

# Μικροβιακή Συνδυαστική Βιοσύνθεση: Σχεδιασμός νέων πολυκετιδικών φαρμάκων

Αλέξανδρος Σίσκος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

[alesiskos@bio.uth.gr](mailto:alesiskos@bio.uth.gr)

Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης: “Μικροβιακή Βιοτεχνολογία”

Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

20 Ιανουαρίου 2010

- **Μικροβιακή Συνδυαστική Βιοσύνθεση:  
Σχεδιασμός νέων πολυκετιδικών φαρμάκων**

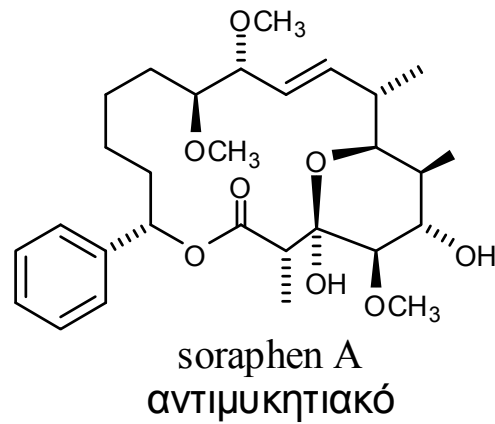
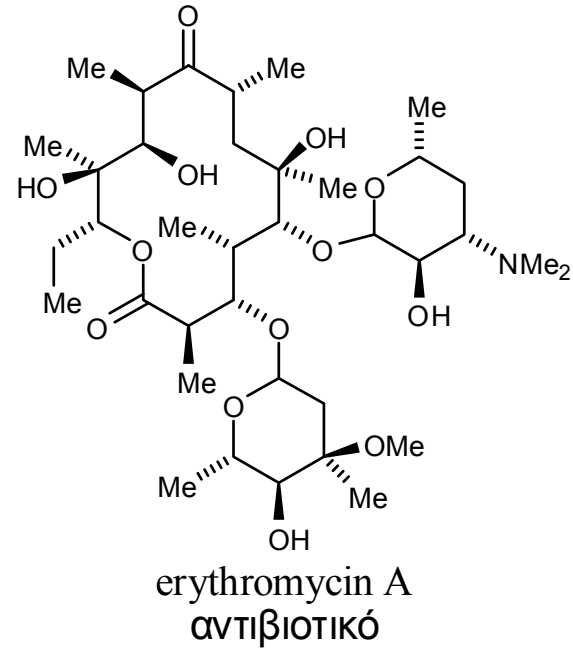
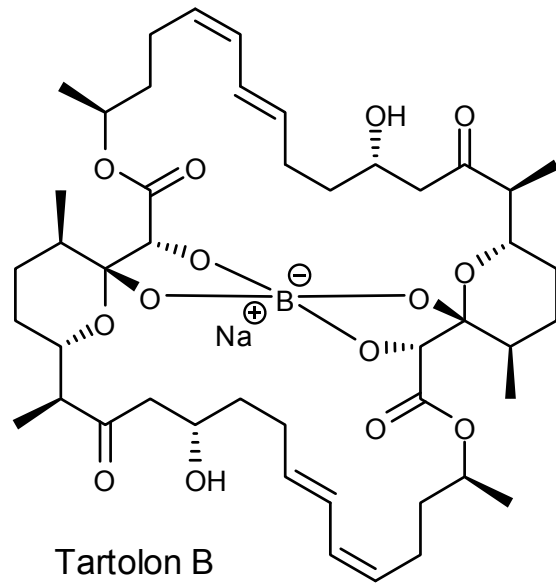
Polyketide drug design with combinatorial biosynthesis/  
bioengineering

- Σχεδιασμός νέων φαρμάκων και βιοενεργών ουσιών με τη βοήθεια γονιδιακών αλλαγών
- **Μικροοργανισμοί ως κυτταρικά εργοστάσια μακρομορίων**

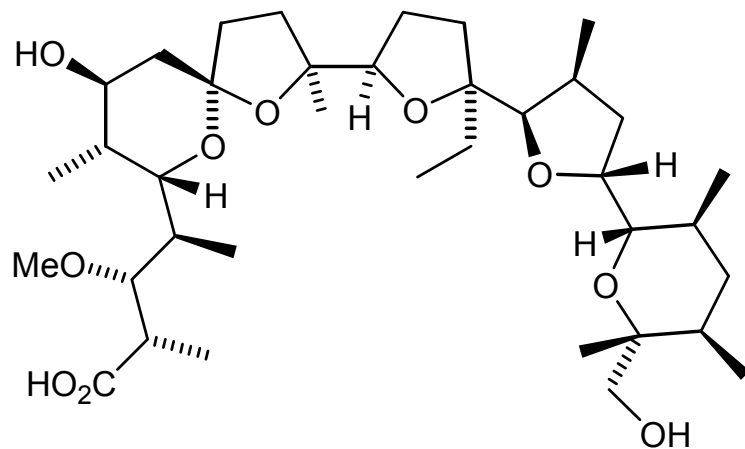
# ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΑ

- Μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με **εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία στις δομές**. Παράγονται από μύκητες, βακτήρια, φυτά, θαλάσσιους οργανισμούς.
- Ο παραδοσιακός ορισμός τους θεωρεί ότι παράγονται από τη συμπύκνωση (πολυμερισμό, συνένωση) μονάδων οξικού κατά τρόπο ‘κεφαλή-ουρά’. (Λιπαρά οξέα, τερπένια)
- Ενώσεις εξαιρετικά μεγάλης βιολογικής σημασίας και χρήσεων (αντιβιοτικά, αντικαρκινικά)

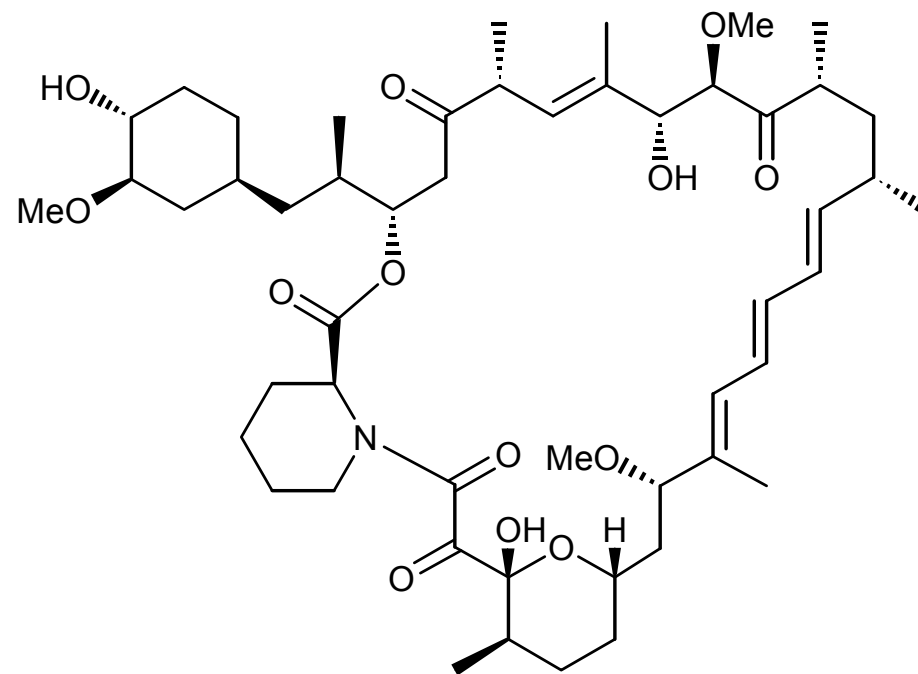
# ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ (macrolides)



# ΠΟΛΥΕΘΕΡΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΕΝΙΑ

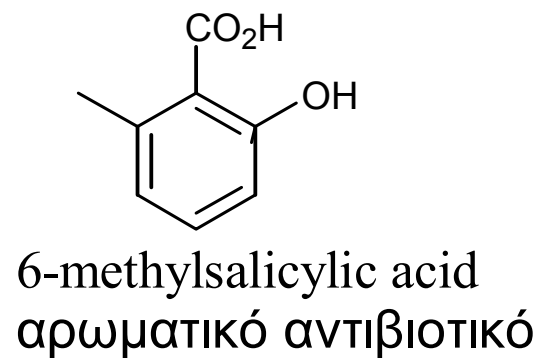
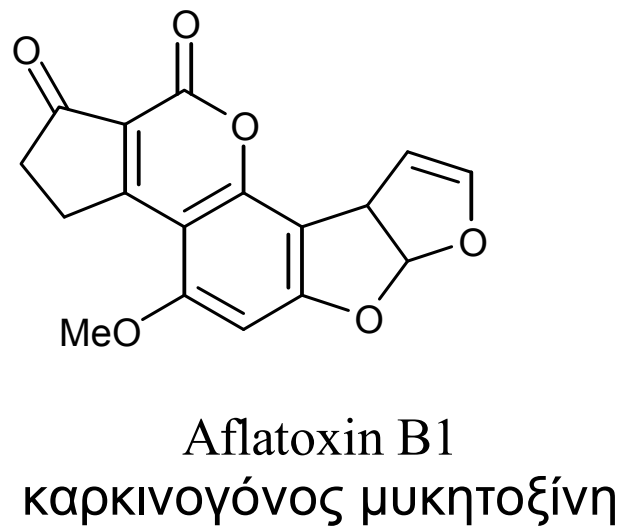
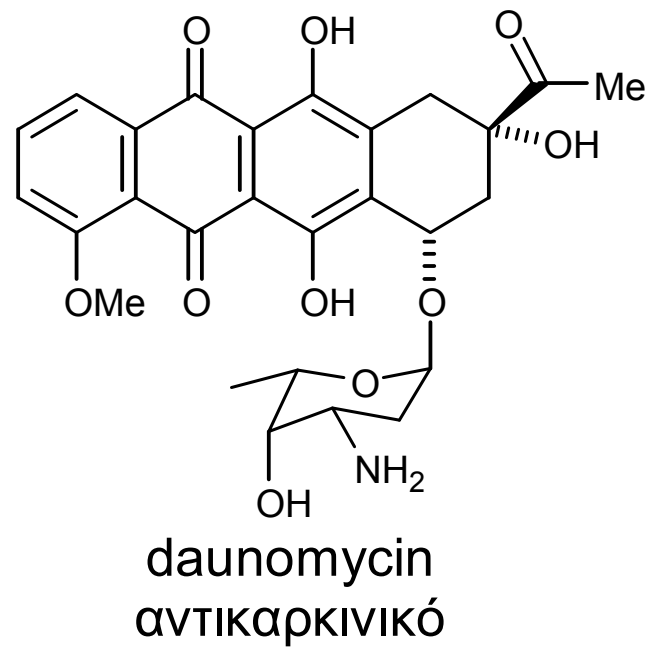
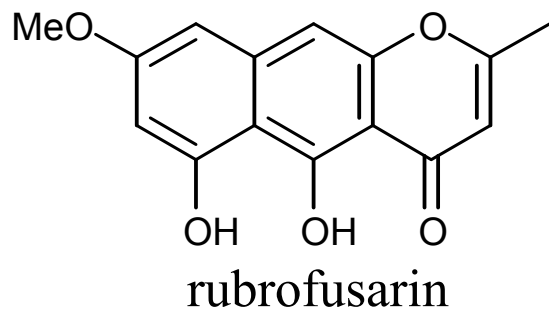


Monensin A  
αντιβιοτικό



rapamycin  
ανοσοκαταστολέας

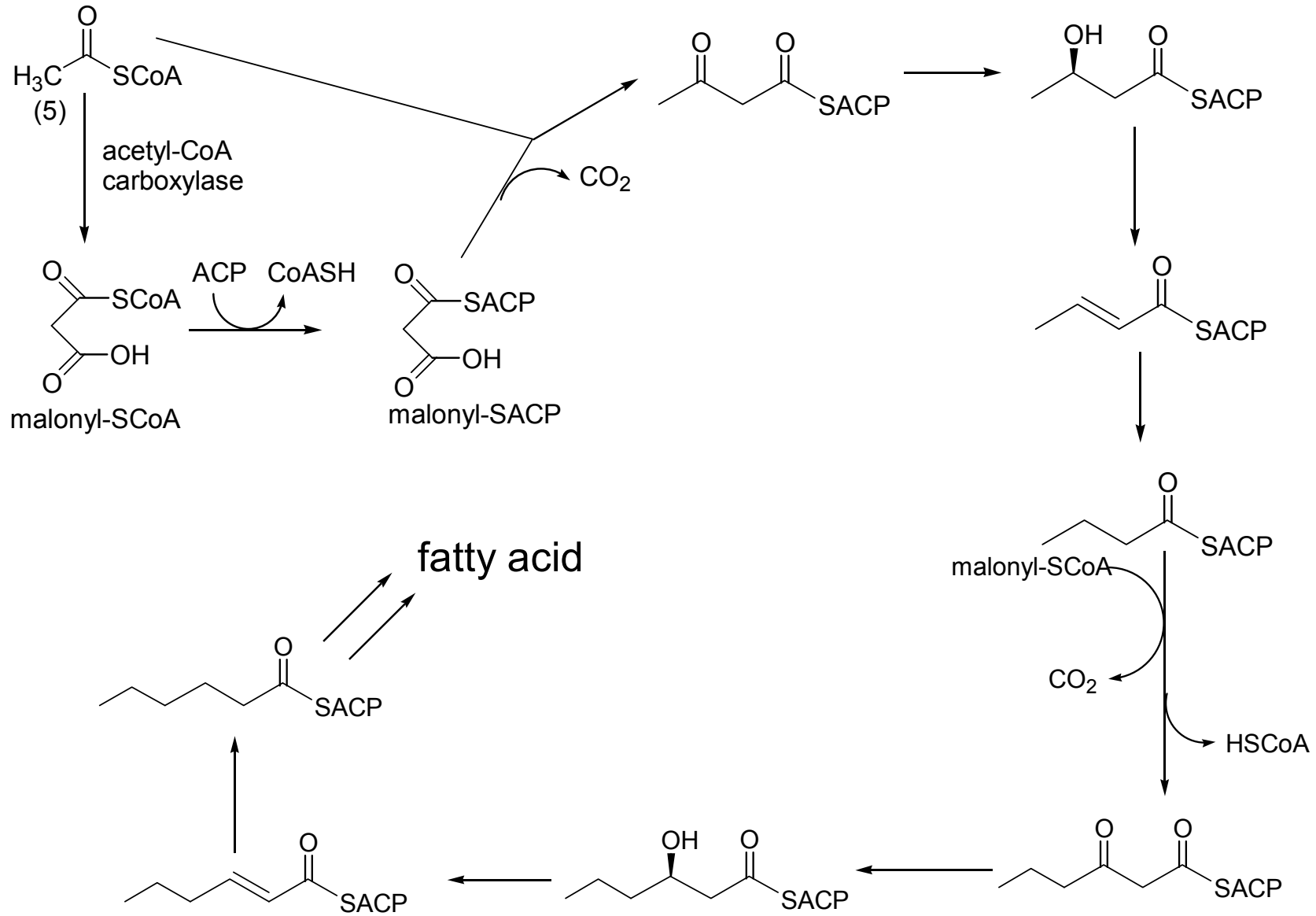
# ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΑ



# ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΑ

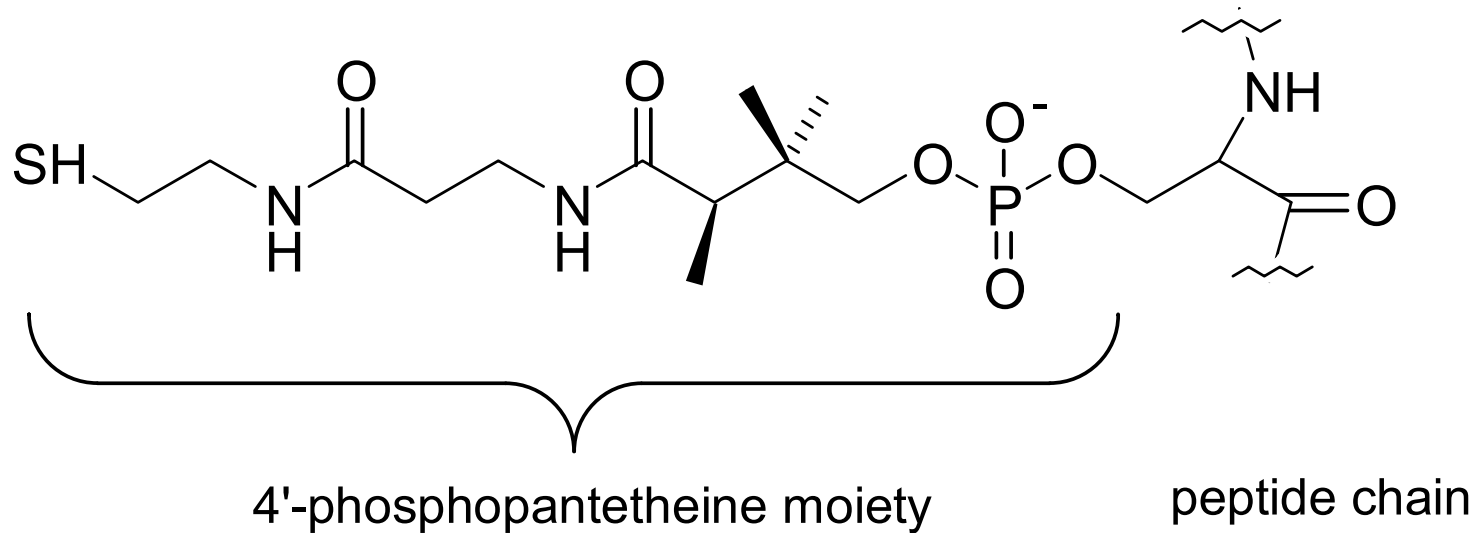
- Κοινό χαρακτηριστικό όλων των πολυκετιδίων είναι ο τρόπος με τον οποίο κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους σχηματίζονται νέοι δεσμοί C-C: αποκαρβοξυλιοτική συνένωση μαλονικού και ενός άκυλο θειοεστέρα με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός β-κετο-θειοεστέρα.
- Ο βιοσυνθετικός μηχανισμός προσομοιάζει εξαιρετικά με τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και μάλιστα η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων μπορεί να θεωρηθεί απλά σαν μια ειδική περίπτωση βιοσύνθεσης πολυκετιδίων.
- *Πως τόσο διαφορετικά δομικές ενώσεις προέρχονται από την ίδια βιοσυνθετική οδό (pathway)????*

# ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ



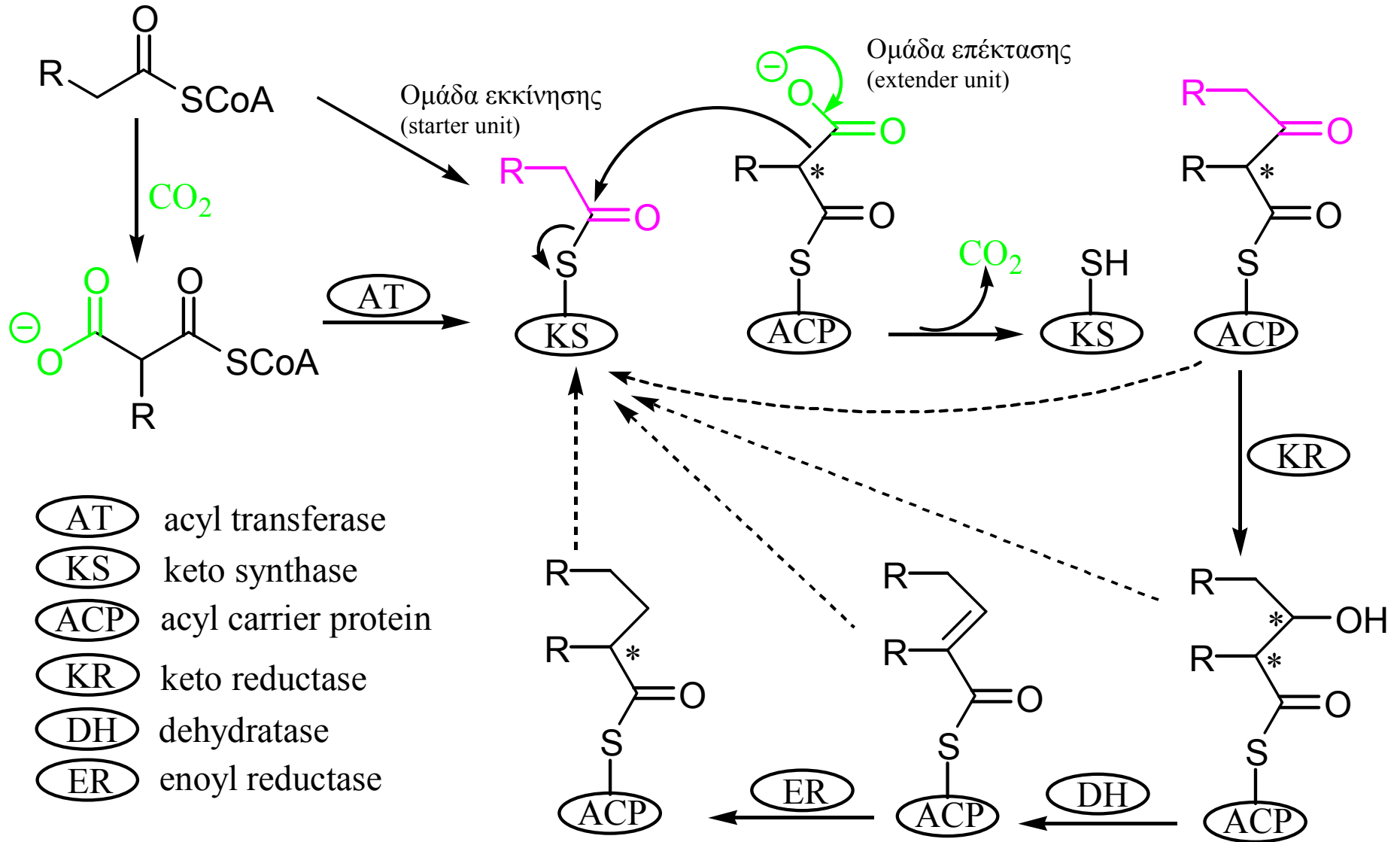


# ΠΡΟΤΕΙΝΗ ΦΟΡΕΑΣ ΑΚΥΛΙΟΥ (acyl carrier protein ACP)



Ο 'βραχίονας' φωσφοπαντοθενικού της ACP  
(θειοεστέρας) πηγαινοφέρει τα υποστρώματα  
μεταξύ των ενζυμικών ενεργοτήτων

# ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΩΝ

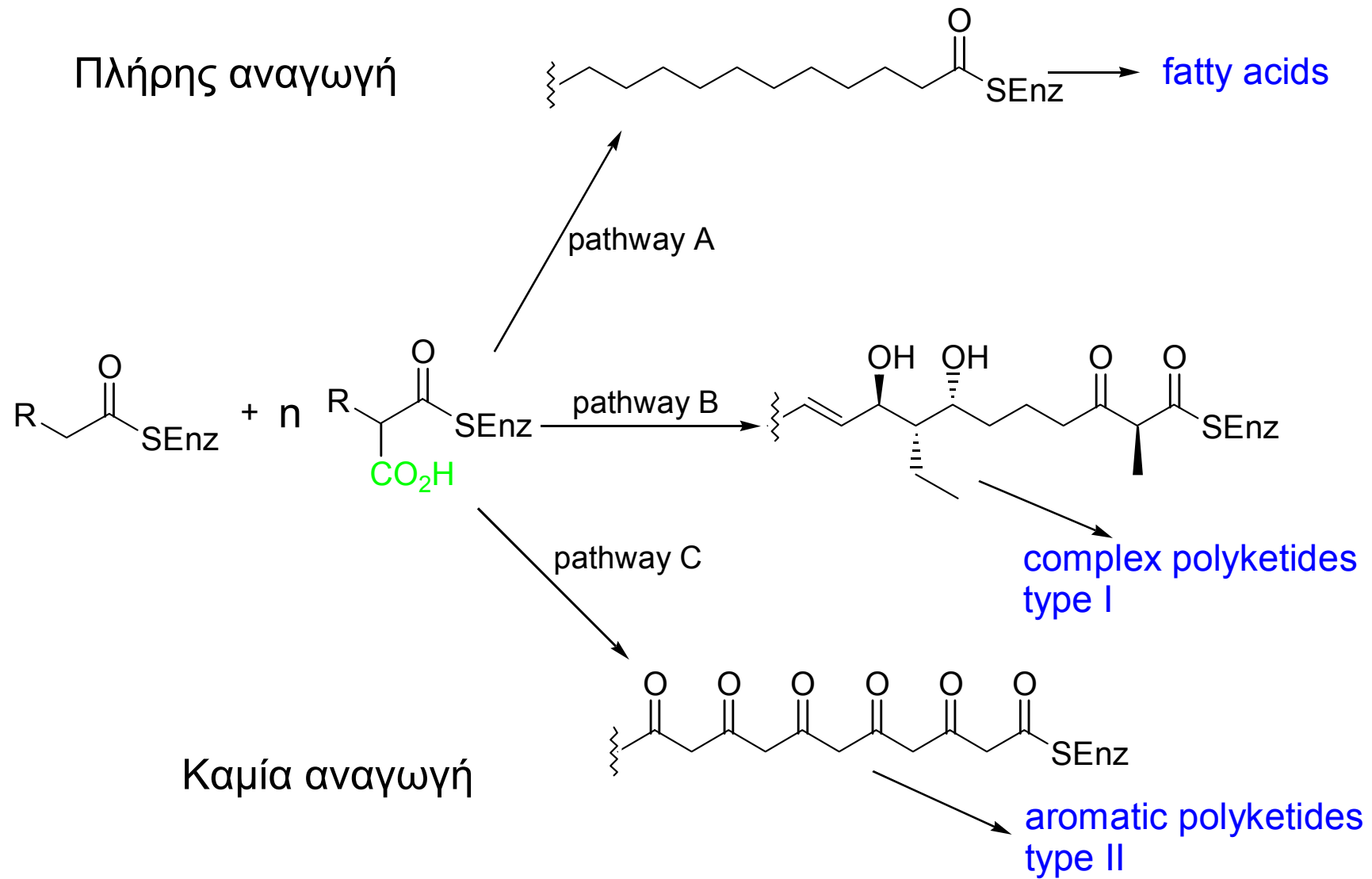


Σχηματισμός δεσμού C-C στη βιοσύνθεση πολυκετιδίων προς παραγωγή δι-, τρι-, πολυκετιδίων

# ΔΟΜΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΩΝ (σύγκριση με FA)

- Οφείλεται στην επιλογή της ομάδας εκκίνησης (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, φαινολικό)
- Στην ικανότητα ενσωμάτωσης όχι μόνο ομάδων οξικού, αλλά και ομάδων προπιονικού (C<sub>3</sub>) και βουτυρικού (C<sub>4</sub>) και στον αριθμό αυτών των ομάδων
- Στο διαφορετικό βαθμό αναγωγής της κέτο ομάδας του β-κετο-θειοέστερα
- Συνεπώς προκύπτουν μέχρι και δυο οπτικώς ενεργά κέντρα για κάθε βιοσυνθετικό κύκλο
- Διαφορετικές αντιδράσεις κυκλοποίησης
- 'Μετά πολυκετιδικές' τροποποιήσεις όπως οξειδώσεις, αναγωγές, μεθυλιώσεις, ακυλιώσεις, γλυκοσυλιώσεις

# ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΩΝ



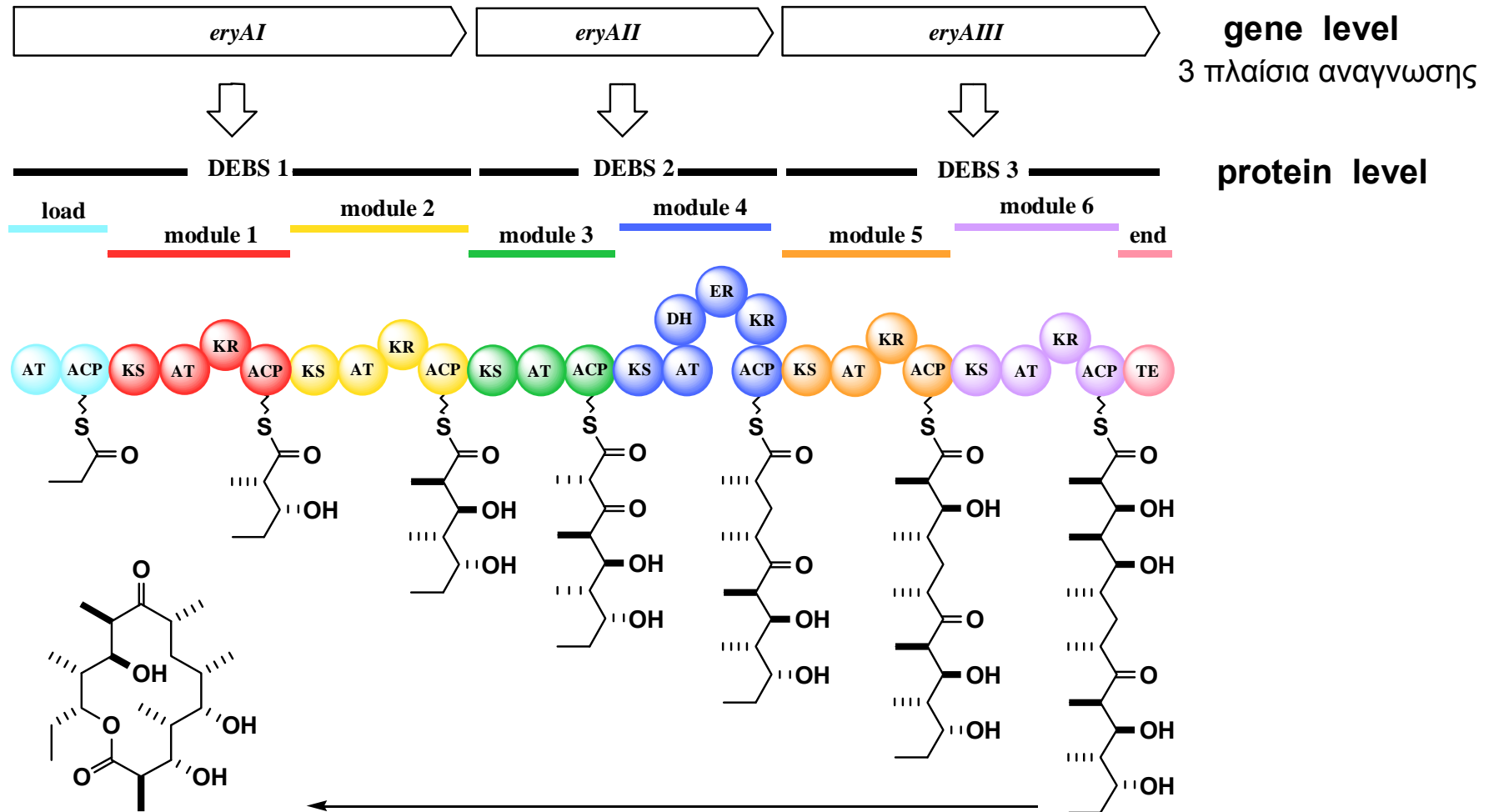
# ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΚΕΣ ΣΥΝΘΑΣΕΣ (Polyketide synthases PKS)

- Οι διαφορές στις δομές των πολυκετιδίων προκύπτουν από διαφορές στην ενζυμική αρχιτεκτονική, οργάνωση και λειτουργία.
- Υπάρχουν δυο ακραίες μορφές ενζυμικής οργάνωσης (όπως και στα FA).
  - PKS τύπος I
  - PKS τύπος II

# ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΚΕΣ ΣΥΝΘΑΣΕΣ (Polyketide synthases PKS)

- **TYPE I (modular) PKS:** πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα. Κάθε αντίδραση της βιοσύνθεσης πραγματοποιείται από μια ξεχωριστή ενζυμική δραστικότητα (περιοχή-domain) και **η οποία χρησιμοποιείται κατά κανόνα μια και μόνο φορά**. Οι περιοχές (**domain**) υπεύθυνες για μια δομική μονάδα ακυλίου είναι οργανωμένες σε στοιχεία δραστικότητας (**module**) και τα οποία είναι οργανωμένα σε *μια η περισσότερες πολυδραστικές πρωτεΐνες* (πολύ μεγάλου μεγέθους).
- Παράγουν πολύπλοκα μη-αρωματικά πολυκετίδια όπως τα μακρολίδια, οι πολυεθέρες, τα πολυένια. Απαντώνται συνήθως σε βακτήρια και θαλάσσιους οργανισμούς. Διαφορετικός βαθμός αναγωγής σε κάθε βιοσυνθετικό κύκλο. Χρήση προπιονικού, βουτυρικού.

# ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ TYPE I (modular) PKS



6-Deoxyerythronolide B

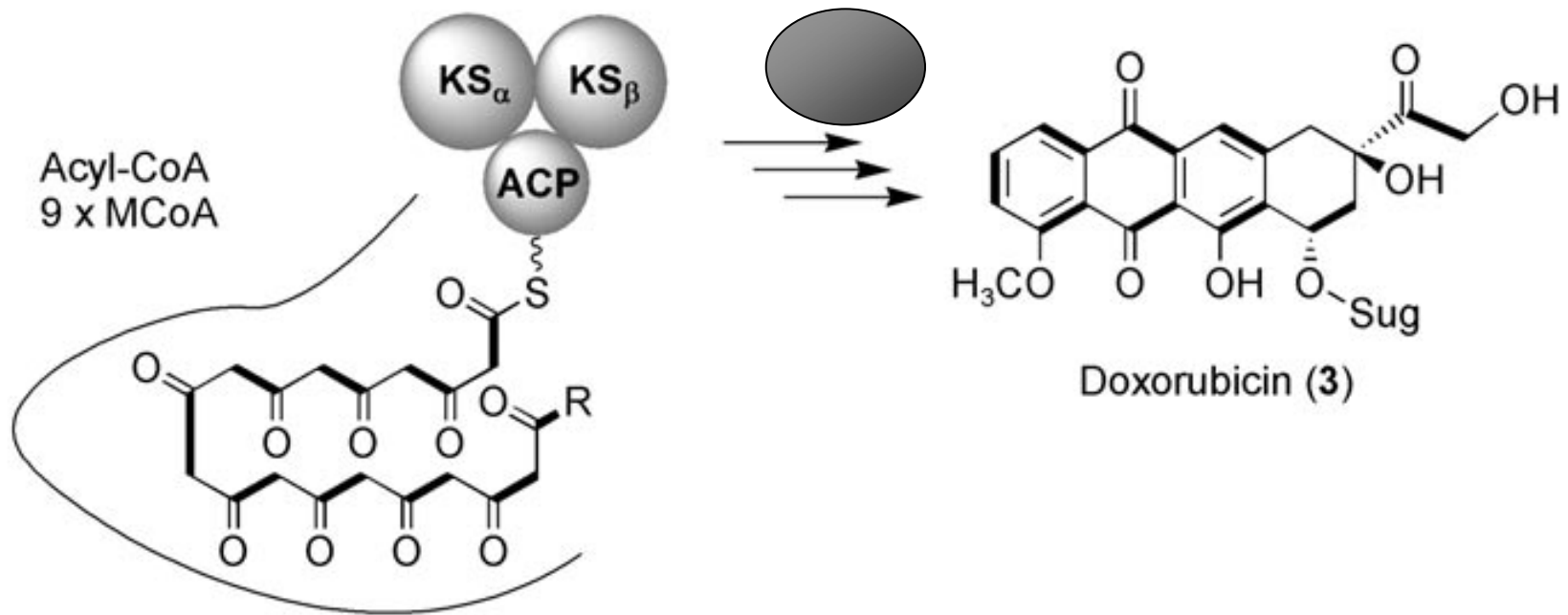
Γονιδιακό συγκρότημα ερυθρομικίνης A στο *Saccharopolyspora erythraea*. Η θειοεστεράση (thioesterase TE) κυκλοποιεί (λακτόνη) και απελευθερώνει το πολυκετίδιο από το ένζυμο.

# ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΚΕΣ ΣΥΝΘΑΣΕΣ (Polyketide synthases PKS)

- **TYPE II (aromatic) PKS:** πιο πρωτόγονη συλλογή ξεχωριστών ενζύμων. **Κάθε ενζυμική δραστικότητα αποτελεί και μια ξεχωριστή πρωτεΐνη.**
- Κάθε μια από τις ενζυμικές αυτές δραστικότητες μπορεί να χρησιμοποιείται **επαναληπτικά** σε κάθε βιοσυνθετικό κύκλο (όπως και οι βακτηριακές FAS).
- Απουσία αναγωγικών δραστικοτήτων (ΣΕ ΠΛΗΡΗ ΑΝΤΙΘΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ FAS) και συνεπώς τρεις και μόνο ενζυμικές δραστικότητες-πρωτεΐνες μπορούν να αποτελούν την **ελάχιστη PKS**.
- Απαντώνται σε μύκητες και φυτά.

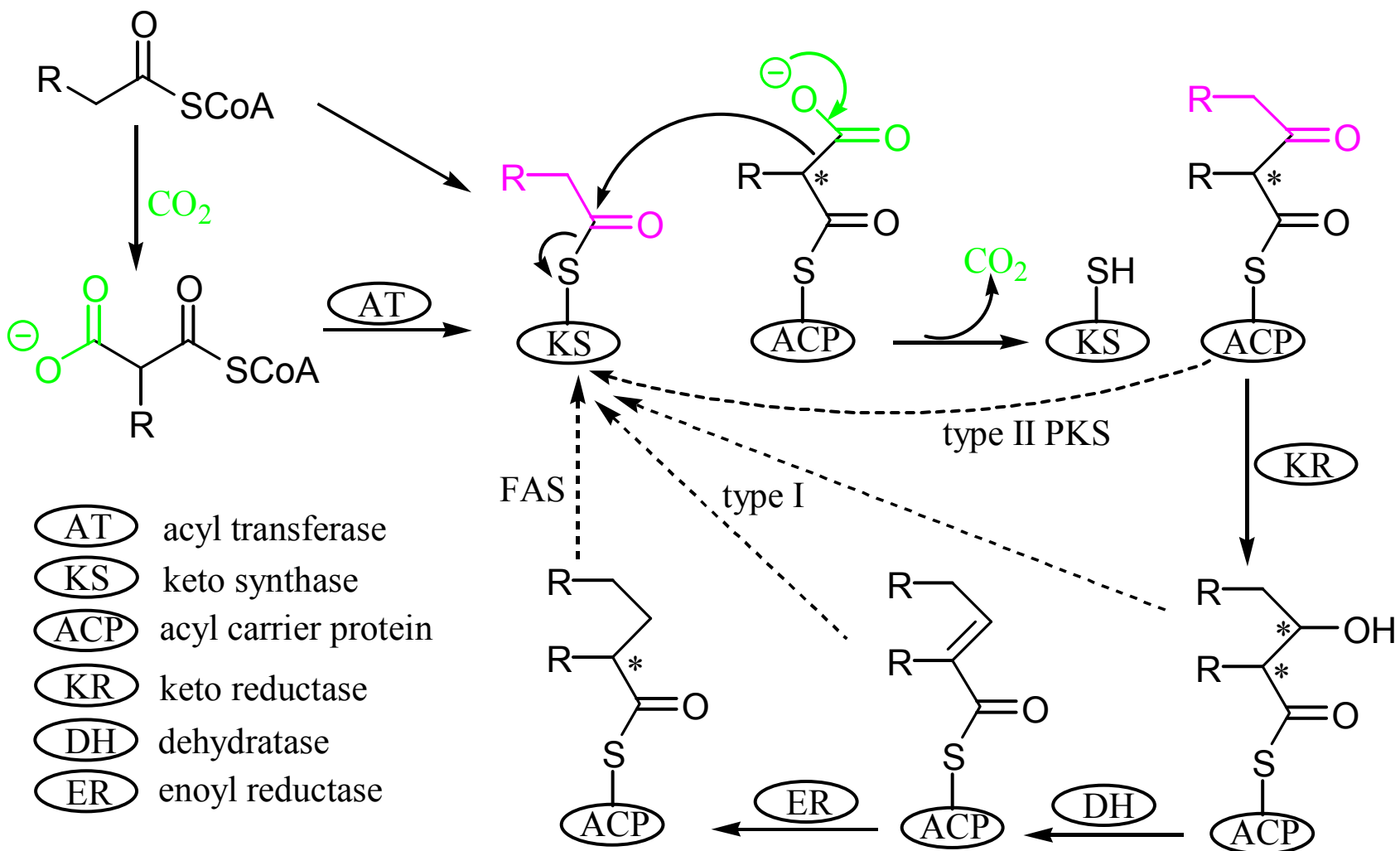


## TYPE II (aromatic) PKS:



Βιοσύνθεση της Doxorubicin από βακτηριακή  
τύπου II PKS

# ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΩΝ



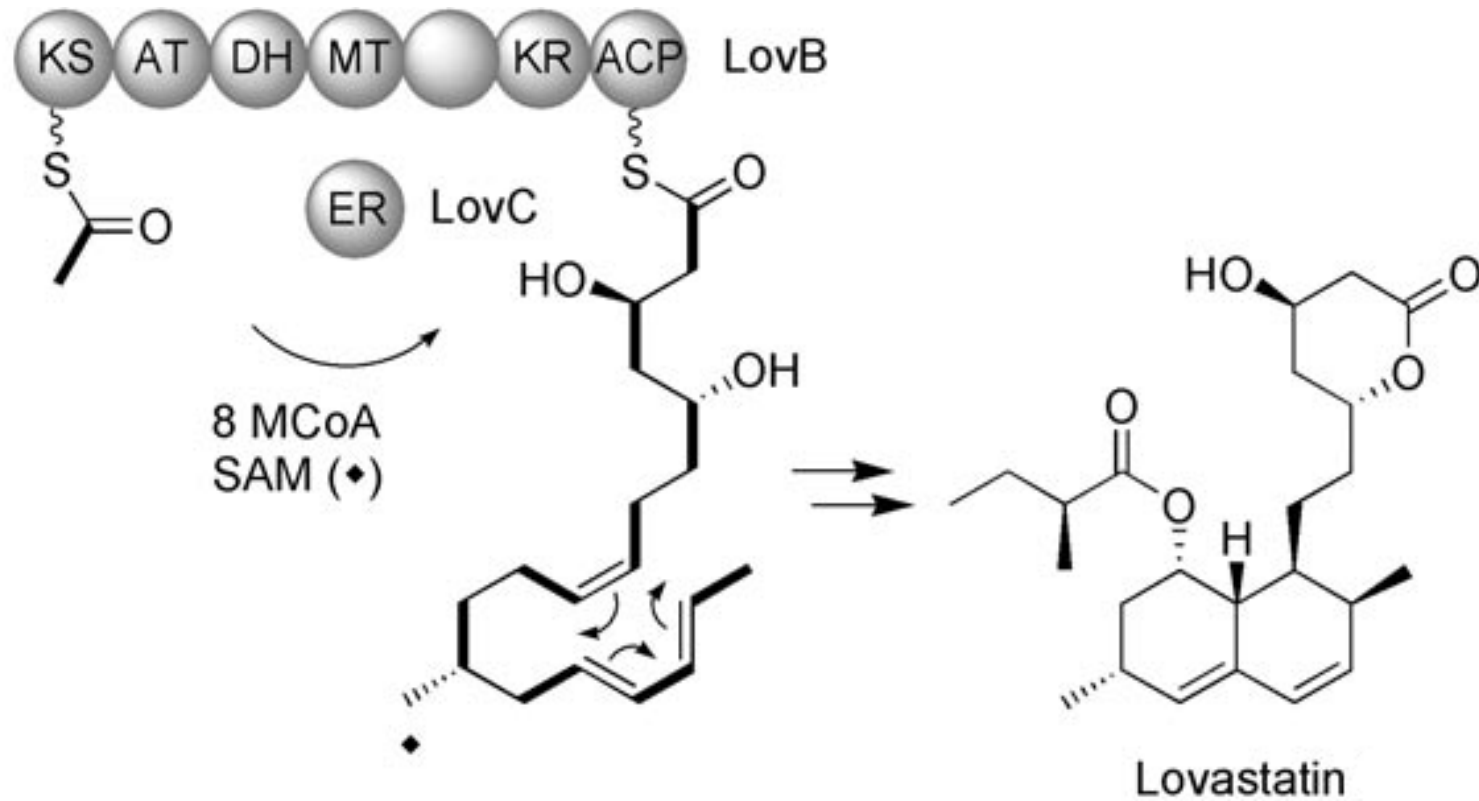
- Η εμφάνιση PKS τύπου I ή II έχει σχέση με τη δομή του πολυκετιδίου και όχι τον οργανισμό προέλευσης (σε αντίθεση με τα FA).
- Η δομική οργάνωση των FAS εξαρτάται από τον οργανισμό που απαντώνται
  - FAS I: Θηλαστικών. Όλες οι ενζυμικές δραστηριότητες είναι συνδεδεμένες (ομοιοπολικά) μεταξύ για να σχηματίσουν μια μεγάλη πολυδραστική πρωτεΐνη (συνήθως επτά ενζυμικές δραστηριότητες).
  - FAS II: Βακτηριακή. Αποτελείται από σετ διακριτών πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να απομονωθούν η κάθε μια ξεχωριστά.

# ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ

- Τα μοντέλα των PKS τύπου I και II δεν είναι οι μοναδικές περιπτώσεις που απαντώνται στη φύση. Ποικιλία παραδειγμάτων όπου η ενζυμική οργάνωση είναι ενδιάμεση των ακραίων δομών τύπου I και II.
  - Επαναληπτικά PKS I (iteratively)
  - Συνθάσες της χαλκόνης (chalcone synthases CHS). PKS τύπος III (φυτά)

# Επαναληπτικά (iterative) PKS I

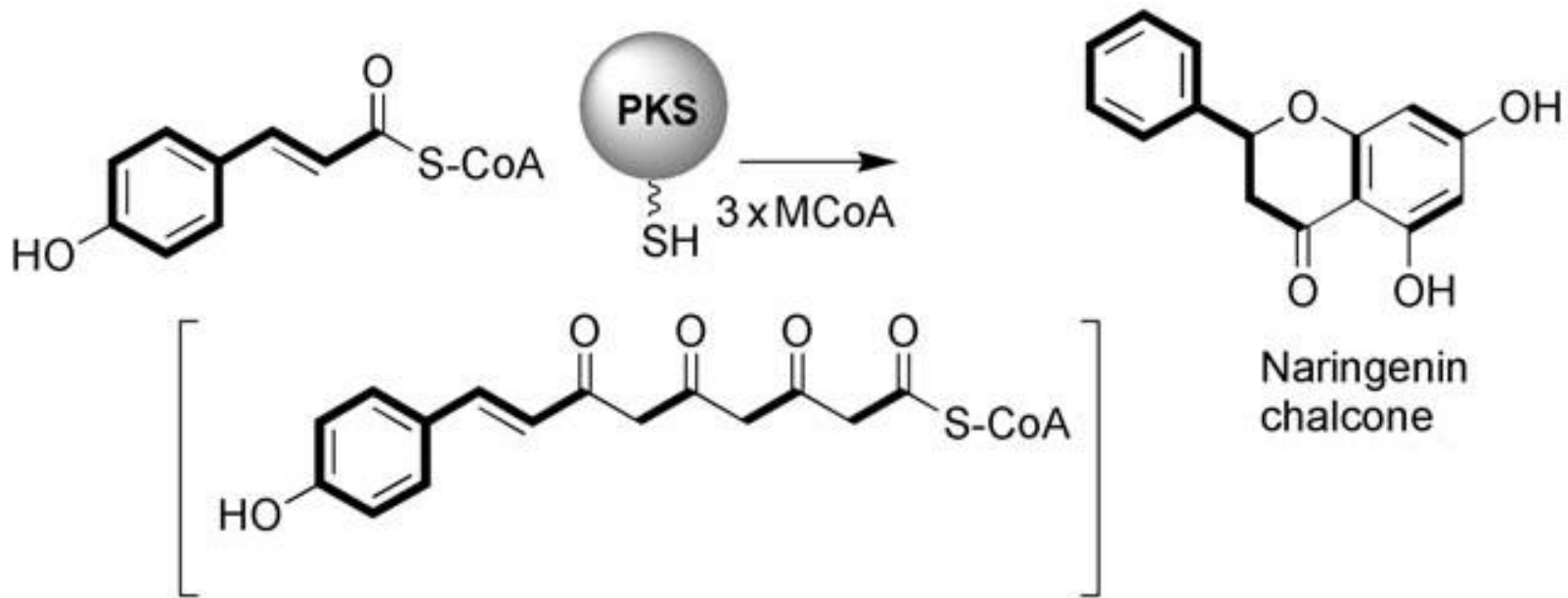
- **Επαναληπτικά PKS I:** Ενζυμική αρχιτεκτονική τύπου I, αλλά μερικές ενζυμικές δραστηριότητες χρησιμοποιούνται επαναληπτικά (iteratively). Δηλαδή οι ενζυμικές δραστηριότητες είναι οργανωμένες σε μεγάλες πολυδραστικές πρωτεΐνες, αλλά σε αντίθεση με τις κλασικού τύπου I, μερικές από τις δραστηριότητες χρησιμοποιούνται επαναληπτικά.
- Παραδείγματα η βιοσύνθεση από μύκητες των 6-MSA και lovastatin.



Βιοσύνθεση Lovastatin από επαναληπτική  
μυκητιακή PKS τύπου I

# Συνθάσες της χαλκόνης (chalcone synthases CHS)

- **Συνθάσες της χαλκόνης** (chalcone synthases CHS): Ενζυμική αρχιτεκτονική τύπου II (ξεχωριστά ένζυμα). Όμως τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις ομάδες ακυλίου με τη μορφή του συνενζύμου A (CoA), χωρίς να μεταφερθούν στην ACP. Επίσης πολλές ενζυμικές αντιδράσεις (αποκαρβοξυλίωση, κυκλοποίηση, δημιουργία δεσμού C-C, αρωματοποίηση)
- Πολυκετίδια φυτών, φαινυλοπροπανοεΐδη (χρωστικές, αντι-UV, χημειοπροστατευτικές κλπ.).



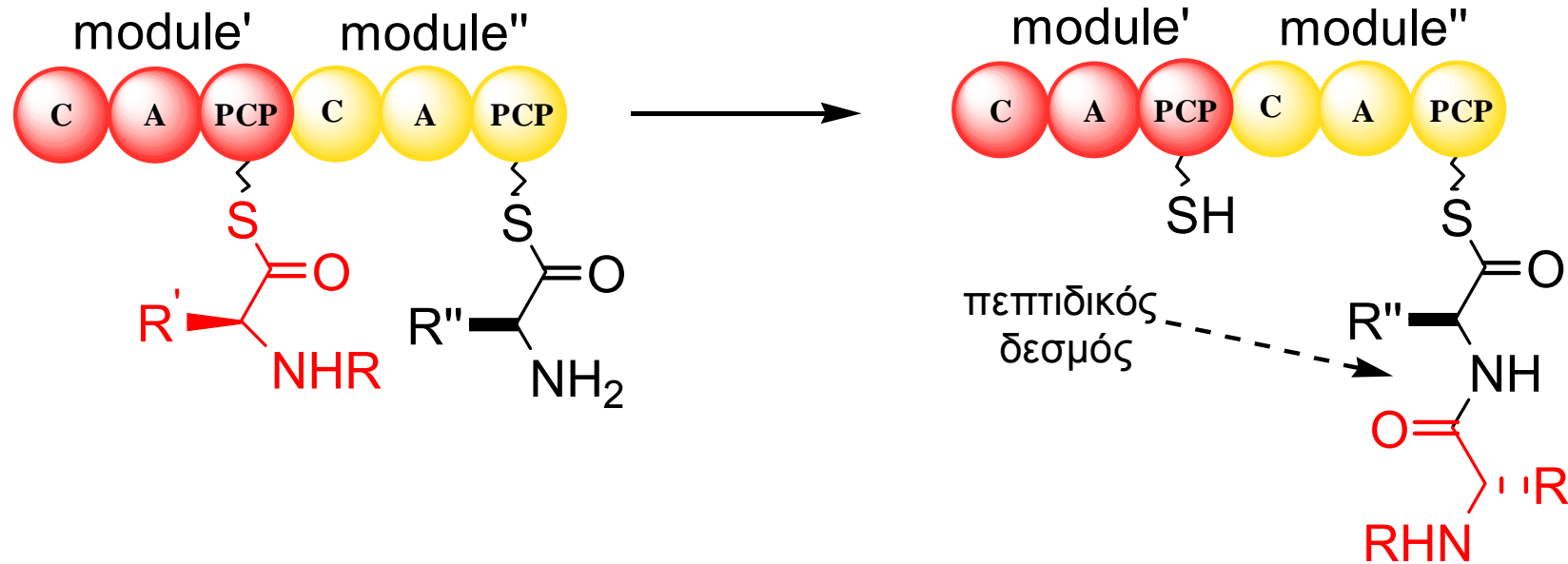
Naringenin (ναρινγκίνη). Συνθάση της χαλκόνη (chalcone synthase). Φυτά τυπος III PKS



# ΜΗ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΕΣ ΣΥΝΘΑΣΕΣ (non ribosomal peptide synthases NRPS)

- Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια είναι γραμμικά, κυκλικά ή διακλαδιζόμενα πεπτίδια με συνήθως λιγότερο από 20 μονάδες
- Πολλά μη ριβοσωμικά πεπτίδια είναι πολύ σημαντικά φάρμακα όπως η κυκλοσπορίνη A, πενικιλίνη, βανκομυσίνη
- Παράγονται από τις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες οι οποίες *εκτός από τα πρωτεϊνογενή αμινοξέα (20) μπορούν και χρησιμοποιούν γύρω στα 300 !!!! άλλα αμινοξέα*
- Οι NRPS έχουν δομή και ενζυμική αρχιτεκτονική παρόμοια με τον τυπο I PKS (modular)
- Για κάθε δομική μονάδα-αμινοξύ, υπάρχει ένα διαφορετικό στοιχείο ενζυμικών δραστηριοτήτων (module) και όλες μαζί είναι οργανωμένες σε μια ή περισσότερες πολυδραστικές πρωτεΐνες

# ΜΗ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΕΣ ΣΥΝΘΑΣΕΣ (non ribosomal peptide synthases NRPS)

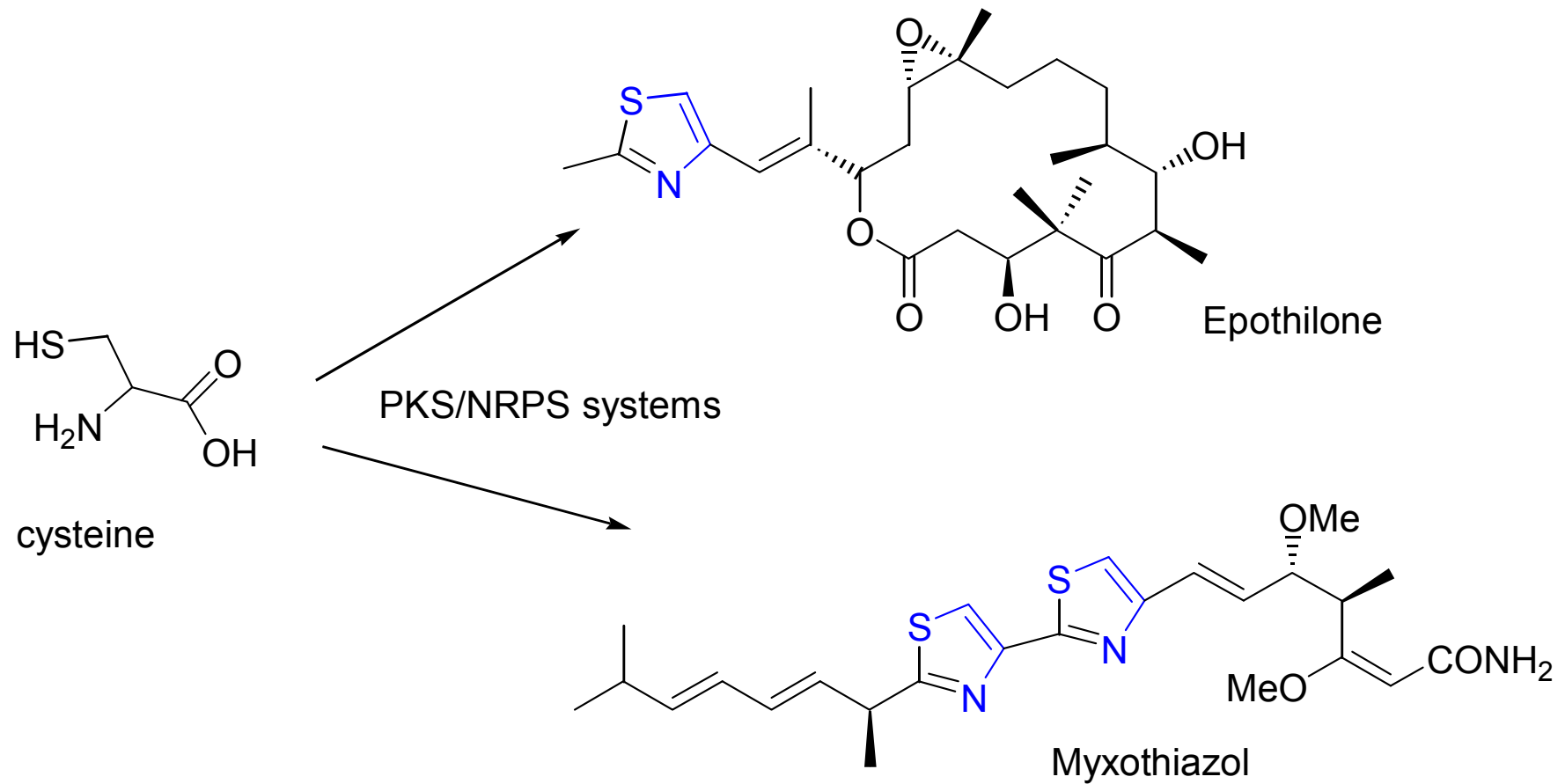


**A:** adenylation  
**PCP:** peptyl carrier protein  
 γνωστό και ως **T:** thiolation  
**C:** condensation

**E:** epimerisation  
**MT:** methylation  
**Cy:** cyclisation  
**R:** reduction  
**Ox:** oxidation

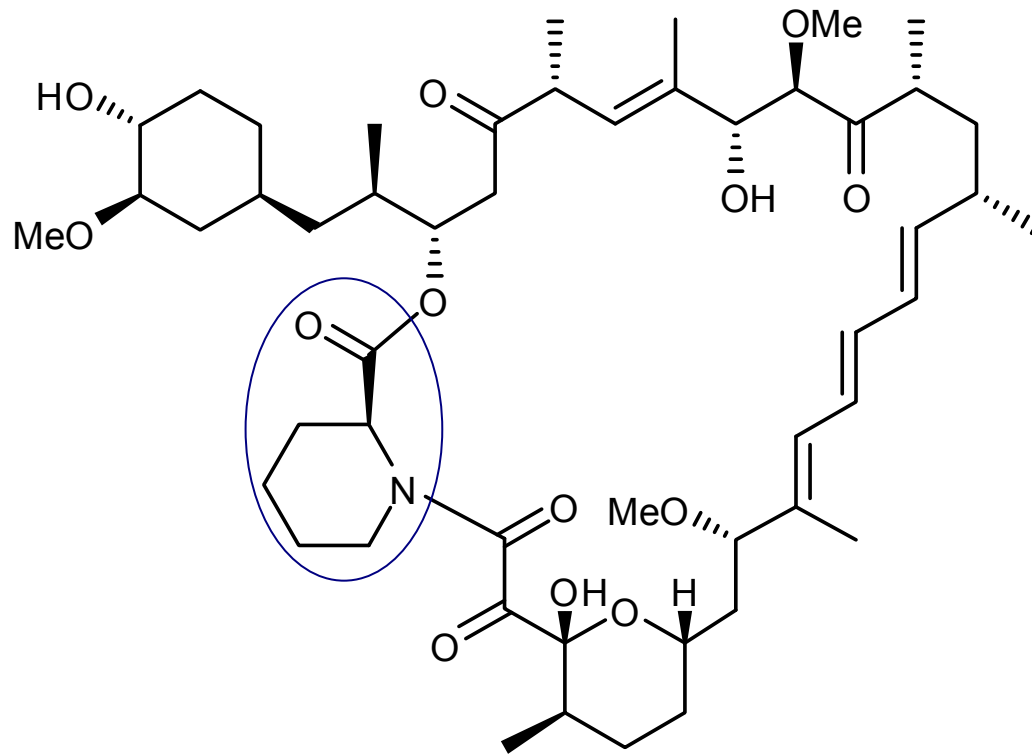
- Πολλά παραδείγματα συστημάτων που είναι μίγματα δυο από των παραπάνω για παράδειγμα
  - εναλλαγή PKS τύπου I και II,
  - **μεικτά PKS/NRPS** (epothiolone, myxothiazol, rapamycin)

# ΜΕΙΚΤΑ PKS/NRPS (ή μήπως φυσική βιοσυνθετική μηχανική)



Χρησιμοποίηση αμινοξέων σαν δομικές μονάδες σε φυσικά συστήματα PKS/NRPS.

# Βιοσύνθεση ραπαμυκίνης



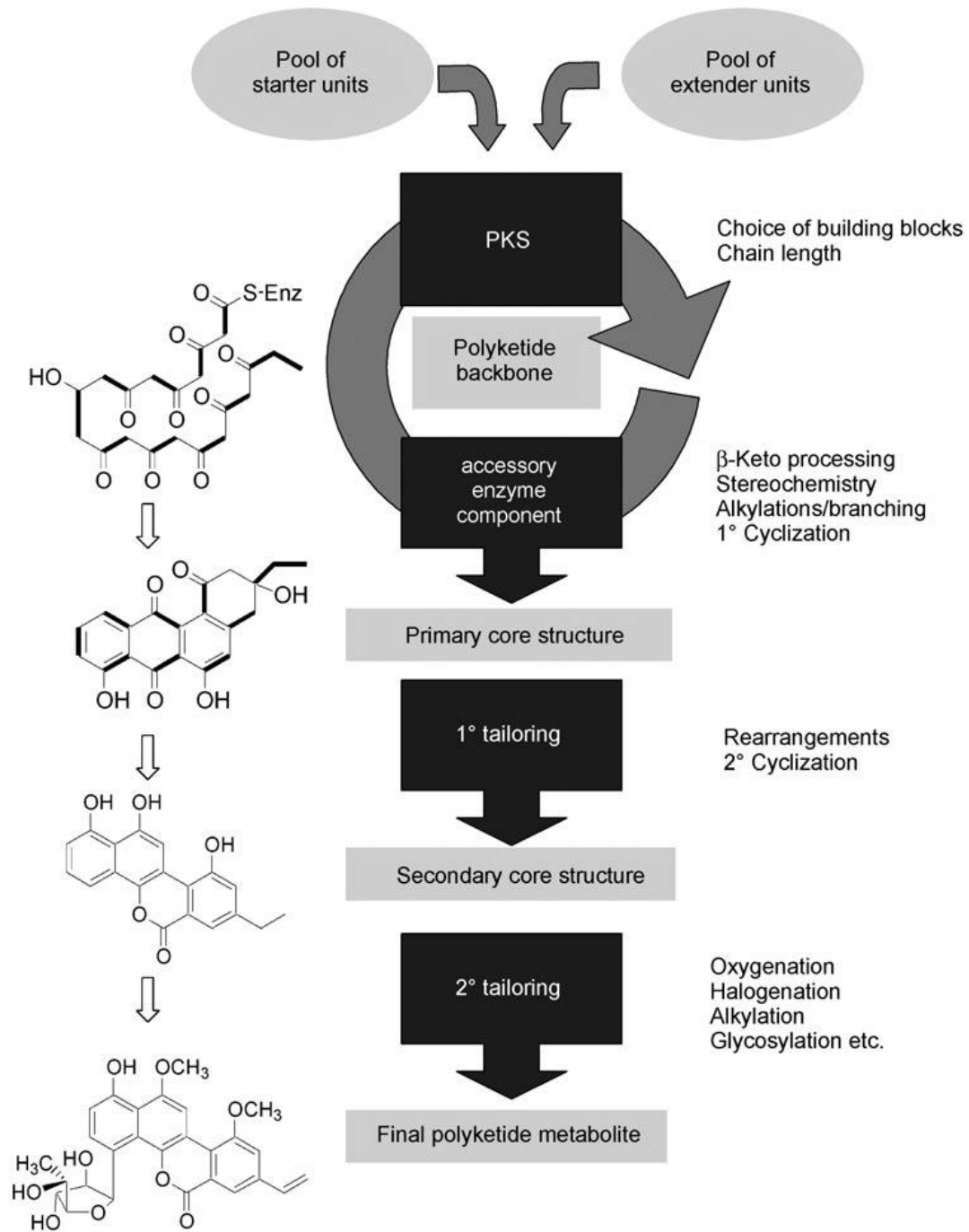
rapamycin  
ανοσοκαταστολέας

# Ταξινόμηση διαφόρων PKS σε σχέση με τους οργανισμούς

Τύπος PKS	Οργανισμοί
Modular PKS τύπος I	Βακτήρια (πρώτιστα)
Επαναληπτική PKS τύπος I	Μύκητες (μερικά βακτήρια)
Επαναληπτική PKS τύπος II	Μόνο βακτήρια
Επαναληπτική PKS τύπος III	Κυρίως φυτά, (μερικά βακτήρια και μύκητες)
PKS/NRPS υβριδικά	Βακτήρια - μύκητες

# ΣΥΝΔΙΑΣΤΙΚΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ (combinatorial biosynthesis)

- Το μοντέλο ενζυμικής αρχιτεκτονικής PKS τύπου I προβλέπει ότι κάθε ενζυμική περιοχή (domain) είναι υπεύθυνη για μια και μόνο αντίδραση της βιοσύνθεσης και κάθε στοιχείο δραστηριοτήτων για κάθε δομική μονάδα.
- Υπόθεση: Πιθανές αλλαγές στο γονίδιο θα πρέπει να προκαλέσουν τις αντίστοιχες αλλαγές στη δομή του μορίου.
- Αξιοποίηση της τεράστιας βιοσυνθετικής ποικιλίας (δομικές μονάδες, στερεοχημεία, οξειδωτική κατάσταση) των πολυκετιδίων για την επίτευξη των τεραστίου εύρους δομικών αλλαγών.
- Παραγωγή υβριδικών αντιβιοτικών ή μη-φυσικών φυσικών προϊόντων με τη χρήση της λεγόμενης βιοσυνθετικής μηχανικής.
- Mutasynthesis: Η παραγωγή αναλόγων φαρμακευτικών προϊόντων, όχι με χημική σύνθεση, αλλά με τη χρήση της μοριακής βιολογίας (σχεδιασμένες αλλαγές στο επίπεδο των γονιδίων)

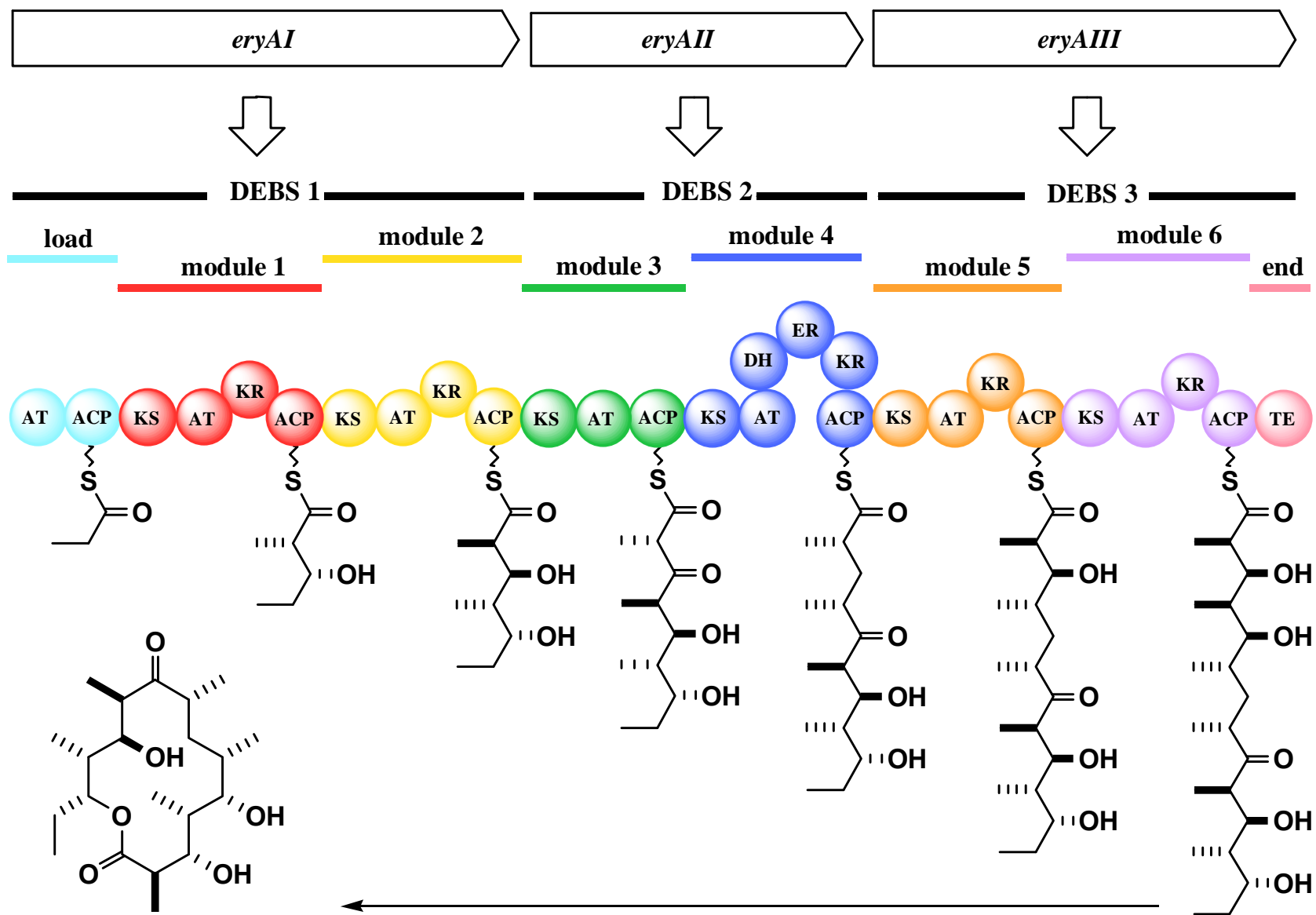




# ΣΥΝΔΙΑΣΤΙΚΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ (combinatorial biosynthesis)

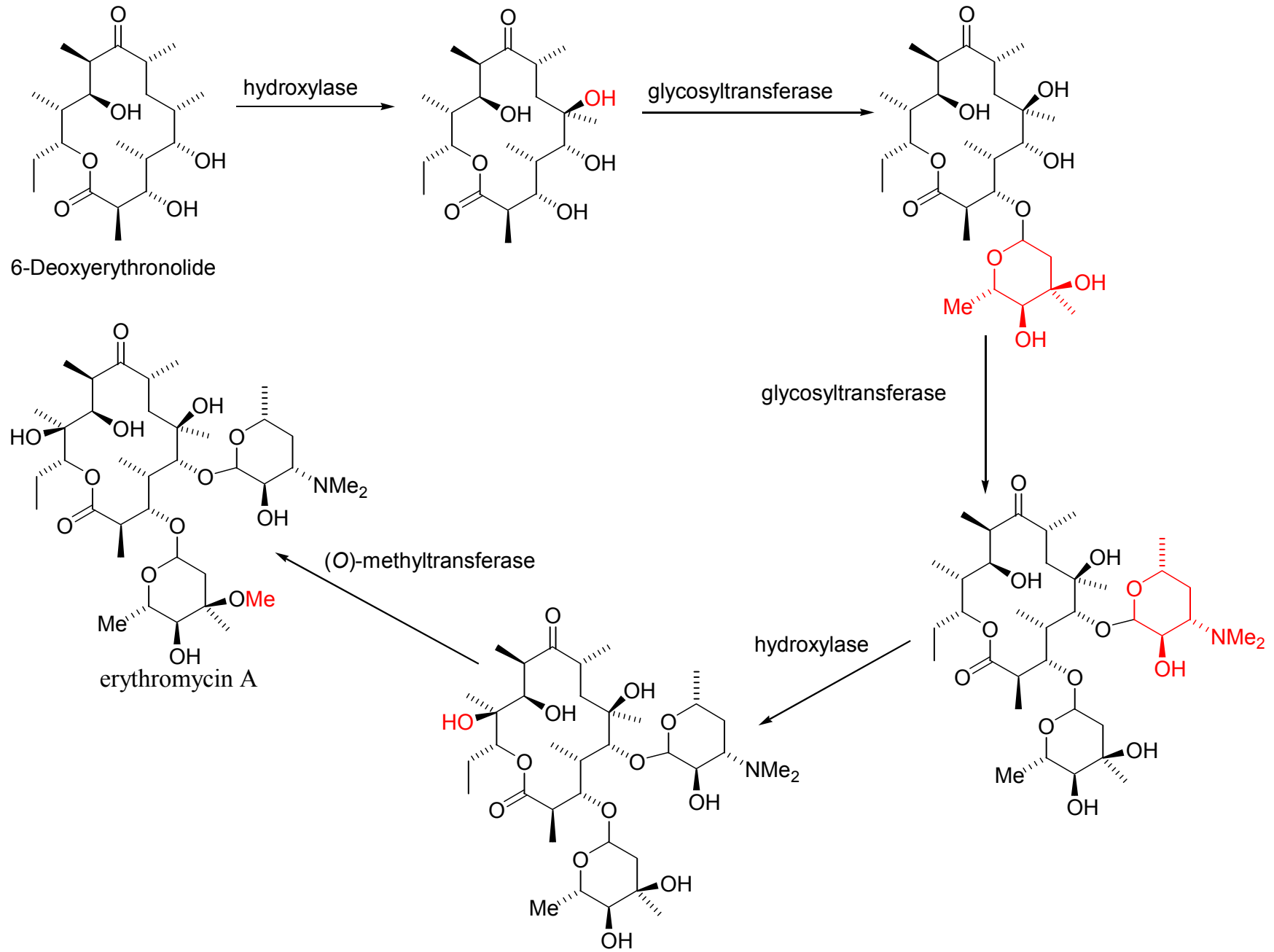
- Η συνδυαστική βιοσύνθεση κατέστη δυνατή με τη κατανόηση της βιοσύνθεσης των πολυκετιδίων και ανάπτυξη της γενετικής, κλωνοποίησης, μικροβιολογίας, ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών.
- Επίσης η αλληλουχία πολλών βιοσυνθετικών γονιδιωμάτων έχει αποσαφηνισθεί, προσφέροντας τη δυνατότητα αναγνώρισης των αλληλουχίας υπεύθυνων για συγκεκριμένες αντιδράσεις.
- Εφαρμογή σε Βακτήρια. *Actinomycetes* (βακτήρια εδάφους) και ειδικά στα *Streptomyces*.

# ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ

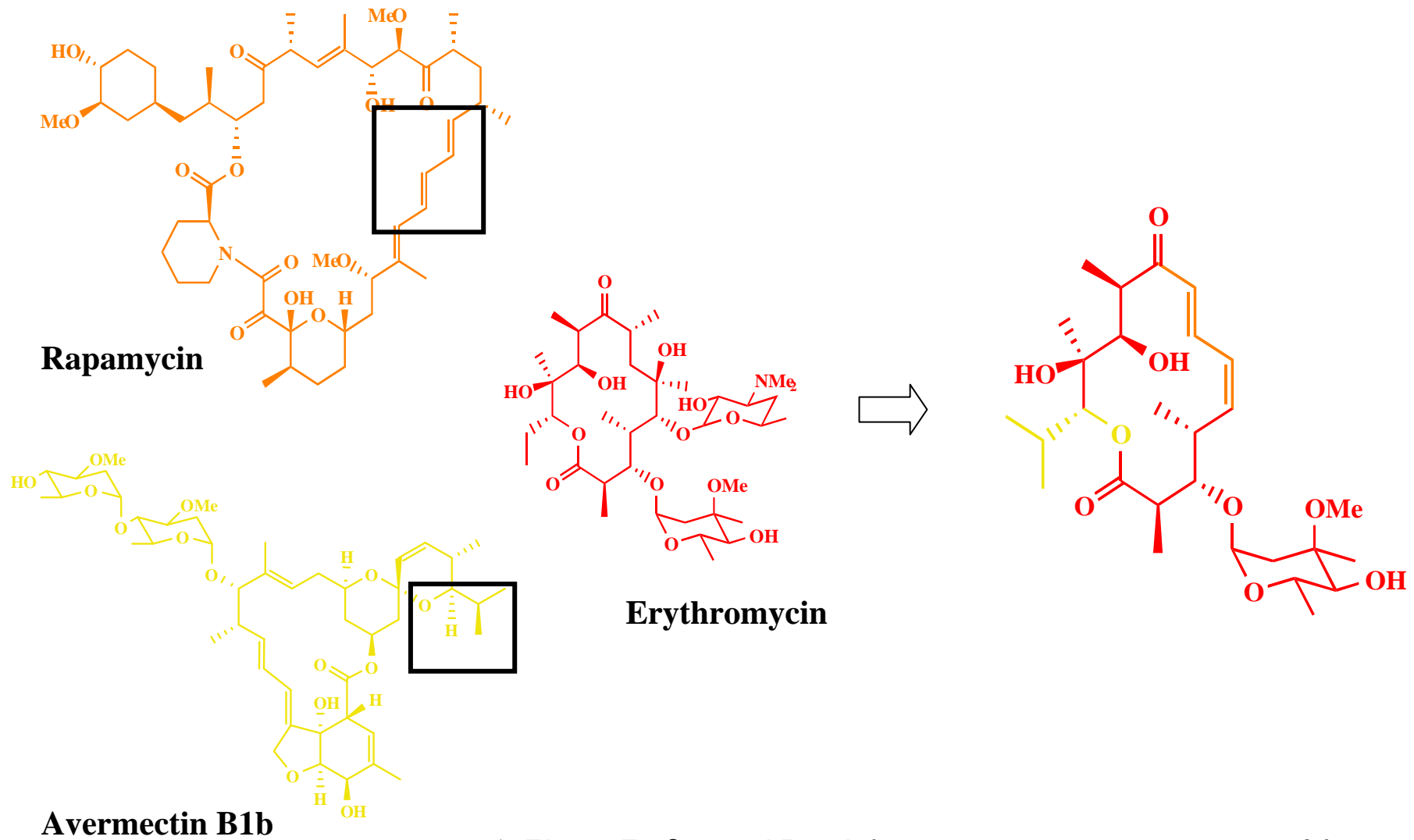


6-Deoxyerythronolide B

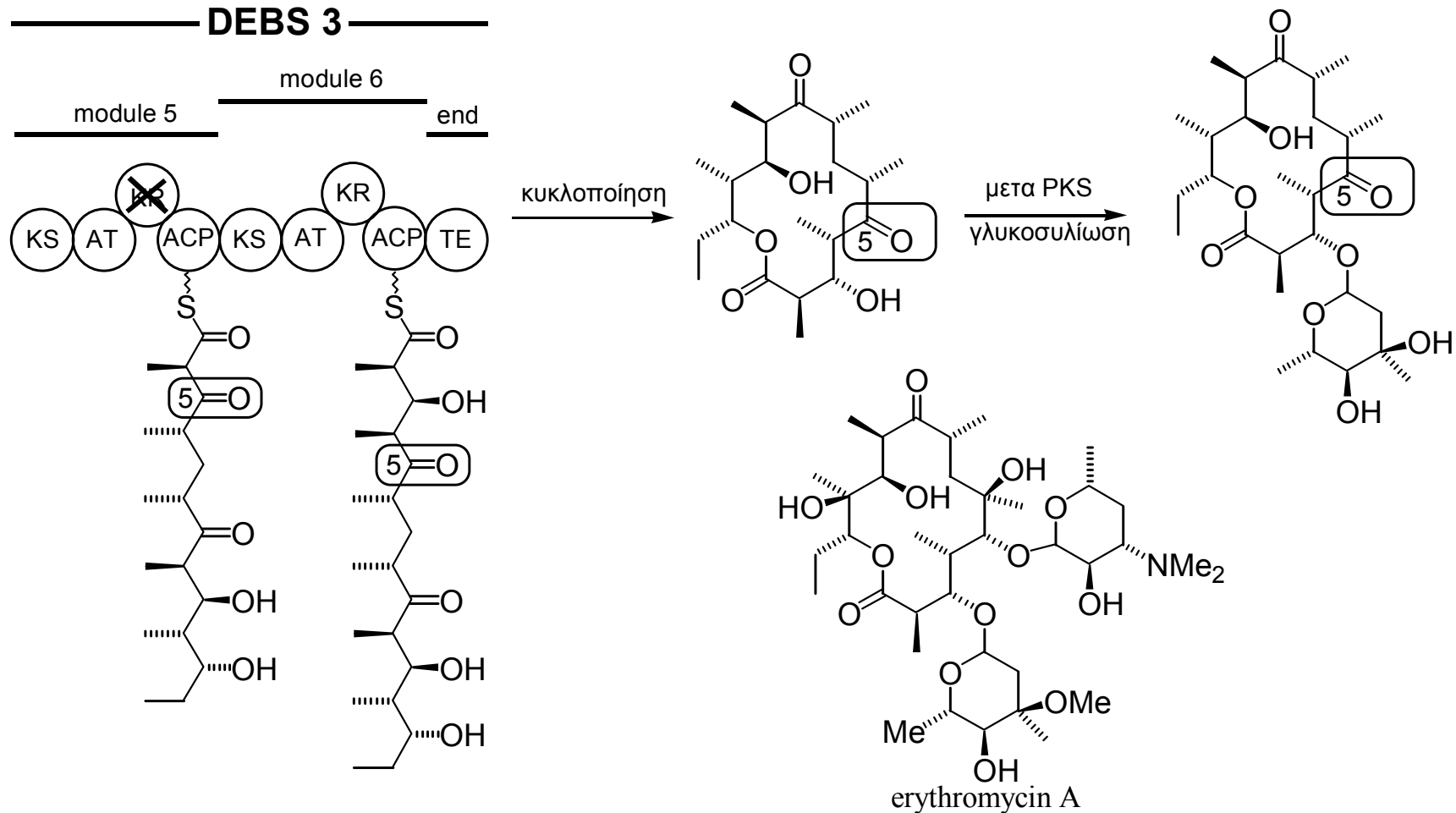
# ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ



# ΣΥΝΔΙΑΣΤΙΚΟΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ - ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

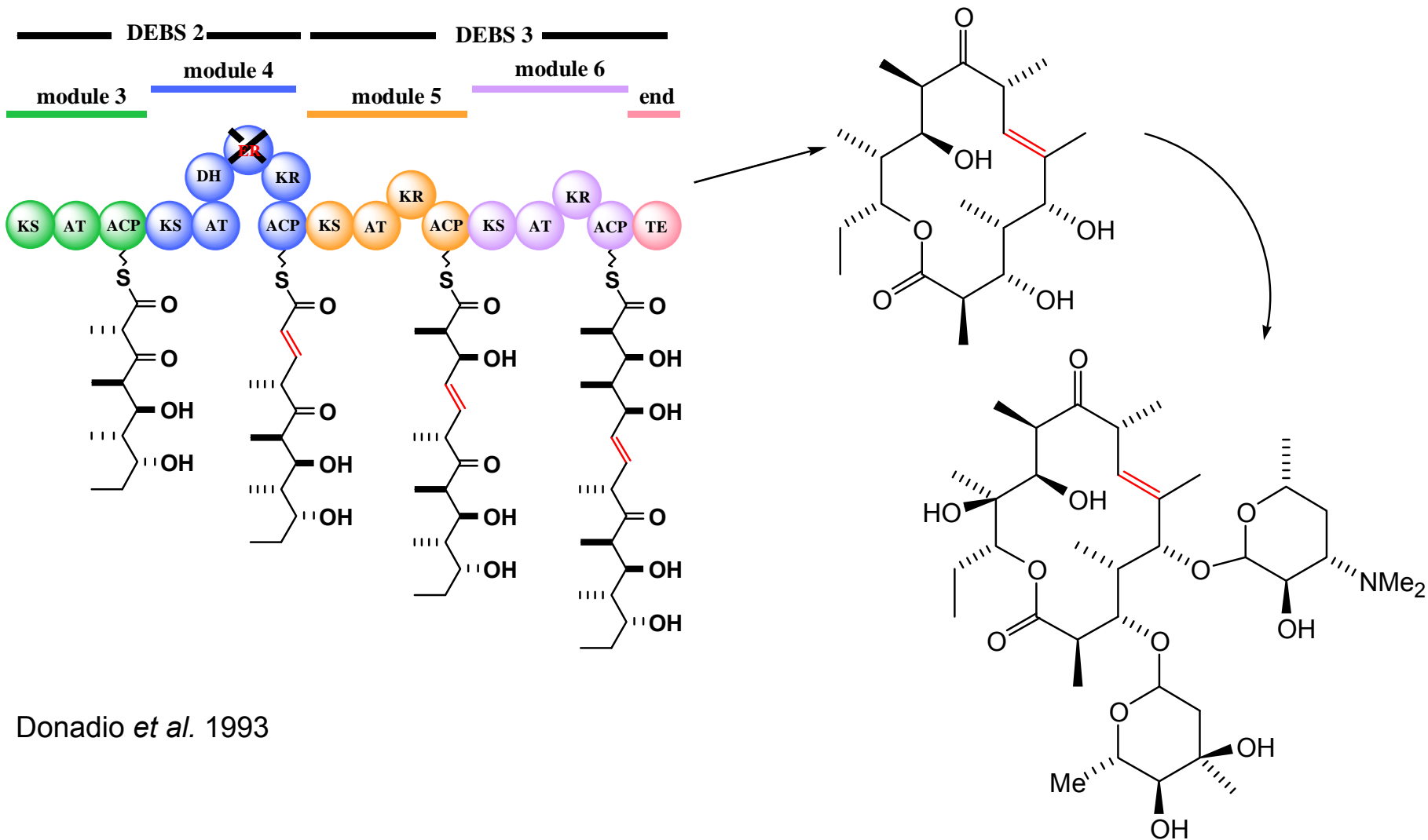


# ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΗΣ KR ΣΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ 5 ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ



Donadio *et al.* 1991: Το πρωτοποριακό πείραμα που αποκάλυψε την ενζυμική αρχιτεκτονική των PKS τύπου I και άνοιξε το δρόμο της συνδυαστικής βιοσύνθεσης. Η διαγραφή της KR προκαλεί την ακριβώς προβλεπόμενη δομική αλλαγή.

# ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΡ ΣΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ 4 ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ



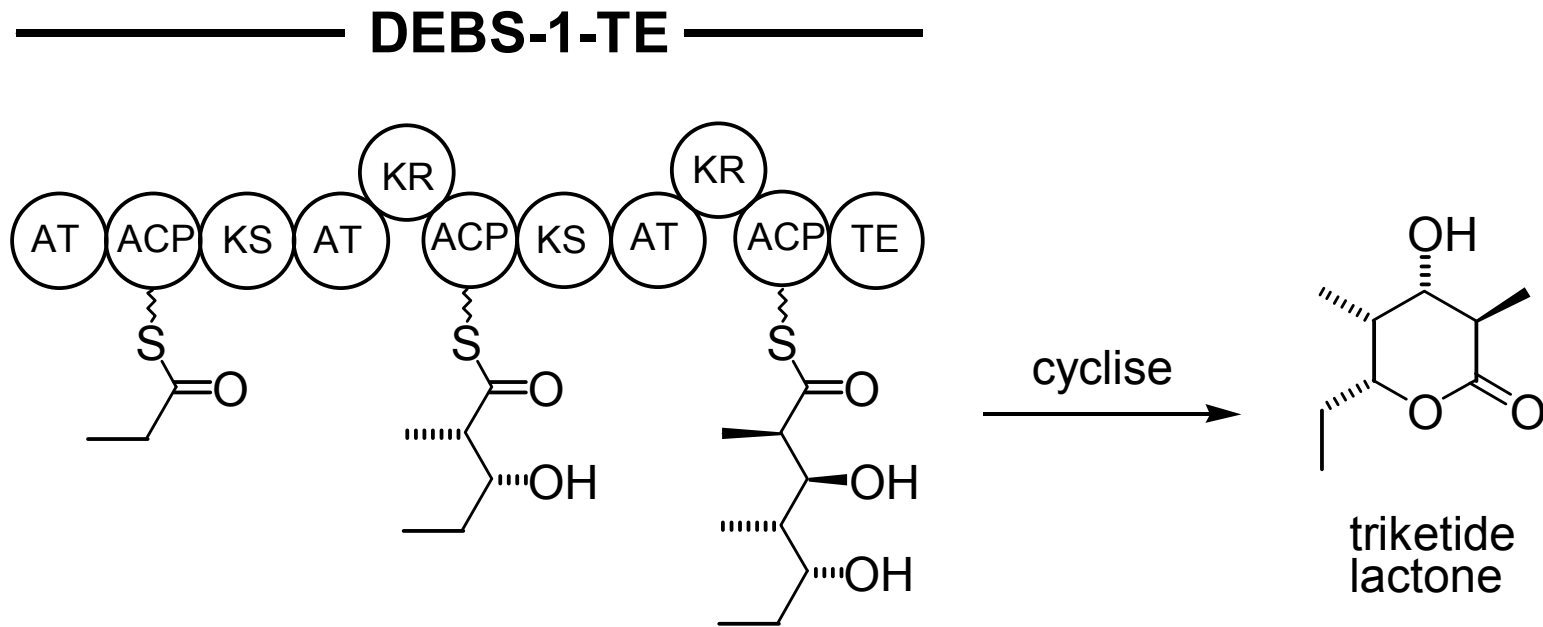
Donadio *et al.* 1993

# ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

## Biosynthetic engineering

- Τα παραπάνω πειράματα διαγραφής μίας ενζυμικής περιοχής σκοπό είχαν την μελέτη των ενζύμων PKS τύπου I, αλλά αποκάλυψαν τις τεράστιες δυνατότητες τις οποίες έχει οι γενετική μηχανική τέτοιων συστημάτων.
- Από τότε η έρευνα της γενετικής τροποποίησης των PKS έχει προσελκύσει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον.
- Μεθοδολογίες που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν τη διαγραφή περιοχών, μεταφορά περιοχών ή στοιχείων, ανάμειξη περιοχών ή στοιχείων δυο διαφορετικών PKS γονιδιακών συστημάτων, εμφύτευση νέων στοιχείων δραστηριοτήτων, αλλαγή ενζυμικής εκλεκτικότητας ή ειδικότητας. Παράγωγή πληθώρα αναλόγων πολυκετιδίων.
- Απομόνωση των αντιστοιχών πρωτεϊνών DEBS1, 2 και 3 και *in vitro* μελέτη.

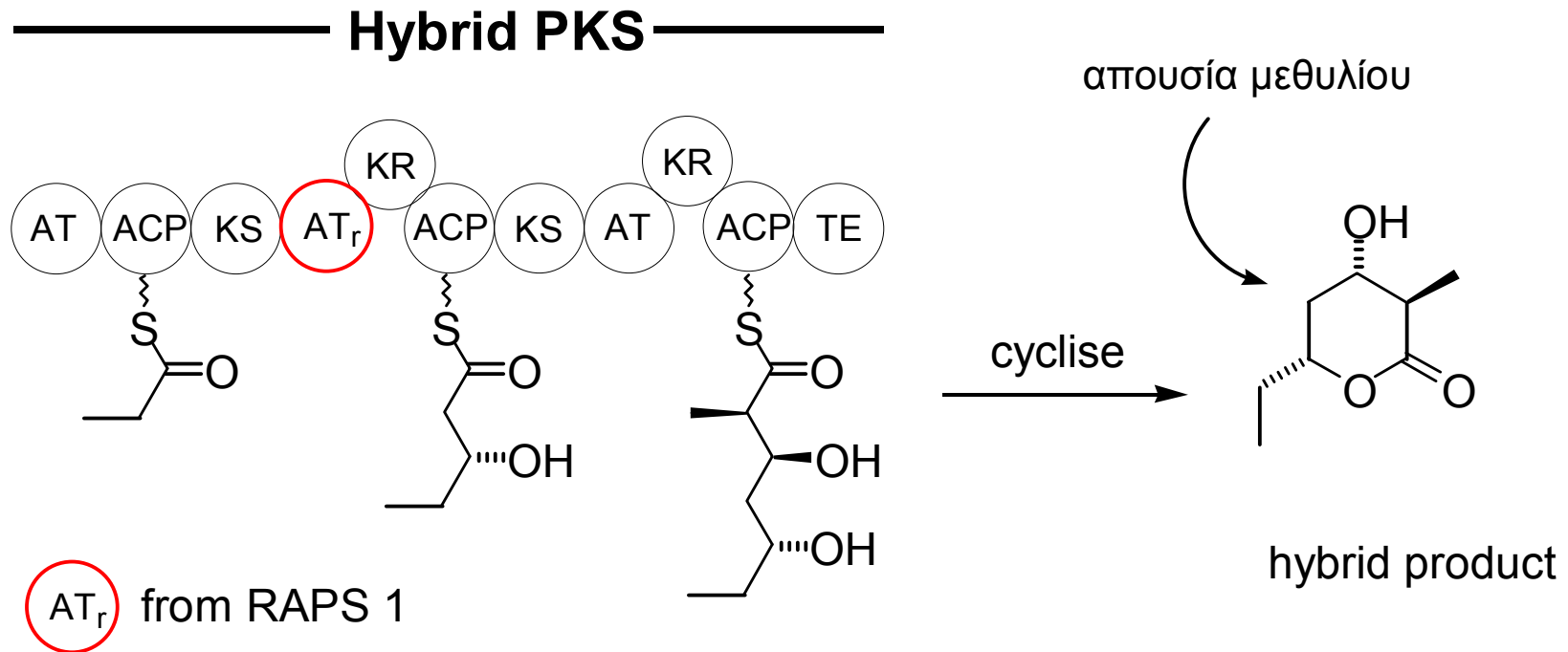
# ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΘΕΙΟΕΣΤΕΡΑΣΗΣ



Cortes *et al.*, 1995: Μεταφορά της θειοεστεράσης στο τέλος της DEBS1 και παραγωγή του τρικετιδίου αντί του επτακετιδίου. Εξαιρετικό μοντέλο μελέτης των PKS (δουλεύει και *in vitro*), παραγωγή αναλόγων στατίτης κτλ. Από τότε η TE έχουν επιτυχώς τοποθετηθεί στο τέλος του στοιχείου 3 και 5 δίνοντας τα αντίστοιχα τετρα-, εξα-κετίδια

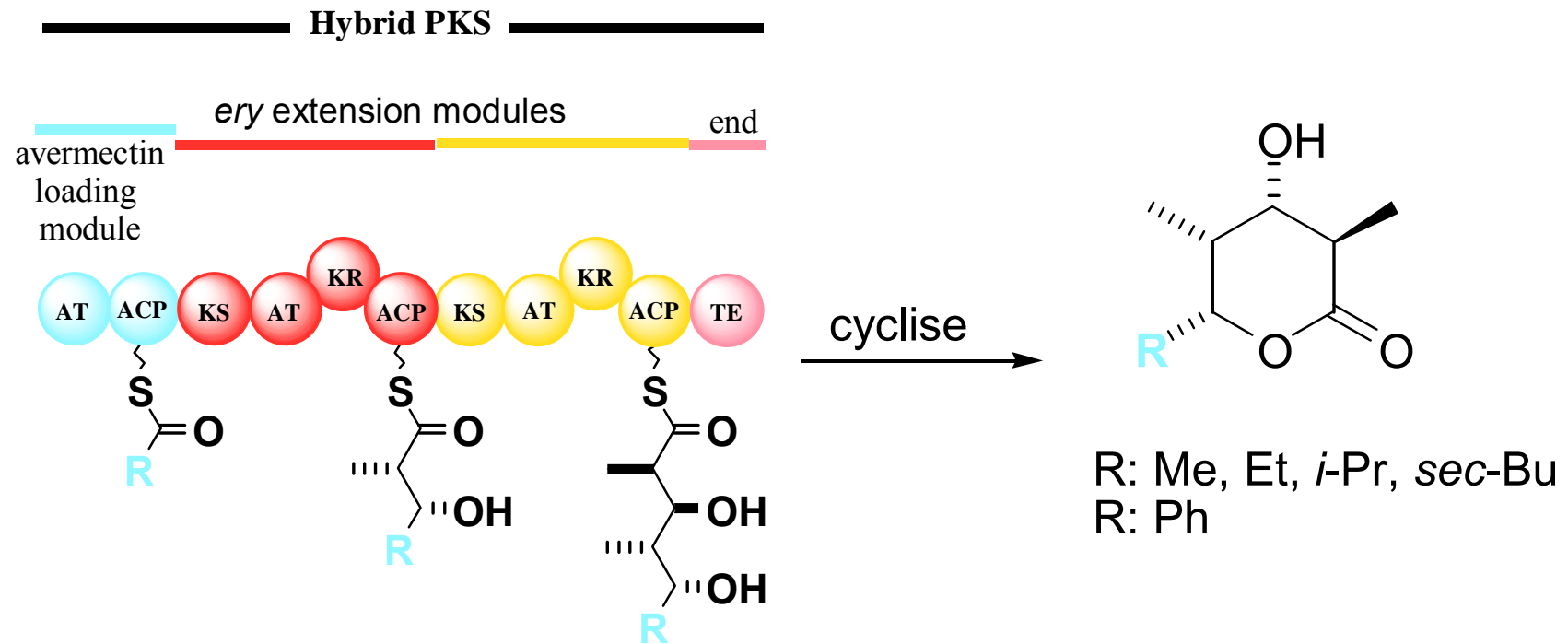


# ΥΒΡΙΔΙΚΗ PKS-ΑΛΛΑΓΗ ΔΟΜΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ



Oliynyk *et al.*, 1996: Αλλαγή δομικής μονάδας στη παραγωγή τρικετίδιου. Πληθώρα παραδειγμάτων αξιοποίησης διαφορετικών εκλεκτικότητων των AT.

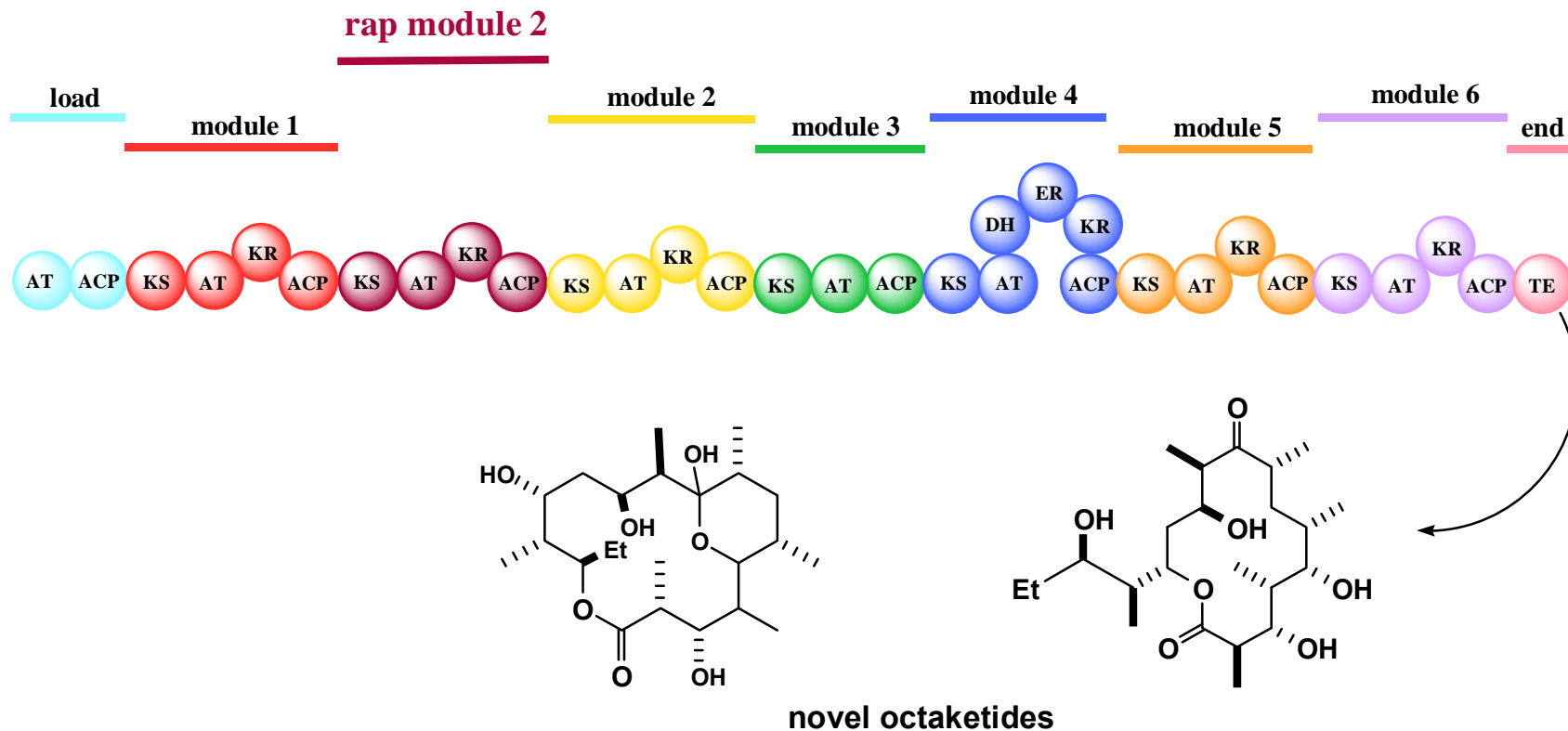
# ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗ DEBS1-TE



Jacobsen *et al.*, 1997: Εμφύτευση του στοιχείου φόρτωσης δομικής μονάδας από το γονίδιο της avermectin. Παραγωγή αναλόγων του τρικετίδιου.

Wilkinson *et al.*, 2001: Εμφύτευση του στοιχείου φόρτωσης δομικής μονάδας (Ph) από το γονίδιο του soraphen A

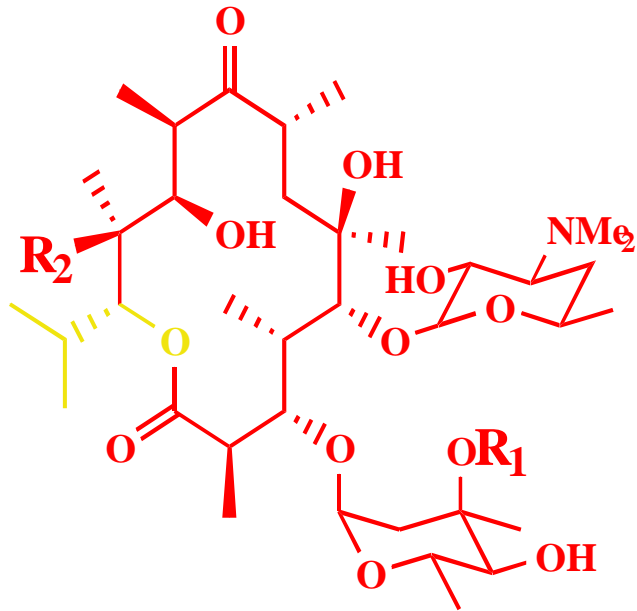
# ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ



- Rowe *et al.* 2001: Εμφύτευση ολοκλήρου στοιχείου από το γονίδιο της ραπαμκίνης και παραγωγή **νέων οκτακετιδίων μακρολιδίων** από καλλιέργειες *Saccharopolyspora erythroea*.

# ΥΒΡΙΔΙΚΕΣ ΡΚΣ

*Avermectin-erythromycin υβριδικά αντιβιοτικά*

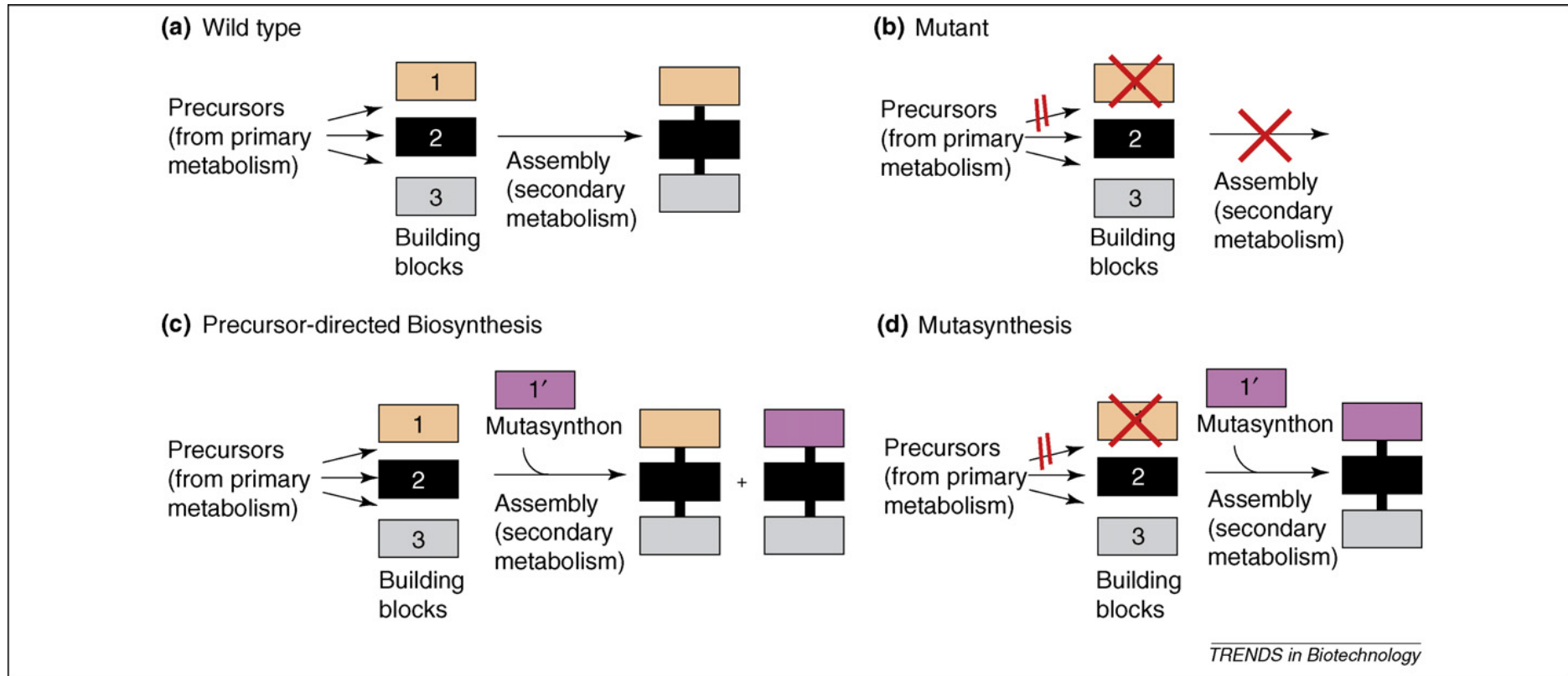


Ανάλογα της ερυθρομυκίνης  
A, B, D, με τουλάχιστον την  
ίδια δραστικότητα

$R_1 = \text{H or CH}_3,$

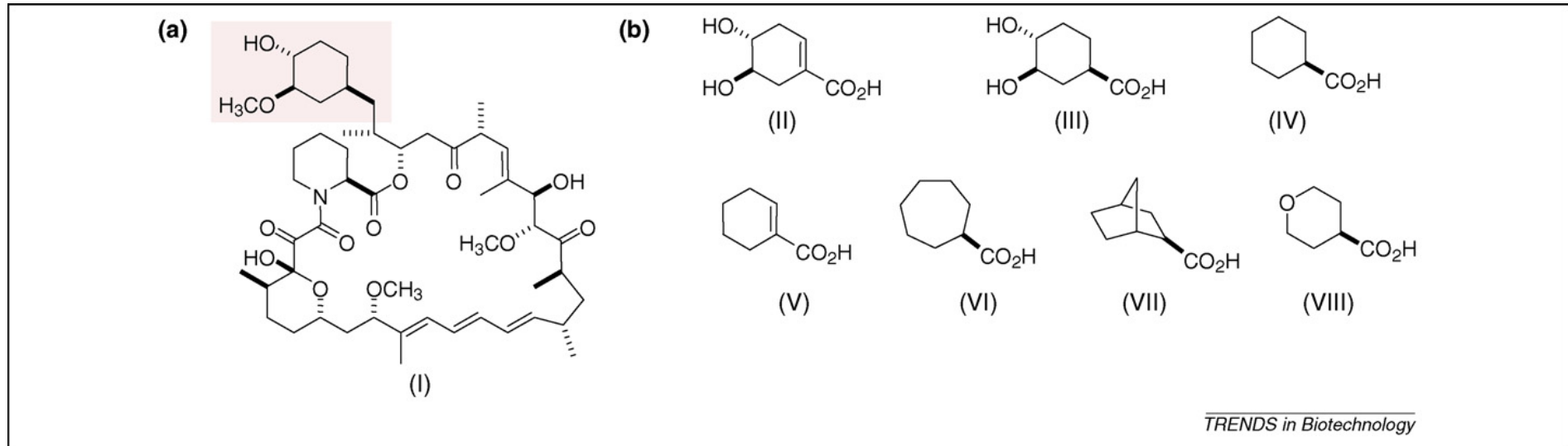
$R_2 = \text{H or OH}$

# Mutasynthesis

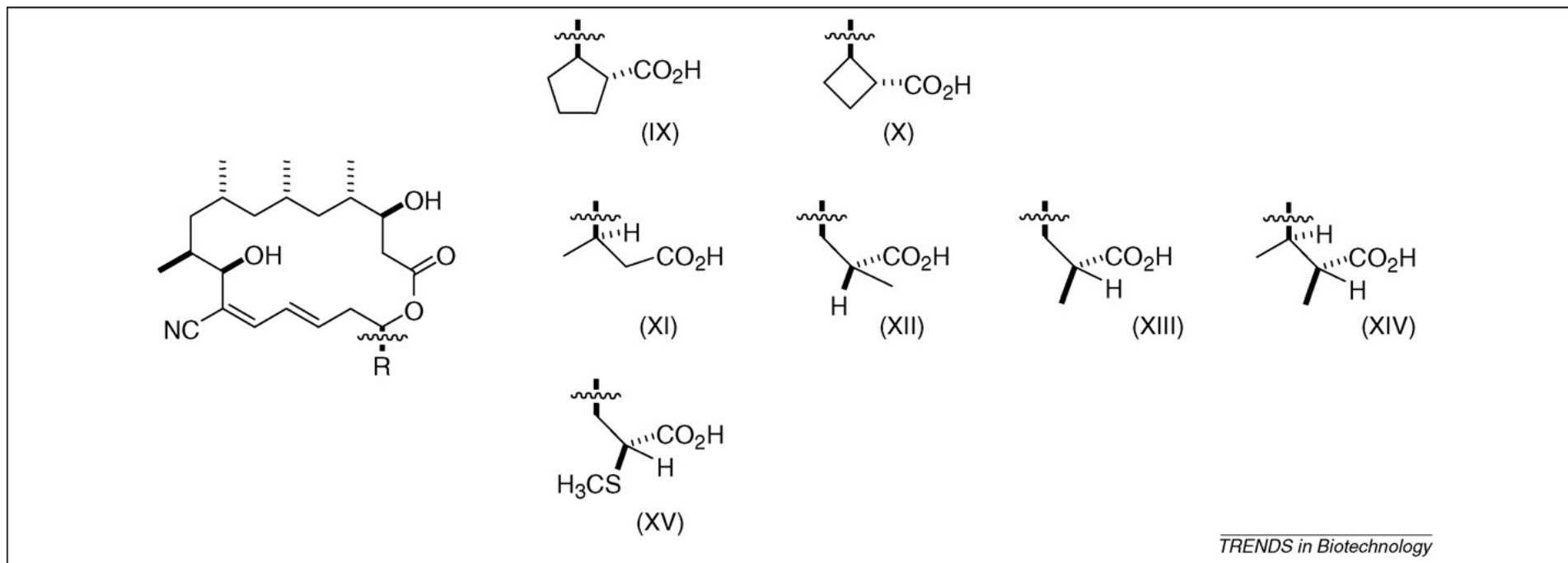


- (a) Wild type
- (b) Μεταλλαγμα στο οποίο η βιοσύνθεση έχει ανασταλεί σε κάποιο κρίσιμο στάδιο
- (c) Precursor-directed biosynthesis: στη καλλιέργεια προσθέτουμε ανάλογα (mutasynthon) των πρόδρομων ενώσεων – ανταγωνισμός με τις φυσικές πρόδρομες ενώσεις
- (d) Mutasynthesis: Μόνο τα ανάλογα παράγονται

# Rapamycin → Rapalogues



# Βελτιώνοντας το Borrelidin



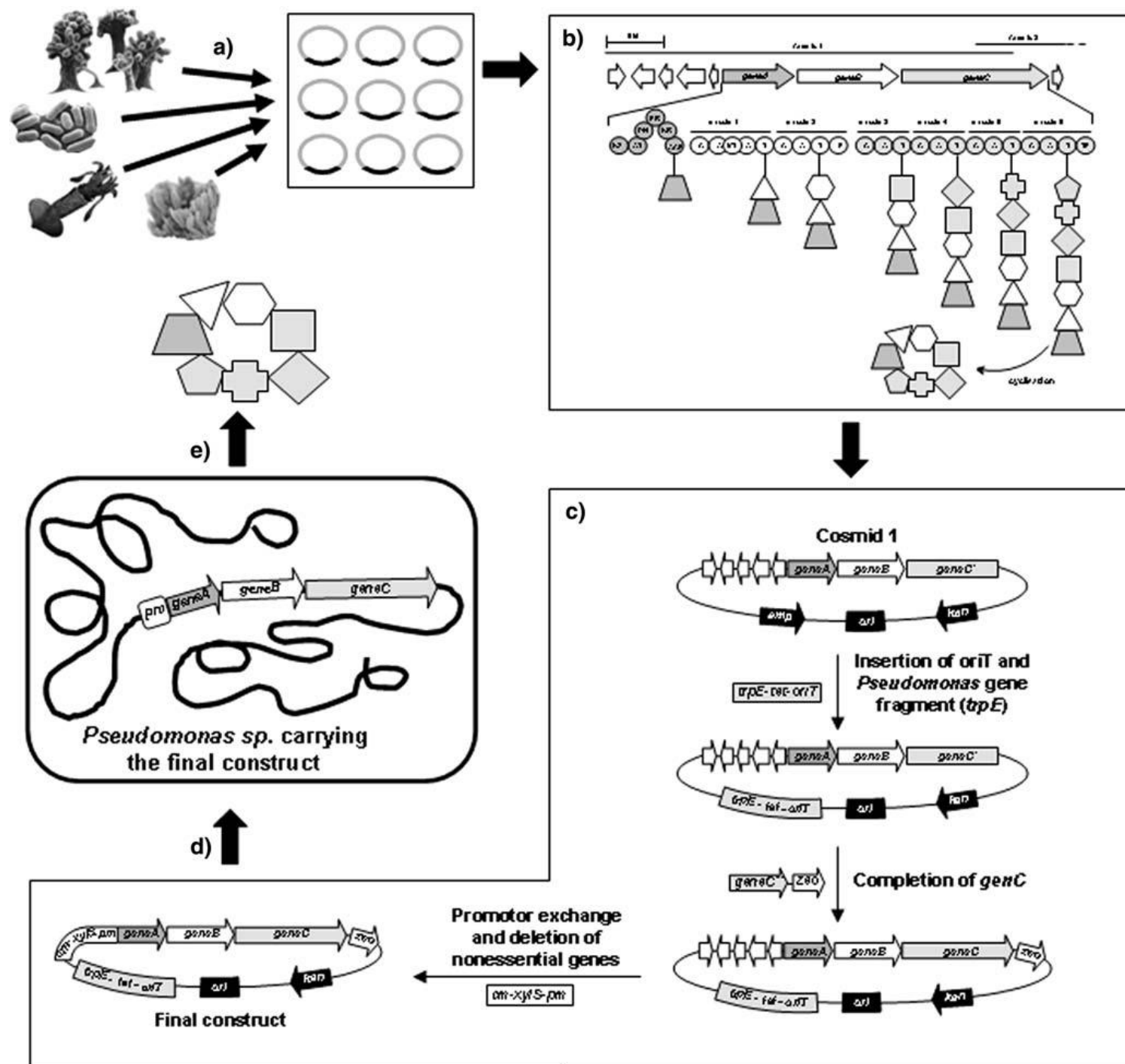
# ΣΥΝΔΙΑΣΤΙΚΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ (combinatorial biosynthesis)

- Συστήματα ετερόλογης έκφρασης
  - *Streptomyces coelicolor* CH999 (actinorodin defecient, τύπος II),
  - *Streptomyces lividans* K4-114 (actinorodin defecient, τύπος II),
  - *Saccharopolyspora erythraea* JC2 (ερυθρομυκίνη defecient, τυπος I)
  - *E.coli* με συν-έκφραση Prant – ενζύμων
  - *Myxococcus xanthus*
  - *Pseudomonas putida*
- Στα συστήματα ετερόλογης έκφρασης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν υπάρχουν?
  - Post-PKS ενζυμα
  - Φωσφωπαντοθεινικός βραχίονας



# Παράδειγμα μεθοδολογίας ετερόλογης έκφρασης σε *Pseudomonas putida*

- Μεθοδολογία ετερόλογης έκφρασης βιοσυνθετικών γονιδίων από μη διαθέσιμες πηγές ή δύσκολες πηγές.
  - Δημιουργία βιβλιοθηκών βιοσυνθετικών γονιδιωμάτων
  - Αναγνώριση και ανάλυση του γονιδιακού συγκροτήματος
  - Κλωνοποίηση σε κατάλληλη κατασκευή με υποκινητή κλπ
  - Μετασχηματισμός σε pseudomonad
  - Παραγωγή της ουσίας στον ετερόλογο ξενιστή



# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η συνδυαστική βιοσύνθεση δίνει τη δυνατότητα παραγωγής βιβλιοθήκης αναλόγων φυσικών προϊόντων με σχεδιασμένες αλλαγές στο επίπεδο των γονιδίων. Τεραστία δυναμική στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων
- Παντρεύει τη μοριακή βιολογία με τη συνθετική χημεία
- Επιθυμητή η δημιουργία βιοσυνθετικών βιβλιοθηκών δομικών μονάδων
- **Σχεδιασμός φαρμάκων:** Στο μέλλον ο σχεδιασμός φαρμάκων θα γίνεται με το ανακάτεμα και ταίριασμα γονιδίων κατά παραγγελία για τη δημιουργία νέων επιθυμητών ενώσεων. Αξιοποίηση του ενζυμικού συστήματος σαν μια μοριακή γραμμή παραγωγής

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Ανασκόπησης (Για τις εξετάσεις να διαβάσετε τα δυο πρώτα)

1. Amoutzias GD, Van de Peer Y, Mossialos D. Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and polyketide synthases. *Future Microbiol.* 2008;3:361-70.
2. Weissman KJ. Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 2007 ;25(4):139-42.
3. Bode HB, Müller R. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006;33(7):577-88.
4. Weissman KJ, Müller R. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg Med Chem.* 2009 ;17(6):2121-36.
5. Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(26):4688-716.
6. Staunton, J. and Weissman, K.J., **2001**. *Natural Products Reports*, 18, 380-416. (PKS)

# ΒΙΟΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Ερευνητικά

1. Donadio, S.; Staver, M. J.; McAlpine, J. B.; Swanson, S. J.; Katz, L. *Science* **1991**, *252*, 675-679.
2. Donadio, S.; McAlpine, J. B.; Sheldon, P. L.; Jackson, M.; Katz, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 7119.
3. Cortes, J.; Wiesmann, K. E. H.; Roberts, G. A.; Brown, M. J. B.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Science* **1995**, *268*.
4. Oliynyk, M.; Brown, M. J. B.; Cortes, J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 833-839.
5. Jacobsen, J. R.; Hutcinson, C. R.; Cane, D. E.; Khosla, C. *Science* **1997**, *277*, 367-369.
6. Wilkinson, C. J.; Frost, E. J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Chem. Biol.* **2001**, *151*, 1-12.
7. Hill, A., M., Harris, J. P., Siskos, A., P., **1998**. *Chem. Commun.*, 2361-2362.
8. Rowe, C. J., Bohm, I. U., Thomas, I. P., Wilkinson, B., Rudd, B. A.M., Foster, G., Blackaby, A. P., Sidebottom, P. J., Roddis, Y., Buss, A. D., Staunton, J., Leadlay, P. F., *Chemistry and Biology* **2001**, *8*, 475-485.
9. Siskos AP, Baerga-Ortiz A, Bali S, Stein V, Mamdani H, Spiteller D, Popovic B, Spencer JB, Staunton J, Weissman K, Leadlay PF (**2005**) Molecular Basis of Celmer's Rules: Stereochemistry of Catalysis by Isolated Ketoreductase Domains from Modular Polyketide Synthases. *Chem Biol*, 12(10): 1145-1153