

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programa

Airidas Bučelis
Magistrinis darbas

**Bioaktyvių medžiagų sintezės genų paieška antimikrobinio aktyvumu
pasižyminčiuose Kruberio-Voronja urvo mikroorganizmuose**

Darbo vadovė:
Prof. dr. Nomedą Kuisienė

Vilnius, 2019

**Bioaktyvių medžiagų sintezės genų paieška antimikrobinio aktyvumu
pasižyminčiuose Kruberio-Voronja urvo mikroorganizmuose**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos
katedroje

Darbą atliko:

Airidas Bučelis

Darbo vadovė:

Prof. dr. Nomeda Kuisienė

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Antibiotikai.....	7
1.2. Antibiotikų klasifikacija	7
1.3. Antimikrobinių medžiagų sintezės fermentai.....	9
1.4. Urvai	15
1.5. Mikroorganizmų įvairovė Krubera-Voronja urve	17
1.6. Antimikrobinės medžiagos urvuose	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	21
2.1 Medžiagos.....	21
2.1.1. Bakterijų kamienai.....	21
2.1.2. Medžiagos PGR ir PGR produktų vizualizavimui:	22
2.1.3. Komerciniai rinkiniai:	22
2.1.4. Kitos medžiagos	22
2.1.5. Mitybinės terpės	22
2.2 METODAI.....	23
2.2.1. Izoliatų kultūrų grynumo patikrinimas ir išgryninimas.....	23
2.2.2. Bakterijų genominės DNR skyrimas	24
2.2.3. Izoliatų priskyrimas kamienams naudojant BOX-PGR	24
2.2.4. Antimikrobinių medžiagų sintezės genų paieška PGR metodu.....	24
2.2.5. 16S rDNR PGR produkto pagausinimas	28
2.2.6. Elektroforezė	28
2.2.7. Antimikrobinių medžiagų sintezės genų ir 16S rDNR PGR produktų valymas	28
2.2.8. Antimikrobinių medžiagų sintezės genų ir 16S rDNR klonavimas	28
2.2.9. Plazmidinės DNR skyrimas.....	28
2.2.10. PGR produkto sekoskaita	29
2.2.11. Augimo kreivių braižymas	29
2.2.12. RNR skyrimas	29
2.2.13. cDNR sintezė.....	29
2.2.14. Tikro laiko PGR	29
3. REZULTATAI	30

3.1. Kamienų skaičiaus nustatymas	30
3.2. Antimikrobinių medžiagų sintezės genų paieška	32
3.3. PKS ir NRPS genų sekų analizė	35
3.4. 16S rRNR geno sekų palyginimas ir filogenetinis medis.....	36
3.5. Genų raiška	39
3.5.1. Kamienų augimo intensyvumo įvertinimas.....	39
3.5.2. Kokybinė raiškos analizė.....	41
3.5.3. Kiekybinė raiškos analizė.....	43
REZULTATŲ APTARIMAS	45
IŠVADOS.....	47
REZULTATŲ SKLAIDA	48
SANTRAUKA	49
SUMMARY	50
PADĖKA	51
LITERATŪRA.....	52

SANTRUMPOS

PKS – poliketidų sintazė

NRPS – neribosominių peptidų sintetazė

ACP – acilo grupę pernešantis baltymas

KS - β -ketosintazės

AT – aciltransferazės

KR – ketoreduktazė

DH – dehidratazė

ER – enoilreduktazė

kb – kilobazė

bp – bazių pora

PGR – polimerazės grandininė reakcija

Rpm – apsisukimų skaičius per minutę

IVADAS

Praėjus daugeliui dešimtmečių po to, kai pirmieji pacientai buvo išgydyti antibiotikais, bakterinės infekcijos vėl tapo didele grėsme. Atsparumo antibiotikams krizė siejama su jų pernelyg dideliu ir netinkamu vartojimu, bei naujų antimikrobinių medžiagų trūkumu (Ventola, 2015).

Šiuo metu žmogui patogeniškos bakterijos vis sparčiau įgyja atsparumą antimikrobinėms medžiagoms. Dėl šios priežasties ieškoma vis naujų medžiagų, kurioms pastarieji mikroorganizmai dar būtų jautrūs. Didžioji dauguma, šiuo metu rinkoje esančių antibiotikų buvo gauti iš sausumos organizmų, tačiau mikroorganizmų išskyrimas iš anksčiau neištyrinėtų buveinių gali nuvesti prie naujų atradimų, naujų struktūrų, turinčių antimikrobinį aktyvumą (Tortorella ir kt., 2018).

Viena iš tokių buveinių yra urvai. Tai vienos unikaliausių ir mažiausiai išstudijuotų ekosistemų žemėje, pasižyminčių itin oligotrofinėmis sąlygomis (Yasir, 2017). Atšiauriuose sąlygose gyvenantys mikroorganizmai reaguoja į aplinkos iššūkius produkuodami biologiškai aktyvius antrinius metabolitus (Covington ir kt., 2018). Šie antriniai metabolitai yra mažos molekulinės masės produktai, kurie nėra būtini mikroorganizmų augimui, tačiau naudojami išgyvenimui konkurencinėje aplinkoje (Vining, 1992). Šios molekulės be galo svarbios ir žmogui, kadangi joms priklauso antibiotikai, priešvėžiniai, cholesterolį mažinantys vaistai (Ruiz ir kt., 2010). Nepaisant didelio potencialo išgauti bioaktyvias medžiagas iš urvo mikroorganizmų, yra per mažai žinoma apie konkrečius cheminius junginius, pasižyminčius bioaktyvumu.

Tuo remiantis buvo suformuluotas šio **darbo tikslas** - nustatyti poliketidų sintazių ir neribosominių peptidų sintetazių genus kamienuose, izoliuotuose iš Kruberio-Voronja urvo ir atlikti jų raiškos analizę.

Darbo tikslui pasiekti buvo iškelti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti kamienų skaičių.
2. Atlikti bioaktyvių medžiagų sintezės genų paiešką PGR būdu.
3. Nustatyti bioaktyvių medžiagų sintezės genų sekas.
4. Identifikuoti kamienus remiantis 16S rRNR geno analize.
5. Atlikti aptiktų genų raiškos analizę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Antibiotikai

S.Waksman pirmasis pavartojo žodį *antibiotikas* 1941 metais, kad apibūdintų molekulę, sintetinamą mikroorganizmų ir slopinančią kitų mikroorganizmų augimą (Clardy, 2010). Šiuolaikinės medicinos ateitis priklauso nuo veiksmingų antibiotikų, maždaug du trečdaliai medicininėje praktikoje naudojamų antibiotikų yra natūralūs produktai, arba jų pusiau sintetiniai dariniai, todėl nerimą kelia tai, kad pastaraisiais metais naujų natūralių antimikrobinų medžiagų aptikimas sumažėjo. Ir nors iš pirmo žvilgsnio antibiotikų paieška atrodo nesudėtinga - nes unikalių, esminių taikinių turėtų būti pakankamai, tačiau antibiotikų vystymo istorija rodo kitaip. Nuo 1930 iki 1962 metų pasaulis aptiko daugiau nei 20 antibiotikų klasių, tačiau nuo to laiko buvo panaudotos tik dvi naujos antibiotikų klasės ir nė viena jų neturėjo didelio efektyvumo (Coates, 2011, Michael, 2009).

Yra trys pagrindiniai keliai, kuriais gaunamos antimikrobinės medžiagos (Hugo ir Russell's, 2004):

- Natūralūs antibiotikai – natūralūs, bakterijų sintetinami produktai, kurie yra pagrindinis antibiotikų šaltinis dabartiniame klinikiame panaudojime (Wright, 2014). Pavyzdžiui, bacitracinas ir polimiksinas yra gaunami iš kai kurių *Bacillus* rūšių, streptomocinas ir tetraciklinas iš *Streptomyces* rūšių (Hugo ir Russell's, 2004).
- Pusiau sintetiniai antibiotikai – antibiotikai, kurių molekulės dalis yra sintetinama fermentacijos proceso metu naudojant atitinkamą mikroorganizmą ir produktas toliau modifikuojamas cheminiu būdu. Šiuo metu daugybė pusiau sintetinių antibiotikų, kurie paremti natūraliais mikroorganizmų produktais (Fair ir Tor, 2014, Hugo ir Russell's, 2004).
- Sintetiniai antibiotikai–antibiotikai, kurie sintetinti natūralių antibiotikų pagrindu. Taip siekiama išgauti efektyvesnes ir mažiau toksiškas antimikrobines medžiagas. Visgi, sintetiniai antibiotikai yra reti ir mažiausiai naudojami (Fair ir Tor, 2014, Hugo ir Russell's, 2004).

1.2. Antibiotikų klasifikacija

Antibiotikų atradimas leido tikėtis, kad infekcijos pagaliau gali būti sukontroliuotos, tačiau jos vis dar yra pagrindinė mirčių priežastis besivystančiame pasaulyje. Taip yra dėl naujų ligų atsiradimo, kadaisė sukontroliuotų ligų grįžimo ir ypač dėl atsparumo antimikrobinėms

medžiagoms atsiradimo. Manoma, kad antimikrobinis atsparumas visiems naujiems vaistams yra neišvengiamas ir laikomas pagrindine problema infekcijų gydyme (Kapoor ir kt., 2017).

Dauguma antimikrobinų medžiagų, naudojamų bakterinių infekcijų gydymui, gali būti suskirstytos pagal veikimo mechanizmą. Yra keturi pagrindiniai veikimo būdai:

- ląstelės sienelės sintezės sutrikdymas,
- baltymų sintezės slopinimas,
- nukleorūgščių sintezės slopinimas,
- metabolinių kelių slopinimas (Tenover, 2006).

Bakterijų ląstelės sienelės sintezės inhibitoriai. Bakterijų ląstelių sienelių peptidoglikano sluoksnio biosintezė yra puikus antimikrobinų medžiagų taikinytis, ir tai yra kliniškai svarbių penicilino ir vankomicino klasių antibiotikų veikimo vieta (Winn ir kt., 2010). Penicilinai - tai antimikrobiniai vaistai, kurie žudo jautrias bakterijas, slopindami jų peptidoglikano sintezę. Peptidoglikano biosintezė susideda iš 3 etapų. Pirmieji du etapai vyksta citoplazmoje, tuo tarpu galutinis etapas vyksta už ląstelės ribų, Trečiajame etape nauji subvienetai pridedami prie augančio peptidoglikano. Gretimai esančios peptido glikano grandinės yra sujungiamos per jų šonines grandines. Šią reakciją katalizuoja transpeptidazė, dar vadinama penicilinus prisijungiančiu baltymu, kuri suformuoja jungtį tarp prieš paskutinės D-Ala ir L-Gly (arba Lys) aminorūgščių. Čia ir efektyvus penicilinų veikimo mechanizmas. Penicilinai ypatingi chemine struktūra, vadinama β -laktamo žiedu, ši struktūra leidžia penicilinams prisirišti prie fermentų, kurie sujungia peptido glikanus ir taip stabdyti ląstelės sienelės sintezę (Guilhelmelli ir kt., 2013, Soares ir kt., 2012).

Bakterijų baltymų sintezės inhibitoriai. Baltymų biosintezę vykdo ribosomos. Bakterijų 70S ribosomos susideda iš dviejų ribonukleoproteinų subvienetų, 30S ir 50S (Kapoor ir kt., 2017). Medžiagos, slopinančios baltymų sintezę, priklauso įvairioms antibiotikų klasėms ir gali būti suskirstytos į dvi klases – 50S inhibitoriai ir 30S inhibitoriai (Kohanski, 2010). Makrolidai, aminoglikozidai, tetraciklinai, chloramfenikolis, streptograminai ir oksazolidinonai pasižymi antibakteriniu aktyvumu inhibuodami būtent baltymų sintezę. Makrolidai, aminoglikozidai ir tetraciklinai jungiasi prie 30S ribosomos subvieneto, o chloramfenikolis - prie 50S subvieneto (Mehta ir kt., 2002, Tenover, 2006).

Bakterijų DNR sintezės inhibitoriai. Bakterijų chromosominė DNR yra smarkiai supakuota, superspiralizacijos būsenoje ir pakeičia struktūrą vykstant replikacijai. DNR sintezei ir RNR transkripcijai yra reikalingos topoizomerazės, kurios įvesdamos trūkius DNR grandinėse padeda pašalinti superspiralizaciją. Šias reakcijas išnaudoja antimikrobinės medžiagos, chinolonai, kurių taikiniai yra DNR topoizomerazės kompleksai. Viduląsteliniai chinolonų taikiniai yra dvi DNR

topoizomerazės – girazė ir topoizomerazė IV. Girazė yra pirminis taikinyš Gram–neigiamose bakterijose, tuo tarpu topoizomerazė IV paprastai inhibuojama Gram-teigiamose bakterijose. Fluorochinolonai pasižymi antimikrobiniu aktyvumu sutrikdydami DNR sintezę ir sukeldami dvigrandės DNR grandinės trūkius replikacijos metu. Tuo tarpu sulfonamidai ir trimetoprimai blokuoja folio rūgšties sintezės kelią, kuris galiausiai inhibuoja DNR sintezę (Aldred ir kt., 2014, Drlice ir kt., 2007, Tenover, 2006).

DNR girazė susideda iš dviejų A ir dviejų B subvienetų. Subvienetas A vykdo DNR grandinės kirpimą, subvienetas B pasižymi ATPaziniu aktyvumu. Fluorochinolonas rišasi prie subvieneto A aukštu giminingumu ir trukdo jo kirpimo bei atsipalaidavimo funkcijoms. Gram-teigiamose bakterijose pagrindinis taikinyš yra topoizomerazė IV, kuri įkerpa ir atskiria komplementarią DNR grandinę po DNR replikacijos. Didesnis giminingumas šiam fermentui gali suteikti efektyvesnę poveikį prieš Gram-teigiamas bakterijas. Tuo tarpu žinduolių ląstelėse, vietoje DNR girazės ar topoizomerazės IV yra topoizomerazė II, kurios labai žemas giminingumas fluorochinolonui, todėl šis junginys yra mažai toksiškas ląstelėms (Collin ir kt., 2011, Drlica ir kt., 2007, Kohanski, 2010).

Metabolizmo inhibitoriai. Ilgiausiai naudojami antimikrobiniai preparatai yra sulfonamidai. Šiuo metu yra naudojami sulfametoksazolas, kuris naudojamas kombinacijoje su trimetoprimu. Šios antimikrobinės medžiagos, naudojamos kartu, tampa baktericidinės. Kiekviena medžiaga slopina skirtingus folio rūgšties metabolizmo etapus. Pavyzdžiui, sulfametoksazolas slopina dihidropterato sintazę folio rūgšties sintezės kelyje, turėdamas didesnę giminingumą fermentui, nei jo natūralūs substratas. Taigi nebaigtas produktas negali būti substratu sekančiam fermentui. Kadangi žmogus neturi dihidropterato sintazės, šie vaistai veikia specifiskai prieš bakterijas (Yoneyama ir Katsumata, 2006).

Trimetoprimas inhibuoja dihidrofolato reduktazę, kuri reikalinga deoksitimidilato, purino nukleotidų, aminorūgščių (glicino ir metionino) sintezei. Priešingai nei dihidropterato sintazė, dihidrofolato reduktazė yra būtina visiems organizmams. Trimetoprimas slopina dihidrofolato reduktazę konkuruodamas ir yra iki 100 000 kartų aktyvesnis prieš bakterijų fermentus, todėl pasižymi dideliu selektyvumu (Yoneyama ir Katsumata, 2006).

1.3. Antimikrobinių medžiagų sintezės fermentai

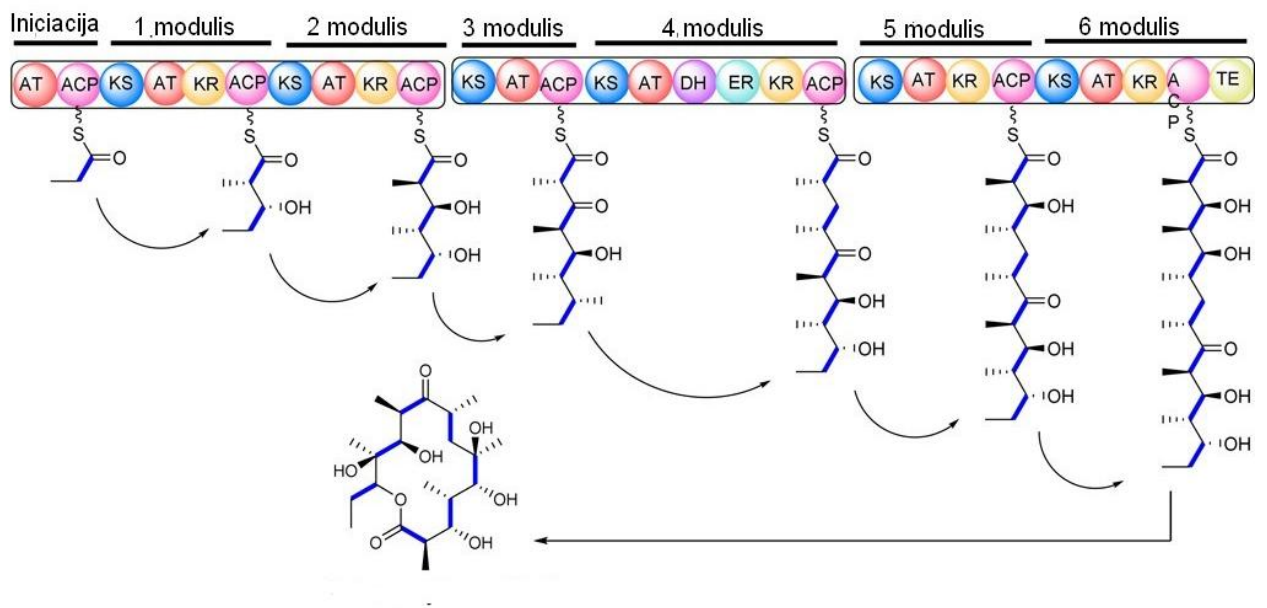
PKS ir NRPS atlieka labai svarbų vaidmenį daugelio bakterijų antriniame metabolizme. Priešingai nei pirminiai metabolitai, antriniai nedalyvauja normaliame mikroorganizmų augimo

cikle ir yra produkuojami antrinių metabolinių kelių, kurie veikia nepriklausomai nuo pirminių metabolinių kelių (Tamano, 2014).

NRPS ir PKS - tai daugiafermentės, daugiadomenės megasintazės, kurios dalyvauja neribosominių peptidų ir poliketidų biosintezėje. Poliketidai apima didelę klasę natūralių, skirtingą cheminę struktūrą turinčių produktų, kurie leidžia veikti itin svarbiose biologinėse ir farmakogeninėse srityse. Poliketidus sintetina fermentai, žinomi kaip PKS, kurios yra suklasifikuotos į tris atskiras grupes – I tipo PKS, II tipo PKS ir III tipo PKS, priklausomai nuo struktūros (Ray, 2017).

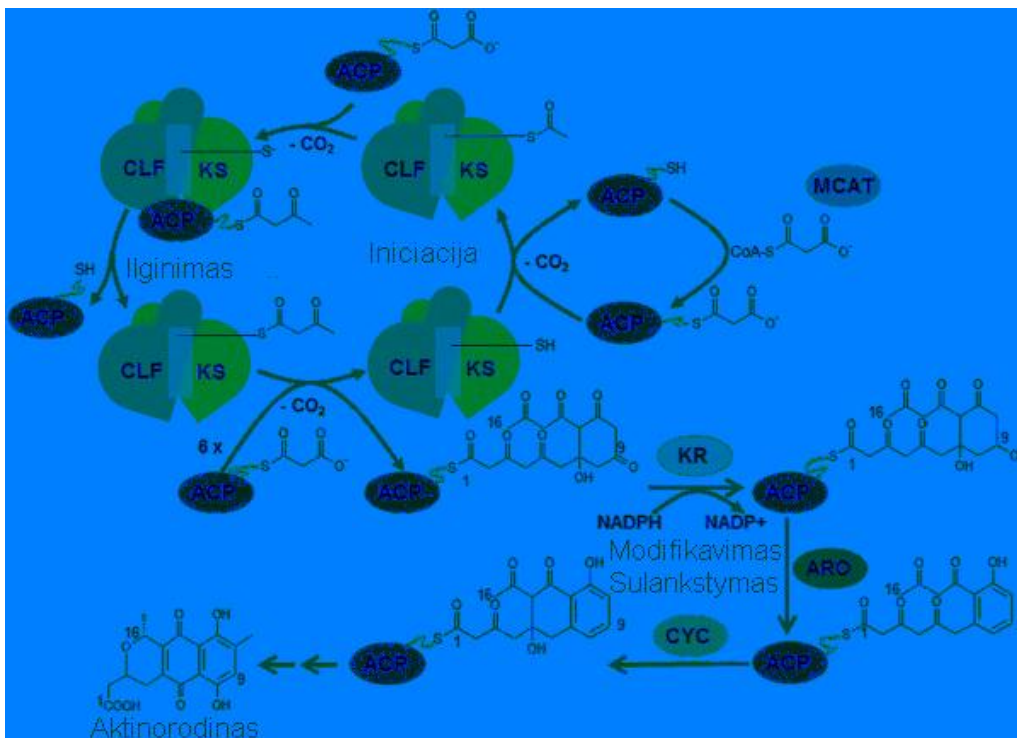
PKS modulių pagrindinis vienetas susideda iš β -ketosintazės (KS), aciltransferazės (AT) ir acilo grupę pernešančio baltymo (ACP). KS domenas gauna augančią poliketido grandinę iš prieš jį esančio domeno ir katalizuoja grandinės elongaciją su ACP. AT domenas atsakingas už tinkamo bloko (malonil- arba metilmalonil-CoA) parinkimą kiekviename grandinės elongacijos cikle, kuris perkeliamas ant tam skirtą ACP domeno, esančio tame pačiame modulyje (Mathews ir kt., 2017). Be to, moduliai taip pat gali turėti domenus, kurie iš eilės modifikuoja β -keto grupę į hidroksilą (ketoreduktazė, KR), dvigubą jungtį (dehidratazė, DH), arba viengubą jungtį (enoilreduktazė, ER) (Dutta ir kt., 2014).

I tipo PKS. Modulinės PKS bakterijose atsakingos už didelės dalies natūralių bioaktyvių junginių sintezę. Tai itin didelės sintazės, susidedančios iš multi domenų, kuriuose yra visa eilė aktyvių vietų skirtingiems PKS etapams (Chen ir kt., 2006, Gomes, 2013). I tipo PKS apima kelis, nuosekliai vienas po kito veikiančius modulius, kurių kiekvienas susideda iš prailginimo, prijungimo domenų. Taigi sistema veikia moduliniu būdu (1 pav.), kuomet kiekvienas modulis yra atsakingas tik už vieną, grandinės pailgėjimo reakciją ir sekančio β -keto apdorojimą prieš perduodant besiformuojantį poliketidą ant sekančio modulio, kuris atlieka grandinės ilginimo ir apdorojimo etapus. Tokių natūralių junginių, gautų iš multikatalizinių fermentų, pavyzdžiai yra makrolidai ir polienai (Chen ir Du, 2016).



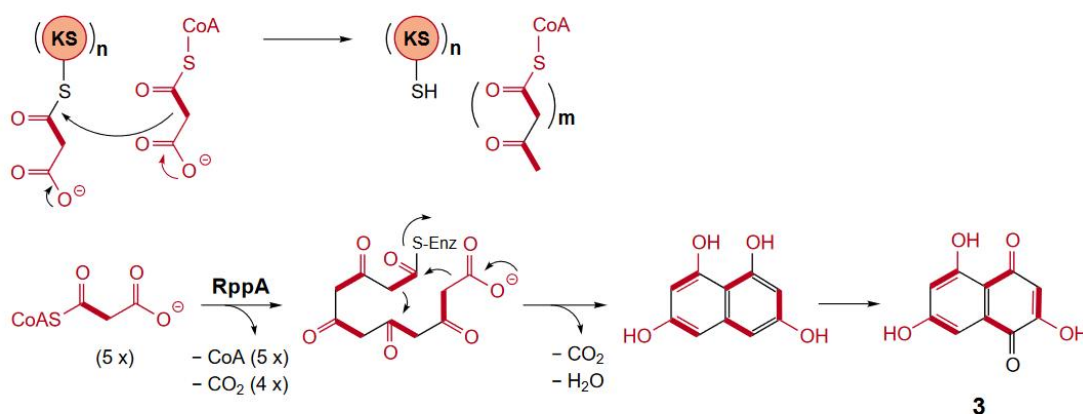
1 pav. I tipo PKS struktūra pagal Chen ir Du (2016).

II tipo PKS. Susideda iš atskirų mono ir bifunkcionalių fermentų, kurie sąveikauja sintezės metu tam, kad suformuotų poliketido struktūrą (2 pav.). Tuomet ši struktūra fermentiškai verčiama į ciklinę formą ir produkuojami policikliniai aromatiniai junginiai, pavyzdžiui tetraciklinas ar doksorubicinas (Gomes, 2013). Heterodimerinės ketosintazės (KS) ir grandinės ilgio faktoriaus (CLF) domenai katalizuoja grandinės iniciaciją ir ilgėjimą. ACP domenai pristato statybinius blokus KS-CLF, o MCAT domenai tiekia malonilo grupes ACP domenui. Komandinis šių II tipo PKS domenų veikimas sąlygoja tarpinių poli- β -keto produktų formavimąsi. Taigi, atsirandanti poliketido grandinė yra modifikuojama, sulankstoma pasitelkiant fermentų domenus KR, ARO ir CYC. KR domenai redukuoja karbonilo grupę specifinėje poliketido grandinės padėtyje, tuo tarpu ARO ir CYC domenai kontroliuoja grandinės susilankstymą (Kim ir Yi, 2012).



2 pav. II tipo PKS struktūra ir veikimo mechanizmas pagal Kim ir Yi (2012).

III tipo PKS. Dar vadinami chalkono sintazėm, yra sąlyginai nedideli baltymai, kurie pagrinde įtraukti į svarbių augalų junginių, tokių kaip flavanoidai, stilbenai (fenoliai) gamybą. Anksčiau manyta, jog III tipo PKS egzistuoja tik augaluose, tačiau tyrimai parodė, jog šios sintazės plačiai paplitusios ir bakterijose bei grybuose. Priešingai nei kitos poliketidų sintazės, PKS III poliketidų tarpiniai produktai yra susiję per laisvuosius kofermentus A-tioesterius, o ne fermentiškai. III tipo PKS (3 pav.), tai homodimeriniai fermentai, kur kiekvieno monomero aktyvi vieta katalizuoja reakcijos pradžios, grandinės ilgėjimo ir ciklizavimo reakcijas, jog suformuotų poliketidą. Iš visų trijų tipų PKS, geriausiai išstudijuotas yra I tipo PKS kelias (Gomes, 2013).



3 pav. III tipo PKS struktūra ir veikimo mechanizmas pagal Gomes (2013).

Neribosominių peptidų sintetazės

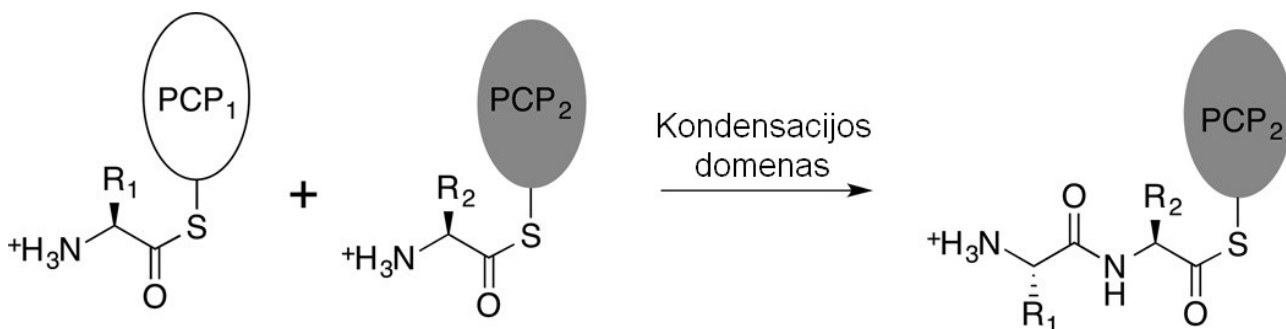
Mikroorganizmai produkuoja begalę nedidelių bioaktyvių peptidų, kurių dauguma yra sintetinami daugiafunkcionalių megasintazių, dar žinomų kaip neribosominių peptidų sintetazės (NRPS). Šie peptidai, tai biosurfaktantai, vaistai, fungicidai. Neribosominiai peptidai nuo polipeptidų, sintetinamų su ribosomų pagalba, skiriasi savo ilgiu, jie yra trumpesni (Gao ir kt., 2018).

NRPS paprastai susideda iš visos eilės specifines aminorūgštis įkorporuojančių modulių, kurių kiekvieną sudaro trys kataliziniai domenai:

- Kondensacijos domenai jungia aktyvuotas aminorūgštis į augančią peptidinę grandinę.
- Adenilimo domenai selektyviai aktyvuoja specifines aminorūgštis
- Peptidą pernešančio baltymo domenai suriša aktyvuotas aminorūgštis ir augančias peptidines grandines per kofaktorių 4'-fosfopantetėiną.
- Tioesterazės domenai, paprastai esantis paskutiniame modulyje, jo funkcija yra paleisti produktą (Gao ir kt., 2018).

Kondensacijos domenai

Kondensacijos domenai, paprastai esantis modulio N gale, katalizuoja amidinės jungties formavimąsi tarp aminorūgščių "blokų" (4 pav.). Kondensacijos domenai perkelti aminorūgštį, arba peptidą nuo baltymo nešiklio domeno ant substrato amino grupės, taip perkeliama augančią aminorūgščių grandinę ant toliau esančio PCP domeno (Conduro ir Bruner, 2012, Miller ir Gulick, 2016).

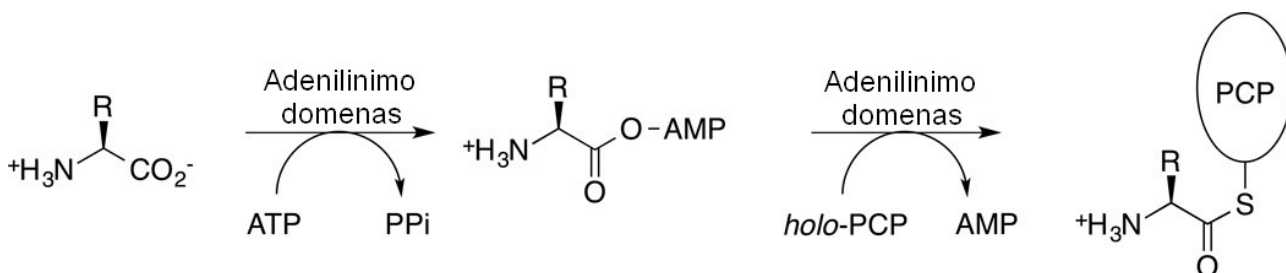


4 pav. NRPS kondensacijos domeno katalizuojama reakcija pagal Miller ir Gulick (2016).

Dažniausiai, kondensacijos domenai rišasi prie prieš jį esančio PCP donoro ir už jo esančio PCP akceptorius. Kai kuriais atvejais, ypač kondensacijos pradžios domenuose naudojamas substratas, kuris nesiriša prie PCP (Miller ir Gulick, 2016).

Adenilinimo domenas

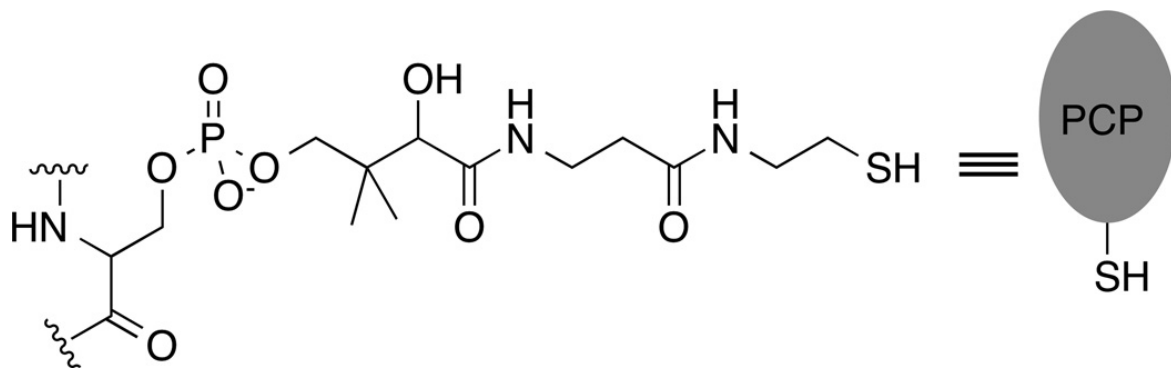
Neribosominių peptidų sintetazių adenilinimo domenai atlieka pagrindinį vaidmenį peptidų biosintezėje. Adenilinimo domenas, tai pirmasis domenas, su kuriuo susiduria substratas prieš prijungiant jį prie atsirandančio peptido produkto. Adenilinimo domenai katalizuoja dviejų žingsnių reakciją (5 pav.), kuri aktyvuoja amino acil substratą kaip adenilatą. Po to seka aminorūgšties perkėlimas ant peptidą pernešančio baltymo domeno pantateino kofaktoriaus (Miller ir Gulick, 2016).



5 pav. NRPS adenilinimo domeno katalizuojama reakcija pagal Miller ir Gulick (2016).

Peptidą pernešančio baltymo domenas

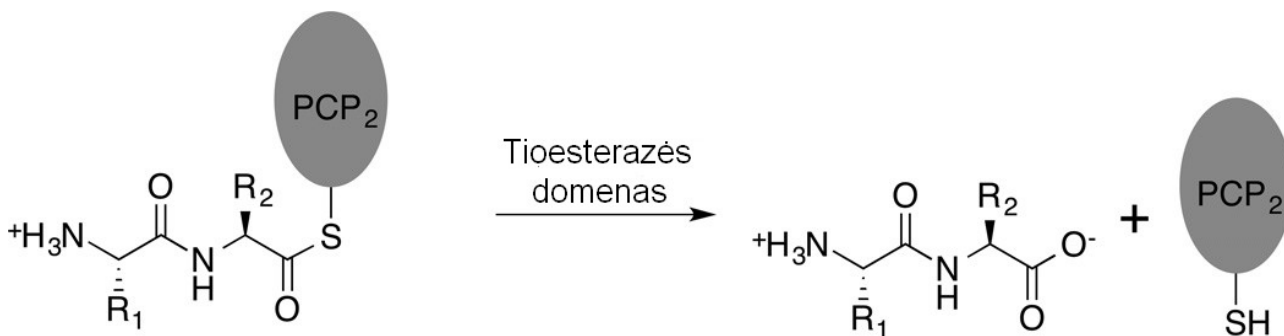
Tai domenas, funkciniu požiūriu homologiškas ACP domenui, kuris dalyvauja poliketidų ir riebalų rūgščių biosintezėje. Šie domenai (6 pav.), naudojami substratų ir peptidų tarpinių produktų judėjimui tarp skirtingų katalizinių domenų. Peptidą pernešančio baltymo domenai yra mažiausi NRPS domenai, paprastai tik 70-90 aminorūgščių ilgio. PCP domenai turi konservatyvią serino liekaną, kuri tarnauja kaip kovalentinio modifikavimo vieta su fosfopanteteino kofaktoriumi, kuris gaunamas iš kofermento A. Fosfopanteteino grupės tiolis kovalentiškai rišasi prie aminorūgšties, o peptido substratas rišasi su aminorūgšties karboksi grupe (Concurso ir Bruner, 2012, Miller ir Gulick, 2016).



6 pav. Fosfopanteteino kofaktoriaus prijungto prie PCP konservatyvios serino liekanos cheminė struktūra pagal Miller ir Gulick (2016).

Tioesterazės domenas

Paskutiniame NRPS modulyje, paskutinio kondensacijos domeno aktyvumas katalizuoja peptido perkėlimą ant aminorūgšties substrato (7 pav.), kuris prikabintas prie PCP domeno galo. Norint atpalaiduoti peptidą ir atlaisvinti NRPS fermentą sekančiai sintezei, tioesterazės domenas yra būtinas (Miller ir Gulick, 2016).



7 pav. Tioesterazės katalizuojama reakcija pagal Miller ir Gulick (2016).

1.4. Urvai

Urvas – tai bet kokia natūrali ertmė, esanti po žemės paviršiumi, kuri yra prieinama žmogui. Urvai pasižymi ekstremaliomis gyvenimo sąlygomis, dažnai labai ribotais maisto ištekliais, kuriuos sukelia šviesos trūkumas, užkertantis kelią augalams sintetinti svarbiausias organines medžiagas. Iš kitos pusės, fiziniai parametrai dažniausiai būna švelnūs ir nuspėjami. Paprastai urvai tęsiasi per kelias zonas. Įėjimo zona - tai urvo pradžia, kuriai daug įtakos turi išorės sąlygos. Giliau urve yra prieblandos zona, į kurią prasiskverbia tik ribotas kiekis šviesos, išorės sąlygos pamažu pakeičiamos urvo sąlygomis. Paskutinėje – giliojoje zonoje yra visiškas šviesos trūkumas, ši zona pasižymi pastovia, žemesne temperatūra ir padidėjusia drėgme (Ghosh ir kt., 2017, Northup, 2001).

Pirmajame šio amžiaus dešimtmetyje urvų mikrobiologija tapo augančia tarpdisciplinine sritimi, kuri reikalavo mikrobiologų, geologų, chemikų pastangų spręsti sudėtingus klausimus, susijusius su mikroorganizmų metabolizmu ir biogeochemija. Skirtingai nuo kitų, maisto medžiagų trūkumu pasižyminčių aplinkų, urvai dažniausiai yra lengvai prieinami. Urvai, kuriuose nėra saulės šviesos, bei yra geologiškai izoliuoti nuo paviršiaus energijos, turi tik labai nedidelius energijos kiekius. Dauguma urvų yra senoviniai, nepakitę, be sezoninių kaitų nuo laikų, kuomet buvo suformuoti prieš milijonus metų. Visgi, nepaisant to, kad urvai ekstremaliai oligotrofiniai, tai nereiškia, kad jie tušti, neturintys gyvybės. Paskaičiuota, kad paprastai ant urvų uolienų randama apie 10^6 ląstelių grame. Tokia ekstremali oligotrofija ir sąlyginai geras prieinamumas paverčia urvus idealia sausumos aplinka, kuri leidžia tirti mikrobu prisitaikymą prie bado (Barton, 2007).

Po pakartotinių filogenetinių tyrimų urvuose pastebimas panašus profilis su šimtais bakterijų rūšių. Tokios didelės mikroorganizmų įvairovės nustatymas, esant bado sąlygoms, yra paradoksas pagal bendrąsias ekologijos taisykles. Remiantis filogenetiniais urvuose gyvenančių mikroorganizmų tyrimais, manoma, kad yra trys pagrindiniai energijos keliai, kurie padeda jiems augti. Energijos šaltiniai ir maistinės medžiagos gali patekti kaip:

- Atmosferos dujos, pavyzdžiui azotas, anglies dvideginis, tokios organinės molekulės, kaip aromatiniai angliavandeniliai.
- Dirvožemio aromatiniai ir poliaromatiniai junginiai, kurie į sistemą patenka su paviršiaus vandeniui.
- Kaip pačioje uoloje esantys redukuoti metalo jonai, pavyzdžiui manganas, geležis.

Kiti, urvuose randami mikroorganizmai, gali mobilizuoti neorganinį fosfatą, oksiduoti metaną, vandenilį ir gauti energijos hidrolizuojant baltymus, lipidus ir kitas makromolekules, kurios buvo atpalaiduotos mikroorganizmų bendruomenės, taip sukantis ratui ir leidžiant perdirbti šias molekules (Barton, 2007)

Krubera-Voronja urvas

Krubera-Voronja urvas yra lokalizuotas Ortobalagano slėnyje, Arabikos masyve, viename didžiausių klinčių masyvų vakarų Kaukaze. Arabika - tai išskirtinis, aukštų kalnų masyvas, sudarytas iš dviejų dalių – viršutinė jūros dalis ir žemutinė kreidos kalkakmenio dalis (Klimchouk, 2009). Pirmąjį savo pavadinimą Krubera, urvas gavo Aleksandrui Kruberiui, urvų mokslo Rusijoje pradininkui, atminti. Antrasis pavadinimas Voronja, kuris reiškia „varnų urvas“, buvo duotas dėl urvo įėjime esančių varnų lizdų (Sendra ir Reboleira, 2012). Krubera-Voronja urvo įėjimas yra atvira, 60 m gylio šachta, pirmą kartą paminėta dokumentuose 1960 m. Gruzijos tyrinėtojų. Ankstyvieji tyrimai buvo vilkinami dėl itin sunkiai prieinamos urvo angos. Paprastai urve labai šalta, vandens temperatūra 100 metrų gylyje yra 1,0° C ir lėtai kyla iki 7,2 °C 2000 metrų gylyje. Oro temperatūra didesnė vos keliomis dešimtosiomis laipsnio dalimis (Klimchouk ir kt., 2012).

1.5. Mikroorganizmų įvairovė Krubera-Voronja urve

2015 m. Krubera-Voronja urve buvo nustatyti 24 bakterijų tipai. Jokiam kitame urve nėra užfiksuota didesnė bakterijų tipų įvairovė. Nustatyta, kad gausiausios yra *Proteobacteria* (43 %), *Actinobacteria* (27 %) filogenetinės grupės, *Firmicutes* (12 %), *Bacteroidetes* (5 %) ir *Acidobacteria* (3 %). *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi* filogenetinės grupės sudarė mažiau nei 1 %. Nepaisant to, kad mėginiai buvo imti iš vandens ir uolienu, iš skirtingų urvo gylių, bei

dažnai ir retai lankomų urvo vietų, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ir *Firmicutes* visuose mėginiuose išliko gausiausiomis filogenetinėmis grupėmis (Kieraitė-Aleksandrova ir kt., 2015).

1.6. Antimikrobinės medžiagos urvuose

Spėjama, kad urvų aplinkose yra potencialiai daug daugiau neatrastų antibiotikų, nei buvo manyta iki šiol. Šioms buveinėms skiriamas milžiniškas dėmesys dėl mikroorganizmų įvairovės, ir jų sugebėjimų sintetinti antimikrobines medžiagas. Urvų buveinės pasižymi labai ekstremaliomis gyvenimo sąlygomis dėl itin žemo maisto medžiagų kiekio. Svarbu tai, jog maisto medžiagų trūkumas gali skatinti konkurenciją tarp mikroorganizmų sintetinant antibiotikus, arba hidrolitinius fermentus. Dėl šių priežasčių urvų mikroorganizmai laikomi potencialiu genetinių studijų ir naujų bioaktyvių junginių sintezės mechanizmų šaltiniu (Cheeptham ir kt., 2013, Ghosh ir kt., 2017).

Dėl didelio naujų vaistų atradimo potencialo, bioaktyvumo tyrimai urvuose prasidėjo daugiau nei prieš 30 metų ir tęsiasi iki šiol. Per šį laiką urvai buvo ištirti įvairiuose geografiniuose regionuose, įskaitant Europą, Aziją, Šiaurės Ameriką. Nepaisant šių ilgų bioaktyvumo paieškų urvuose, buvo identifikuota tik nedidelis skaičius antimikrobinių junginių (1 lentelė). Daugeliu atvejų, bioaktyvių junginių cheminė prigimtis ir skaičius yra nežinomi (Ghosh ir kt., 2017). Žinomi identifikuoti junginiai yra nurodyti 1 lentelėje:

1 lentelė. Visi urvuose identifikuoti antimikrobiniai junginiai pagal Ghosh ir kt. (2017)

Urvas	Bioaktyvus junginys	Bioaktyvumas	Taksonas
Cueva de los Murciélagos, Ispanija	Peptidas A12-C	Antibakterinis (<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Sarcinasp.</i>), Priešgrybelinis (<i>Microsporium canis</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Trichophytonmentagrophytes</i>). Jokio aktyvumo prieš testuotas Gram-neigiamas bakterijas	<i>Bacillus licheniformis</i> (kamienas A12; <i>Firmicutes</i>)
Grotta dei Cervi, Italija	Cervimicinai A-D	Antibakterinis (*MRSA,*VRE <i>faecalis</i>).	<i>Streptomyces tendae</i> (Kamienas HKI 0179; <i>Actinobacteria</i>)
Miroc kalno urvas, Serbija	Undecilprodigiozinas	Antibakterinis (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonasaeruginosa</i>), Priešgrybelinis (<i>Candida albicans</i>), Antioksidacinis, imunosupresantinis aktyvumas, apoptozę sukeliantis aktyvumas vėžinėse ląstelėse, apsauginės savybės nuo UV	<i>Streptomyces</i> sp. (kamienas JS520; <i>Actinobacteria</i>)
Chongqing miesto urvas, Kinija	ksiakemicinas A	Antibakterinis (<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>), Priešgrybelinis(<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>), citotoksinis (plaučių vėžys, krūties vėžys, hepatoma, gimdos kaklelio vėžys, gaubtinės žarnos vėžys, neuroblastoma, prostatės vėžys).	<i>Streptomyces</i> sp. (kamienas CC8-201; <i>Actinobacteria</i>)
Francthi urvas, Graikija	Lipidai	Antibakterinis (*MRSA, meticilinui jautrūs <i>Staphylococcus aureus</i> ,*VRE <i>faecalis</i> ,*VRE <i>faecium</i> , vankomicinui jautrūs <i>Enterococcus faecalis</i>). Nėra aktyvumo prieš testuotas Gram-neigiamas bakterijas	<i>Toxopsis calypsus</i> (kamienas ATHU-CY 3314; <i>Cyanobacteria</i>)
Graikijos urvai	Lipidai	Antibakterinis (*MRSA, meticilinui jautrūs <i>Staphylococcus aureus</i> ,*VRE <i>faecalis</i> ,*VRE <i>faecium</i> , vankomicinui jautrūs <i>Enterococcus faecalis</i>). Nėra aktyvumo prieš testuotas Gram-neigiamas bakterijas	<i>Phormidium melanochroun</i> (kamienas ATHU-CY 3315; <i>Cyanobacteria</i>)

1 lentelės tęsinys

Bolshaya Oreshnaya urvas, Siberia, Russia	Junginių mišinys: ciklodisidinas D, chaksalaktinas B, stilisazolas B, giroforo rūgštis	Gram-negiamos bakterijos, Antibakterinės (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas putida</i>), priegrybelinės (<i>Candida albicans</i>).	<i>Streptomyces sp.</i> (kamienas IB 2014/I/78–8; <i>Actinobacteria</i>)
Kruber-Voronja urvas, Abkhazia, Gruzija	Junginių mišinys: 1,2-benzendikarboksi rūgštis, 2-metilpropilas, 1,2-benzen dikarboksi rūgštis, diizoktilo esteris, dibutil ftalatas, 2,4-di-tert-butilfenolis	Antibakteriniai (<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Brevibacillus sp.</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Paenibacillus sp.</i>). Nėra aktyvumo prieš testuotas Gram-neigiamas bakterijas.	<i>Bacillus sp.</i> (kamienas 1410WF1-TSA30-2; <i>Firmicutes</i>)
Kruber-Voronja urvas, Abkhazia, Gruzija	Junginių mišinys: gancidinas W, ciklo(L-prolil-D-phenilalanil); 1,2-benzendikarboksi rūgštis, dizoktilo esteris, 1,3-dimetil benzenas.	Antimikrobinės (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Brevibacillus sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> , <i>Streptomyces sp.</i>) Nėra aktyvumo prieš testuotas gram-neigiamas bakterijas.	<i>Bacillaceae bacterium</i> (kamienas 1350R2-TSA30-6; <i>Firmicutes</i>)

Iš lentelės matyti, jog bioaktyvūs junginiai, rasti urvuose pademonstravo aktyvumą prieš pagrindines patogenines bakterijas – Gram-teigiamas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Paenibacillus larvae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) ir Gram-neigiamas (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas oryzae*), prieš grybus (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Fusarium verticillioides*, *Microsporium canis*, *Mucor mucedo*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes*) ir vėžines ląsteles. Kai kuriuose antimikrobinių medžiagų mišiniuose buvo antibiotikų. Pavyzdžiui, *Streptomyces genties*, IB 2014/I/78–8 kamienas, kuris produkuoja chaksalaktiną, ansamicino tipo poliketidą. *Bacilaceae* bakterijos kamienas 1350R2-TSA30-6 produkavo ciklinius dipeptidus gancidiną W ir ciklo (L-prolil-D-fenilalanilą). Nors kai kurie iš paminėtų bioaktyvių junginių buvo identifikuoti mikroorganizmuose, gyvenančiuose ne urvuose, pavyzdžiui, nustatyta, kad undecilprodigiosinas yra sintetinamas tiek Gram-teigiamų, tiek Gram-neigiamų bakterijų, tačiau buvo rasta ir naujų antibiotikų. Vieni tokių cervimiciniai A-D, ksiakemicinas A (Ghosh ir kt., 2017).

Pažymima, jog urvų potencialas nėra išnaudotas ir akivaizdu, kad tai itin turtingas naujų bioaktyvių junginių šaltinis, kuris potencialiai gali būti naudingas biotechnologijose (Lamprinou ir kt., 2015). Taigi, atrasti ir identifikuoti mikroorganizmus, kurie gali sintetinti naujas bioaktyvias medžiagas kovai prieš dabar esančius ir atsirasiančius atsparius infekcinius agentus yra svarbiau nei bet kada anksčiau (Cheeptham ir kt., 2013).

REZULTATŲ SKLAIDA

Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „4th Congress of Baltic Microbiologists (CBM2018)” (2018m., Gdansk, Lenkija).

Screening for polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in bacteria isolated from Krubera-Voronja Cave.

Kuisienė, Nomedą ; Vilniaus universitetas ; Lebedeva, Jolanta ; Vilniaus universitetas ; Bukelskis, Dominykas ; Vilniaus universitetas ; Radevič, Junona ; Vilniaus universitetas ; Lukoševičiūtė, Laima ; Vilniaus universitetas ; Kriauciūnas, Ignas ; Vilniaus universitetas ; Bučelis, Airidas ; Vilniaus universitetas.

ISSN: 0001-527X.

Acta biochimica Polonica. Warszawa : Państwowe Wydawnictwo Naukowe. 2018, vol. 65, Supplement 1, abstract no. IV.P.9, p. 70.

Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

Airidas Bučelis
Magistrinis darbas

Bioaktyvių medžiagų sintezės genų paieška antimikrobinium aktyvumu pasižyminčiuose Kruberio-Voronja urvo mikroorganizmuose

SANTRAUKA

Žmogui patogeniškos bakterijos vis sparčiau įgyja atsparumą antimikrobinėms medžiagoms. Dėl šios priežasties ieškoma naujų natūralių bioaktyvių medžiagų. Būtent urvai dėl juose esančių oligotrofinių sąlygų yra laikomi puikiu naujų antimikrobinų medžiagų šaltiniu. Pastarųjų dešimtmečių tyrimai parodė, jog urvuose aptinkami mikroorganizmai geba sintetinti antrinius metabolitus, kurie gali slopinti patogenų augimą. Šie antriniai metabolitai – antibiotikai, galintys padėti įveikti atsparumą įgijusius mikroorganizmus.

Šio darbo metu buvo vykdoma antimikrobinų medžiagų sintezės genų paieška kamienuose, kurie ankstesnės mokslinės grupės darbuose pasižymėjo fenotipiniu antimikrobinium aktyvumu. Taip pat buvo atlikta pasirinktuose kamienuose aptiktų bioaktyvių medžiagų sintezės genų kokybinė ir kiekybinė raiškos analizė.

Atlikus genų paiešką nuspręsta dirbti su 3 kamienais – VR1, VR5 ir VR26. Šių kamienų filogenetinė analizė parodė, jog VR1 kamienas priklauso *Rhodococcus* genčiai ir yra artimiausias *Rhodococcus erythreus* ir *Nocardia coellaca* rūšims. VR5 kamienas priklauso *Pseudomonas* genčiai ir yra artimiausias *Pseudomonas frederiksbergensis* rūšiai, o VR26 kamienas priklauso *Arthrobacter* genčiai ir yra artimiausias *Arthrobacter sulfureus* rūšiai. Atlikus kokybinę raiškos analizę paaiškėjo, jog antimikrobinų medžiagų sintezės genų ekspresija vyko visuose 3 kamienuose, visose augimo stadijose, nepriklausomai nuo mitybinės terpės turtingumo. Kiekybinę raiškos analizę buvo pasirinkta atlikti su VR26 kamieniu. Nustatyta, jog silpniausiai geno raiška buvo vykdyta eksponentinio augimo metu, efektyviausiai – stacionaro metu.

Vilnius University

Life sciences center

Airidas Bučelis

Master thesis

**The Search for Bioactive Compounds Biosynthesis Genes in Krubera-Voronya Cave
Microorganisms with Antimicrobial Activity**

SUMMARY

Human pathogenic bacteria are increasingly gaining antimicrobial resistance. For this reason, new natural bioactive substances are being sought. Caves, because of their oligotrophic conditions, are considered to be an excellent source of antimicrobials. Studies over the past decades have shown that the microorganisms detectable in caves are able to synthesize secondary metabolites which might inhibit the growth of pathogens.

During this work, the search of genes for the synthesis of antimicrobials was carried out in strains characterized by phenotypic antimicrobial activity in the previous scientific group. Qualitative and quantitative expression analysis of the genes for the synthesis of the bioactive substances in selected strains was also performed.

After gene search, it was decided to work with 3 strains - VR1, VR5 and VR26. The phylogenetic analysis of these strains showed that the VR1 strain belongs to the *Rhodococcus* genus and is closest to the species *Rhodococcus erythreus* and *Nocardia coellaca*. The VR5 strain belongs to the genus *Arthrobacter* and is the closest to the species *Arthrobacter sulfureus*, and the VR26 strain belongs to the genus *Pseudomonas* and is closest to the species *Pseudomonas frederiksbergensis*. The qualitative analysis of the expression revealed that the expression of the genes for the synthesis of antimicrobials took place in all 3 strains, at all stages of growth, independently to the richness of the nutrient medium. For quantitative expression analysis VR26 strain was selected. It was found that the weakest expression of the gene was carried out during exponential growth, most effectively during stationary growth.

PADĖKA

Noriu padėkoti savo magistrinio darbo vadovei prof. dr. Nomedai Kuisienei už suteiktą galimybę dirbti, įgyti naujų žinių rengiant šį mokslinį darbą, bei visokeriopą pagalbą ir paskatinimą.

LITERATŪRA

- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathelet, B., Hacene, H., and Jacques, P. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *92*, 571–581.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., and Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 1565–1574.
- Amin, D., Borsetto, C., Tolba, S., Abolmaaty, A., Abdallah, N., and Wellington, E. (2017). Phylogenetic Analysis of NRPS and PKS Genes Associated with Antagonistic *Micromonospora* Rc5 and *Streptomyces* Ru87 Isolates. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* *16*, 1–22.
- Chen, H., and Du, L. (2016). Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 541–557.
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., et al. (2006). Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* *188*, 4024–4036.
- Clardy, J., Fischbach, M.A., and Currie, C.R. (2009). The natural history of antibiotics. *Curr. Biol.* *19*, R437–R441.
- Coates, A.R., Halls, G., and Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same?: New antibiotic classes are urgently needed. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 184–194.
- Collin, F., Karkare, S., and Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *92*, 479–497.
- Condurso, H.L., and Bruner, S.D. (2012). Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat. Prod. Rep.* *29*, 1099.
- Covington, B.C., Spraggins, J.M., Yniguez-Gutierrez, A.E., Hylton, Z.B., and Bachmann, B.O. (2018). Response of Secondary Metabolism of Hypogean Actinobacterial Genera to Chemical and Biological Stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* *84*.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 385–392.
- Du, L., and Lou, L. (2010). PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* *27*, 255–278.
- Dutta, S., Whicher, J.R., Hansen, D.A., Hale, W.A., Chemler, J.A., Congdon, G.R., Narayan, A.R.H., Håkansson, K., Sherman, D.H., Smith, J.L., et al. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* *510*, 512–517.
- E. Northup, Kathleen H. Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiol. J.* *18*, 199–222.
- Encheva-Malinova, M., Stoyanova, M., Avramova, H., Pavlova, Y., Gocheva, B., Ivanova, I., and Moncheva, P. (2014). Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* *28*, 721–727.

- Esteves, A.I.S., Hardoim, C.C.P., Xavier, J.R., Gonçalves, J.M.S., and Costa, R. (2013). Molecular richness and biotechnological potential of bacteria cultured from Irciniidae sponges in the north-east Atlantic. *FEMS Microbiol. Ecol.* *85*, 519–536.
- Fair, R.J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* *6*, PMC.S14459.
- Fisch, K.M., Gurgui, C., Heycke, N., van der Sar, S.A., Anderson, S.A., Webb, V.L., Taudien, S., Platzer, M., Rubio, B.K., Robinson, S.J., et al. (2009). Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 494–501.
- Gao, L., Guo, J., Fan, Y., Ma, Z., Lu, Z., Zhang, C., Zhao, H., and Bie, X. (2018). Module and individual domain deletions of NRPS to produce plipastatin derivatives in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Factories* *17*.
- Ghosh, S., Kuisiene, N., and Cheeptham, N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochem. Pharmacol.* *134*, 18–34.
- Gomes, E.S., Schuch, V., and de Macedo Lemos, E.G. (2013). Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* *44*, 1007–1034.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., and Kyaw, C.M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* *4*.
- Jasim, B., Mathew, J., and Radhakrishnan, E.K. (2016). Identification of a novel endophytic *Bacillus* sp. from *Capsicum annuum* with highly efficient and broad spectrum plant probiotic effect. *J. Appl. Microbiol.* *121*, 1079–1094.
- Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* *33*, 300.
- Kieraite-Aleksandrova, I., Aleksandrovas, V., and Kuisiene, N. (2015). Down into the Earth: microbial diversity of the deepest cave of the world. *Biologia (Bratisl.)* *70*.
- Kim, J., and Yi, G.-S. (2012). PKMiner: a database for exploring type II polyketide synthases. *BMC Microbiol.* *12*, 169.
- Kim, E.Y., Han, J.W., Lee, J.Y., and Kim, B.S. (2012). Identification of the biosynthetic gene cluster for the antibiotic polyketide L-155,175 in *Streptomyces hygroscopicus*. *Folia Microbiol. (Praha)* *57*, 543–550.
- Klimchouk, A. (2019). Kruberá (Voronja) cave. In *Encyclopedia of Caves*, (Elsevier), pp. 627–634.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 423–435.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* *75*, 417–434.
- Le, T.-H., Sivachidambaram, V., Yi, X., Li, X., and Zhou, Z. (2014). Quantification of polyketide synthase genes in tropical urban soils using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* *106*, 135–142.
- Mehta, R., and Champney, W.S. (2002). 30S Ribosomal Subunit Assembly Is a Target for Inhibition by Aminoglycosides in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1546–1549.

- Meklat, A., Sabaou, N., Bouras, N., Zitouni, A., Spröer, C., Klenk, H.-P., Mathieu, F., and Lebrihi, A. (2012). A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Ann. Microbiol.* *62*, 1049–1057.
- Miller, B.R., and Gulick, A.M. (2016). Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases. In *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis*, B.S. Evans, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 3–29.
- Najafabadi, H., Torabi, N., and Chamankhah, M. (2008). Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. *BMC Bioinformatics* *9*, 55.
- Qiu, P., Feng, Z.-X., Tian, J.-W., Lei, Z.-C., Wang, L., Zeng, Z.-G., Chu, Y.-W., and Tian, Y.-Q. (2015). Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. *Chin. J. Nat. Med.* *13*, 942–953.
- Rajendran, N. (1999). Identification and Cloning of a Gene Locus Encoding Peptide Synthetase of *Pseudomonas fluorescens* by Two Sets of PCR Primers. *Z. Für Naturforschung C* *54*, 105–109.
- Ray, L., and Moore, B.S. (2016). Recent advances in the biosynthesis of unusual polyketide synthase substrates. *Nat. Prod. Rep.* *33*, 150–161.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., et al. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* *36*, 146–167.
- Russell, A.D. (2004). Types of Antibiotics and Synthetic Antimicrobial Agents. In *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*, S.P. Denyer, N.A. Hodges, and S.P. Gorman, eds. (Oxford, UK: Blackwell Science Ltd), pp. 152–186.
- Sendra, A., and Reboleira, A. (2012). The world's deepest subterranean community - Krubera-Voronja Cave (Western Caucasus). *Int. J. Speleol.* *41*, 221–230.
- Tambadou, F., Lanneluc, I., Sablé, S., Klein, G.L., Doghri, I., Sopéna, V., Didelot, S., Barthélémy, C., Thiéry, V., and Chevrot, R. (2014). Novel *nonribosomal peptide synthetase (NRPS)* genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* n/a-n/a.
- Tanvir, R., Sajid, I., and Hasnain, S. (2013). Screening for type I polyketide synthases genes of endophytic *Streptomyces* isolated from *Parthenium hysterophorus* L. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* *28*, 32–39.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., and Jacques, P. (2010). New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1521–1531.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* *119*, S3-10; discussion S62-70.
- Tortorella, E., Tedesco, P., Palma Esposito, F., January, G., Fani, R., Jaspars, M., and de Pascale, D. (2018). Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. *Mar. Drugs* *16*, 355.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* *40*, 277–283.

Vining, L.C. (1992). Roles of secondary metabolites from microbes. *Ciba Found. Symp.* *171*, 184–194; discussion 195-198.

Winn, M., Goss, R.J.M., Kimura, K., and Bugg, T.D.H. (2010). Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure–function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat Prod Rep* *27*, 279–304.

Wood, S.A., Kirby, B.M., Goodwin, C.M., Le Roes, M., and Meyers, P.R. (2007). PCR screening reveals unexpected antibiotic biosynthetic potential in *Amycolatopsis* sp. strain UM16. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 245–253.

Yasir, M. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Braz. J. Microbiol.* *49*, 248–257.

Yoneyama, H., and Katsumata, R. (2006). Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 1060–1075.