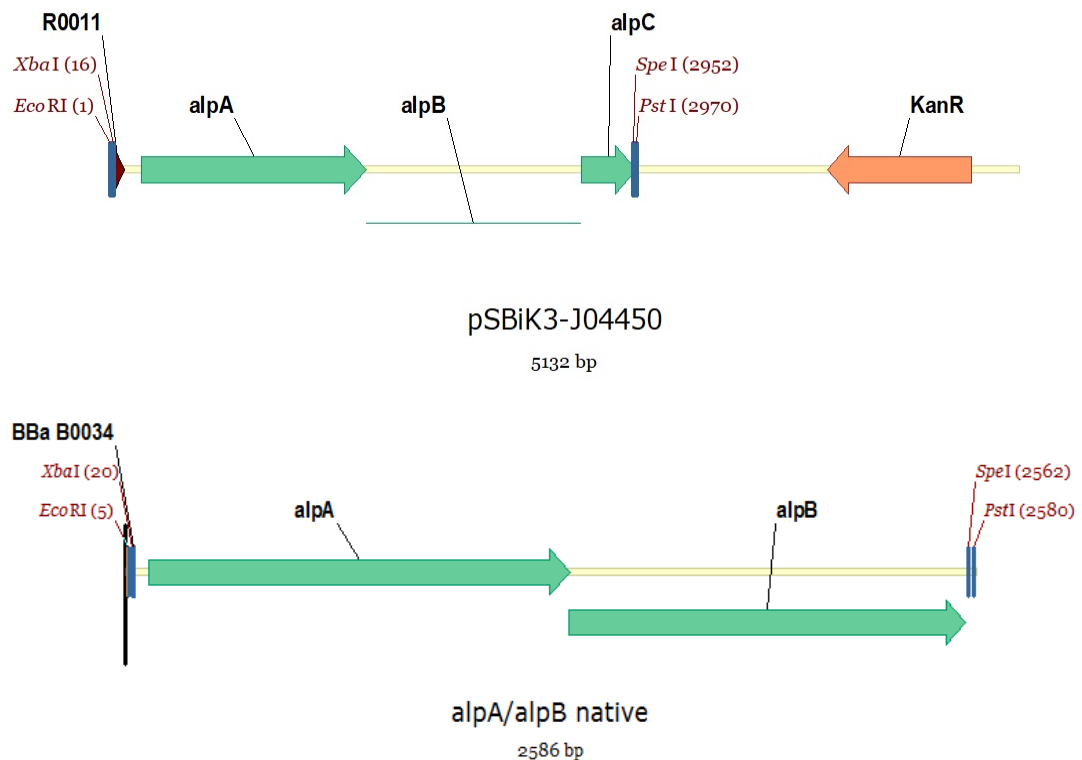
BioBrick-vektoreissa on katkaisualueet *EcoRI*-, *XbaI*-, *SpeI*- ja *PstI*-restriktioentsyymeille (Kuva 19). Insertissä, eli vektoriin liitettävässä sekvenssirakenteessa, tulee olla samat katkaisualueet. Käyttämällä kyseisiä

restriktioentsyymejä hyödyksi rakenteet voidaan katkaista siten, että syntyy kaksi erilaista osaa, jotka voidaan yhdistää ligaation avulla (Kuva 20). (Knight ja muut 2003.)

```

5' --gca GAATTC GCGGCCGC T TCTAGA G --insert-- T ACTAGT A GCGGCCG CTGCAG gct--
    --cgt CTTAAG CGCCGGCG A ACATCT C ----- A TGATCA T CGCCGGC GACGTC cga--
        EcoRI  NotI      XbaI                SpeI  NotI  PstI
  
```

Kuva 19. Esimerkkikuva BioBrick-vektorin DNA-sekvensistä (Knight ja muut 2003).



Kuva 20. Esimerkki BioBrick-osista. Yläpuolella vektori, alapuolella insertti.

Katkaisemalla vektori entsyymeillä *EcoRI* ja *XbaI*, saadaan etuvektori (front vektor, FV). Katkaisemalla insertti entsyymeillä *EcoRI* ja *SpeI*, saadaan etuinsertti (front insert, FI). Katkaisemalla vektori entsyymeillä *SpeI* ja *PstI*, saadaan takavektori (back vector, BV). Katkaisemalla insertti entsyymeillä *XbaI* ja *PstI* saadaan takaininsertti (back insert, BI). Katkaisun jälkeen muodostuvien yhteensopivien ulokkeiden avulla etuvektori ja -insertti, sekä takavektori ja -insertti voidaan yhdistää ligaation avulla toisiinsa, jolloin muodostuvassa rakenteessa on samat katkaisuentsyymialueet. Lisäksi muodostuu arpialue (scar

site), jonka sekvenssi (ACTAGA) ei ole tunnistettavissa yhdellekään käytettävälle restriktioentsyymille, jolloin sitä ei voida enää katkaista. (Knight ja muut 2003.)

1.6.3 Polyketidituotanto kolibakteereissa

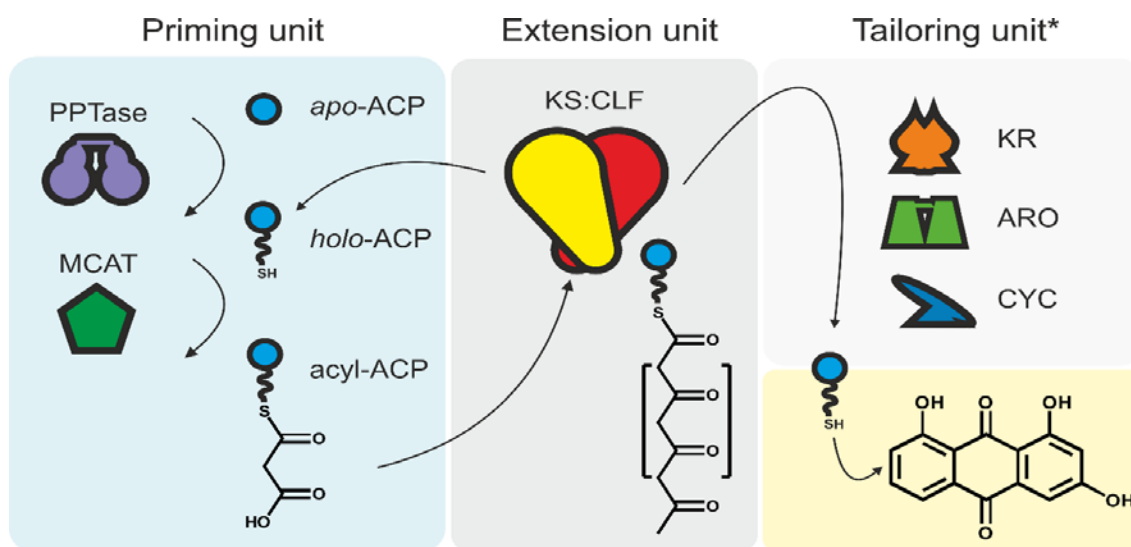
Streptomykeetit erilaistuvat morfologisesti kasvun eri vaiheissa, kasvavat tyypillisesti hitaasti ja niiden geneettiseen muokkaukseen olemassa olevat työkalut ovat usein suppeat (Cummings ja muut 2019). Sen sijaan yhdisteiden tuottaminen kolibakteerien avulla on yleensä nopeaa, tuotantoreittien muokkaamiseen ja suunnitteluun käytettävät menetelmät yksinkertaisia ja mahdollisuuksiltaan monipuolisia. Tästä johtuen kolibakteerien hyödyntämistä luonnontuotteiden tuotannossa onkin tutkittu paljon. Sen hyödyntäminen lääketieteellisesti tärkeiden luonnontuotteiden, tyyppin II polyketidien tuotannossa on kuitenkin vielä alkutekijöissään. (Liu ja muut 2020.)

Antrasykliinien yksinkertaisista osista huolimatta niiden rakenteellinen monimutkaisuus estää usein käytännöllisten synteeseittien kehittämisen laboratoriossa, jolloin fermentointi on lähes ainut mahdollinen keino niiden tuottamiseksi. Vaikka yhdisteiden tuottaminen kolibakteereissa on lähtökohtaisesti nopeaa ja suhteellisen yksinkertaista, polyketidien tuotannolle on kuitenkin omat haasteensa: (1) rakenneosien saatavuus, (2) oikein laskostuneiden ja translaation jälkeen muokattujen minimaalisten polyketidisyntaasien ilmentäminen ja (3) polyketidituotteen reaktioreitin synkronointi siten, että tuotto on mahdollisimman tehokasta. (Pfeifer ja muut 2001.)

Antrasykliinien sytotoksisuus vaikuttaa myös kolibakteerikasvatuksissa. Kolibakteereja kasvatetaan fermentoimalla, joten vaikka ne pystyisivätkin poistamaan antrasykliinit solun ulkopuolelle, ne eivät varsinaisesti poistu sen elinympäristöstä. Näin antrasykliinien konsentraatio mediumissa kasvaa, ja tällä on suurella todennäköisyydellä vaikutusta suoraan saantoihin. (Pontrelli ja muut 2018.)

Cummings ja muut (2019) (Kuva 21) havainnollistavat, että minPKS:n KS α /KS β -heterodimeeri (tai KS/CLF) on osa niin kutsuttua pidennysyksikköä (extension unit). Jotta aromaattisia polyketidejä voidaan tuottaa kolibakteereissa, tarvitaan tämän lisäksi myös pohjustusyksikkö (priming unit) ja räätälöintiyksikkö (tailoring

unit). Pohjustusyksikkö kuvaa niitä entsymaattisia reaktioita, jotka vaaditaan aromaattisten polyketidien tuotannon hienosäätöön: ACP:n muokkaamiseen fosfopanteteinylaatiolla apo-muodosta holo-muotoon. Tästä on vastuussa fosfopanteteinyylitransferaasi (PPTase), joka liittää fosfopanteteinimolekyylin ACP-proteiiniin. Tämän lisäksi substraatteina toimivia malonyyliryhmiä pitää liittää holo-ACP-proteiiniin. Toiminnasta vastaa malonyyli-KoA-ACP-transsasyklaasi (MCAT), mutta reaktio voi tapahtua myös itsenäisen malonylaation (self-malonylation) avulla. Räätelöintiyksikkö kuvaa tyypillisimpiä polyketidien reaktiotiehen osallistuvia ensimmäisiä entsyymejä, ketoreduktaasia (KR), aromataasia (ARO) ja syklaasia (CYC), joiden avulla muodostetaan polyketidien kolme ensimmäistä rengasrakennetta.



Kuva 21. Aromaattisten polyketidien biosynteesiin vaadittavat elementit (Cummings ja muut 2019).

Pääasiallinen ongelma toimivan tyypin II PKS-systeemin luomiselle kolibakteereissa kautta aikojen on ollut liukoisen $KS\alpha/KS\beta$ -heterodimeerin ilmentäminen. Ongelmana on ollut erityisesti ketosyntaasien tuottaminen liukoisena. On arveltu, että liukenemattoman heterodimeerin syntyminen liittyy joko translaatioon, proteiinien laskostumiseen tai heterodimerisaatioon. (Cummings ja muut 2019). Viime aikaisissa tutkimuksissa on havaittu, että valtaosa $KS\alpha/KS\beta$ -geneistä on ryhmittyneenä yhteen ja transkriptionaalisesti päällekkäin neljän nukleotidin osalta (ATGA). Kun näitä genejä ilmennetään yhdessä, on mahdollista saavuttaa liukoinen heterodimeeri. (Liu ja muut 2020.)

Kolibakteeissa ei myöskään onnistu luontaisesti fosfopanteteiinosan liittäminen apo-ACP-proteiiniin aktiivisen holo-ACP-proteiinin muodostamiseksi. Tähän tarkoitukseen on suunniteltu oma kanta, BAP1 (BL21(DE3) Δ prpRBCD::T7prom-*sfp*, T7prom-*prpE*), joka ilmentää 4'-fosfopanteteinyylitransferaasia, mikä ratkaisee tämän ongelman. BAP1-kannasta on lisäksi poistettu propionyyli metabolia, jolloin se ei kuluta polyketidien substraatteja. (Pfeifer ja muut 2001.) Lisäksi minPKS:n on havaittu toimivan huomattavasti paremmin, kun BAP1-kantaan on yhdistetty kolibakteerien GroEL- ja GroES-kaperoniinit (Liu ja muut 2020).

2 TUTKIELMAN TAVOITTEET

Tässä tutkielmassa oli kaksi päätavoitetta:

1. Luoda toimiva polyketidien synteesireitti BAP1-kannassa.
2. Tuottaa polyketidejä kyseistä synteesireittiä hyödyntäen.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä käytettävät vektorit (psBiK3, pSBiA3, pt-GroE), promoottorit (BBa_R0011, T7), kuivatut standardit (Taulukko 2) sekä kaikki kloonattavat geenisekvenssirakenteet (Taulukko 3) saatiin ABE-tutkimusryhmän yhteistyökumppanilta (PhD Erik Nybo, Ferris State University), lukuun ottamatta *alpAB*-, *alpC*-, *pgax*-geenisekvenssejä, jotka tilattiin Genewiziltä.

Taulukko 2. Tutkielmassa käytettävät kontrollit ja standardit. TK24 on Streptomyces lividans -kanta, ja pSY21 on vektori, joka sisältää nogalamysiinin biosynteesiin vaadittavat geenit.

Kontrollit	Standardit
BAP1	SEK15
BAP1 + pt-GroE	TK24_pSY21_snoaD-uutos
BAP1 + pt-GroE + pSBiK3	TK24_pSY21_snoaDE-uutos
	TK24_pSY21_snoaDEBC-uutos

Taulukko 3. Tutkielmassa käytettävät geenit (co=kodonioptimoitu).

minPKS	KR	ARO	CYC	MUUT
<i>snoa123</i>	<i>snoaD</i>	<i>snoaE</i>	<i>snoaM</i>	<i>snoaBCLF</i>
<i>alpABC</i>	<i>snoaD(co)</i>	<i>snoaE(co)</i>	<i>snoaM(co)</i>	<i>pgax</i>
<i>alpAB</i>	<i>aknA</i>	<i>aknE1</i>	<i>aknW</i>	
<i>ravC</i>	<i>aknA(co)</i>	<i>aknE1(co)</i>	<i>aknW(co)</i>	
	<i>dpsE</i>	<i>dpsF</i>	<i>dpsY</i>	
	<i>dpsE(co)</i>	<i>dpsF(co)</i>	<i>dpsY(co)</i>	

3.1 Kloonaus

Digestioihin, eli sekvenssin katkaisuihin restriktioentsyymien avulla, käytettiin FastDigest-restriktioentsyymejä ja -puskureita (Thermo Scientific) ja valmistajan protokollaa. Digestion jälkeen geenisekvenssit eroteltiin agarosigeelielektroforeesin avulla, johon käytettiin Nippon Genetics Europe GmbH:n Midori Green -värjäysainetta ja protokollaa seuraavissa olosuhteissa: 0.8 % agarosigeeli (Sigma-Aldrich), ajo elektroforeesilaitteella (Biorad PowerPac 300) 90 voltilla, 45-60 minuuttia. Näytteisiin lisättiin ennen ajoa latauspuskuria (6X TriTrack™ DNA Loading Dye, Thermo Fisher) valmistajan ohjeen mukaan. Näytteiden rinnalla ajettiin molekyylipainostandardi (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific), johon vertaamalla geelistä saatiin leikattua oikean kokoiset geenisekvenssit Dark Reader™-laitteistoa hyödyntämällä.

Geenisekvenssit puhdistettiin geeliltä puhdistuskitin (GeneJET Gel extraction kit, Thermo Scientific) avulla. Ligaatioihin käytettiin T4 DNA ligaasia ja -puskuria (Thermo Scientific) ja valmistajan protokollaa.

Kloonattavien geenisekvenssirakenteiden eteen lisättiin haluttu promoottori, BBa_R0011 tai T7, katkaisemalla promoottorin sisältämä vektori restriktioentsyymeillä EcoRI ja XbaI, eli luomalla etuvektori. Tämän jälkeen kyseiseen vektoriin yhdistettiin ligaation avulla seuraava haluttu insertti, eli *alpA*, *snoaD* (tai sen homologi), *snoaB* tai *snoaL*-geenisekvenssi. Tämän jälkeen yhdistetty promoottori ja insertti katkaistiin yhdessä ja yhdistettiin ligaation avulla haluttuun vektoriin.

Kun promoottori oli kloonattu tutkittavan geenisekvenssin alkuun, ja tämä kokonaisuus kloonattu käytettävään vektoriin (pSBIK3 tai pSBI A3), voitiin muut geenit yksi kerrallaan kloonata tähän perään luomalla vektorista takavektori ja seuraavasta liitettävästä geenisekvenssistä takaininsertti. Takaininsertti yhdistettiin takavektoriin ligaation avulla. Näin tuotettiin kaikki tutkittavat geenisekvenssirakenteet.

3.2 Polyketidien tuotto ja eristäminen

TOP10-solukantaa (ABE-laboratorion kantakokoelma) käytettiin haluttujen plasmidien monistamiseen. Plasmidit eristettiin soluista käyttämällä plasmidien eristykseen tarkoitettua kittiä (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific). Sekvenssirakenteiden oikeellisuus tarkistettiin ulkoisella palveluntarjoajalla (Eurofins Genomics). Näytteet käsiteltiin palveluntarjoajan ohjeistuksen mukaan (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics).

BAP1-solukantaa (Kerafast) käytettiin polyketidien tuottokasvatuksissa. Ensimmäisenä BAP1-kantaan transformoitiin pt-GroE-vektori käyttämällä transformaatio kalsiumkloridin avulla -protokollaa (Ausubel ja muut, Current Protocols in Molecular Biology, 2003). Tästä kannasta luotiin samaa protokollaa käyttäen uudet kompetentit solut, joihin transformoitiin pSBI A3-vektori ja kaikki vektoriin kloonatut geenisekvenssivariaatiot omina kasvatuksinaan. Kun kaikki ensimmäisen nogalamysinoni-tuotantoreitin sisältämät geenit sisältävä pSBI A3-vektori oli transformoitu BAP1-kantaan, tästä kannasta luotiin uudet kompetentit solut, joihin transformoitiin seuraava pSBIK3-vektori ja kaikki sen

geenisekvenssivariaatiot omina kasvatuksinaan. Transformaatioissa käytettävät vektoreiden resistenssigeenien mukaan valitut antibiootit ja niiden pitoisuudet olivat seuraavat: ampisilliini 100 µg/ml (Fisher Bioreagents), kanamysiini 50 µg/ml (Alfa Aesar) ja kloramfenikoli 25 µg/ml (Sigma Aldrich).

Polyketidit tuotettiin ja eristettiin Liun ja muiden (2020) protokollaa mukaillen. Soluja (yhdestä pesäkkeestä) esikasvatettiin yön yli ravistelussa (250 rpm, +37 °C) viidessä millilitrassa LB-lientä (Luria broth). Tästä kasvatuksesta 1 ml siirrostettiin 50 ml:aan polyketidien tuottomediumia (5% hiivauute, 10 % tryptoni, 15 % glyseroli, 10% natriumkloridi, 100 mM HEPES-puskuri (4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaani-sulfonihappo), pH 7.6). Tätä pääkasvatusta kasvatettiin ravistelussa (250 rpm, +37 °C) kunnes kasvatusten OD₆₀₀ ylitti arvon 0,5. Tämän jälkeen kasvatus indusoitiin 0,05 % IPTG:llä (Thermo Scientific) ja siirrettiin ravisteluun (200 rpm) huoneenlämpöön neljäksi vuorokaudeksi.

Esikasvatuksessa käytettiin vektorien resistanssigeenien mukaisesti antibiootteja seuraavasti: ampisilliini 100 µg/ml (Fisher Bioreagents), kanamysiini 50 µg/ml (Alfa Aesar) ja kloramfenikoli 25 µg/ml (Sigma Aldrich). Pääkasvatuksessa antibioottien pitoisuudet olivat vain puolet tästä, sillä niitä oli muutoin vaikea saada ylipäänsä kasvamaan. Kun havaittiin, että kloramfenikoli ei poistu näytteistä polyketidien eristysvaiheessa, jätettiin se pääkasvatuksesta kokonaan pois. Tällöin pääkasvatukseen lisättiin vain kanamysiiniä ja/tai ampisilliinia. Lisäksi kasvatuksia seurattiin siirrostamalla kasvatuksista silmukallinen LA-maljoille (Luria agar + kloramfenikoli 25 µg/ml). Näin nähtiin, että pt-GroE-vektori, joka sisältää klormanfenikoliresistenssigeenin, on läsnä kasvatuksissa koko kasvatusten ajan.

Kasvatusten jälkeen niihin lisättiin 0,5 ml etikkahappoa (Sigma Aldrich) ja sentrifugoitiin (4000*g, 10 min, Thermo Fisher Heraeus Multifuge XIR -sentrifugi). Supernatantti käsiteltiin 50 ml:lla etyyliasettaattia (Sigma Aldrich) ja pelletti 5 ml:lla metanolia (Sigma Aldrich) ja sentrifugoitiin kuten edellä. Etyyliasettaattikerros (ylempi) ja metanolikerros yhdistettiin, ja näytteet kuivattiin typpikaasun (N₂, Woikoski) alla, kunnes ne voitiin siirtää vakuumikuivaukseen (SpeedVac Eppendorf™ Concentrator plus). Kuivatut näytteet uutettiin 0,2 ml:n metanolia.

3.3 Laajan mittakaavan kasvatukset

Lupaavista kasvatuksista aloitettiin myös laajan mittakaavan kasvatukset NMR-määritystä varten: 50 ml:n esikasvatuksesta (LB-liemi) siirrostettiin 16 ml/ 500 ml polyketidien tuottomediumia. Kasvatus ja indusointi kuten edellä.

Kasvatusten jälkeen niihin lisättiin 5 ml etikkahappoa (Sigma Aldrich) ja sentrifugoitiin (8000*g, 10 min, Beckman coulter Avanti™ J-20 XP -sentrifugi). Supernatantti käsiteltiin 500 ml:lla etyyliasetaattia (Sigma Aldrich), kaadettiin erotussuppiloon, sekoitettiin huolella ja annettiin seistä. Ylempi etyyliasetaattikerros otettiin talteen tutkimuksia varten. Näytteet kuivattiin (Rotavapor RII, Büchi) ja eroteltiin semi-preparatiivisella HPLC-laitteistolla (Shimadzu, LC-20AP/CBM-20A-järjestelmä, diodirividetektori) seuraavissa olosuhteissa: 0–2 min 100 % puskuri-A (Milli-Q-vesi + 0,1% trifluoretikkahappo (TFA, Sigma Aldrich)) 2-22 min 0–100 % puskuri-B (asetonitrili (ACN, Sigma Aldrich), 22–29 min 100 % puskuri-B. Virtaus ajon aikana 20 ml/min. Kolonni: EVO C18, 5 µm, 100 Å, 250 x 21.2 mm Kinetex column (Phenomenex). Puhdistetut näytejakeet uutettiin etyyliasetaattiin, kuivattiin ja liuotettiin DMSO-D6:een (dimetyylisulfoksidi-D6, Sigma Aldrich).

3.4 Polyketidien analysointi

Näytteet analysoitiin nestekromatografisesti UPLC-laitteistolla (Shimadzu Nexera X3, fotodiodirividetektori (photodiode array detector)) seuraavissa olosuhteissa: 0–22 min 100 % puskuri-A (Milli-Q-vesi + 0,1% trifluoretikkahappo (TFA, Sigma Aldrich)), 22–24,10 min 100 % puskuri-B (asetonitrili (ACN, Sigma Aldrich) + 0,1% TFA), 24,10–30 min 100 % puskuri-A. Virtaus ajon aikana 0,3 ml/min, UV-VIS-detektointi 250/430 nm. Kolonni: Kinetex C18-LC-kolonni (100*2,1 mm, 1,7 µm). Näytteiden rinnalla ajettiin myös kontrollit (tuottajakanta ja tyhjät vektorit) sekä saatavilla olevat standardit. Kuivatut standardit käsiteltiin, kuten kuivatut näytteet.

Kaikki analysoidut näytteet, joissa esiintyi UPLC:llä potentiaalisesti kiinnostavia yhdisteitä analysoitiin lisäksi massaspektrometrillä (AGILENT 6120 LC/MS-massaspektrometri) samoissa olosuhteissa kuin UPLC:llä. Tulokset analysoitiin Mestre Nova -ohjelmalla.

Laajan mittakaavan näytejakeet analysoitiin NMR:llä (600 MHz Bruker AVANCE-III-järjestelmä, jossa nestetyöllä jäähdytetty Prodigy TCI-kryoilmaisin (cryoprobe)). Kaikki NMR-spektrit prosessoitiin Bruker TopSpin 4.1.3 -ohjelmalla ja jokaista signaalia verrattiin sisäiseen standardiin, tetrametyylisilaaniin. Diasetyylikloramfenikolin rakenne ratkaistiin 1D-NMR-määrittäyksillä (^1H ja ^{13}C) ja 2D-määrittäyksillä (^1H , ^1H -COSY, HSQC ja HMBC).

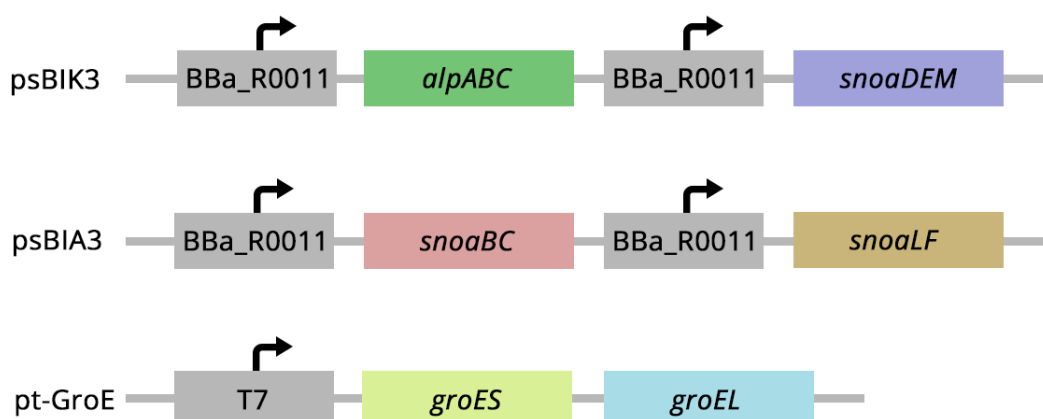
Osa näytteistä analysoitiin myös yhteistyökumppanimme puolesta (Ferris State University) LC-MS-laitteistolla (Agilent Infinity II 1260 LC/MSD iQ) seuraavissa olosuhteissa: 0–10 min: puskuri-A (Milli-Q-vesi + 0,1% muurahaishappo) 95% ja puskuri-B (ACN + 0,1% muurahaishappo) 5%, 10–13 min: puskuri-A 5% ja puskuri-B 95 %, 13,1–15,1 min: puskuri-A 95%, puskuri-B 5%. Virtaus ajon aikana 0,5 ml/min, UV-VIS-detektointi 250/430 nm. Kolonni: Infinitylab Poroshell Phenyl-Hexyl (4,6 * 100 mm, 2,7 μm). ESI-MS-detektointi \pm tiloissa: 200–1000 m/z.

4 TULOKSET

Tutkielmassa toimimme synteettisen biologian periaatteiden mukaisesti. Tutkimus toteutettiin nelivaiheisesti (design-build-test-learn-sykli): (1) suunnittelu, (2) suunniteltujen rakenteiden rakentaminen, (3) kyseisten rakenteiden kokeilu ja (4) reagoiminen kokeista saatuihin tuloksiin.

4.1 Polyketidikantojen kloonauus

Tässä tutkielmassa keskityttiin aluksi nogalamysiinin synteesisireitin ensimmäisiin vaiheisiin, eli nelirenkaisen nogalamysinoniaglykoniytimen reaktioreittiin. Tarkoituksena oli luoda toimiva tuottomenetelmä kolibakteerissa, ja näin kehittää työkalu, jolla tämä antrasykliinien tuottoon tarvittava perusrakenne saataisiin tuotettua mahdollisimman tehokkaasti. Tutkielman alkuperäisenä tavoitteena oli luoda toimiva polyketidien synteesisireitti BAP1-kannassa hyödyntämällä kolmea eri vektoria: pSBIK3, pSBI A3 ja pt-GroE (Kuva 22). Näistä viimeisin, pt-GroE, sisältää minimaalisen polyketidisyntaasikompleksin toimivuudelle olennaisten kaperoniinien, GroES ja GroEL, geenit. Minimaalisen polyketidisyntaasikompleksin geenit (*alpABC*) kloonattiin korkean kopioluvun vektoriin, pSBIK3.



Kuva 22. Yleiskuvaus tutkielmaan käytettävistä vektoreista ja geenisekvensseistä.

Tutkimuksessa käytettiin kinamysiinin minPKS:n ilmentämiseksi vaadittavia geenejä, sillä sen avulla on aiemmissa polyketidien kolibakteeritutkimuksissa (Liu ja muut 2020) saatu hyviä tuloksia. Nogalamysinonin tuottamiseksi vaadittavien

entsyymien geenit kloonattiin osin tähän samaan pSBiK3-vektoriin (*snoaD*, *snoaE*, *snoaM*), ja osin toiseen, korkean kopioluvun pSBiA3-vektoriin (*snoaB*, *snoaC*, *snoaL*, *snoaF*), jotta yksittäisen vektorin koko ei kasvaisi tarpeettoman suureksi. Promoottorina käytettiin vahvaa BioBrick-standardipromoottoria, BBa_R0011.

Koska tutkimuksen aikana havaittiin, ettei nogalamysinonin tuotantoreitti toimi kuten oletettua, tutkielmaan täytyi ottaa uusi näkökulma. Tulosten perusteella näytti siltä, että erityisesti syklaasi ja aromataasi saattaisivat olla ongelmana. Tästä johtuen päätettiin kokeilla kyseisille geeneille homologeja aklasinomysiinin ja daunorubisiinin tuotantoreiteiltä (ARO: *snoaE*, *aknE1*, *dpsF*; CYC: *snoaM*, *aknW*, *dpsY*). Samalla koettiin, että on järkevää kokeilla homologeja myös reaktiotien ensimmäiselle entsyymille, ketoreduktaasille (KR: *snoaD*, *aknA*, *dpsE*). Lisäksi, koska nogalamysiinin tuotantoreitin geenit eivät olleet kolibakteerille kodonioptimoituja, päätettiin myös kokeilla, olisiko sillä vaikutusta reaktioreittiin. Lisäksi kokeiltiin vahvemman strandardipromoottorin, T7, vaikutusta reaktioreitin toimivuuteen (Kuva 23).



Kuva 23. Suunniteltu geenisekvenssien tutkimusasetelma. KR: *snoaD*, *aknA*, *dpsE*, ARO: *snoaE*, *aknE1*, *dpsF*, CYC: *snoaM*, *aknW*, *dpsY*

4.2 Polyketidien tuottokokeet

Kasvatuskokeet aloitettiin, kun kaikki tutkittavat nogalamysinonireitin rakenteet (*alpABC*, *snoaD*, *snoaDE*, *snoaDEM*) oli kloonattu ensimmäiseen vektoriin, pSBiK3, ja nämä vektorit transformoitu BAP1-kantaan, joka sisälsi lisäksi pt-GroE-vektorin. Kun myös toinen vektori, pSBiA3, sisälsi kaikki tutkittavat geenit (*snoaBCLF*), tämä transformoitiin muut kaksi vektoria sisältävään kantaan ja tutkittiin kaikkien geenien vaikutusta tuotantoprofiiliin.

Nogalamysinonin tuotantoreitin alkupään näytteet, KR1, ARO1 ja CYC1 (nimet ja rakenteet taulukoissa 5, 6 ja 7), lähetettiin lisäksi yhteistyökumppanillemme (Ferris State University) analysoitavaksi LC-MS-laitteella. Tulosten mukaan

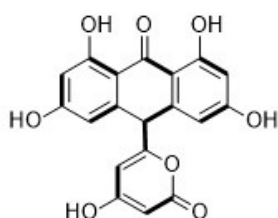
KR1:llä tuotetut näytteet sisälsivät RM20b,c-yhdistettä (rakenne esiteltynä Kuvassa 20A), sekä lisäksi hyvin niukasti SEK43-yhdistettä, joka on vasta reaktioreitin seuraavan entsyymin (aromataasi) tuottama yhdiste. Myös ARO1-näytteessä havaittiin pieniä määriä SEK43:sta, mutta huomattavasti pienempiä määriä kuin olisi voinut olettaa. CYC1-näytteessä ei havaittu trisyklisiä yhdisteitä, joita olisi voinut olettaa havaittavan. Näiden tulosten perusteella arveltiin, että reaktioreitin aromataasi ja syklaasi eivät välttämättä toimi kuten toivottua. Epäiltiin myös, että käytettävä promoottori (BBa_R0011) ei ole tarpeeksi vahva ilmentämään kaikkia kolmea geeniä.

Omien UPLC-tuloksemme (kohdat 4.2.1-4.2.4) tukivat tätä tulosta, ettei nogalamysinonin tuotantoreitti toimi kuten oletettua. Aluksi kokeiltiin erilaisia variaatioita minPKS:n toiminnan tutkimiseksi. Tutkimusasetelma ja sen tulokset on esitelty yksityiskohtaisemmin kohdassa 4.2.1. Lisäksi päätettiin kokeilla käyttää muuten samaa tutkimusasetelmaa (sama promoottori BBa_R0011 ja minPKS), ja vaihtaa nogalamysiinin ketoreduktaasin tilalle daunorubisiinireitin ketoreduktaasi. Tuottoprofiili oli täysin samanlainen kummankin ketoreduktaasin kanssa. Lisäksi, kun myöhemmin tutkimme daunorubisiiniketoreduktaasin tuottoprofiilia uuden T7-promoottorin kanssa, tuottoprofiilit vastasivat toisiaan. Promoottorilla ei siis vaikuttaisi olevan merkittävää vaikutusta ainakaan ketoreduktaasien ilmentämiseen.

Kun psBiK3-vektoriin oli kloonattu uusi T7-promoottori ja promoottorin perään reaktiotien ensimmäiset ketoreduktaasien homologit aklasinomysiinin ja daunorubisiinin tuotantoreiteiltä, myös nämä tuottokokeet voitiin aloittaa. Tarkemmat tulokset on esitetty kohdassa 4.2.2. Näiden tulosten perusteella ei voitu jättää yhtäkään ketoreduktaasirakennetta pois laskuista, joten kun ketoreduktaasien perään oli kloonattu myös aromataasit, nämä tuottokokeet voitiin aloittaa. Aromataasien tuottokokeiden perusteella oli tarkoitus valita kaikki sopivat rakenteet syklaasikokeisiin.

Tutkimuksen tavoitteena oli lopulta nähdä, saadaanko näiden homologien avulla tuotettua polyketidejä. Kaikki tunnetut reaktioreitillä syntyvät yhdisteet on esitelty kuvissa 24A ja 24B. Aromataasien tuottokokeiden (4.3.2) jälkeen kuitenkin havaittiin, että syntyneet, määrältään helposti tutkittavissa olevat yhdisteet eivät valitettavasti vastaa mitään tunnettuja polyketidejä. Lisäksi tuottokokeissa syntyi

niin paljon erilaisia yhdisteitä, että pelkästään LC-MS-tulosten perusteella on mahdotonta sanoa, onko jokin näistä mahdollisesti polyketidi. Näin ollen päätettiin, että ennen tutkimuksen jatkoa on oleellista selvittää tarkemmin, mitä nämä syntyneet yhdisteet ovat. Valitettavasti nogalamysiinin ketoreduktaasin laajan mittakaavan tuottokokeissa havaitsimme, että yhdisteiden tuotto laajassa mittakaavassa on myös haasteellista. Tämän tutkimuksen perusteella päätettiin siis lopulta, mitkä näistä ketoreduktaasien ja aromataasien sekvenssirakenteista ovat potentiaalisimpia laajan mittakaavan tutkimuksiin tulevaisuuden jatkotutkimuksissa.

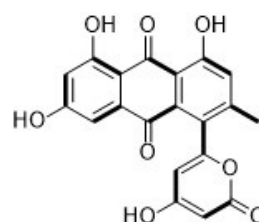
Expected products from *snoa123* minPKS**SEK15**Chemical Formula: C₁₉H₁₂O₈

Exact Mass: 368.05

Molecular Weight: 368.30

m/z: 368.05 (100.0%), 369.06 (21.0%), 370.06 (3.7%)

Elemental Analysis: C, 61.96; H, 3.28; O, 34.75

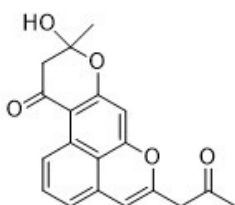
**SEK15b**Chemical Formula: C₂₀H₁₂O₈

Exact Mass: 380.05

Molecular Weight: 380.31

m/z: 380.05 (100.0%), 381.06 (22.1%), 382.06 (4.0%)

Elemental Analysis: C, 63.16; H, 3.18; O, 33.65

Expected products from *snoa123 + snoaD***RM-20**Chemical Formula: C₁₉H₁₆O₅

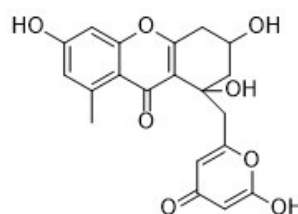
Exact Mass: 324.10

Molecular Weight: 324.33

m/z: 324.10 (100.0%), 325.10 (20.7%),

326.11 (2.1%), 326.10 (1.0%)

Elemental Analysis: C, 70.36; H, 4.97; O, 24.66

**RM-20b,c**Chemical Formula: C₂₀H₁₈O₈

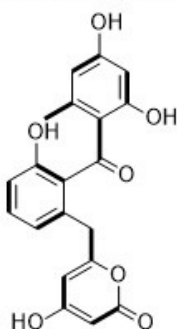
Exact Mass: 386.10

Molecular Weight: 386.36

m/z: 386.10 (100.0%), 387.10 (21.9%),

388.11 (2.3%), 388.10 (1.6%)

Elemental Analysis: C, 62.18; H, 4.70; O, 33.13

Expected products from *snoa123 + snoaDE***SEK43**Chemical Formula: C₂₀H₁₆O₇

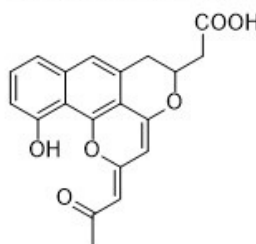
Exact Mass: 368.09

Molecular Weight: 368.34

m/z: 368.09 (100.0%), 369.09 (21.9%),

370.10 (2.3%), 370.09 (1.4%)

Elemental Analysis: C, 65.22; H, 4.38; O, 30.40

Expected products from *snoa123 + snoaDEM***S2501**Chemical Formula: C₂₀H₁₆O₈

Exact Mass: 352.09

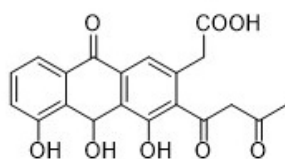
Molecular Weight: 352.34

m/z: 352.09 (100.0%), 353.10 (22.0%), 354.10 (3.5%)

Elemental Analysis: C, 68.18; H, 4.58; O, 27.24

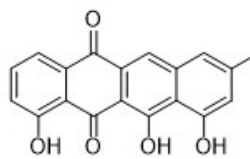
Kuva 24A. Nogalamysinonin tuotantoreitin alkupäässä muodostuvat yhdisteet. Kuvissa esiteltynä odotetut yhdisteet niiden ominaisuuksineen kunkin geenin tuottaman entsyymin läsnä ollessa. Lähde: PhD Erik Nybo, Ferris State University.

Expected products from *snoa123* + *snoaDEMB*



Nogalonic acid

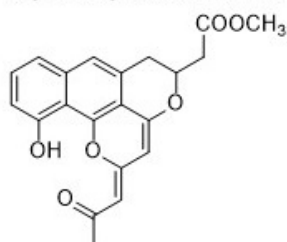
Chemical Formula: $C_{20}H_{16}O_8$
 Exact Mass: 384.08
 Molecular Weight: 384.34
 m/z: 384.08 (100.0%), 385.09 (22.1%),
 386.09 (4.0%)
 Elemental Analysis: C, 62.50; H, 4.20; O, 33.30



Decarboxy-anhydronogalonic acid product

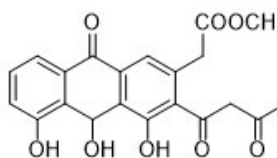
Chemical Formula: $C_{19}H_{12}O_5$
 Exact Mass: 320.07
 Molecular Weight: 320.30
 m/z: 320.07 (100.0%), 321.07 (20.9%), 322.08 (2.1%),
 322.07 (1.0%)
 Elemental Analysis: C, 71.25; H, 3.78; O, 24.98

Expected products from *snoa123* + *snoaDEMBC*



S2502

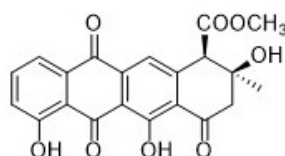
Chemical Formula: $C_{21}H_{18}O_8$
 Exact Mass: 366.11
 Molecular Weight: 366.37
 m/z: 366.11 (100.0%), 367.11 (22.9%),
 368.12 (2.6%), 368.11 (1.2%)
 Elemental Analysis: C, 68.85; H, 4.95; O, 26.20



Nogalonic acid methyl ester

Chemical Formula: $C_{21}H_{18}O_8$
 Exact Mass: 398.10
 Molecular Weight: 398.37
 m/z: 398.10 (100.0%), 399.10 (23.0%),
 400.11 (2.6%), 400.10 (1.6%)
 Elemental Analysis: C, 63.32; H, 4.55; O, 32.13

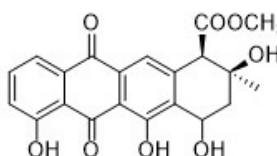
Expected products from *snoa123* + *snoaDEMBCL*



Nogalaviketone

Chemical Formula: $C_{21}H_{18}O_8$
 Exact Mass: 396.08
 Molecular Weight: 396.35
 m/z: 396.08 (100.0%), 397.09 (23.2%), 398.09 (4.2%)
 Elemental Analysis: C, 63.64; H, 4.07; O, 32.29

Expected products from *snoa123* + *snoaDEMBCLF*



Nogalamycinone

Chemical Formula: $C_{21}H_{18}O_8$
 Exact Mass: 398.10
 Molecular Weight: 398.37
 m/z: 398.10 (100.0%), 399.10 (23.0%),
 400.11 (2.6%), 400.10 (1.6%)
 Elemental Analysis: C, 63.32; H, 4.55; O, 32.13

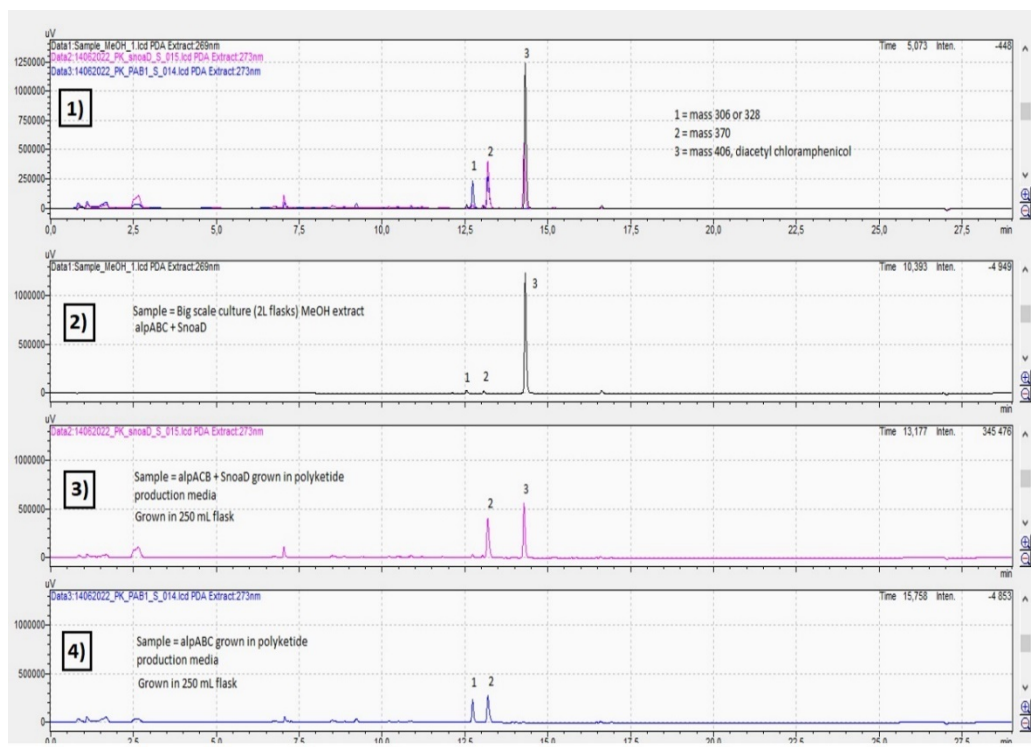
Kuva 24B. Nogalamysinonin tuotantoreitin loppupäässä muodostuvat yhdisteet. Kuvissa esiteltynä odotetut yhdisteet niiden ominaisuuksineen kunkin geenin tuottaman entsyymin läsnä ollessa. Lähde: PhD Erik Nybo, Ferris State University.

4.2.1 Minimaalinen polyketidisyntaasi

Kaikki tutkimuksen aikana kloonatut minPKS-geenejä (*alpA*, *alpB*, *alpC*, *snoa1*, *snoa2*, *snoa3*, *pgax*, *ravC*) sisältävät plasmidit on esitelty Taulukossa 4. Kun tuotantokasvatusnäytteet ajettiin UPLC-laitteistolla, tulokset vaikuttivat aluksi lupaavilta (Kuva 25). Minimaalinen polyketidisyntaasi vaikutti tuottavan kahta yhdistettä (piikit 1 ja 2). Valitettavasti NMR-tulosten kumpikaan piikki ei ollut massojen (piikki 1: 306 ja 328 m/z; piikki 2: 370 m/z) perusteella ainakaan mikään tunnettu polyketidi (SEK15 ja SEK15b, Kuva 20A).

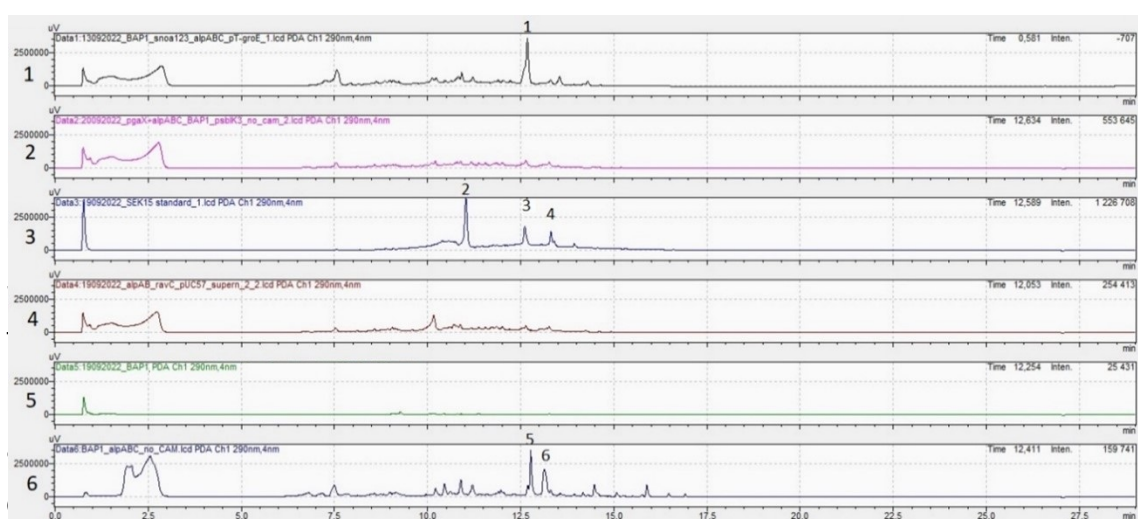
Taulukko 4. Kaikki tutkielmassa tutkittavat minimaalisen polyketidisyntaasin tuottoon johtavat sekvenssirakenteet. Promoottorit: BBa_R0011 ja T7. Geenit eroteltu alaviivalla.

Nimi	Sekvenssirakenteet
PKS1	BBa_R0011_ <i>alpABC</i>
PKS2	T7_ <i>snoa123_ alpABC</i>
PKS3	T7_ <i>pgax_ alpABC</i>
PKS4	T7_ <i>alpAB_ ravC</i>



Kuva 25. MinPKS1:n ja KR1:n polyketidituotantojen tulokset UPLC-laitteistolla. 1. Yhdistetty KR1:n ja PKS1:n kromatogrammi. 2. KR1-näytteen laajan mittakaavan tulokset. 3. KR1. 4. PKS1. Piikit: 1 ja 2: mahdollisia polyketidejä. 3: kloramfenikoli.

Saatujen tulosten perusteella epäilyksenä oli, että minPKS ei ehkä toimi niin kuin pitäisi. Tämän vuoksi kokeiltiin kolmea erilaista ratkaisua (Kuva 26): nogalamysiinin ja kinamysiinin minPKS-geenien (*snoa123* + *alpABC*) yhteisekspressiota (PKS2), kinamysiinin minPKS-geenien yhteisekspressiota 4'-fosfopanteteiinitransferaasin geenien (*pgaX*) kanssa (PKS3), sekä kinamysiinin minPKS geenien *alpC*:tä korvattuna vastaavalla ravidomysiinin minPKS *ravC*-geenillä (PKS4). PKS3:n ja PKS4:n tuottoprofiili vastasi lähestulkoon pelkän negatiivisena kontrollina käytettävän BAP1-kannan tuottoprofiilia. PKS2 vaikutti näiden tulosten perusteella lupaavalta, mutta valitettavasti LC-MS osoitti, että kyseessä ei ole polyketidi. Kyse oli useammasta yhdisteestä, eikä tästä kannasta kannattanut aloittaa laajan mittakaavan kokeita.



Kuva 26. Minimaalisen polyketidisyntaasin tuotantokasvatuskokeet 1. PKS2 2. PKS3 3. SEK15-standardi, 4. PKS4. 5. BAP1 (neg. ctrl) 6. PKS1. Piikit: 1, 5 ja 6: mahdollisia polyketidejä, 2, 3 ja 4: standardissa esiintyvät piikit.

4.2.2 Ketoreduktaasit

Kun nogalamysinonituotantoreitin näytteet ajettiin UPLC-laitteistolla, tulokset vaikuttivat aluksi lupaavilta (Kuva 25). KR1:n kromatogrammissa oli lupaavat piikit (2 ja 3). Koska KR1 vaikutti näiden tulosten perusteella tuottavan mahdollisia polyketidejä, aloitettiin tästä myös laajan mittakaavan kasvatus, jota tutkittiin LC-MS:llä ja NMR:llä. Valitettavasti NMR-tulosten perusteella piikki (3) johtui käytettävästä antibiootista (klormanfenikoli), eikä myöskään toinen piikki (2) ollut massan (306 ja 328 m/z) perusteella ainakaan mikään tunnettu polyketidi (SEK15 ja SEK15b, Kuva 20A). Valitettavasti näytteistä havaittuja piikkejä ei

saatu näkyviin laajan mittakaavan kasvatuksissa. Koska kaikkien minPKS:n jälkeisten entsyymien tuottoprofiilit (KR1, ARO1 ja CYC1) olivat identtisiä ketoreduktaasin tuottoprofiilin kanssa, oli selvää, ettei jokin reaktioreitissä toimi niin kuin pitäisi.

Homologien systemaattinen tutkiminen aloitettiin kloonamalla kaikki ketoreduktaasigeenit (*snoaD*, *snoaD(co)*, *aknA*, *aknA(co)*, *dpsE*, *dpsE(co)*) pSBiA3-vektoriin, johon oli jo kloonattu T7-promoottorit sekä minimaalisen polyketidisyntaasin geenit. Kaikki tutkittavat ketoreduktaasirakenteet on esitetty Taulukossa 5. Ketoreduktaasien tuottokokeista KR8 (kodonioptimoitu *dpsE*) antoi lupaavia tuloksia (Kuva 27). Kun polyketidit eristettiin kasvatusliuoksesta, eristetyn näytteen väri poikkesi muista näytteistä: muut näytteet ovat olleet lähinnä keltaisia, tämä näyte oli punainen. Erityisesti piikki numero 3 vaikutti potentiaaliselta polyketidiltä, mutta valitettavasti tutkittaessa näytettä LC-MS:llä, osoittautui, ettei näytteessä ole massan perusteella mitään tunnettuja polyketidejä. Piikki 3 koostui useammasta yhdisteestä, eikä kannasta kannattanut aloittaa laajan mittakaavan kokeita. *Streptomyces lividans* -bakteerista eristetyn standardin (TK24_ *snoaD*) kanssa vertailtaessa mikään ketoreduktaasien tuottamista yhdisteistä ei vastaa standardin kromatogrammissa havaittavia piikkejä.

KR3 (villityypin *snoaD*) ja KR6 (kodonioptimoitu *aknA*) eivät näissä tuotantokasvatuskokeissa vaikuttaneet tuottavan mitään. Tässä on kuitenkin vain yksi toisto, joten tämän perusteella ei välttämättä kannata vetää tuloksesta lopullisia johtopäätöksiä. Lisäksi nogalamysiinin villityypin ketoreduktaasi (KR1) on kuitenkin aiemmin tuottanut jotakin (Kuva 25), kun ero oli ainoastaan käytettävässä promoottorissa.

Ennen homologien systemaattista tutkimista tutkittiin daunorubisiinireitin ketoreduktaasientsyymien vaikutusta reaktioreittiin, kun käytetään muuten samaa asetelmaa, eli promoottorina on BBa_R0011-standardipromoottori. Näytteessä esiintyi sama piikki 1, kuin vastaavaa entsyymiä ilmennettäessä näiden homologien systemaattisen tutkimuksen yhteydessä (Kuva 27). Promoottorilla ei siis vaikuttaisi olevan merkittävää vaikutusta ainakaan ketoreduktaasien ilmentämiseen, joten KR3-kannan tuottavuus johtuu hyvin suurella

todennäköisyydellä jostakin muusta kuin promoottorista, kuten esimerkiksi proteiinin väärästä laskostumisesta *E. colissa*.



Kuva 27. Ketoreduktaasien UPLC-kromatogrammit. 1. KR8. 2. KR7 3. KR6. 4. KR5. 5. KR4. 6. KR3. 7. Ketoreduktaasistandardi (*snoaD*) (TK24_pSY21). 7. BAP1 + *minPKS* (*alpABC*). Kaikki numeroidut piikit ovat mahdollisia polyketidejä.

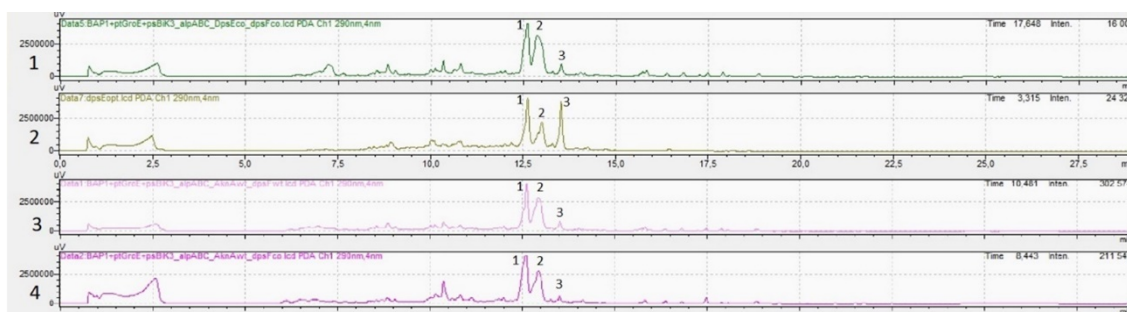
Taulukko 5. Kaikki tutkittavat ketoreduktaasien sekvenssirakenteet. Promoottorit: BBa_R0011 ja T7. Geenit eroteltu alaviivalla.

Nimi	Sekvenssirakenteet
KR1	BBa_R0011_ <i>alpABC</i> _BBa_R0011_ <i>snoaD</i>
KR2	BBa_R0011_ <i>alpABC</i> _BBa_R0011_ <i>dpsE</i>
KR3	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>snoaD</i>
KR4	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>snoaD</i> (co)
KR5	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>aknA</i>
KR6	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>aknA</i> (co)
KR7	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>dpsE</i>
KR8	T7_ <i>alpABC</i> _T7_ <i>dpsE</i> (co))

4.2.3 Aromataasit

Nogalamysiinin aromataasi (ARO1) antoi täysin samanlaisen tuottoprofiilin kuin nogalamysiinin ketoreduktaasi (KR1, Kuva 25). Sen tuottoprofiilia ei ole erikseen esitelty, sillä nogalamysiinin tuotantoreitillä ei selvästi toimi kuten odotettua. MinPKS:n jälkeisten entsyymien homologien systemaattista tutkimista jatkettiin kloonamalla kaikkien ketoreduktaasirakenteiden perään lisäksi kaikki aromataasigeenit (*snoaE*, *snoaE*(co), *aknE1*, *aknE1*(co), *dpsF*, *dpsF*(co)). Kaikki tutkittavat aromataasirakenteet on esitetty Taulukossa 6.

Ketoreduktaasitulosten perusteella vaikutti siltä, että KR7 (kodonioptimoitu *dpsE*), KR8 (villityypin *dpsE*), ja KR4 (kodonioptimoitu *snoaD*) ovat tuottoprofiililtaan luovaavia jatkotutkimuksia ajatellen. Aromataaseja tutkittaessa tämä kuva kuitenkin muuttui. KR8 yhdistettynä aromataaseihin ei tuottanut mitään uutta. Kuvassa 27 näkyvät piikit 2 ja 3 häviävät aromataasin sisältävien näytteiden profiileista, eikä kromatogrammissa voi havaita uusia piikkejä. KR7:än yhdistetyt aromataasit vastasivat profiililtaan KR8:n yhdistettyjen aromataasien profiileja, lukuunottamatta ARO37:n (*dpsE(co)_dpsF(co)*) tuottoprofiilia (Kuva 28). Piikki 2 selvästi kasvaa, ja piikki 3 pienenee.



Kuva 28. Mielenkiintoisten ketoreduktaasien ja aromataasien tuottoprofiilit. 1. ARO37. 2. KR8. 3. ARO28. 4. ARO34. Kaikki piikit ovat mahdollisia polyketidejä.

KR6 yhdistettynä aromataasigeeneihin oli tuottoprofiililtaan täysin vastaava kuin KR7, eli ei mitään huomioitavaa. KR5 muistutti ARO37:n tuottoprofiilia kahden aromataasin suhteen: ARO28 ja ARO34 (Kuva 22). Muuten KR5:n ja aromataasien yhdistelmien tuottoprofiileissa ei havaittu oletettuja muutoksia. KR4-pohjaisista aromataaseista ainoastaan ARO9:n (*snoaD(co)_snoaE(co)*) tuottoprofiili vaikutti aluksi mielenkiintoiselta. Tajusimme kuitenkin hyvin pian, että tuottoprofiili oli identtinen negatiivisen kontrollin, IPTG:llä indusoidun BAP1-kannan kanssa. Näin ollen kodonioptimoitu KR4 yhdistettynä mihinkään aromataasigeeniin ei tuottanut mitään mielenkiintoista jatkon kannalta.

KR3 yhdistettynä aromataaseihin tuotti myös samanlaisen tuottoprofiilin kuin KR7, joten näistäkään ei jatkotutkimuksia ajatellen löytynyt mitään mielenkiintoista. Näin ollen seuraavista rakenteista olisi kannattavaa selvittää, mikä on yhdiste, joka syntyy (Kuva 28, piikki 2) ja vähenee (piikki 3) aromataasien läsnä ollessa: ARO28, ARO34 ja ARO 37.

Taulukko 6. Kaikki tutkittavat aromataasien sekvenssirakenteet. Promootorit: BBa_R0011 ja T7. Geenit eroteltu alaviivalla.

Nimi	Sekvenssirakenteet
ARO1	BBa_R0011_alpABC_BBa_R0011_snoaDE
ARO2	T7_alpABC_T7_snoaD_snoaE
ARO3	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_snoaE
ARO4	T7_alpABC_T7_aknA_snoaE
ARO5	T7_alpABC_T7_aknA(co)_snoaE
ARO6	T7_alpABC_T7_dpsE_snoaE
ARO7	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_snoaE
ARO8	T7_alpABC_T7_snoaD_snoaE(co)
ARO9	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_snoaE(co)
ARO10	T7_alpABC_T7_aknA_snoaE(co)
ARO11	T7_alpABC_T7_aknA(co)_snoaE(co)
ARO12	T7_alpABC_T7_dpsE_snoaE(co)
ARO13	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_snoaE(co)
ARO14	T7_alpABC_T7_snoaD_aknE1
ARO15	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_aknE1
ARO16	T7_alpABC_T7_aknA_aknE1
ARO17	T7_alpABC_T7_aknA(co)_aknE1
ARO18	T7_alpABC_T7_dpsE_snoaE_aknE1
ARO19	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_aknE1
ARO20	T7_alpABC_T7_snoaD_aknE1(co)
ARO21	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_aknE1(co)
ARO22	T7_alpABC_T7_aknA_aknE1(co)
ARO23	T7_alpABC_T7_aknA(co)_aknE1(co)
ARO24	T7_alpABC_T7_dpsE_snoaE_aknE1(co)
ARO25	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_aknE1(co)
ARO26	T7_alpABC_T7_snoaD_dpsF
ARO27	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_dpsF
ARO28	T7_alpABC_T7_aknA_dpsF
ARO29	T7_alpABC_T7_aknA(co)_dpsF
ARO30	T7_alpABC_T7_dpsE_dpsF
ARO31	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_dpsF
ARO32	T7_alpABC_T7_snoaD_dpsF(co)
ARO33	T7_alpABC_T7_snoaD(co)_dpsF(co)
ARO34	T7_alpABC_T7_aknA_dpsF(co)
ARO35	T7_alpABC_T7_aknA(co)_dpsF(co)
ARO36	T7_alpABC_T7_dpsE_dpsF(co)
ARO37	T7_alpABC_T7_dpsE(co)_dpsF(co)

4.2.4 Reaktioreitin seuraavat vaiheet

Nogalamysiinin syklaasi (CYC1) antoi täysin samanlaisen tuottoprofiilin kuin nogalamysiinin ketoreduktaasi (KR1, Kuva 25). Sen tuottoprofiilia ei ole erikseen esitelty, sillä nogalamysiinin tuotantoreitillä ei selvästi toimi kuten odotettua. Ennen homologien tutkimista tutkittiin myös koko nogalamysinonin reaktiotietä (geenit: *snoaDEMBCLF*) kaikkien kolmen vektorin kanssa (Kuva 22), mutta nämä kasvatukset eivät valitettavasti tuottaneet mitään. Kaikki nämä muut tutkielmassa tutkittavat rakenteet on esitelty Taulukossa 7.

Aromataasitutkimusten tulosten perusteella oli tarkoitus valikoida, mitkä sekvenssirakenteet valikoidaan syklaasigeenien (*snoaM*, *snoaM(co)*, *aknW*, *aknW(co)*, *dpsY*, *dpsY(co)*) tutkimuksiin. Koska aromataasinäytteiden tulosten jälkeen näytti siltä, että olisi syytä selvittää, mitä tuotetut yhdisteet ovat, kloonausta ei jatkettu eteenpäin syklaaseihin.

Taulukko 7. Muut tutkittavat sekvenssirakenteet. Promoottori: BBa_R0011. Geenit eroteltu alaviivalla.

Nimi	Sekvenssirakenteet
CYC1	BBa_R0011_ <i>alpABC</i> _BBa_R0011_ <i>snoaDEM</i>
OXY1	BBa_R0011_ <i>snoaB</i>
MET1	BBa_R0011_ <i>snoaBC</i>
CYCII1	BBa_R0011_ <i>snoaBC</i> _BBa_R0011_ <i>snoaL</i>
KRII1	BBa_R0011_ <i>snoaBC</i> _BBa_R0011_ <i>snoaLF</i>

5 TULOSTEN TARKASTELU

Ensimmäiset kokeet nogalamysinonigeenien kanssa olivat sekä lupaavia että lannistavia. Yhteistyökumppanimme LC-MS-tulokset, joiden mukaan ketoreduktaasinäytteet (*snoaD*) sisälsivät polyketidejä (RM20b,c) antoivat sellaisen kuvan, että vain ketoreduktaasia seuraavat entsyymit, aromataasi ja syklaasi, olisivat näissä kasvatuskokeissa olleet ongelmallisia. Kun tätä tulosta ei kuitenkaan saatu laajan mittakaavan kasvatuskokeissa ja NMR:llä varmennettua, oli selvää, että jokin reaktioreitillä ei toimi. On mahdollista, että yhteistyökumppanimme havaitsemat signaalit olivat väärä positiivisia tuloksia, jotka johtuivat LC-MS-menetelmän herkkydestä ja yhdisteiden tunnistamisen hankaluudesta ainoastaan massaspektrometriaan luottaen. Lisäksi kasvatusten kanssa oli muutenkin haasteita, sillä pääkasvatusten saaminen logaritmiseen vaiheeseen osoittautui haastavaksi. Kun käytettävä antibiootin määrä puolitettiin alkuperäisestä puoleen, onnistuttiin kuitenkin saamaan kasvatukset normaalisti käyntiin.

Näytteissä havaittiin myös kloramfenikolipiikki (Kuva 25), mikä antoi aluksi väärän kuvan näytteiden mahdollisesti sisältämistä yhdisteistä. Tähän kehoitettiin ratkaisuksi jättää kloramfenikoli pääkasvatuksesta pois, ja lisätä se vain esikasvatukseen. Näin ollen pääkasvatukseen lisättiin vain kanamysiiniä tai kummakin vektorin läsnäollessa kanamysiiniä ja ampisilliiniä. Jotta kasvatukset varmasti sisälsivät pt-GroE-vektorin soluissaan loppuun asti, kasvatuksia seurattiin myös maljaamalla ne kloramfenikolia sisältäville LA-maljoille. Näiden perusteella kasvatuksissa oli pt-GroE-vektorin sisältäviä soluja koko polyketidi-tuotantokasvatuksen ajan.

5.1 MinPKS:n kasvatuskokeet

Nogalamysinonin tuotantoreitin tutkimusten aikana heräsi kysymys siitä, toimiiko minPKS niin kuin se pitäisi. Kaikki edellytykset sille on: BAP1-kanta ilmentää 4'-fosfopanteteinyylitransferaasia, joten ACP:n pitäisi teoriassa muuttua apo-muodosta synteesissä tarvittavaan holo-muotoon. Käytössä oli pt-GroE-vektori, joka sisälsi minPKS:n laskostumista tukevat kaperoniinit. Tiedettiin, että pt-GroE-vektori oli läsnä kasvatuksissa loppuun asti, sillä tätä seurattiin maljamenetelmällä. Kinamysiinin minPKS:n pitäisi tuottaa liukoinen

heterodimeeri, sillä sen ketosyntaasigeenejä ilmennettiin neljän nukleotidin osalta päällekkäin, kuten Liu ja muut (2020) tutkimuksessaan.

Tämän vuoksi kokeiltiin kolmea erilaista ratkaisua (Kuva 26). Aluksi kokeiltiin nogalamysiinin ja kinamysiinin minPKS-geenien (*snoa123* + *alpABC*) yhteisekspressiota. Tällä kasvatuksella saatiinkin tavallaan lupaava tulos, sillä sen tuottoprofilissa esiintyi piikissä (1) etupuolella niin kutsuttu olkapää, joka osui SEK15-standardin kanssa samaan kohtaan (piikki 3). Tarkempi analysointi LC-MS:llä kuitenkin osoitti, että kyseessä ei massan perusteella ollut SEK15, vaan kyse oli useammasta eri yhdisteestä, josta ei suoraan voinut sanoa minkään näistä olevan polyketidi.

Toiseksi kokeiltiin kinamysiinin minPKS-geenien yhteisekspressiota 4'fosfopanteteiini-transferaasin geenien (*pgaX*) kanssa, mikäli syy minPKS:n huonolle tuotannolle olisikin se, ettei BAP1-kanta muuta ACP-proteiinia (*AlpC*) aktiiviseen holo-muotoon. Tulosten perusteella (Kuva 26) tästä oli kasvatukselle lähinnä vain haittaa. Tästä ei kuitenkaan voi vielä vetää johtopäätöksiä sen suuremmin mihinkään suuntaan. Tämä kasvatuskoe pitäisi toistaa, jotta voitaisiin olla varmoja, ettei se todella tuota mitään.

Kolmanneksi kokeiltiin kinamysiinin minPKS geenien *alpC*:tä korvattuna vastaavalla ravidomysiinin minPKS *ravC*-geenillä. On olemassa ainakin kaksi tutkimusta (Liu ja muut 2020; Kharel ja muut 2018), joiden avulla oli saatu hyviä tuloksia *ravC:n* avulla. Tämän kokeemme perusteella siitä ei kuitekaan ollut apua. Toisaalta tässä on otettava huomioon toinenkin seikka: *E. coli*:lla tehdyssä polyketiditutkimuksissa on yleensä raportoitu tuotteita vasta, kun minPKS:n jälkeiset entsyymit, KR, ARO ja CYC, ovat myös läsnä (Liu ja muut 2020; Cummings ja muut 2019). Tätä näkemystä tukee myös tieto siitä, että streptomykeettien tuottamista polyketideistä ensimmäinen vakaa intermediaatti on aklanoni- tai nogalonihappo, joka syntyy vasta, kun KR:n, ARO:n ja CYC:n läpikäymä polyketidi-intermediaatti katalysoidaan mono-oksygenaasin (OXY) avustamana (Metsä-Ketelä ja muut 2007). Voi siis olla, että kolibakteerikasvatuksissa ei nyt havaita polyketidejä, koska mukana on vasta synteesireitin alkupään entsyymit.

On myös huomioitavaa, että streptomykeettien sekundaarimetboliittien tuotantoon vaadittavat geenit ovat ryhmittyneinä geeniklustereissa, ja ne ovat

usein hiljennettyjä laboratorio-olosuhteissa (Walsh ja Fischback 2010). Yhdisteiden muodostus tapahtuu lisäksi eri organismeissa usein hieman eri tavoin ja niiden tuotannossa saattaa olla mukana myös vielä tuntemattomia säätelymekanismeja. On siis aina teoriassa mahdollista, että tämän tutkimuksen aikana ei ole täysin varmaa tietoa kaikista laskostumiseen vaikuttavista yhdisteistä, ja nämä yhdisteet puuttuvat nyt näistä kolibakteerikasvatuksista.

5.2 Ketoreduktaasien kasvatuskokeet

Ketoreduktaasigeenien tuottokokeista KR8 (kodonioptimoitu *dpsE*) antoi lupaavia tuloksia (Kuva 27), mutta LC-MS osoitti, ettei KR8 tuottanut polyketidejä. Standardin (TK24_*snoaD*) kanssa vertailtaessa mikään ketoreduktaasien tuottamista yhdisteistä ei vastaa standardin kromatogrammissa havaittavia piikkejä. Kuitenkin voisi olla syytä tutkia tarkemmin, mitä kromatogrammeissa esiintyvät yhdisteet ovat.

KR3 (villityypin *snoaD*) ja KR5 (kodonioptimoitu *aknA*) eivät vaikuttaneet näiden tulosten perusteella tuottavan mitään. KR3 (villityypin *snoaD*) on kuitenkin aiemmin tuottanut jotakin (Kuva 25), kun sen ainoa ero oli eri promoottori, BBa_R0011. Koska tässä tutkielmassa tutkittiin myös promoottorin vaikutusta ketoreduktaasien ilmentämiseen, eikä promoottorien välillä ollut ilmeistä eroa, KR3-kannan tuottavuus johtuu hyvin suurella todennäköisyydellä jostakin muusta kuin promoottorista.

5.3 Aromataasien kasvatuskokeet

Aromataasikokeissa mielenkiintoisiksi näytteiksi osoittautui kolme eri sekvenssiyhdistelmää (Kuva 28). Yhdiste 3 selvästi muuttuu muiksi yhdisteiksi ja yhdiste 2 selvästi lisääntyy siirryttäessä reaktioreitillä ketoreduktaasista aromataasiin. Näin ollen seuraavista rakenteista olisi kannattavaa jatkotutkimuksissa selvittää, mitä nämä yhdisteet 2 ja 3 ovat: ARO28, ARO34 ja ARO 37. Maininnan arvoista on myös se, että kaikista kolmesta homologista daunorubisiinin entsyymit vaikuttivat toimivan kolibakteerissa parhaiten.

6 PÄÄTELMÄT

Etsittäessä parempaa antibioottia tai syöpälääkettä, yksi mahdollisuus on käyttää jo tunnettua bioaktiivista yhdistettä suunnittelun pohjana, ja muuttaa tämän bioaktiivisia osia, jolloin voidaan löytää yhdiste, jolla on samat positiiviset vaikutukset ja mahdollisesti lievemmät haittavaikutukset. (Hulst ja muut 2022.) Tämä on yksi syy tämän tutkimuksen merkityksellisyydelle: vaikka vain antrasykliinien aglykoniosa tuotettaisiin tehokkaasti kolibakteerissa, säästettäisiin jo sillä aikaa ja resursseja, joita voitaisiin käyttää bioaktiivisten sokeriosien tutkimiseen esimerkiksi streptomyykeettien avulla.

Polyketidien rakentumisen tutkiminen on hankalaa, sillä niiden hyvin reaktiivinen poly- β -keto-intermediaatti rakentuu entsyymikompleksin, eikä yhden entsyymin avulla. Lisäksi tämä mainittu välituote on hyvin epästabiili ja muodostaa erilaisia sykliisiä yhdisteitä spontaanisti. (Hertweck ja muut 2007.) Tutkielmassa suurin kysymys onkin koko ajan ollut: toimiiko minimaalinen polyketidisyntaasi. Viitteitä siihen on ollut. Kun reaktioreitin ensimmäiset nogalamysinonigeenein (*snoaD/DE/DEM*) tuotetut näytteet analysoitiin yhteistyökumppanimme toimesta, *snoaD*-geenien avulla tuotetuista näytteissä havaittiin LC-MS:llä RM20:tä. Tätä ei kuitenkaan saatu näkyviin omissa LC-MS-analyseissämme, eikä myöskään NMR:llä.

Myös Liun ja muiden (2020) tutkimuksessa oli ongelmia toimivan minimaalisen PKS:n toiminnan kanssa. Tutkimuksessa havaittiin, että minPKS:n ACP ei muuttunut tehokkaasti apo-muodosta holo-muotoon, vaikka heidän käyttämänsä BAP1-kanta ilmentääkin tähän muokkaukseen tarkoitettua 4'-fosfopanteteinyylitransferaasia. Kokeissa *alpC*:n korvaaminen *ravC*:llä sen sijaan tuotti holo-muotoa suhteella 1:1, joten tämä oli selvästi toimiva ratkaisu. Tässä tutkimuksessa tällä yhdistelmällä ei saatu alustavasti lupaavia tuloksia, mutta tästä ei voi suoraan vetää lopullisia johtopäätöksiä. Liu tutkimusryhmineen myös raportoi polyketidituotantoa vasta, kun reaktioreitillä oli läsnä kaikki entsyymit syklaaseihin asti. Näin ollen tässä on tämänkin tutkimuksen jatkoa ajatellen potentiaalinen tutkimusasetelma.

Käytimme tutkimuksessa Liun ja muiden (2020) kuvailemaa menetelmää, jossa polyketidien pääkasvatusta kasvatettiin 2–4 päivää. Tässä tutkielmassa kaikkia

kasvatuksia kasvatettiin neljä päivää. Jatkossa voisi olla järkevää kokeilla myös, onko kasvatusajalla polyketidien tuotantoon jotakin vaikutusta. Eli riittäisikö kasvatusajaksi tuo kaksi päivää, ja toisaalta, onko tuotantoprofiilissa eroja näiden päivien aikana. Myöskin laajan mittakaavan menetelmä vaatii vähintäänkin hienosäätöä tai uuden näkökulman yhdisteiden tuottamiseksi siinä määrin, että niitä voitaisiin tutkia NMR:llä. Tällä hetkellä se on haasteellista yhdisteiden pienen tuottomäärän takia.

Tästä tutkielmasta on tehtävissä kaksi oleellista päätelmää. Ensinnäkin kokonaiskuvan selvittäminen polyketidien tuotannolle *E. coli*:ssa on edelleen kesken, ja vaatii vielä paljon tutkimusta. Polyketidien rakenteet ovat monimutkaisia ja niiden muodostukseen liittyy useita eri tekijöitä, joista osa on edelleen tuntemattomia. Vaikka tuotannon eri vaiheista ja mekanismeista tiedetään paljon, näiden muodostamassa kokonaisuudessa on edelleen avonaisia kysymyksiä: minkälaisia yhdisteitä polyketidireaktiotien eri vaiheista on mahdollista odottaa ja minkälaisella saannolla. Lisäksi, streptomykeettien geeniklusterit, joita ilmentämällä polyketidejä tuotetaan, ovat usein laboratorioolosuhteissa hiljennettyjä (Walsh ja Fischback 2010). On myös mahdollista, että tämän tutkimuksen aikana ei ole ollut käytettävissä varmaa tietoa kaikista laskostumiseen vaikuttavista tekijöistä, ja tämän vuoksi yhdisteiden tuottaminen kolibakteerissa on haastavaa.

Toinen tärkeä päätelmä on, että polyketidien tuotto kolibakteerien avulla sen kaikki työkalut hyödyntäen on osoitettu olevan mahdollista. Polyketidien tuotannolle kolibakteereissa on ollut samat haasteet vuosikymmeniä: rakenneosien saatavuus, oikein laskostuneiden ja translaation jälkeen muokattujen minimaalisten polyketidisyntaasien (minPKS) ilmentäminen ja polyketidituotteen reaktioreitin synkronointi siten, että tuotto on mahdollisimman tehokasta (Pfeifer ja muut 2001). Rakenneosat ovat kuitenkin jo paremmin saatavilla, minPKS:n toimintamekanismit tunnetaan jo sellaisella tasolla, että tiedetään, miten polyketidejä voidaan tuottaa ja reaktioreitin synkronoimiseksi tehdään tutkimusta jatkuvasti. Näihin haasteisiin on siis löydetty jo useitakin ratkaisuja, vaikka ydinkysymykset tutkimuksen ympärillä ovatkin edelleen samat. On siis selvää, että polyketidien tuotto kolibakteerien avulla vaatii vielä paljon tutkimusta ja lääkeaineiden tuoton teolliset sovellukset ovat edelleen kaukana,

mutta viime aikaiset tutkimustulokset ovat antaneet viitteitä, että tämä on mahdollista.

Lähteet

Abdella, B.R.J. & Fisher, J. (1985) A chemical perspective on the anthracycline antitumor antibiotics. *EHP*. **64**: 3–18.

Alexeev, I., Sultana, A., Mäntsälä, P., Niemi, J. & Schneider, G. (2007) Aclacinomycin oxidoreductase (AknOx) from the biosynthetic pathway of the antibiotic aclasinomycin is unusual flavoenzyme with a dual active site. *PNAS*. **104(15)**: 6170–6175.

Arkin, A. & Endy, D. (1999) A Standard Parts List for Biological Circuitry. *Tech rep, DARPA white paper*. [<http://hdl.handle.net/1721.1/29794>].

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Ringbou edition, Supplement 37, Transformation using calcium chloride, 1.8.1–1.8.3. John Wiley & Sons, Inc.

Bhuyan, B.K. & Smith, C.G. (1975) Nogalamycin: A. C. Sartorelli and D. G. Johns (toimittajat), *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, part II*. *New York: Springer-Verlag*. 623–632.

Borchmann, P., Hubel, K., Schnell, R. & Engert, A. (1997) Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int J Clin Pharmacol Ther*. **35**: 80–83.

Boros, I., Pósfai, G. & Venetiärer, P. (1984) High copy number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322. *Gene*. **30(1–3)**: 257–260.

Boucher, Y., Nesbø, C.L. & Doolittle, W.F. (2001) Microbial genomes: dealing with diversity. *COMICR*. **4(3)**: 285–289.

Brockmann, H. & Brockmann, H.Jr. (1963) Rhodomycine, VIII; Antibiotica aus Actinomyceten, L. δ-Rhodomycinon. *Chem Ber*. **96**: 1771.

Caicedo-Montoya, C., Manzo-Ruiz, M. & Ríos-Esteva, R. (2021) Pan-Genome of the genus *Streptomyces* and prioritization of biosynthetic gene clusters with potential to produce antibiotic compounds. *Fron Microbiol*. **12**: 677558.

- Chater, K.F. & Chandra, G. (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparison. *FEMS Microbiol Rev.* **30**: 651–672.
- Chi, W.J., Lee, S.Y., Lee J.H. (2011) Functional analysis of SGR4635-induced enhancement of pigmented antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *J Microbiol.***49**: 828–833.
- Collie, J.N. & Myers, W.S. (1893) The formation of orcinol and other condensation products from dehydracetic acid. *J. Chem. Soc.* **63**: 122–128.
- Cummings, M., Peters, A.D., Whitehead, G.F.S., Menon, B.R.K., Micklefield, J., Webb, S.J. & Takano, E. (2019) Assembling a plug-and-play production line for combinatorial biosynthesis of aromatic polyketides in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **17(7)**: e3000347.
- Di Marco, A., Cassinelli, G. & Arcamone, F. (1981) The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat Rep.* **65**: 3–8.
- Feng, J., Shi, W., Zhang, S. & Zhang, Y. (2015) Identification of new compounds with high activity against stationary phase *Borrelia burgdorferi* from the NCI compound collection. *Emerg Microbes Infect.* **4(6)**: e31. doi: 10.1038/emi.2015.31.
- Feng, P., Weagant, S., Grant, M. & Burkhardt, W. (2002) Bacteriological analytical Manual: enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. *Bacteriol. Anal. Man.* **6**: 1–13.
- Fernandez, M. & Sanchez, J. (2002) Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology.* **148**: 405–412.
- Flårdh, K & Buttner M.J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature.* **7**: 36–49.
- Francis, D.M. & Page R. (2010) Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **61**:5.24.1–5.24.29.
- Grimm, A., Madduri, K., Ali, A. & Hutchinson, C.R. (1994) Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene.* **151**: 1–10.

Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. (2007) Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *NPR*. **24**: 162–190.

Holmes, V.F. & Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 1322–1324.

Hopwood, D.A. & Sherman D.H. (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet*. **24**: 37–66.

Horinouchi, S., Kumada, Y. & Beppu T. (1984) Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol*. **158**: 481–487.

Hortobágyi, G.N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. **54(4)**: 1–7.

Huang, C.H., Lin, Y.S., Yang, Y.L., Huang, S.W. & Chen, C.W. (1998) The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol*. **28**: 905–916.

Hulst, M.B., Grocholski, T., Neefjes, J.J.C., van Wezel, G.P. & Metsä-Ketelä, M. (2022) Antracyclines: biosynthesis, engineering and clinical applications. *NPC*. Doi: 10.1039/d1np00059d

Kharel, M.K., Pahari, P., Lian, H. & Rohr, J. (2010). Enzymatic total synthesis of rabelomycin, an angucycline group antibiotic. *Org. Lett*. **12(12)**: 2814–2817.

Knight, T., Rettberg, R., Chan, L., Endy, D., Shetty, R. & Che, A. (2003) Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *MIT Artificial Intelligence Laboratory; MIT Synthetic Biology Working Group*. <http://hdl.handle.net/1721.1/21168>

Law, J., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N-S., Wong, S., Goh, B.H., & Lee, L-H. (2019). A Review on Mangrove Actinobacterial Diversity: The Roles of *Streptomyces* and Novel Species Discovery. *Progress In Microbes & Molecular Biology*. 2. 10.36877/pmmb.a0000024.

- Lee, E., Karoonuthaisiri, N., Kim, H., Park, J., Cha, C., Kao, C. & Roe, J. (2005) A master regulator sigma governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* **57**:1252–1264.
- Lee, J., Hwang, Y. J., Kim, Y., Lee, M. Y., Hyeon, S. J., Lee, S., Kim, D. H., Jang, S.J., Im, H., Min, S. J., Choo, H., Pae, A.N., Kim, D.J., Cho, K.S., Kowall, N.W. & Ryu, H. (2017) Remodeling of heterochromatin structure slows neuropathological progression and prolongs survival in an animal model of Huntington's Disease. *Acta Neuropathol.* **134(5)**: 729–748. doi: 10.1007/s00401-017-1732-8.
- Li, L.H. & Krueger, W.C. (1991) The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives. *Pharmac. Ther.* **51**: 239–255.
- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* **16(6)**: 466–471.
- Liu, X., Hua, K., Liu, D., Wu, Z.-L., Wang, Y, Zhang, H., Deng, Z. Pfeifer, B.A. & Jiang, M. (2020) Heterologous biosynthesis of type II polyketide products using *E. coli*. *ACS Chem. Biol.* **15**: 1177–1183.
- Loman, N.J. & Pallen, M.J. (2015) Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 787–794.
- Lorico, A. & Long, B.H. (1993) Biochemical characterization of elsamicin and other coumarin-related antitumour agents as potent inhibitors of human topoisomerase II. *Eur. J. Cancer.* **29A**: 1985–1991.
- Metsä-Ketelä, M., Palmu, K., Kunnari, T., Ylihonko, K. ja Mäntsälä, P. (2003) Engineering anthracycline biosynthesis toward angucyclines. *ASM.* **47(4)**: 1291–1296.
- Metsä-Ketelä, M., Niemi, J. & Mäntsälä, P. (2008) Anthracycline biosynthesis: genes enzymes and mechanisms. *Top Curr Chem.* **282**: 101–140.
- Meurer, G. Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Vining, L.C., Rohr, J & Hutchinson, R. (1997) Iterative type II polyketide synthases, cyclases and ketoreductases

exhibit context-dependent behavior in the biosynthesis of linear and angular decapolyketides. *Chem. Biol.* **4**: 433–443.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56**: 185–229.

Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2020) Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**: 770–803.

Nji Wandi, B., Siitonen, V., Palmu, K. & Metsä-Ketelä, M. (2020) The Rieske oxygenase SnoT catalyzes 2''-Hydroksylation of 1-Rhodosamine in Nogalamycin biosynthesis. *Chembiochem.* **21(21)**: 3062–3066.

Oki, T., Matsuzawa, Y., Yoshimoto, A., Numata, K. & Kitamura, I. (1975) New antitumor antibiotics, aclacinomycins A and B. *J Antibiot.* **28**: 830–834.

Pettersen, V. (2012) Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*: the influence of the nucleotide sequences at the 5' ends of target genes. The Arctic University of Norway. Väitöskirja.

Pfeifer, B.A., Khosla, C., Admiraal, S.J. & Gramajo, H., Cane, D.E. (2001) Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **291**: 1790–1792.

Piggot P.J. (2009) Encyclopedia of Microbiology: *Bacillus subtilis*. 3. painos. *Academic press*. 45–56. ISBN 9780123739445.

Pontrelli, S., Chiu, T-Y., Lan, E.I., Chen, F.Y-H., Chang, P. & Liao, J.C. (2018) *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Elsevier.* **50**: 16–46.

Rebatchouk, D., Daraselina, N. & Narita, J.O. (1996) NOMAD: a versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93(20)**:10891–10896.

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. & van Wezel, G.P. (2008) Feast of famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports.* **9**: 670–675.

- Risdian, C., Mozef, T. & Wink, J. (2019) Biosynthesis of polyketide in *Streptomyces*. *MDPI*. **7**: 124–141.
- Robert, J. (1993) Epirubicin. Clinical pharmacology and dose-effect relationship. *Drugs*. **45(2)**: 20–30.
- Räty, K., Kantola, J., Hautala, A., Hakala, J., Ylihonko, K. & Mäntsälä, P. (2002) Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*. **293**: 115–122.
- Shen, B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol*. **7**: 285–295.
- Shetty, R.P., Endy, D. & Knight Jr, T.F. (2008) Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J. Biol. Eng.* **2**:5–17.
- Siitonen, V., Selvaraj, B., Niiranen, L., Lindqvist, Y., Shneider, G. & Metsä-Ketelä, M. (2016) Divergent non-heme iron enzymes in the nogalamycin biosynthetic pathway. *PNAS*. **113(19)**: 5251–5256.
- Staunton, J. & Weissman, K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *NPR*. **18**: 380–416.
- Waksman, S.A. & Henrici, A.T. (1943) The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol*. **46**: 337–341.
- Walsh, C.T. & Fischbach, M.A. (2010) Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 2469–2493.
- Weiss, R.B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin oncol*. **19(6)**: 670–686.
- Ylihonko, K., Mäntsälä, P., Kantola, J., Kunnari, T., Hautala, A. & Hakala, J. (2000) Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. *Microbiology*. **146**: 155–163.
- Zhu, H., Sandiford, K. & van Wezel, G.P. (2014) Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *JIBM*. **41(2)**: 371–386.

Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shibai, T., Sakaki, Y. & Hattori M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS*. **98(21)**: 12215-12220.