



Mikrobien tuottamat luonnonyhdisteet uusien lääkkeiden lähteenä

LuK-tutkielma
Turun Yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia
04/24
Amanda Moglia

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Turun Yliopisto

Bioteknologian laitos

Amanda Moglia: Mikrobien tuottamat luonnonyhdisteet uusien lääkkeiden lähteenä

LuK-tutkielma, 23 s.

Biokemia

Huhtikuu 2024

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

Mikrobien tuottamat luonnonyhdisteet ovat jo pitkään olleet tärkeä osa lääketeollisuutta, mutta uusia lääkkeiksi sopivia yhdisteitä ei ole enää löydetty samaan tahtiin kuin aluksi. Uusille mikrobien tuottamille bioaktiivisille yhdisteille on kuitenkin kasvava tarve muun muassa mikrobilääkeresistenssin lisääntyessä. Mikrobeista erityisesti streptomykeetti-bakteerit ovat olleet vuosikymmenten ajan merkittäviä luonnonyhdisteiden lähteitä tuottaen esimerkiksi puolet tunnetuista antibiooteista.

Luonnonyhdisteet syntyvät biosynteesireittien tuloksena, ja synteesireittien eri vaiheista vastuussa olevat geenit sijaitsevat mikrobien DNA:ssa biosynteettisinä geeniryhminä (engl. *biosynthetic gene cluster*, BGC). Genomisekvensoinnin ollessa yhä laajemmin saatavilla ja genomitiedon analysoimiseen soveltuvien bioinformatiikan työvälineiden kehittyessä, mikrobien BGC:iden määrän on havaittu olevan huomattavasti suurempi, kuin niiden tuottamista yhdisteistä on voitu päätellä.

BGC:iden ilmentyminen on tarkkaan säädeltyä, ja niistä suuri osa on laboratorio-olosuhteissa ilmentymättömiä. Uusien luonnonyhdisteiden tuottamiseksi BGC:t täytyy pystyä aktivoimaan. Aktivointiin soveltuvia menetelmiä on runsaasti, ja niiden kehittämisen ovat mahdollistaneet muun muassa saatavilla olevan genomitiedon kasvava määrä sekä genomien muokkaukseen soveltuvien teknologioiden kehitys. Menetelmät on mahdollista jaotella tiettyihin BGC:ihin kohdistettuihin menetelmiin sekä laajemmin vaikuttaviin eli pleiotrooppisiin menetelmiin.

Asiasanat: luonnonyhdisteet, antibiootit, biosynteettinen geeniryhmä, streptomykeetit

Sisällysluettelo

1 Johdanto	2
2 Luonnonyhdisteet lääkeaineina	3
2.1 Mikrobeista saatavat lääkeaineet	3
2.2 Uusien lääkeaineiden tarve	4
3 Streptomykeetit	5
4 Biosynteettiset geeniryhmät	7
5 Genomien sekvensointi ja louhinta	8
6 Biosynteettisten geeniryhmien aktivointi	9
6.1 Pleiotrooppiset menetelmät	10
6.1.1 Ribosomimuokkaus	10
6.1.2 Säätelögeenien käsittely	12
6.1.3 Mikrobin välinen vuorovaikutus	13
6.2 Tiettyihin biosynteettisiin geeniryhmiin kohdistetut menetelmät	14
6.2.1 Heterologinen ekspressio	14
6.2.2 Biosynteettisten geeniryhmien muokkaus ja uudelleenjärjestely	16
7 Yhteenveto ja tulevaisuus	17
8 Kirjallisuus	18

1 Johdanto

Mikrobilääkeresistenssi (engl. *antimicrobial resistance*, AMR) on maailmanlaajuinen ongelma, jonka tuomiin haasteisiin on vastattava nopeasti. Vuonna 2019 4,95:n miljoonan ihmisen kuolema liittyi mikrobilääkeresistenssiin, ja näistä kuolemista 1,27 miljoonaa oli suoraan seurausta AMR:stä (Murray ja muut 2022). Iso-Britannian valtionjohdon tilaaman raportin mukaan taas vuosittain jopa 10 miljoonaa ihmistä on vaarassa kuolla resistenttien infektioiden seurauksena vuoteen 2050 mennessä (O'Neill 2016). AMR:n lisääntyessä tarve uusille mikrobilääkkeille kasvaa jatkuvasti.

Ihminen on jo pitkään hyödyntänyt luontoa ja sieltä löytyviä yhdisteitä moniin tehtäviin. Luonnonyhdisteisiin kuuluu laaja ryhmä erilaisia bioaktiivisuuksia omaavia kemiallisia yhdisteitä, joita tuottavat muun muassa bakteerit, kasvit ja sienet. Luonnonyhdisteitä on vuosittain käytetty monissa tarkoituksissa, kuten ihmisten ja eläinten lääkkeinä sekä maataloudessa. (Katz ja Baltz 2016.) Luonnonyhdisteistä puhutaan usein vaihtoehtoisesti erikoistuneina metaboliitteina tai sekundäärimetaboliitteina. Sekundäärimetaboliitit ovat yhdisteitä, jotka eivät suoraan ole välttämättömiä organismin kasvulle ja kehitykselle. (Baltz 2019.)

Mikrobit ovat merkittävä bioaktiivisten luonnonyhdisteiden lähde ja niiden syntetisoimista yhdisteistä kehitetyt lääkeaineet ovat tärkeä osa lääketeollisuutta. Näihin yhdisteisiin kuuluvat muun muassa antibiootit kuten kefalosporiinit ja tetrasykliinit, immunosupressorit kuten syklosporiinit ja rapamysiini sekä loislääkkeenä käytetty ivermektiini (Cragg ja Newman 2013). Antibiootit ja muut bioaktiiviset luonnonyhdisteet ovat mahdollistaneet tarttuvien tautien hoidon, ja niiden avulla myös esimerkiksi elinsiirrot ja syöpähoidot on tehty mahdollisiksi. Mikrobit eivät kuitenkaan tuota näitä lääkinnälliseen käyttöön soveltuvia yhdisteitä ihmisten tarpeisiin, vaan omaan käyttöönsä. Maaperässä esiintyvien mikro-organismien tuottamien bioaktiivisten luonnonyhdisteiden runsauden syyksi on esitetty yhdisteiden toimiminen kilpailijoita tappavina, signaalimolekyyleinä tai eukaryoottien kanssa vuorovaikutuksia välittävinä. (Hutchings ja muut 2019.)

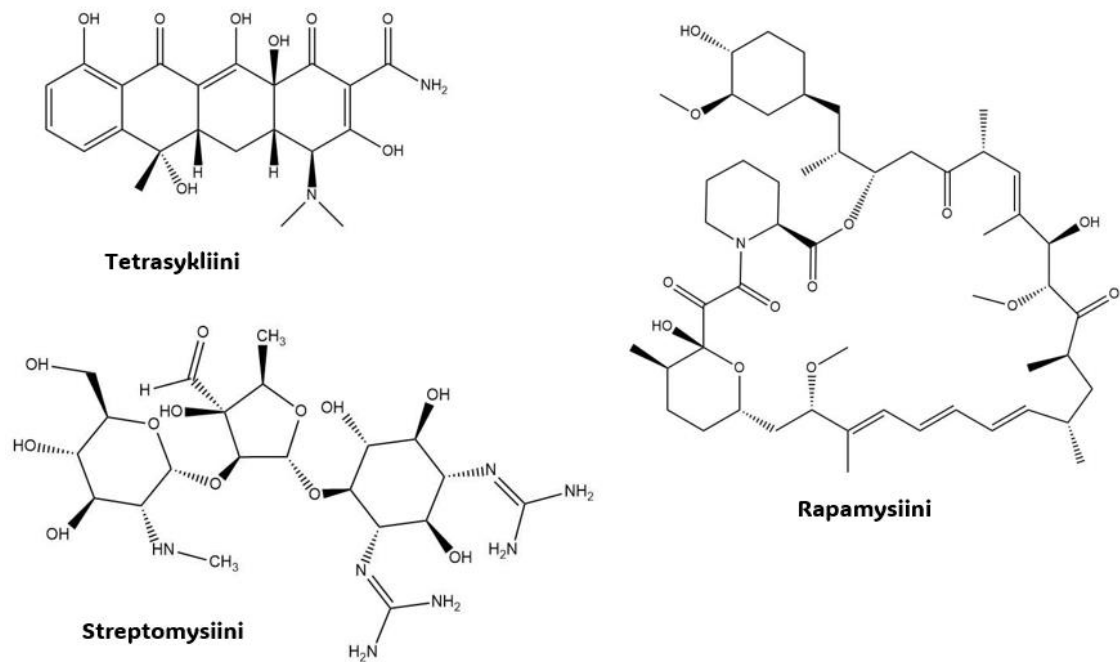
Tutkielmassa keskitytään mikrobeihin, erityisesti streptomykeetti-bakteereihin, lääkkeiden tuottajina, ja pohditaan uusien lääkeaineiden tarvetta. Lisäksi perehdytään mikrobien luonnonyhdisteiden tuottoon niiden geeniryhmien avulla, ja siihen, kuinka nämä geeniryhmät saataisiin aktivoitua uusien bioaktiivisten luonnonyhdisteiden tuottamiseksi.

2 Luonnonyhdisteet lääkeaineina

2.1 Mikrobeista saatavat lääkeaineet

Alexander Fleming löysi penisilliinin rihmamaisesta *Penicillium notatum*-homesienestä vuonna 1928, ja 1940-luvulle päästessä penisilliinin suuri lääkinnällinen potentiaali oli havaittu (Cragg ja Newman 2013). Selman Waksmanin työ maaperämikrobiologian parissa taas johti streptomysiinin löytämiseen ja havaintoon siitä, että aktinomykeettien pääjaksoon kuuluvat bakteerit, erityisesti streptomykeetit, ovat runsaimpia luonnosta löytyviä antibioottien tuottajia. Waksman löysi streptomysiinin aktinomykeetteihin kuuluvasta *Streptomyces griseus*-bakteerista ja osoitti yhdisteen toimivan gram-negatiivisten bakteerien lisäksi myös tuberkuloosia aiheuttavaa *Mycobacterium tuberculosis*:ta vastaan. (Hopwood 2007.)

Waksmanin havaintoja seurasi kulta-aika bioaktiivisten luonnonyhdisteiden löytämisessä. Lääkeyhtiöt alkoivat ensin etsiä tapoja tuottaa penisilliiniä ja streptomysiiniä tehokkaasti, mutta siirtyvät 1940-luvun loppupuolella monien tutkimusryhmien tavoin etsimään täysin uusia antibiootteja. Seuraavien vuosikymmenten ajan uusia antibiootteja löydettiin kiihtyvään tahtiin. (Hopwood 2007.) Kuitenkin uusia lääkinnällisiä luonnonyhdisteitä alettiin löytää koko ajan vähemmän, koska samoja yhdisteitä löydettiin vain uudelleen ja pienissä määrissä esiintyvien luonnonyhdisteiden löytämiseen ei ollut soveltuvia menetelmiä (Baltz 2019). 1990-luvulla iso osa lääkeyhtiöistä siirsi resurssinsa mikrobien tuottamien luonnonyhdisteiden etsimisestä synteettisten yhdisteiden valmistamiseen. Kuitenkaan synteettisten antibioottien valmistaminen ei ole osoittautunut kovinkaan menestykkääksi ja lähes kaikki luonnolliset antibiootit ovat fermentaatiotuotteita edelleen. Luonnolliset antibiootit ovat vertaansa vailla muun muassa tehokkuudessa, ja uusien mikrobien valmistamien luonnonyhdisteiden löytäminen onkin yhä tärkeää. (Hopwood 2007.) Kolmen eri luonnonyhdisteen rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Tetrasykliinin, streptomysiinin ja rapamysiinin rakenteet. Tetrasykliini ja streptomysiini ovat antibiootteja, kun taas rapamysiini toimii immunosuppressiivisena lääkkeenä.

2.2 Uusien lääkeaineiden tarve

Tarve uusille mikrobilääkkeille on kasvanut, vaikka tahti uusien bioaktiivisten luonnonyhdisteiden löytämisessä on huomattavasti hidastunut ja lääkeyhtiöiden kiinnostus mikrobilääkkeiden tutkimiseen sekä kehittämiseen vähentynyt. Merkittävänä syynä tarpeen kasvuun on mikrobilääkeresistenssi (AMR). Mikrobilääkeresistenssissä mikrobeja, kuten bakteereja, viruksia ja loisia, ei enää saada tuhottua mikrobilääkkeillä ja lääkkeitä tulee tehottomia patogeenejä vastaan. AMR on uhka modernin lääketieteen saavutuksille, kun vaarana on infektio tautien hoitamisen vaikeutuminen sekä useiden lääketieteellisten toimenpiteiden, kuten leikkausten ja kemoterapian, suorittamisen muuttuminen riskialttiimmaksi. Suurimmat syyt lääkeresistenttien patogeenien kehittymiseen ovat mikrobilääkkeiden liika- ja väärinkäyttö ihmisten, eläinten sekä kasvien infektio tautien hoidossa ja torjunnassa. Ihmisen toiminnan vaikutuksesta AMR:n ilmaantuminen ja leviäminen on kiihtynyt, vaikka ilmiönä AMR on patogeenien geneettisistä muutoksista johtuen täysin luonnollinen. (World Health Organization 2023.) Mikrobilääkeresistenssin ihmisten terveyteen kohdistaman uhan lisäksi AMR:n taloudelliset vaikutukset ovat mittavat ja arvion mukaan maksaisivat maailmantaloudelle 100 biljoonaa Yhdysvaltain dollaria vuoteen 2050 mennessä (O' Neill 2016).

Vuonna 2019 kuuden patogeenin (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas aeruginosa*) havaittiin olevan vastuussa suuresta osasta AMR:ään liittyvistä kuolemista (Murray ja muut 2022). Myös Maailman terveysjärjestön (engl. *World Health Organization*) julkaisema prioriteettilista patogeeneista korostaa tiettyjen bakteerien kohdistavan suuremman uhan ihmisten terveydelle kuin toisten. Lista nostaa esiin erityisesti moniresistentit gram-negatiiviset bakteerit, ja sen tarkoituksena on tukea antibiootteihin keskittyvää tutkimusta ja edistää tiettyjen bakteerien priorisointia antibioottien kehityksen kohteena. (Tacconelli ja muut 2018.)

AMR vaikuttaa ihmisiin maailmanlaajuisesti eri alueista ja tuloeroista riippumatta, mutta suurimmat kärsijät löytyvät köyhempien maiden väestöistä, joissa muun muassa puhtas vesi ja terveydenhoito eivät aina ole laajasti saatavilla. AMR:n tuomiin haasteisiin vastaamisen keinoja ovat muun muassa infektioiden ehkäiseminen rokotteilla, antibioottien käytön rajoittaminen tapauksiin, jossa se on välttämätöntä sekä antibioottien käytön vähentäminen esimerkiksi maanviljelyssä. Resurssien ohjaaminen uusien antibioottien kehitykseen on myös olennaista. (Murray ja muut 2022.)

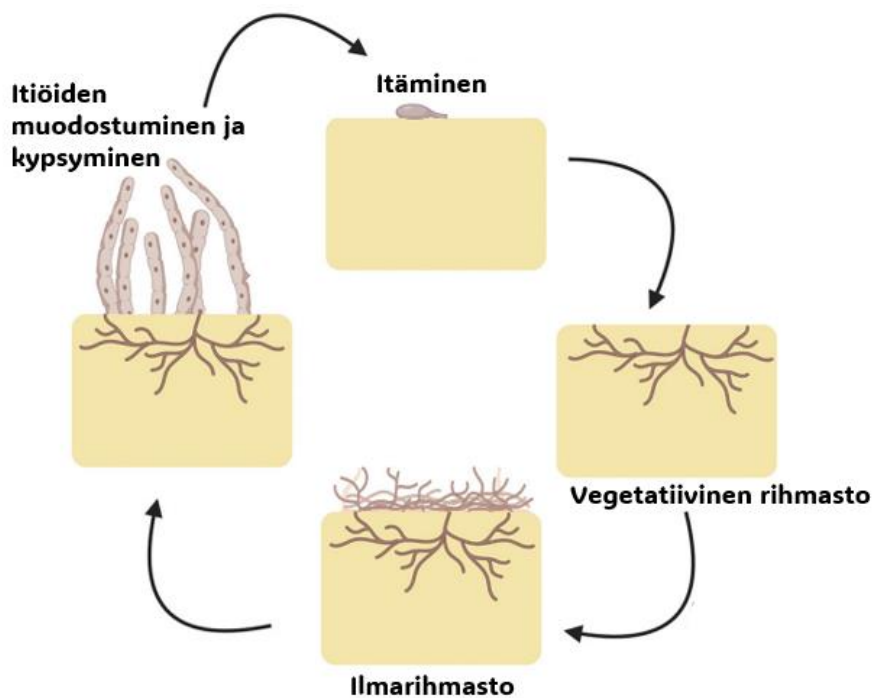
3 Streptomykeetit

Aktinobakteerien (engl. *Actinobacteria*) pääjaksoon kuuluvat Streptomykeetit (engl. *Streptomyces*) ovat erityisen lahjakkaita luonnonyhdisteiden tuottajia, ja esimerkiksi puolet tunnetuista antibiooteista ovat niiden syntetisoimia (Van Der Meij ja muut 2017). Streptomykeetit ovat pitkään olleet runsaita luonnonyhdisteiden lähteitä, joten ne ovat edelleen erityisen kiinnostuksen ja tutkimuksen kohteena mitä tulee uusien lääkinnällisten luonnonyhdisteiden etsimiseen.

Streptomykeetit ovat gram-positiivisia bakteereja, joille on tyypillistä genomien suuri sytosiini- ja guaniinipitoisuus, ja ne ovat monista muista bakteereista poiketen monisoluisia ja liikkumattomia. Streptomykeettejä esiintyy runsaissa määrin maaperässä, missä niillä on merkittävä tehtävä monien polysakkaridien, kuten kitiniin ja selluloosan, ja muiden makromolekyylien hydrolysoinnissa sekä yhdisteissä kiinni olevan hiilen kierrättämisessä. Maaperän lisäksi osa streptomykeeteistä elää vesiympäristöissä. (Barka ja muut 2016.) Streptomykeetit eroavat monista muista bakteereista myös kasvunsa ja

kehityksensä suhteen, ja muistuttavat näiltä ominaisuuksiltaan enemmän rihmamaisia sieniä (Flärdh 2003).

Streptomykeeteillä on monivaiheinen elinkierto (kuva 2), ja ne lisääntyvät itiöiden muodostumisen avulla. Sopivissa olosuhteissa itiö itää ja muodostaa yhden tai kaksi itiöputkea (engl. *germ tube*), jotka kehittyvät ensin rihmaksi ja lopulta vegetatiiviseksi rihmastoverkoksi kasvamalla sekä kärjestä, että haarautuen. Polysakkaridien, kuten selluloosan ja kitiinin, hajottaminen entsyymaattisesti tarjoaa rihmastolle sen kasvuun tarvitsemia ravinteita. Epäsuotuisat olosuhteet, kuten ravinteiden ehtyminen, johtavat itiöitä tuottavien ilmarihmojen (engl. *aerial hyphae*) kehittymiseen, ja ravinteet uuden rihmaston valmistamiseen saadaan hajottamalla vegetatiivista tai substraattirihmasto autolyttisesti. Rihmaston hajoamisen seurauksena vapautuneet yhdisteet, kuten aminohapot ja nukleotidit, alkavat kertyä ja houkuttaa paikalle kilpailevia mikrobeja. Liikkumiseen kykenemättömät streptomykeetit puolustautuvat muita mikrobeja vastaan syntetisoimalla bioaktiivisia luonnonyhdisteitä, ja antibiootteja tuotetaan eniten tässä vaiheessa elinkiertoa. (Barka ja muut 2016; Van Der Meij ja muut 2017.)



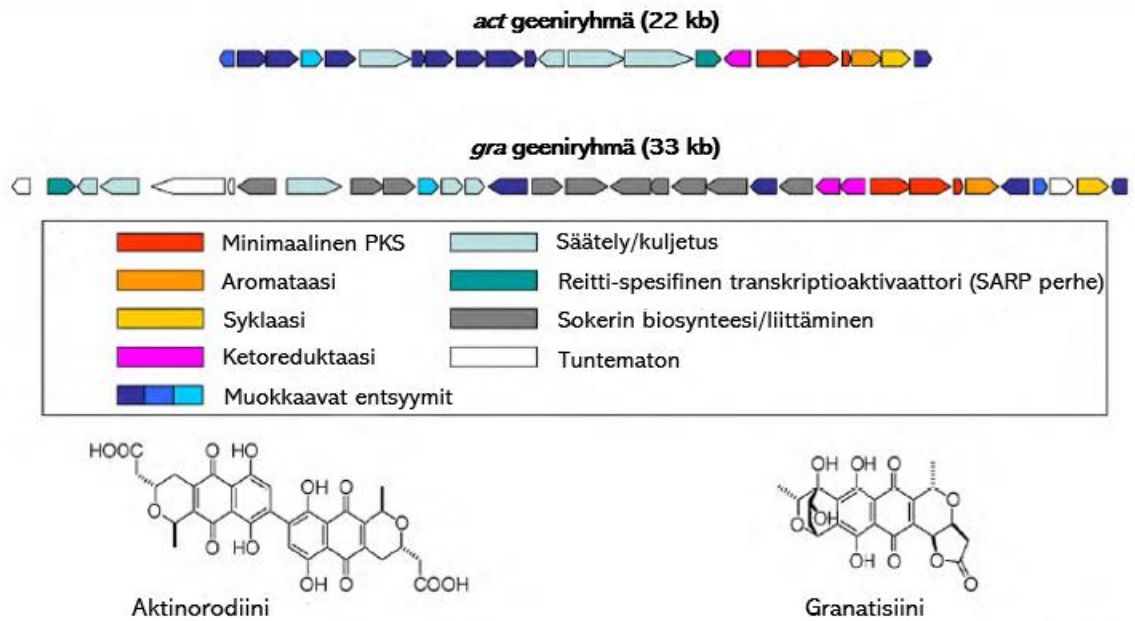
Kuva 2. Streptomykeettien elinkierto. Itiö itää, ja muodostaa ensin vegetatiivisen rihman ja lopulta rihmastoverkoston. Epäsuotuisien olosuhteiden, kuten ravinnon puutteen, seurauksena kehittyvät ilmarihmat, jotka tuottavat itiöitä. (Muokattu kuvasta Pacios-Michelena ja muut 2021).

4 Biosynteettiset geeniryhmät

Jo bakteerien genetiikkaan keskittyvän tutkimuksen alkuaikoina saatiin selville, että biosynteettisten reittien peräkkäisistä vaiheista vastuussa olevat geenit esiintyvät rykelmänä DNA:ssa. Tietyn luonnonyhdisteen tuotosta vastaavaa biosynteettistä reittiä koodaavat geenit sijaitsevat siis tyypillisesti samassa biosynteettisessä geeniryhmässä (engl. *biosynthetic gene cluster*, BGC). Aktinomykeettien BGC:t löytyvät yleensä kromosomista, mutta voivat sijaita joissain tapauksissa myös plasmideissa. Kromosomeissa geeniryhmien paikka on tavallisesti kromosomien päiden lähellä. (Osborn 2010.) Eri geeniryhmien koot vaihtelevat suuresti riippuen tuotettavan metaboliitin monimutkaisuudesta ja siten tuotteen syntetisoimiseen tarvittavien entsyymien määrästä (Baral ja muut 2018). Geeniryhmien määrä taas kasvaa organismin genomien koon kasvaessa (Doroghazi ja Metcalf 2013).

Tutkituimpia luonnonyhdisteiden luokkia ovat polyketidit sekä ei-ribosomaaliset peptidit, ja merkittävä osa aktinomykeettien BGC:istä voidaankin yhdistää polyketidisyntaasi- (engl. *polyketide synthase*) ja ei-ribosomaalisiin peptidisyntaasireitteihin (engl. *nonribosomal peptide synthase*) (Davies 2013; Doroghazi ja Metcalf 2013). Muita merkittäviä luonnonyhdisteiden luokkia ovat esimerkiksi terpeenit, ribosomaalisesti syntetisoidut ja translaation jälkeisesti muokatut peptidit (engl. *ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide*) sekä alkaloidit. Polyketidisyntaasi- ja ei-ribosomaaliset peptidisyntaasi-entsyymien geenit sijaitsevat BGC:issä, ja ne ovat esimerkkejä biosynteettisistä ydinentsyymeistä, jotka tuottavat luonnonyhdisteen perusrakenteen. Tämän perusrakenteen muokkaamista varten BGC:issä on muokkauksen aikaansaavien entsyymien geenejä. Näihin entsyymeihin lukeutuvat muun muassa oksidoreduktaasit, glykosyylitransferaasit sekä metyyliitransferaasit. (Osborn 2010.)

Biosynteettisiä entsyymejä koodaavien geenien lisäksi tiettyä yhdistettä, kuten antibioottia, syntetisoiva organismi tarvitsee geenejä ollakseen resistentti tuottamaansa yhdistettä kohtaan, ja usein nämä geenit sijaitsevat samassa BGC:ssä kuin yhdistettä tuottavat geenit (Hopwood 2007). Myös kuljetukseen tarvittavat geenit kuuluvat yleensä geeniryhmiin, koska monet luonnonyhdisteet, muun muassa antibiootit ja rautaa kelatoivat sideroforit, tuotetaan solusta ulos eritettäväksi (Crits-Christoph ja muut 2021). Näiden lisäksi iso osa BGC:istä sisältää geeniryhmän ilmentymisen säätelyyn osallistuvia geenejä (Osborn 2010). Kuvassa 3 on esitettyä kahta luonnonyhdistettä, aktinorodiinia ja granatisiinia, koodaavat BGC:t sekä yhdisteiden rakenteet.



Kuva 3. Kahta polyketidiä, aktinorodiinia ja granatysiinia, koodaavat biosynteettiset geeniryhmät. Eri väreillä on merkattu geeniryhmien geenien tehtävät. Näkyvillä ovat lisäksi luonnonyhdisteiden rakenteet. (Muokattu kuvasta Osbourn 2010)

5 Genomien sekvensointi ja louhinta

DNA-sekvensoinnin kapasiteetti on kasvanut ja sekvensoinnin kustannukset laskeneet, suurelta osin seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmien kehittymisen seurauksena (Mardis 2017). Tämä on tuonut mikrobien tuottamien luonnonyhdisteiden etsimiseen uudenlaisen edun. Kokonaisten genomien sekvensoinnin myötä ymmärrettiin, että mikrobeilla on huomattavasti enemmän BGC:itä, kuin niiden tuottamista yhdisteitä voitiin päätellä. *Streptomyces coelicolor* A3(2):n koko genomien sekvensointi paljasti genomissa olevan yli 20 BGC:tä, vaikka aiemmin tunnettuja reaktioreittien tuotteita oli vain neljä (Bentley ja muut 2002). Kun genomisekvensointia muiden lajien kohdalla jatkettiin, saman huomattiin toistuvan. Esimerkiksi *Streptomyces avermitilis*in genomista löytyi 30 BGC:tä (Ikeda ja muut 2003) ja erytromysiiniä tuottavan aktinomykeetin, *Saccharopolyspora erythraea* genomista 25 BGC:tä (Oliynyk ja muut 2007).

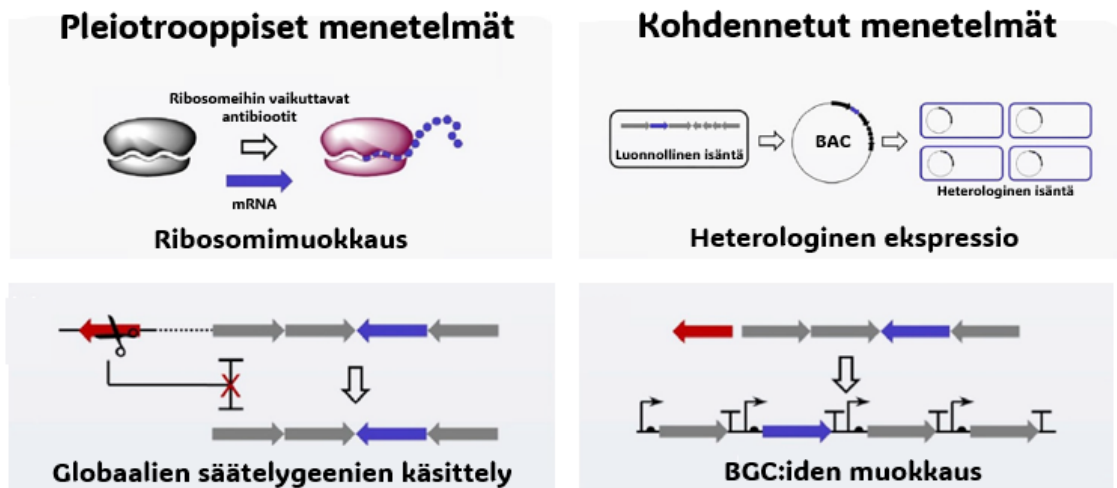
Genomilouhinnaksi (*engl.* genome mining) kutsutussa menettelytavassa kokonaisista genomeista analysoidaan biosynteettisiä geeniklustereita uusien luonnonyhdisteiden löytämiseksi. Genomilouhinnan kehittymisen mahdollistivat yhä laajemmin saatavilla oleva genomitieto sekä erilaiset bioinformatiikan työvälineet. (Baral ja muut 2018.) Kun koko ajan enemmän tietoa biosynteettisistä geeniryhmistä alkoi olla saatavilla,

ongelmaksi muodostui tiedon hajanaisuus tieteellisessä kirjallisuudessa. BGC:ihin liittyvän tiedon yhteen keräämiseksi kehitettiin standardisoitu tietokanta, MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster), joka mahdollistaa pääsyn karakterisoiduista BGC:istä kerättyyn tietoon ja tarjoaa standardimenettelyn BGC:iden annotointiin. Näin esimerkiksi vertailevan analyysin tekeminen sekä tietyn BGC:n tuottaman metaboliitin rakenteen ennustaminen helpottuu. (Medema ja muut 2015.)

Biosynteettisten geeniryhmien tunnistamiseen ja luokitteluun soveltuvia bioinformatiikan työvälineitä on monia, muutamana esimerkkinä antiSMASH (antibiotics & secondary metabolite analysis shell) (Medema ja muut 2011), BAGEL3 (Bacteriocin genome mining tool 3) (Van Heel ja muut 2013) sekä PRISM (Prediction informatics for secondary metabolomes) (Skinnider ja muut 2015). Työkalut eroavat toisistaan muun muassa sen suhteen, mitä luonnonyhdisteluokkaa varten ne on suunniteltu sekä kuinka laajat toiminnot niissä on. BAGEL3 soveltuu ribosomaalisesti syntetisoitujen ja post-translacionaalisesti muokattujen peptidien BGC:den etsimiseen ja analysoimiseen (Van Heel ja muut 2013), kun taas PRISM on tarkoitettu ei-ribosomaalisten peptidien ja polyketidien rakenteiden ennustamiseen (Skinnider ja muut 2015). antiSMASH on ohjelmista laajin: se on BGC:iden havainnointiin ja karakterisointiin laajimmin käytetty bioinformatiikan työväline, ja se soveltuu nykyään jopa 81 geeniryhmätyypin analysoimiseen (Blin ja muut 2023).

6 Biosynteettisten geeniryhmien aktivointi

Genomisekvenssien analysointi on osoittanut, että mikrobien potentiaali tuottaa monia erilaisia luonnonyhdisteitä on huomattavasti suurempi kuin laboratorio-olosuhteissa on havaittu. Valtaosa BGC:ista on laboratorio-olosuhteissa ilmentymättömiä tai niiden syntetisoimia metaboliitteja tuotetaan niin pieniä määriä, että niitä ei havaita (Scherlach ja Hertweck 2021). Potentiaalisten BGC:den tunnistamisen jälkeen haasteeksi jää ilmentymättömien geeniryhmien aktivointi tai jo pienissä määrissä tuotettujen yhdisteiden saannon parantaminen. Menetelmiä näihin on monia erilaisia ja ne voidaan jakaa karkeasti kahteen kategoriaan: tiettyihin BGC:hin kohdistettuihin ja laajemmin vaikuttaviin eli pleiotrooppisiin menetelmiin (kuva 4) (Baral ja muut 2018; Kalkreuter ja muut 2020). Lähestymistapojen suuren määrän vuoksi tutkielmassa keskitytään vain muutamaani eri menetelmään hieman tarkemmin.



Kuva 4. Erilaisia menetelmiä biosynteettisten geeniryhmien aktivointiin. Lähestymistavat voidaan jakaa tiettyihin biosynteettisiin geeniryhmiin kohdistettuihin menetelmiin ja laajemmin metabolomiin vaikuttaviin eli pleiotrooppisiin menetelmiin. Sinisellä on merkattu biosynteettiset geenit ja punaisella negatiivisesti ilmentymiseen vaikuttavat säätelygeenit. (Muokattu kuvasta Kalkreuter ja muut 2020).

6.1 Pleiotrooppiset menetelmät

BGC:den aktivoinnissa käytetyt menetelmät voivat omata laajan vaikutusalueen ja pleiotrooppisilla menetelmillä ei saada aktivoitua tiettyä BGC:itä vaan ne tähtäävät kohde-organismien koko metabolomin muokkaamiseen. Tällaisten lähestymistapojen etuja ovat niiden suhteellisen yksinkertainen toteutus sekä mahdollisuudet toteutuksiin suuremmissa mittakaavoissa. Kuitenkin ongelmaksi saattaa muodostua se, että niitä ei voida kohdentaa tiettyihin BGC:hin, jotka saattaisivat vaikuttaa genomilouhinnan perusteella potentiaalisimmilta uusien yhdisteiden löytämiseen. (Baral ja muut 2018.) Pleiotrooppisia menetelmiä ovat esimerkiksi ribosomimuokkaus, säätelygeenien käsittely sekä mikrobien yhteiskasvatukset.

6.1.1 Ribosomimuokkaus

Ribosomimuokkaus (engl. *ribosome engineering*) on menettelytapa, jossa seulotaan tietyille antibiooteille resistenttejä mutanteja, joilla on myös mutaatioita niiden ribosomien komponenteissa tai RNA-polymeraasissa (RNAP). Osan näistä mutanteista on huomattu tuottavan suurempia määriä tiettyä bioaktiivista yhdistettä tai kokonaan uusia luonnonyhdistettä. Seulomiseen eniten käytettyjä antibiootteja ovat rifampisiini ja

streptomysiini, mutta myös esimerkiksi gentamysiini ja linkomysiini ovat olleet käytössä. (Zhu ja muut 2019.) Jo vuonna 1996 streptomysiini-resistentin *Streptomyces lividans* TK24 kannan todettiin tuottavan sinisen väristä antibioottia, aktinorodiinia, ja omaavan *str-6* pistemutaation ribosomaalista S12- proteiinia koodaavassa *rpsL*-geenissä, vaikka *S. lividans* ei normaalisti tuota kyseistä antibioottia (Shima ja muut 1996). Rifampisiiniä taas on myöhemmin muun muassa hyödynnetty eri aktinomykeeteille, joiden mutaatiot RNAP:n β -alalyksikköä koodaavassa *rpoB*-geenissä johtivat monien antibioottien ylituotantoon (Tanaka ja muut 2013). Ribosomimuokkausta on käytetty yli kahden vuosikymmenen ajan ja se on lähestymistapana nopea ja kustannustehokas (Zhu ja muut 2019).

Ribosomimuokkausta on sovellettu sekä bioaktiivisten yhdisteiden tuoton lisäämiseen että uusien luonnonyhdisteiden löytämiseen. Monien luonnonyhdisteiden tuotto on alhaista villityypin kannoilla ja tarve saannon parantamiseen on suuri, jotta muun muassa yhdisteiden jatkokehittäminen kliiniseksi lääkkeiksi olisi mahdollista. *Streptomyces* sp. CB03234:n tuottaman tiansimysiini A:n (TNM A) on osoitettu toimivan syöpäsoluja vastaan ja tappavan niitä nopeaan tahtiin, mutta villityypin kannan tuottamat TNM A konsentraatiot ovat kuitenkin jääneet alhaisiksi, noin 0,3 mg/L. Liu työryhmineen (2018) onnistui löytämään *S. sp* CB03234-R-16-mutantit seulomalla rifamysiini-resistenttejä *S. sp.* CB03234-mutanteja, ja tämä mutantti omasi L422P mutaation *rpoB* geenissä ja 6–7 kertaisen TNM A tuottokonsentraation villityyppiin verrattuna. Kun lisäksi kasvatusmediumia optimoitiin muun muassa liukoisen tärkkelyksen ja HP2MGL-resiinin lisäyksillä, tuottokonsentraatioita onnistuttiin kasvattamaan seuraavalla tavalla: $22,5 \pm 3,1$ mg/L ravistelupulloissa ja $13 \pm 1,0$ mg/L 15 L:n fermentoreissa. (Liu ja muut 2018.)

Myös frederikamysiini A (FDM A) on osoittautunut lupaavaksi syöpäsoluja vastaan, mutta sen vähäiseksi jäänyt saanto estää sen pidemmälle kehittämistä syöpälääkkeeksi. Zhang ja muut (2015) seuloivat merenpohjasta löydetyn *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66:n mutanteja rifampisiinin avulla ja totesivat R444H mutaation *rpoB* geenissä omaavan ZH66-RIF1-mutantit tuottavan ruskean pigmenttistä yhdistettä, jota villityypin kanta ei tuottanut ollenkaan. Yhdiste tunnistettiin FDM A:ksi ja kasvatusmediumin optimoinnin avulla FDM A:n tuottokonsentraatio saatiin kolminkertaiseksi ($679,5 \pm 15,8$ mg/L) alun perin käytetyn kasvatusmediumin avulla saatuihin tuloksiin verrattuna. (Yonghe Zhang ja muut 2015.)

6.1.2 Sääteilygeenien käsittely

Mikrobien sääteilyverkostot pitävät huolta siitä, että BGC ilmentyvät vain tiettyjen ympäristön signaalien toimesta ja suurin osa BGC:istä onkin laboratorio-olosuhteissa inaktiivisia. Streptomykeeteillä sekundäärimetaboliittien tuoton on osoitettu olevan yhteydessä esimerkiksi tiettyyn kasvuvaiheeseen ja ravinnon saatavuuteen (Bibb 2005). Sääteilyverkostot ovat monimutkaisia ja mikrobien erilaisten sääteilyproteiinien määrä valtava. Iso osa biosynteettisistä geeniklustereista sisältää synteetisireitti-spesifisiä sääteilygeenejä, mutta monien luonnonyhdisteiden synteesi on globaalien sääteilygeenien kontrolloimaa. Globaalit sääteilygeenit ovat vastuussa säätelystä myös monien geenien kohdalla, jotka eivät ole yhteydessä sekundäärimetaboliaan. Sääteilygeenien käsittely voi olla geenien ilmentymisen lisäämistä eli yliekspressiota aktivaattorien tapauksessa tai niiden inaktivointia repressorien tapauksessa. Positiiviset säätelijät eli aktivaattorit voivat edistää luonnonyhdisteiden biosynteesiä, kun taas negatiiviset säätelijät eli repressorit estävät sitä. (Xia ja muut 2020.)

Merenpohjasta löydetty *Streptomyces* sp. XS-16 saatiin tuottamaan kolmea uutta angusykliini-johdannaisista yliekspressoimalla sekä primääri- että sekundäärimetaboliaan laajasti vaikuttavaa globaalia SCrp-säätelijää. Yhdisteille suoritettuna rakenneanalyysin jälkeen kunkin uuden yhdisteen sytotoksisuus ja antimikrobinen aktiivisuus arvioitiin, ja yhden yhdisteistä huomattiin omaavan sytotoksisuutta viittä eri syöpäsolulinjaa kohtaan. (X. Xu ja muut 2023.) Yksi säätelijä voi myös tietyssä kannassa samaan aikaan estää yhden ja aktivoida toisen luonnonyhdisteen biosynteesiä. Häiritsemällä globaalia säätelijää, AdpA:ta, koodaavaa geeniä, *Streptomyces ansochromogenes*:n Δ adpA mutantti saatiin tuottamaan oviedomysiiniä, jota villityypin kanta ei syntetisoi. Samalla villityypin normaalisti syntetisoiman nikkomysiinin tuotto kuitenkin loppui. AdpA:n vaikutusmekanismiksi todettiin oviedomysiini BGC:n transkriptioon positiivisesti vaikuttavien klusterissa sijaitsevien säätelijöiden OvmZ ja OvmW repressio. (J. Xu ja muut 2017.)

Synteetisireitti-spesifisten, tietyissä BGC:ssä sijaitsevien, sääteilygeenien käsittely on myös lupaava lähestymistapa geeniklustereiden syntetisoimien yhdisteiden tuoton aktivoinnissa. *Streptomyces tsukubaensis* L20:n kohdalla SARP-sääteilyproteiinien (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins) yliekspressio johti täysin uuden, bioaktiivisuutta omaavan antrasykliinin, tsukubarubisiinin, synteesiin ja sen tuotosta vastuussa olevan BGC:n tunnistamiseen. Yhdisteen bioaktiivisuusanalyysien perusteella

sen havaittiin osoittavan suurempaa aktiivisuutta neljää eri ihmisen syöpäsolulinjaa kohtaan kuin syöpälääkkeenä käytetty doksorubisiini. (Wu ja muut 2021.)

6.1.3 Mikrobien välinen vuorovaikutus

Luonnonyhdisteiden synteesi vaatii huomattavan määrän energiaa ja resursseja, minkä seurauksena suurin osa BGC:istä on ilmentymättömiä ennen oikeanlaista signaalia ympäristöltä. Tällaisia signaaleja voivat olla esimerkiksi kuivuus, lämpötilan muutos sekä mikrobien välinen kilpailu ravinteista. Mikrobien yhteiskasvatuksella pyritään jäljittelemään mikrobien luontaista elinympäristöä, jossa mikrobit elävät sekapopulaatioissa vuorovaikuttaen toistensa kanssa. Laboratorio-olosuhteissa kasvatusta toteutetaan yleensä puhtasviljelminä. Menetelmänä mikrobien yhteiskasvatusta on suhteellisen yksinkertainen eikä sen hyödyntämiseen uusien luonnonyhdisteiden etsinnässä välttämättä vaadita yksityiskohtaista tietämystä lajin BGC:istä. (Kim ja muut 2021.) Yhteiskasvatuksessa luonnonyhdisteiden tuottajaa ja synteessin indusoivaa kohdeorganismia voidaan kasvatella sekä maljoilla että nestekasvatuksissa, mutta kiinteän faasin kasvatuksissa ongelmana voi esiintyä haluttujen yhdisteiden tuotto tarpeeksi suuressa mittakaavassa (Bertrand ja muut 2014).

Mikrobien välinen vuorovaikutus voi tapahtua eritettyjen molekyylien kautta tai fyysisen kontaktin avulla, mutta vuorovaikutusten taustalla vaikuttavat mekanismit ovat edelleen pitkälti tutkimattomia. Uusien luonnonyhdisteiden löytämisen ohella yhteiskasvatusta tarjoaa tilaisuuden sen ymmärtämiseen, miten mikrobien väliset vuorovaikutukset säätelevät niiden sekundäärimetaboliittien tuottoa. Tärkeänä etuna yhteiskasvatuksissa voi lisäksi olla mahdollisuus havainnoida syntetisoitujen luonnonyhdisteiden bioaktiivisuuksia jo suoraan kasvatusten aikana, kun muun muassa muutoksia kohdeorganismien solujen morfologiassa voidaan seurata. (Kim ja muut 2021.)

Eri tutkimuksissa yhteiskasvatuksia on toteutettu varsin vaihtelevin lähestymistavoin ja eroja esiintyy muun muassa käytetyissä tuotto- ja kohdeorganismien määrissä sekä kasvatuksissa hyödynnettyjen mikrobien esikasvatusten i'issä (Boruta 2021). Vaihtelevuutta ilmenee lisäksi luonnollisesti yhteiskasvatukseen valittujen organismien välillä. *Streptomyces* sp. MA37:n yhteiskasvatusta toisen bakteerin, *Pseudomonas* sp.:n, kanssa johti useaan yhdisteen tuottoon, joita kumpikaan bakteereista ei yksinään syntetisoinut. Kasvatusta toteutettiin niin, että lajien välillä ei ollut fyysistä kontaktia, mutta muun muassa ravinteiden ja metaboliittien kulku oli mahdollista. *S.* sp. MA37:n

tuottamaksi paljastunut indolialkaloidi BE-13793C osoitti paksusuolen syövän HT-29-solujen kasvua ehkäisevää aktiivisuutta. (Maglangit ja muut 2020.)

Streptomyces leeuwenhoekii:n C34- ja C58-kantojen yhteiskasvatukset *Aspergillus fumigatus* MR2012-homesienen kanssa saivat kummankin osapuolen tuottamaan yksinkasvatuksiin verrattuna uusia luonnonyhdisteitä. C34:n ja *A. fumigatus* yhteiskasvatuksista eristettiin kaksi homesienen tuottamaa täysin uutta luonnonyhdistettä, luteoridi D sekä pseurotiini C. (Wakefield ja muut 2017.) Vastaavasti *Streptomyces rochei* MB037:n ja *Rhinocycladiella similis* 35 -homesienen yhteiskasvatus johti kahden uuden *S. rochei*:n tuottaman yhdisteen, borrelidiini J:n ja K:n, eristämiseen, minkä lisäksi *R. similis* tuotti yhteiskasvatuksissa uutta yhdistettä, 7-metoksi-2,3-dimetyylikromoni-4-onia, kontrollina käytettyyn puhdasviljelmään verrattuna suurempia määriä. Streptomykeen tuottama borrelidiini J osoitti selvää antimikrobista aktiivisuutta metisilliinille resistenttiä *Staphylococcus aureus*:ta kohtaan. (Yu ja muut 2019.)

6.2 Tiettyihin biosynteettisiin geeniryhmiin kohdistetut menetelmät

Pleiotrooppisten menetelmien lisäksi lähestymistavat BGC:iden aktivointiin voivat olla tiettyihin geeniryhmiin kohdistettuja, ja mahdollistavat siten eniten mielenkiintoa herättäneisiin BGC:ihin keskittymisen. Nämä toimintatavat voivat kuitenkin olla haastavampia toteuttaa ja ongelmana voi olla heikko yhdisteiden tuotantokyky. (Baral ja muut 2018.) Näihin menetelmiin kuuluvat muun muassa heterologinen ekspressio ja BGC:iden muokkaus.

6.2.1 Heterologinen ekspressio

Heterologisessa ekspressiossa yksi tai useampi geeni siirretään ja ilmenetään isäntäorganismissa, joka ei luontaisesti omaa kyseessä olevaa geeniä tai genejä. BGC:iden heterologisessa ekspressiossa isäntäorganismiin voidaan siirtää kokonainen geeniryhmä. Monet runsaasti eri luonnonyhdisteitä tuottavat mikrobit ovat vaikeasti muokattavissa geneettisesti, ja siksi BGC:n siirtäminen helpommin käsiteltävään organismiin voi olla eduksi. Mikrobien BGC:iden heterologinen ekspressio on perinteisesti vaatinut DNA-kirjastojen, kuten kosmidi- tai BAC-kirjastojen, rakentamista sekä seulomista, ja on ollut siksi aikaa vievää. Edistysaskeleet genomien muokkaukseen soveltuvissa tekniikoissa, kuten CRISPR/Cas9:n kehittäminen, ovat mahdollistaneet uusien kloonausmenetelmien kehittämisen ja BGC:iden kloonauksen toteuttamisen

esimerkiksi suoraan genomisesta DNA:sta ilman geenikirjaston valmistamista. Heterologisen ekspression tarjoama merkittävä etu on BGC:n siirtäminen hyvin tunnettuun ympäristöön, josta uuden luonnonyhdisteen tunnistaminen on yksinkertaisempaa. Heterologinen ekspressio mahdollistaa lisäksi sellaisten BGC:iden kanssa työskentelyn, jotka ovat peräisin mikrobeista, joita ei ole vielä kasvatettu laboratorio-olosuhteissa, esimerkkinä ympäristöstä eristetyn DNA:n (engl. *environmental DNA*) BGC:t. (Kang ja Kim 2021.)

Isäntäorganismien valintaprosessi on BGC:iden heterologisen ekspression onnistumisen kannalta erittäin tärkeää, ja on monta ominaisuutta, jotka hyvän isäntäorganismien tulisi omata. Heterologiseen ekspression soveltuvan isäntäorganismien tulisi olla helposti työstettävissä ja muokattavissa geneettisesti sekä tuottaa haluttua yhdistettä tarpeeksi suuria määriä. Isäntäorganismien tulisi omata BGC:iden tehokkaaseen ilmentämiseen tarvittavat geneettiset järjestelmät, jotta tarpeettoman laajalta BGC:iden muokkaamiselta vältyttäisiin. Isäntäorganismilla ei saisi myöskään olla halutun yhdisteen tuottoa häiritseviä luontaisia biosynteesireittejä. Heterologisen ekspression tehostamiseksi isäntäorganismeja voidaan muokata muun muassa poistamalla isännän luontaisia BGC:itä. Luontaisten BGC:iden vähentäminen mahdollistaa prekursorien paremman riittävyyden heterologisten BGC:iden tarpeisiin ja helpottaa haluttujen yhdisteiden tunnistamista isäntäorganismien aineenvaihduntaprofiilin yksinkertaistuessa. (Baral ja muut 2018; Kang ja Kim 2021.)

Useaa eri streptomykeettiä on hyödynnetty heterologisena isäntäorganismina ja näistä eniten käytettyihin lukeutuvat *Streptomyces albus*, *S. coelicolor* sekä *S. lividans*. Genominsa puolesta tutkituimman aktinomykeetin *S. coelicolor*:n muokkaukseen on olemassa laajasti erilaisia työkaluja, ja sen M1152- sekä M1154-kanta ovat olleet villityypin kantaa käytetympiä heterologisia isäntäorganismeja. (Baral ja muut 2018; Kang ja Kim 2021.) Näiltä kannoilta on poistettu neljä luontaista BGC:tä, ja niiden *rpoB*- ja *rpsL*-geeneihin on tehty mutaatioita (Gomez-Escribano ja Bibb 2011). *S. coelicolor*:lle läheistä sukua olevan *S. lividans*:n tapauksessa kanta TK24 on ollut eniten käytössä. *S. albus*:n etuja isäntäorganismina ovat muun muassa streptomykeeteille pieni genomi (6,8 miljoonaa emäsparia) sekä nopea kasvutahti. (Kang ja Kim 2021.) Myös monia muita isäntäorganismeja on streptomykeettien lisäksi hyödynnetty BGC:iden heterologisessa ekspressiossa. Näitä ovat esimerkiksi *Escherichia coli* sekä usea eri *Aspergillus* sukuun kuuluva homesieni. (Baral ja muut 2018.)

6.2.2 Biosynteettisten geeniryhmien muokkaus ja uudelleenjärjestely

Heterologisen ekspression lukuisista hyödyistä huolimatta useat BGC:t pysyvät ilmentymättöminä heterologisissa isäntäorganismeissa. Synteettisen biologian ja metabolian muokkaukseen soveltuvat työkalut kehittyvät jatkuvasti, minkä lisäksi DNA-synteesin kustannukset ovat laskussa. BGC:iden muokkaus ja uudelleenjärjestely (engl. *BGC refactoring*) ovat näin tuoneet mahdollisuuden BGC:iden ilmentymisen tehostamiseen ja hiljaisten geeniryhmien aktivointiin. (Li ja muut 2021; J. J. Zhang ja muut 2019.) Kokonaisten BGC:iden uudelleenjärjestely tai jopa täysin synteettisten BGC:iden valmistaminen on mahdollista, mutta edelleen haastavaa, aikaa vievää sekä kallista. Toimivien BGC:iden suunnittelua vaikeuttaa luonnonyhdisteiden synteesireittien monimutkaisuus, ja synteettisten BGC:iden valmistaminen lieneekin mielekkäämpää ennemmin tunnettujen luonnonyhdisteiden saantojen parantamiseen kuin täysin tuntemattomien BGC:iden aktivointiin. (Baral ja muut 2018.)

Kokonaisten BGC:iden uudelleenjärjestelyn sijasta tavallisempaa on muun muassa säätelygeenien, ribosomin sitoutumispaikkojen (engl. *ribosome binding site*), promoottorialueiden sekä terminaattorien käsittely (Li ja muut 2021). Promoottorit omaavat tärkeän roolin geenien ilmentymisen kontrolloinnissa, ja promoottorialueiden käsittely voi siksi mahdollistaa BGC:iden ilmentymistä rajoittavien säätelyverkostojen ohittamisen. Luontainen promoottori voidaan vaihtaa indusoitavaan tai jatkuvasti aktiiviseen (engl. *constitutive promoter*) promoottoriin BGC:iden aktivoimiseksi. (Li ja muut 2021.) Bauman työryhmineen (2019) siirsi merestä eristetyn *Streptomyces* sp. CNB-091:n streptofenatsiini BGC:ksi (engl. *streptophenazine BGC*) tunnistetun geeniryhmän heterologisena isäntäorganismina käytettyyn *S. coelicolor* M1146:teen. Kun yhtäkään streptofenatsiini-yhdistettä ei onnistuttu heterologisen ekspression seurauksena havaitsemaan, sen BGC:tä muokattiin vaihtamalla luontaisten promoottorialueiden tilalle uudet, jatkuvasti aktiiviset promoottorit. Streptofenatsiinin BGC:n muokkauksen seurauksena löydettiin yli 100 streptofenatsiinia, ja 15:sta eristetystä streptofenatsiini-analogista yhden, N-formyylylglysiini-osan sisältävän yhdisteen, havaittiin omaavan huomattavaa antibioottiaktiivisuutta A ryhmän *Streptococcus*-bakteeria vastaan. (Bauman ja muut 2019.)

7 Yhteenveto ja tulevaisuus

Mikrobien tuottamat luonnonyhdisteet ovat olleet lääkinnällisesti tärkeitä jo pitkään toimien esimerkiksi antibiootteina ja immunosuppressiivisina lääkkeinä. Uusien, mikrobien tuottamien bioaktiivisten luonnonyhdisteiden löytäminen kulta-ajan tahtiin ei kuitenkaan ole enää ollut mahdollista, suurelta osin johtuen samojen yhdisteiden uudelleenlöytymisestä. Uudet lääkinnälliset yhdisteet ovat entistä tärkeämpiä muun muassa mikrobilääkeresistenssin lisääntymisen vaikuttaessa laajasti sekä ihmisten terveyteen että maailman talouteen.

Erityisesti maaperästä löytyvät streptomykeetit ovat olleet merkittäviä bioaktiivisten luonnonyhdisteiden lähteitä jo kauan, ja tutkimuksessa on ollut luonnollista keskittyä mikrobeihin, jotka ovat aiemminkin tuottaneet runsaasti haluttuja yhdisteitä. Yksi mahdollisuus uusien luonnonyhdisteiden etsimisessä on keskittyminen myös vähemmän tunnettuihin tai kokonaan uusiin luonnonyhdisteiden tuottajiin. Tämä voisi tarkoittaa täysin uusin mikrobisukuihin keskittymistä tai epätavallisissa olosuhteissa eläviä mikrobeja, esimerkiksi merenpohjasta löydettyjä streptomykeettejä.

Havainto mikrobien biosynteettisten geeniryhmien oletettua suuremmasta määrästä on tuonut toivoa ja mahdollisuuksia luonnonyhdisteiden etsimiseen. Kehitysaskeleet genomisekvensoinnissa, bioinformatiikan työvälineissä sekä genomien muokkaukseen soveltuvissa teknologioissa ovat mahdollistaneet useiden eri menetelmien kehittämisen tavanomaisissa laboratorio-olosuhteissa ilmentymättömien BGC:iden aktivointiin. Osa menetelmistä tarjoaa mahdollisuuden keskittyä tiettyihin BGC:ihin, kun taas osan menetelmistä vaikutus ulottuu laajemmalle. Edistysaskeleiden usealla eri alalla voidaan olettaa johtavan olemassa olevien menetelmien kehittymiseen, ja esimerkiksi edistys synteettisen biologian menetelmien kohdalla voisi helpottaa kokonaisten BGC:iden muokkausta ja uudelleenjärjestelyä.

8 Kirjallisuus

- Baltz, R. H. (2019) Natural product drug discovery in the genomic era: Realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *J Ind Microbiol Biotechnol* **46**:281–299.
- Baral, B., Akhgari, A. & Metsä-Ketelä, M. (2018) Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synth Syst Biotechnol* **3**:163–178.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., ... Van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**:1–43.
- Bauman, K. D., Li, J., Murata, K., Mantovani, S. M., Dahesh, S., Nizet, V., ... Moore, B. S. (2019) Refactoring the Cryptic Streptophenazine Biosynthetic Gene Cluster Unites Phenazine, Polyketide, and Nonribosomal Peptide Biochemistry. *Cell Chem Biol* **26**:724-736.e7.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**:141–147.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K. & Wolfender, J.-L. (2014) Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv* **32**:1180–1204.
- Bibb, M. J. (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**:208–215.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., ... Weber, T. (2023) antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res* **51**:W46–W50.

- Boruta, T. (2021) A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. *World J Microbiol Biotechnol* **37**:171.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1830**:3670–3695.
- Crits-Christoph, A., Bhattacharya, N., Olm, M. R., Song, Y. S. & Banfield, J. F. (2021) Transporter genes in biosynthetic gene clusters predict metabolite characteristics and siderophore activity. *Genome Res* **31**:239–250.
- Davies, J. (2013) Specialized microbial metabolites: Functions and origins. *J Antibiot (Tokyo)* **66**:361–364.
- Doroghazi, J. R. & Metcalf, W. W. (2013) Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* **14**:611.
- Flårdh, K. (2003) Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **6**:564–571.
- Gomez-Escribano, J. P. & Bibb, M. J. (2011) Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* **4**:207–215.
- Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Cary, UNITED STATES: Oxford University Press, Incorporated. Noudettu osoitteesta
<http://ebookcentral.proquest.com/lib/kutu/detail.action?docID=2012788>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W. & Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: Past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **51**:72–80.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., ... Ōmura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**:526–531.

- Kalkreuter, E., Pan, G., Cepeda, A. J. & Shen, B. (2020) Targeting Bacterial Genomes for Natural Product Discovery. *Trends Pharmacol Sci* **41**:13–26.
- Kang, H.-S. & Kim, E.-S. (2021) Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts. *Curr Opin Biotechnol* **69**:118–127.
- Katz, L. & Baltz, R. H. (2016) Natural product discovery: Past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**:155–176.
- Kim, J. H., Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Cho, S., ... Cho, B.-K. (2021) Discovery of novel secondary metabolites encoded in actinomycete genomes through coculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **48**:kuua001.
- Li, L., MacIntyre, L. W. & Brady, S. F. (2021) Refactoring biosynthetic gene clusters for heterologous production of microbial natural products. *Curr Opin Biotechnol* **69**:145–152.
- Liu, L., Pan, J., Wang, Z., Yan, X., Yang, D., Zhu, X., ... Huang, Y. (2018) Ribosome engineering and fermentation optimization leads to overproduction of tiancimycin A, a new enediyne natural product from *Streptomyces* sp. CB03234. *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**:141–151.
- Maglangit, F., Fang, Q., Kyeremeh, K., Sternberg, J. M., Ebel, R. & Deng, H. (2020) A Co-Culturing Approach Enables Discovery and Biosynthesis of a Bioactive Indole Alkaloid Metabolite. *Molecules* **25**:256.
- Mardis, E. R. (2017) DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat Protoc* **12**:213–218.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... Breitling, R. (2011) antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**:W339–W346.

- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., ...
Glöckner, F. O. (2015) Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster.
Nat Chem Biol **11**:625–631.
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A.,
... Naghavi, M. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in
2019: A systematic analysis. *The Lancet* **399**:629–655.
- Oliynyk, M., Samborsky, M., Lester, J. B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., ...
Leadlay, P. F. (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing
bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* **25**:447–
453.
- O’Neil (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and
recommendations. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20
paper_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf) (Luettu 2.2.2024)
- Osborn, A. (2010) Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for
chemical innovation. *Trends Genet* **26**:449–457.
- Pacios-Michelena, S., Aguilar González, C. N., Alvarez-Perez, O. B., Rodriguez-
Herrera, R., Chávez-González, M., Arredondo Valdés, R., ... Ilyina, A. (2021)
Application of Streptomyces Antimicrobial Compounds for the Control of
Phytopathogens. *Front Sustain Food Syst* **5**:696518.
- Scherlach, K. & Hertweck, C. (2021) Mining and unearthing hidden biosynthetic
potential. *Nat Commun* **12**:3864.
- Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S. & Ochi, K. (1996) Induction of
actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations
that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces*
coelicolor A3(2). *J Bacteriol* **178**:7276–7284.

- Skinnider, M. A., Dejong, C. A., Rees, P. N., Johnston, C. W., Li, H., Webster, A. L. H., ... Magarvey, N. A. (2015) Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Res* gkv1012.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... Zorzet, A. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **18**:318–327.
- Tanaka, Y., Kasahara, K., Hirose, Y., Murakami, K., Kugimiya, R. & Ochi, K. (2013) Activation and Products of the Cryptic Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters by Rifampin Resistance (*rpoB*) Mutations in Actinomycetes. *J Bacteriol* **195**:2959–2970.
- Van Der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I. & Van Wezel, G. P. (2017) Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **41**:392–416.
- Van Heel, A. J., De Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2013) BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res* **41**:W448–W453.
- Wakefield, J., Hassan, H. M., Jaspars, M., Ebel, R. & Rateb, M. E. (2017) Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Front Microbiol* **8**:1284.
- World Health Organization (2023) Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Luettu 2.2.2024)
- Wu, Q.-B., Chen, X.-A., Lv, Z.-Y., Zhang, X.-Y., Liu, Y. & Li, Y.-Q. (2021) Activation and discovery of tsukubarubicin from *Streptomyces tsukubaensis* through overexpressing SARPs. *Appl Microbiol Biotechnol* **105**:4731–4741.

- Xia, H., Li, X., Li, Z., Zhan, X., Mao, X. & Li, Y. (2020) The Application of Regulatory Cascades in Streptomyces: Yield Enhancement and Metabolite Mining. *Front Microbiol* **11**:406.
- Xu, J., Zhang, J., Zhuo, J., Li, Y., Tian, Y. & Tan, H. (2017) Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces anschromogenes*. *J Biol Chem* **292**:19708–19720.
- Xu, X., Zhang, F., Zhou, L., Chang, Y., Che, Q., Zhu, T., ... Zhang, G. (2023) Overexpression of Global Regulator SCrp Leads to the Discovery of New Angucyclines in *Streptomyces* sp. XS-16. *Mar Drugs* **21**:240.
- Yu, M., Li, Y., Banakar, S. P., Liu, L., Shao, C., Li, Z. & Wang, C. (2019) New Metabolites From the Co-culture of Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and Fungus *Rhinochadiella similis* 35. *Front Microbiol* **10**:915.
- Zhang, J. J., Tang, X. & Moore, B. S. (2019) Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products. *Nat Prod Rep* **36**:1313–1332.
- Zhang, Yanyan, He, H., Liu, H., Wang, H., Wang, X. & Xiang, W. (2016) Characterization of a pathway-specific activator of milbemycin biosynthesis and improved milbemycin production by its overexpression in *Streptomyces bingchengensis*. *Microb Cell Factories* **15**:152.
- Zhang, Yonghe, Huang, H., Xu, S., Wang, B., Ju, J., Tan, H. & Li, W. (2015) Activation and enhancement of Fredericamycin A production in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 by using ribosome engineering and response surface methodology. *Microb Cell Factories* **14**:64.
- Zhu, S., Duan, Y. & Huang, Y. (2019) The Application of Ribosome Engineering to Natural Product Discovery and Yield Improvement in *Streptomyces*. *Antibiotics* **8**:133.