

# Metabolity wtórne grzybów jako źródło związków bioaktywnych: nowoczesne podejście w ich pozyskiwaniu i analizie

GBM – glejak wielopostaciowy (łac. *Glioblastoma multiforme*); FPP – pirofosforan farnelyzowy; GGPP – pirofosforan geranylogeranylu; GFPP – pirofosforan geranylfarnezylowy; PDA – agar ziemniaczano-glukozowy (ang. *potato dextrose agar*); HG-II – (katalizator) Hoveyda-Grubbsa drugiego typu; chA – Chaetoglobosyna A; NRPs – nierybosomalna syntaza peptydowa; ML – uczenie maszynowe (ang. *machine learning*).

## STRESZCZENIE

**P**rodukty naturalne grzybów, zwane metabolitami wtórnymi, pełnią kluczowe funkcje biologiczne i mają zastosowanie w medycynie. Ich produkcja jest kontrolowana przez zgrupowane w genomie w postaci klastrów genów biosyntetycznych, które mogą być uspio- ne w standardowych warunkach hodowli. Dzięki nowoczesnym metodom genetycznym i epigenetycznym możliwe jest ich aktywowanie, co pozwala odkrywać nowe związki bio- aktywne. W artykule przedstawiono klasy metabolitów, mechanizmy ich biosyntezy oraz aktualne strategie badawcze, łącząc wiedzę z zakresu biologii, genetyki i biotechnologii.

## WPROWADZENIE

Produkty naturalne (NP) to związki chemiczne, które powstają wewnątrz or- ganizmów żywych, takich jak rośliny, mikroorganizmy czy grzyby. Są to sub- stancje o zróżnicowanej budowie chemicznej i szerokim zakresie właściwości biologicznych, wytwarzane głównie w wyniku procesów metabolicznych, co stwarza wysokie zapotrzebowanie na tworzenie zbiorów danych w celu uła- twienia racjonalnego wyszukiwania i rozwoju ich przyszłych aplikacji.

Produkty tych procesów możemy podzielić na metabolity pierwotne i me- tabolity wtórne. Metabolity pierwotne to związki, które posiadają fundamen- talne znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Przykładem takich związków mogą być wybrane aminokwasy oraz kwasy tłuszczowe. Natomiast metabolity wtórne (SM) to związki, które nie uczestniczą bezpośrednio w podstawowych procesach życiowych organizmu, a ich występowanie jest zazwyczaj uwarunko- wane wyłącznie dla określonych grup taksonomicznych. Grzyby są szczególnie bogatym źródłem różnorodnych metabolitów wtórnych. Zwykle są one synte- zowane po zakończeniu intensywnego wzrostu organizmu oraz w specyficz- nych warunkach środowiskowych, na przykład w sytuacjach stresowych i/lub ograniczających dostępność składników odżywczych. Metabolity wtórne pełnią różne funkcje, takie jak obrona przed patogenami lub adaptacja do zmieniające- go się środowiska [1]. W środowisku metabolity wtórne pełnią kluczową rolę w rozwoju, przetrwaniu i interakcjach grzybów z innymi organizmami.

Grzybiczne SM są zróżnicowaną grupą substancji wykazującą szerokie spek- trum właściwości chemicznych. Charakteryzują się one szerokim zróżnicowa- niem funkcji i często są związane z przystosowaniem grzyba do warunków środowiskowych [2]. Niektóre metabolity wtórne grzybów są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym jako antybiotyki (np. penicylina) oraz leki obni- żające poziom cholesterolu (np. lowastatyna). Te bioaktywne związki wytwa- rzane są przez określone grupy grzybów, głównie przez grzyby strzępkowe z klasy *Pezizomycotina* (typ *Ascomycota*) oraz kilku klas *Basidiomycota* (*Agaricomycetes*, *Exobasidiomycetes*) [1]. Istnieje wiele gatunków grzybów o złożonych mecha- nizmach metabolicznych i bogatym składzie wtórnych związków typu SM. Jed- nakże ich wykorzystanie wiąże się z wieloma problemami, głównie z powodu braku wnikliwego rozpoznania genetycznego [3].

Grzybiczne SM można zaliczyć do jednej z następujących grup tj.: terpenoidy, poliketydy, peptydy nierybosomalne lub ich kombinacje [2]. Klasyfikacja che- miczna metabolitów wtórnych oparta jest o substraty, z których syntezowane są dane związki oraz dedykowane danej reakcji enzymy [4]. Synteza metabolitów głównie opiera się na polimeryzacji metabolitów pierwotnych przez specyficz-

**mgr inż. Piotr Michałowski<sup>1,2</sup>,  
Katarzyna Rynarzewska<sup>1</sup>,  
Dagmara Nowicka<sup>1</sup>,  
Olimpia Gawrońska<sup>3</sup>,  
dr hab. inż. Katarzyna  
Bielicka – Daszkiewicz<sup>1,✉</sup>,**

<sup>1</sup> Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Poznań

<sup>2</sup> Pracownia Chemii Medycznej, Centrum Bio- logii Chemicznej, Instytut Chemii Bioorganicz- nej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

<sup>3</sup> Wydział Informatyki i Telekomunikacji, Poli- technika Poznańska, Poznań

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_634](https://doi.org/10.18388/pb.2021_634)

✉ Autor korespondencyjny:  
katarzyna.bielicka-daszkiewicz@put.poznan.pl

**Słowa kluczowe:** metabolity wtórne, produkty naturalne, programowalna bioprodukcja ana- logów naturalnych

**Wykaz skrótów:** ANPs – produkty naturalne (ang. *natural products*); SM – metabolity wtór- ne (ang. *secondary metabolites*); NRP – peptydy nierybosomalne (ang. *non-ribosomal peptides*); BGC – klastry genów biosyntetycznych (ang. *biosynthetic gene clusters*); GT – gliotoksyna (ang. *gliotoxin*); acyl-CoA – acylokoenzym A (ang. *acylocoenzyme A*); malonyl-CoA – malonylo- koenzym A (ang. *malonylcoenzyme A*); IPP – pirofosforan izopentyli (ang. *isopentyl pyro- phosphate*); DMAPP – fosforan dimetyloallilu (ang. *dimethylallyl pyrophosphate*); ACV – δ-(L- α-aminoadipyl)-L-cysteinylo-D-walina (ang. *δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinylo-D-valine*); IPN – izopenicylina N; DAC – deactyloksycelalo- sporyna C; PBPs – białka wiążące penicylinę (ang. *penicillin-binding proteins*); ACN – aceto- nitril (ang. *acetonitrile*); MeJA – jasmonian me- tyli (ang. *methyl jasmonate*); RLS – plamistość liści *Ramularia* (ang. *Ramularia leaf spot*); PTP1B – białkowa fosfataza tyrozynowa 1B (ang. *pro- tein tyrosine phosphatase 1B*); MFS – główna rod- zina transporterów ułatwiających (ang. *major facilitator superfamily*); HMG – 3-hydroksy- -3-metyloglutarylokoenzym A; TBS – tetr- butyloamoniowy; TEMPO – 2,2,6,6-tetrametylo- -1-oksopiperodyna; PIDA – (diaceoksyjodo) benzen; PKS – syntaza poliketydowa; AMT – amidotransferaza; MDCK – komórki nerkowe psa *Madin-Darby* (ang. *Madin-Darby canine kid- ney cells*); KS – ketosyntaza; KR – ketoredukta- za; DH – dehydrataza; ER – enyloreduktaza;

**Tabela 1.** Klasy grzybiczych metabolitów wtórnych i ich reprezentanci.

Grupa/klasa strukturalna	Przykład	Występowanie	Funkcja/rola	Źródło
Poliketydy	R-melleina	<i>Phoma tracheiphila</i>	Fitotoksyczność względem cytrusów	[8]
	Lowastatyna	<i>Aspergillus terreus</i>	Obniżanie poziomu cholesterolu we krwi	[12]
	Tetracyklina	<i>Streptomyces genus of Actinobacteria</i>	Działanie antybakteryjne	[6]
Terpenoidy	Aspergoterpenina A	<i>Aspergillus versicolor</i>	Działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec <i>Erwinia carotovora</i>	[7]
	β-karoten	<i>Mucor circinelloides</i>	Antyoksydant, prekursor witaminy A	[9]
	Bipolaroksyna	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Wywołuje plamistość pszenicy	[8]
Peptydy nierybosomalne	Penicylina	<i>Penicillium notatum</i>	Działanie przeciwbakteryjne	[10]
	Leucynostatyna B	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Hamowały przenoszenie <i>Plasmodium falciparum</i> na komary	[11]
	Rubelina A	<i>Ramularia collo-cygni</i>	Niespecyficzne działanie fitotoksyczne	[10]
Alkaloidy	Giluterryna	<i>Aspergillus terreus</i>	Antyproliferacyjny dla linii komórkowych raka prostaty (PC-3) i nerki (786-0)	[7]
	18-hydroksydekaturyna B	<i>Penicillium oxalicum</i>	Śmiertelność dla larw solankowych przy wartości LD50 wynoszącej 2,3 μM	[7]
	Chamizyd A	<i>Chaetomium nigricolor</i>	Przeciwbakteryjne wobec <i>S. aureus</i>	[7]

ne, selektywne enzymy [5]. Najczęściej spotykane związki SM należą do jednej z czterech klas.

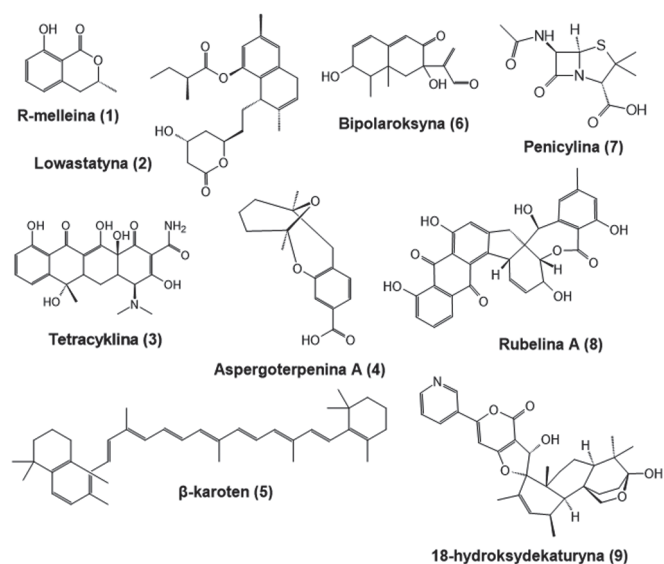
Poliketydy są jedną z najbardziej zróżnicowanych klas. Wytwarzane są na drodze polimeryzacji cząsteczek acylokoenzymu A (acyl-CoA) i malonylokoenzymu A (malonyl-CoA) przez syntazy poliketydowe [4]. Poliketydy znajdują zastosowanie jako antybiotyki i statyny, a jedną z ich ekologicznych funkcji jest wytwarzanie woskowej warstwy ochronnej na powierzchni tkanek roślinnych. Przykładowe związki należące do poliketydów to R-melleina (1 na Rycinie 1), lowastatyna (2) i tetracyklina (3) (Ryc. 1, Tab. 1.) [6,8,12]. Terpenoidy są pochodnymi produktów szlaku mewalonowego – pirofosforanu izopentylu (IPP) oraz pirofosforanu dimetyloallilu (DMAPP). W biosyntezie terpenów bierze udział między innymi syntaza terpenowa, która tworzy monoterpyny z prekursorowych pirofosforanów [4]. Terpenoidy wraz z terpenami są powszechnie występującymi związkami, do których zakwalifikować można aspergoterpeninę A (4), bipolaroksynę (5) i β-karoten (6) (Ryc. 1, Tab. 1.) [7-9].

Wyróżniającą się klasą grzybiczych SM są peptydy nierybosomalne (NRP). NRP są jednymi z najbardziej zróżnicowanych grup związków wśród tej klasy. Związki należące do klasy NRP to między innymi penicylina (7), która ma działanie przeciwbakteryjne, rubelina A (8) o działaniu fitotoksycznym i leucynostatyna B, hamująca przenoszenie *Plasmodium falciparum* na komary (Ryc. 1.) [10,11]. Biosynteza NRP jest podobna do biosyntezy poliketydów, gdyż syntetazy NRP tworzą nierybosomalne peptydy z aminokwasów. Niektóre metabolity wtórne są hybrydami

kilku grup, co wynika z udziału kilku biokatalizatorów w ich biosyntezie. Przykładem takiego związku jest fumagilina - substancja o działaniu przeciwbakteryjnym - która jest syntezowana przez cyklazę terpenową oraz syntazy nierybosomalnych peptydów [5].

Większość alkaloidów jest syntezowana z 7 aminokwasów, tj. ornityny, lizyny (Lys), tyrozyny (Tyr), kwasu antranilowego, kwasu pikolinowego, histydyny (His) oraz tryptofanu (Trp). Azot pochodzący od aminokwasów często jest zachowany w związku w formie heterocyklicznej. Alkaloidy są mniej liczną grupą metabolitów wtórnych niż wcześniej wymienione, gdyż ich poznana

liczba jest bliska 30 000. Duża różnorodność strukturalna tej grupy związków znajduje odzwierciedlenie w liczbie podgrup, która bazuje na heterocyklicznym związku stanowiącym podstawę struktury. Przykładem związku należącego do podgrupy ksantynowej to kofeina. Niewiele alkaloidów znajduje swoje zastosowanie lecznicze, ale budzą one coraz większe zainteresowanie, ponieważ nie są wystarczająco przebadaną grupą związków. Przykładem związku o poznanim działaniu jest giluterryna o działaniu antyproliferacyjnym dla linii komórkowej raka prostaty, 18-hydroksy-



**Rycina 1.** Struktura wybranych metabolitów wtórnych [6-12].

dekaturyna B (9 na Ryc. 1.) wykazująca szkodliwy efekt dla larw solankowych, a także chamizyd A o właściwościach przeciwbakteryjnych wobec *S. aureus* [6,7].

W przeciwieństwie do genów odpowiedzialnych za syntezę metabolitów pierwotnych, które są rozproszone w genomie grzyba, geny kodujące enzymy uczestniczące w produkcji metabolitów wtórnych są zgrupowane w tzw. klastry genów biosyntetycznych (BGC). Liczba tych klastrów jest różna u danych gatunków grzybów i może wynosić od poniżej 15 do nawet 100 na jeden organizm [1,13]. U *Aspergillus fumigatus* BGC zlokalizowany na VI chromosomie zawiera 13 genów *gli* odpowiedzialnych za biosyntezę i wydzielanie gliotoksyny (GT), którą wykryto u pacjentów z chorobami nowotworowymi, a także w izolatach pochodzących od pacjentów z COVID-19 i wtórnymi zakażeniami aspergilozą. Biosynteza GT jest ściśle regulowana, ponieważ zależy od wielu szlaków komórkowych, które regulują metabolizm siarki, co wiąże się z obroną przed stresem oksydacyjnym, metylacją oraz metabolizmem żelaza. Regulacja biosyntezy GT obejmuje liczne czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe, regulatory transkrypcyjne i rozwojowe, regulatory sygnalizacji białek G, a także enzymy modyfikujące chromatinę [14].

Tradycyjne metody wykorzystywane do odkrywania bioaktywnych produktów naturalnych pochodzących z grzybów zazwyczaj obejmują pobieranie próbek, hodowlę szczepów grzybów, ekstrakcję, izolację ukierunkowaną na aktywność biologiczną, określanie struktury oraz ocenę bioaktywności. Analizy genomowe grzybów wykazały, że duża liczba klastrów genowych kontrolujących ekspresję wtórnych metabolitów pozostaje zazwyczaj w stanie uśpienia w tradycyjnych warunkach hodowli laboratoryjnej. Klastry te posiadają również potencjał do wytwarzania znacznie większej ilości produktów naturalnych niż odkryto do tej pory. Poczyniono postępy w zakresie genetycznych manipulacji regulatorami - od nadekspresji regulatorów specyficznych dla danego szlaku biosyntetycznego, po usuwanie epigenetycznych blokad ekspresji BGC, co umożliwia dostęp do nowych związków pochodzenia grzybowego. Do pełnego wykorzystania potencjału nowych SM, konieczne jest powiązanie metabolitu wtórnego z genami odpowiedzialnymi za jego produkcję [13,15,16].

Niniejszy artykuł prezentuje kompleksowe, syntetyczne i krytyczne zestawienie wiedzy na temat wybranych metabolitów wtórnych (SM) grzybów i ich pochodnych, klasyfikacji oraz funkcji. Opisano

główne klasy SM: poliketyny, terpenoidy czy pochodne antrachinonów, wskazując konkretne przykłady związków bioaktywnych wraz z ich funkcjami, mechanizmami biosyntezy i źródłami. Istotnym elementem jest omówienie klastrów genów biosyntetycznych (BGC), które warunkują produkcję metabolitów i ich różnorodność. Podkreślone zostały ograniczenia klasycznych metod hodowli grzybów, wskazując nowoczesne podejścia, takie jak manipulacje epigenetyczne i genetyczne aktywujące uśpione BGC. Artykuł łączy informacje biochemiczne, genetyczne i technologiczne, dostarczając przeglądu stanu wiedzy oraz kierunków rozwoju w obszarze bioaktywności grzybów.

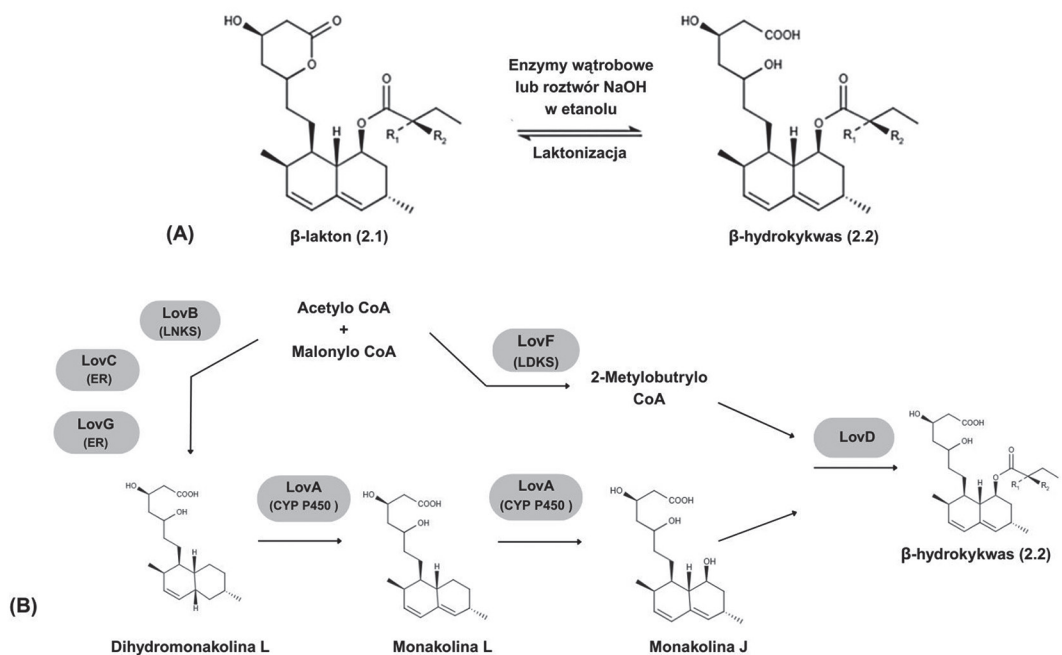
## ZWIĄZKI BIOAKTYWNE POCHODZĄCE OD GRZYBICZNYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH

### POLIKETYDY

#### LOWASTATYNA

Lowastatyna (2 na Ryc. 1) to związek pochodzenia naturalnego, powstający w wyniku fermentacji prowadzonej przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Szczególną rolę odgrywają tu dwa gatunki: *Aspergillus terreus* oraz *Aspergillus caespitosus*, przy czym to pierwszy z nich jest głównym producentem związku w znaczących ilościach.

Lowastatyna należy do statyn, grupy leków odpowiedzialnych za obniżenie poziomu cholesterolu we krwi. Jest jedną z pierwszych szeroko stosowanych substancji o takim działaniu. Związek ten występuje w dwóch formach: aktywnej jako  $\beta$ -hydroksykwas (2.2, Ryc. 2) z otwartym pierścieniem sześciowęglowym, oraz nieaktywnej jako  $\beta$ -lakton (2.1, Ryc. 2) z zamkniętym pierścieniem. Obie formy różnią się właściwościami fizykochemicznymi i farmaceutycznymi. Aktywna postać lowastatyny ( $\beta$ -hydroksykwas) obniża poziom cholesterolu w osoczu, natomiast forma nieaktyw-



Rycina 2. Lowastatyna. (A) Postać aktywna i prolekowa. (B) Ścieżka biosyntezy z uwzględnieniem enzymów katalizujących [12,17].

na ( $\beta$ -lakton) pełni rolę proleku, który może ulec biotransformacji w formę aktywną w wybranych tkankach, najczęściej wątroby [12].

Biosynteza lowastatyny (Ryc. 2B) zachodzi w wyniku działania złożonego szlaku metabolicznego, kontrolowanego przez klaster składający się z 18 genów. Kluczowym etapem tego procesu jest synteza monakoliny L, prekursora lowastatyny, która powstaje w wyniku kondensacji dziewięciu jednostek acetylowych, pochodzących z acetyl-CoA i malonyl-CoA. Za przebieg reakcji odpowiada wielofunkcyjna syntaza poliketydowa LovB (produkt genu *lovB*), jednak ze względu na nieaktywną domenę reduktazy w jej strukturze, konieczna jest obecność niezależnej reduktazy enoilowej LovC, która pełni kluczową rolę w zapewnieniu pełnej aktywności układu enzymatycznego. Oba enzymy razem katalizują około 35 reakcji, prowadzących do utworzenia dihydromonakoliny L, która następnie jest uwalniana przez tioesterazę LovG. W kolejnym etapie enzym z rodziny cytochromu P450, monoooksygenaza LovA, hydroksyluje dihydromonakolinę L, przekształcając ją najpierw w kwas monakolinowy L, a następnie w jego pochodną. Równoległe syntetyzowany jest łańcuch boczny – 2-metylomastłowy diketyd – przy udziale drugiej syntazy poliketydowej LovF. Ostateczne połączenie obu części cząsteczki następuje dzięki enzymowi LovD, który katalizuje przeniesienie reszty acylowej z diketydowego prekursora na monakolinę J, tworząc kwas mewinolinowy, czyli aktywną formę lowastatyny. Zidentyfikowano także czynniki środowiskowe, takie jak ograniczenie składników odżywczych i fermentacja w stanie stałym, które stymulują ekspresję *lovE* i biosyntetycznych genów, prowadząc do zwiększenia produkcji lowastatyny [17].

Lowastatyna jest otrzymywana przemysłowo na drodze fermentacji szczepów *Aspergillus terreus* lub *A. caespitosus*, przy czym kluczowe znaczenie mają warunki podłoża, składniki odżywcze oraz sposób prowadzenia hodowli. Wykazano, że zarówno dobór medium, jak i warunki fizykochemiczne istotnie wpływają na poziom produkcji związku. Po zakończeniu fermentacji lowastatyna jest izolowana z biomasy i pożywki metodami ekstrakcyjnymi, a jej zawartość analizowana technikami chromatograficznymi i spektroskopowymi [18].

## PENICYKLON A

Penicyklon A to niedawno odkryty związek, pochodzący z wtórnego metabolizmu grzybów głębinowych z gatunku *Penicillium sp. F23-2*. Na ten moment nie uzyskano wielu informacji na temat tego polilaktydu. Ze szczepu udało się wyselekcjonować cytotoksyczne alkaloidy (NRPs) oraz terpenoidy – w podłożu na bazie ziemniaków – oraz poliketydy, które zawierały azot, stosując mieszane podłoże. Dalsze badania doprowadziły do określenia zależności produkowanego metabolitu od warunków hodowli, co może prowadzić do uzyskania zróżnicowanej grupy produktów wtórnych (OSMAC). W ten sposób, podczas hodowli na stałym podłożu na bazie ryżu oraz dalszej selekcji, udało się otrzymać nowe produkty wtórne penicyklony A–E [18]. Związki te są pochodnymi kwasu ambuinowego. W strukturze penicyklonu A (10.1) zauważa się charakterystyczny

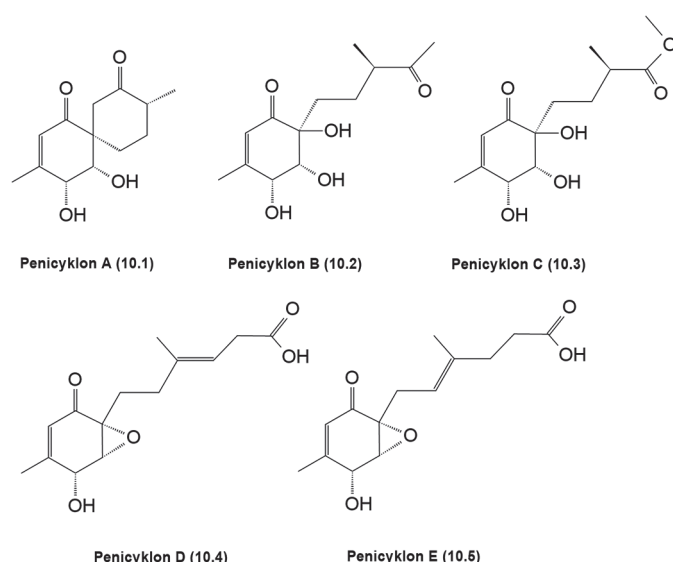
sześciozłonowy spirolakton, który sąsiaduje z pierścieniem cykloheksanolu (Ryc. 3) [19].

Całkowitą syntezę indukowaną sztucznie Penicyklonu A można przeprowadzić za pomocą podwójnej reakcji Grignarda. Synteza ta jest wieloetapowa oraz opiera się na wykorzystaniu *d*-rybozy jako chiralnego prekursora. Obejmuje ona kontrolowaną budowę rdzenia spirolaktonowego i kończy się utlenieniem allilowym, tworząc strukturę metabolitu. *d*-Ryboza, jako tani i optycznie czysty prekursor fragmentu *cis*-diolu, okazała się najskuteczniejszym wyborem do przeprowadzenia syntezy penicyklonu A. Następnie dokonano przekształcenia szkieletu węglowodanowego w cykloheksanowy rdzeń penicyklonu A. Pozwoliło to zbudować kluczowe fragmenty cząsteczki, które później stały się częściami dwóch pierścieni obecnych w strukturze docelowego związku [20].

Opracowano również pełną syntezę laboratoryjną penicyklonu A, opartą na wykorzystaniu *d*-rybozy jako chiralnego prekursora. Strategia ta umożliwiła kontrolowaną budowę rdzenia spirolaktonowego oraz odtworzenie kluczowych elementów stereochemicznych cząsteczki. Choć synteza potwierdziła poprawność przypisania struktury, syntetycznie otrzymany związek nie wykazywał wcześniej raportowanej aktywności biologicznej, co wskazuje na możliwy wpływ zanieczyszczeń w próbkach naturalnych. Dzięki zastosowaniu reakcji metatezy doprowadzono do zamknięcia drugiego pierścienia, otrzymując związek pośredni bardzo zbliżony do struktury penicyklonu A [20].

## TETRACYKLINY

Tetracykliny to grupa poliketydów o działaniu przeciwbakteryjnym, zawierających charakterystyczny układ czterech sześcioczłonowych pierścieni. Pierwszym wyizolowanym związkiem z tej grupy była chlorotetracyklina (11). Tetracykliny są jednymi z najczęściej używanych antybiotyków, historycznie były to tetracykliny I generacji, a współcześnie II i III. Generacja I to produkty naturalne szczepów bakteryjnych, takich jak – *Streptomyces aureofaciens*, *Strepto-*



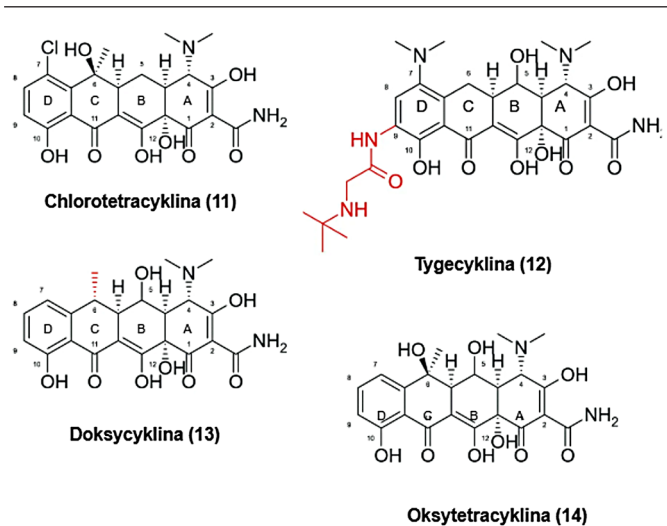
Rycina 3. Struktura penicyklonu A i jego pochodnych [19].

*myces rimosus* – kolejne generacje to związki semisyntetyczne opierające się na produktach naturalnych [21]. Mimo że związek (11) nie ma obecnie zastosowania farmakologicznego, to ma on kluczowe znaczenie w syntezie nowoczesnych antybiotyków i stanowi ich częsty prekursor. W ogólnym ujęciu mechanizm działania przeciwbakteryjnego tetracyklin może opierać się na ich zdolności do zatrzymywania syntezy białek. Dokładniej, zatrzymują translację poprzez przyłączanie się do locus 16S podjednostki 30S rybosomu, co przeciwdziała wiązaniu się aminoacylowego przenośnika tRNA do kompleksu mRNA-rybosom. Inne właściwości bioaktywne, takie jak - działanie przeciwzapalne, antyapoptozowe i neuroprotektoryjne - pozostają niewytłumaczone tym mechanizmem. Przypuszcza się, że płaska policykliczna tetracyklin ułatwia im wiązanie się do RNA [22].

Właściwości tetracyklin I generacji mogą być rozwijane, poprzez zmiany strukturalne w zakresie grup aminowych, hydroksylowych oraz karbonylowych, prowadząc do tetracyklin wyższych generacji.

Doksycyklina zmodyfikowana jest poprzez eliminację grupy hydroksylowej na węglu C-6, co wpływa na rozszerzenie spektrum przeciwbakteryjnego w porównaniu do chlorotetracykliny, jak i możliwość zastosowania farmakologicznego w leczeniu zapaleń przewlekłych. Mechanizm jej działania może również opierać się na zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu [24]. Tygecyklina posiada nieobecny w chlorotetracyklinie podstawnik (2-tertbutyloamino) acetamidowy przy węglu C-9. Klasyfikowany jest on jako antybiotyk o niskiej toksyczności i statystycznie wysokiej biodegradowalności. Jego działanie przeciwbakteryjne jest skuteczne zarówno na bakterie Gram(+), jak i Gram(-). Jest stosowany w leczeniu zapaleń skóry oraz układu pokarmowego. Wykazuje on również działanie przeciwnowotworowe, lecz nie jest ono jeszcze w pełni zbadane (Ryc. 4) [25].

Badania nad biosyntezą tetracyklin zaczęły się już w latach 60 XX wieku w celach optymalizacji produkcji antybiotyków. Do tej pory najdokładniej opisanym szlakiem biosyntezy chlorotetracykliny jest proces zachodzący w szczepie *S. rimosus*. Szkielet poliketydowy syntezowany jest przez minimalną PKS (syntetazę poliketydową) typu II, składającą się z ketosyntaz  $\alpha$  i  $\beta$ , a także białka nośnikowego acylowego (ACP) przy współprzyłączeniu do amidotransferazy (AMT). Minimalna PKS typu II katalizuje kondensację Claisena prekursorów malonowych, aby wytworzyć dekaketydowy produkt pośredni. Kluczowe wstępne związanie struktury poliketydu przeprowadzane jest przez keto-reduktazę, która katalizuje redukcję grupy ketonowej węgla C-8. Natomiast cyklizacja oraz aromatyzacja pierścienia zachodzi, dzięki cyklazo-aromatazie. Zamknięcie pierścienia może zachodzić spontanicznie lub przy udziale nieopisannej jeszcze cyklazy. Dalsze przekształcenia produktu pośredniego prawdopodobnie rozpoczynają się metylacją na węglu C-6 przez metylotransferazę, a następnie podwójną hydroksylacją odpowiednio na węglach C-4 oraz C-12 przez układ oksygenaz. Za ostateczne kroki w biosyntezie chlorotetracykliny uważa się redukcję wiązania podwójnego między węglami C-5 oraz C-11, a następnie chlorowanie przez halogenazę flawinozależną CtcP, należącą do osobnego



**Rycina 4.** Metabolity wtórne z grupy tetracyklin [21,23]. Komentarz: czerwonym kolorem oznaczono wyróżniający podstawnik tygecykliny, prowadzący do zmian właściwości farmakodynamicznych związku.

klastru genowego w stosunku do wcześniej wymienionych enzymów [21].

Hodowla przemysłowego szczepu bez modyfikacji genowej *S. rimosus* może prowadzić do uzyskania oksytetracykliny (14), zatem do jego genomu został wprowadzony gen *ctcB* w celu generacji ukierunkowanej syntezy na chlorotetracyklinę. Dzięki modyfikacjom genetycznym szczepów, obejmującym m.in. nadekspresję genów odpowiedzialnych za oporność, możliwe było istotne zwiększenie wydajności biosyntezy chlorotetracykliny. Wyniki te potwierdzają potencjał podejść inżynierii metabolicznej w ukierunkowanym kształtowaniu produkcji antybiotyków poliketydowych [23].

Pomimo 60-letniego czasu stosowania w farmakologii, to nadal nie każdy aspekt ich funkcjonowania jest zbadany. Poznanie dokładnego mechanizmu funkcjonowania umożliwiłoby ukierunkowany rozwój kolejnych generacji antybiotyków lub ich pochodnych. Jednocześnie lepsze poznanie ścieżki biosyntezy chlorotetracykliny może być kluczowe w optymalizacji produkcji na skalę przemysłową. Szczególnie, że klasyczna ścieżka syntetyczna jest wieloetapowa i ciężka do przeskalowania, semisynteza stanowi alternatywne i proekologiczne rozwiązanie [21].

Tym samym przykład tetracyklin obrazuje ich szeroki potencjał bioaktywny oraz podobną specyfikację problemów i wyzwań w zakresie biosyntezy poliketydowych pochodnych, których źródło stanowią również bakterie. Stosując podobne podejście jak przy programowaniu szczepów grzybiczych, tetracykliny stanowią element porównawczy wobec pozostałych przytoczonych metabolitów grzybowych.

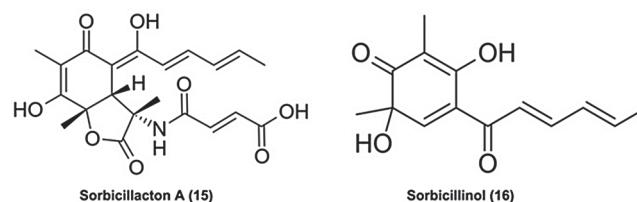
#### SORBICILLAKTON A

Sorbicyllinoidy (15) to grupa pigmentów o zróżnicowanych właściwościach, strukturze i aktywności biologicznej.

Wiele z nich posiada układy dwu- i trzypierścieniowe, lecz każdy z nich zawiera szkielet węglowy sorbicillinolu (16) [26]. Sorbicillakton A jest wyjątkowym członkiem tej grupy, jako że był pierwszym wyizolowanym związkiem zawierającym w swojej strukturze azot – rzadko spotykany wśród sorbicyllinoidów. Sorbicillakton A wykazuje działanie przeciwbiałaczkowe - selektywne wobec morskiej linii limfoblastów L517y, cytotatyczne wobec wirusa HIV i grypy typu A (H1N1) w komórkach MDCK; oraz neuroprotektoryjne - hamujące negatywny wpływ neuroprzekazników takich jak kwasu L-glutaminowego lub serotoniny [27-29]. Związek ten został wyizolowany ze szczepu *Penicillium chrysogenum* powiązanego z gatunkiem gąbki śródziemnomorskiej [27]. Sorbicillakton A zawdzięcza swoją unikalną strukturę jego cząsteczkom budulcowym – sorbicillinolowi, anilinie i kwasie fumarowym (Ryc. 5) [27].

Ścieżka biosyntezy sorbicillaktonu A nie jest w pełni poznana, ale opisywane są propozycje szlaku dla jej prekursora. Koncentrują się one na genach syntaz poliketydowych (PKS) uważanych za kluczowe. W tych klastrach kodowane są między innymi geny SorA, SorB i SorC, które odpowiadają bezpośrednio za przemiany prekursorów, dalsze modyfikacje struktury oraz regulację transkrypcji [29]. Jednakże bezpośrednia rola syntaz poliketydowych pozostaje niejednoznaczna. Opisuje się powiązanie nieredukujących PKS – SorA i SorB – z dimeryzacją prekursorów (jednego acetylowanego przez ketosyntetazę (KS) oraz jednego manoylowanego przez ACP) oraz syntezą heksaketydu. W kroku pomiędzy dimerem a wytworzeniem heksaketydu odgrywa rolę kilka enzymów: keto-reduktaza (KR), dehydrataza (DH) oraz enoyloreduktaza (ER). Po cyklizacji heksaketydu mogącej zachodzić zgodnie z kondensacją Claisena, następuje monoooksydacja sorbiciliny z pomocą enzymu kodowanego przez SorC [28,29]. Poprzez addycję Michaela do sorbicillinolu uzyskuje się końcową postać sorbicillaktonu A (Ryc. 6) [27].

Badania dotyczące wielkoskalowego pozyskiwania sorbicillaktonu A skupiają się na optymalizacji hodowli, syntezy laboratoryjnej, jak i chemoenzymatycznej. Znaczącym czynnikiem wpływającym na efektywność hodowli *P. chrysogenum* jest medium startowe. Początkowe pH również ma znaczący wpływ na wydajność procesu, w tym przypadku wynosiło ono 6.6. Po 14 dniach inkubacji w ciemności w 30°C otrzymano 25mg/L sorbicillaktonu A. Raportowany jest również efekt źródła węglowodanów na wydajność pro-



Rycina 5. Struktura sorbicillaktonu A oraz jego składowej, sorbicillinolu [27].

dukcji (60 - 66%), gdzie lepsza wydajność została uzyskana przy zastosowaniu sacharozy, galaktozy, maltozy i trehalozy. Po ekstrakcji ciecz-ciecz zastosowano metodę szybkiej chromatografii wirówkowo-podziałowej (FCPC) w celu oczyszczenia produktu [30]. Ponadto powstało kilka dróg całkowitej syntezy laboratoryjnej sorbicillaktonu A [27]. Stanowią one wyzwanie w skalowalności przez ilość kroków potrzebnych do wytworzenia produktu, lecz pozwalają na dalsze poznawanie zachowania i właściwości chemicznych sorbicillaktonu A oraz jego pochodnych. Dodatkowym rozwiązaniem jest podejście biokatalityczne, które umożliwiłoby łatwiejszą kontrolę nad stereoselektywnością reakcji, co skutkuje mniejszą liczbą wymaganych kroków w syntezie [27].

Przykłady takie jak lowastatyna czy sorbicillakton A pokazują ich istotne znaczenie farmakologiczne, w tym działanie hipolipemiczne, przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe i neuroprotektoryjne. Pomimo zaawansowanej wiedzy na temat biosyntezy wielu z tych związków, nadal istnieją luki dotyczące pełnej regulacji szlaków metabolicznych oraz ich zależności od warunków środowiskowych. Dalsze badania nad inżynierią klastrów genowych i optymalizacją hodowli mogą umożliwić bardziej efektywne wykorzystanie poliketydów w biotechnologii i medycynie.

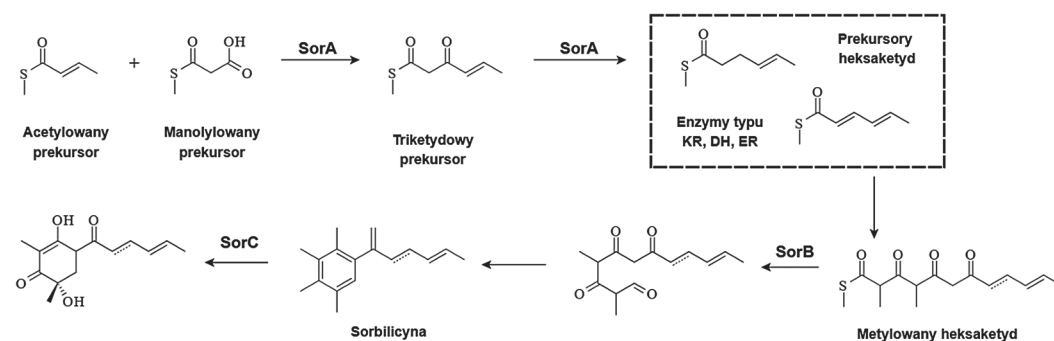
## TERPENOIDY

### OPHIOBOLINA A

Ophiobolina A (17) to związek należący do grupy sesterpenoidów, będąca klasą składającą się najczęściej z 25 atomów węgla – w tym 5 jednostek izoprenowych. Występują one głównie w organizmach morskich. Jednym z grzybów produkujących ophiobolinę A jest *Bipolaris oryzae*, odpowiedzialny za brązowienie liści ryżu. Początkowo znane były tylko jego właściwości fitotoksyczne, ale dalsze dokładne

badania wykazały potencjalne działanie przeciwnowotworowe. Charakterystycznym elementem strukturalnym związku (17) jest cykliczny układ dwóch pięciocłonowych pierścieni oraz jednego ośmiocłonowego, tworząc układ 5-8-5 [31].

Działanie przeciwnowotworowe ophioboliny A może opierać się na selektywnej inhibicji



Rycina 6. Proponowana ścieżka biosyntezy prekursora, sorbicillinolu [29]. Skróty: KR - keto-reduktaza, DH - dehydrataza, ER - enoyloreduktaza (ER); SorA, SorB, SorC - geny kodujące ścieżkę biosyntetyczną sorbicillaktonu A.

aktywności K-ras4B, poprzez dezaktywację calmoduliny, która wpływa na wzrost nowotworowych komórek macierzystych. Ophiobolina A hamuje wzrost zarówno komórek wrażliwych na apoptozę, jak i odpornych na apoptozę. Wykazała również działanie wobec linii komórek nowotworowych zawierających różne fenotypy uodporniające na leczenie farmakologiczne – takich jak linia nowotworu płuc GLC-4 [32]. W badaniach na myszach poskutkowało wzrostem przeżywalności populacji oraz zmniejszeniem wzrostu nowotworów, a w ludzkich liniach komórek GBM związek ten wywołał reakcję o charakterze parapoptozy oraz zmniejszenie aktywności kanału BKCa, lecz wpływ inhibicji kanału na zaobserwowaną śmierć komórek nie jest znany (Ryc. 7) [33].

Proces biosyntezy ophioboliny w szczepie *A. ustus* jest połączony z czterema innymi szlakami, poprzez produkty pośrednie konieczne do generacji związku bioaktywnego. Substratami do biosyntezy ophioboliny są DMAPP (pirofosforan dimetyloallilu) oraz IPP (pirofosforan izopentylu). Pierwszym produktem pośrednim jest pirofosforan farnesylowy (FPP) powstający w reakcji katalizowanej enzymem Au6298, jednocześnie jest to substrat do biosyntezy draminy (18). Kolejnym produktem pośrednim jest – pirofosforan geranylgeranylu (GGPP) – powstaje on w wyniku przedłużenia łańcucha o jedną cząsteczkę IPP. Dalsze elongacje łańcucha o kolejną cząsteczkę IPP generuje powstaje pirofosforan geranylarnazyloowy (GFPP), a jego cyklizacja skutkuje otrzymaniem ophioboliny. Dalsze wydłużanie łańcucha GFPP przez enzym Au3446 oraz cyklizacja przez syntetazę sterolową prowadzić może do otrzymania ergosterolu [34].

Przypuszczany szlak biosyntezy ophioboliny może zachodzić w szczepach – *A. clavatus*, *Bipolaris maydis* (producent ophioboliny A) oraz *Emericella varicolor* (producent ophioboliny K) – z racji na homologiczne fragmenty klastru genowego ophioboliny. Zidentyfikowano monooksygenazę odpowiedzialną za utlenianie ophioboliny – OblB należąca do cytochromu P450. Wykazano, że proces utleniania zachodzi przez czteroetapowy mechanizm rodnikowy, w którym przyłączane są atomy tlenu do odpowiednich węgli. Po tych przekształceniach otrzymywana jest ophiobolina C lub 6-epiophiobolina C, w zależności od pozycji protonu w

strukturze. Za przemianę ophioboliny C do ophioboliny A może być odpowiedzialny enzym OblC. Odgrywa on rolę w utlenianiu allilowym na łańcuchu bocznym, poprzez rodnik allilowy – podobnie jak w utlenianiu ophioboliny [35].

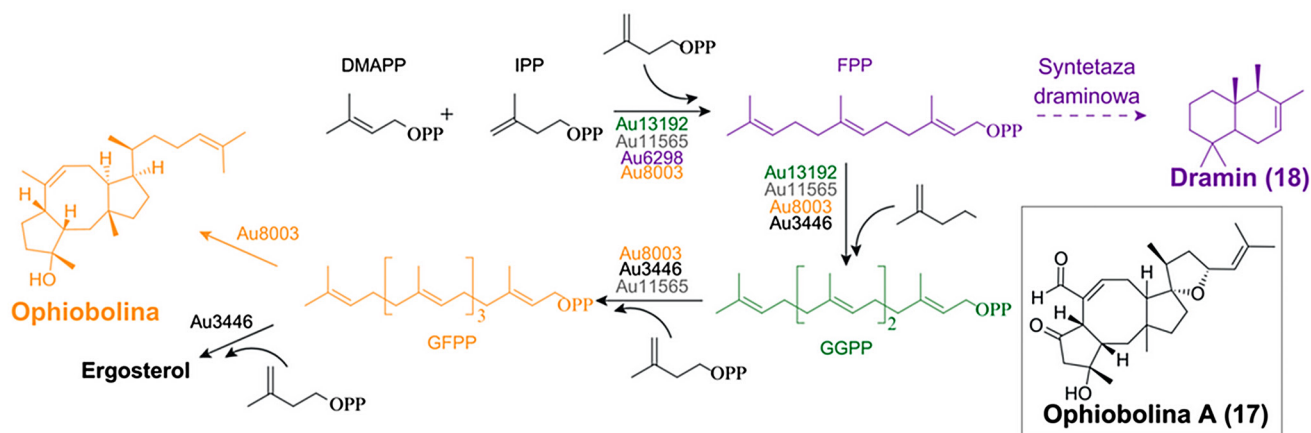
Badania wykazały, że warunki środowiskowe, w tym rodzaj oświetlenia, istotnie wpływają na wzrost grzybów produkujących ophiobolinę A oraz na poziom jej biosyntezy. Zaobserwowano wyraźne różnice w wydajności produkcji związku w zależności od długości fali światła, co wskazuje na możliwość regulacji metabolizmu wtórnego poprzez czynniki fizyczne [31].

Badano też syntetyczną drogę do układu pierścieniowego 5-8-5 – prekursorów ophioboliny A. W enancjoselektywnej kaskadzie rodnikowej punktem wyjścia był (-)-linalool. Po metatezie z katalizatorem HG-II otrzymano cyklopentanon, który przekształcano metodą rutenową. Osobno gennaiol konwertowano do jodoalkilopochodnej, stosując cyklopropanację Charette i zmodyfikowaną metodę Appel. Transmetylacja dała organomiedziowy pośrednik, a jego addycja dała trichloroketon. Po izolacji oraz reakcji wobec chlorku miedzi (I) i bipirydyny uzyskano pożądany policykliczny związek [36].

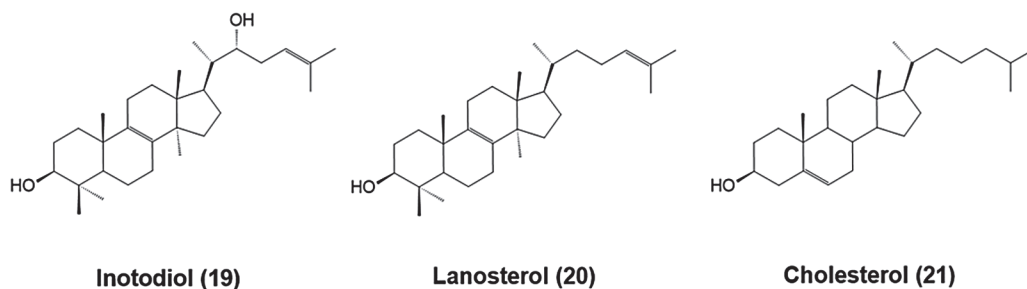
Ophiobolina A ma wiele nieopisanych całkowicie aspektów, które przy dogłębniejszym poznaniu mogłyby skutkować łatwiejszej determinacji jej potencjalnych zastosowań w przyszlności. Z pewnością wnikliwie zbadany szlak biosyntezy, umożliwiłby dalszą optymalizację hodowli produkujących ją grzybów. Jednakże obecnie znane informacje na temat biosyntezy tego związku wskazują na trudności w jej pełnym poznaniu, jako że ten szlak może być powiązany z kilkoma różnymi związkami. Mimo tego dalsza optymalizacja hodowli produkujących ophiobolinę A grzybów może przynieść korzystne rezultaty w jej wielkoskalowej produkcji.

## INOTODIOL

Inotodiol (19) jest rzadkim tetracyklicznym triterpenoidem zaliczanym do oksysteroli, znaleziony do tej pory tylko w *I. obliquus* w niskim stężeniu (> 0,2%) i charakteryzuje



Rycina 7. Struktura ophioboliny A oraz proponowana ścieżka biosyntezy jej prekursora [34]. Komentarz: zastosowane różne kolory obrazują etapy i produkty pośrednie, powstające na każdym etapie ścieżki biosyntetycznej; w ramce została zaprezentowana struktura produktu końcowego – ophioboliny A. geny kodujące ścieżkę biosyntetyczną sorbicillaktonu A.



Rycina 8. Struktury inotodiolu, cholesterolu i lanosterolu [38].

się względnie niską rozpuszczalnością w wodzie [37,38]. Badania wskazują, że posiada różnorodne właściwości biologiczne: przeciwnowotworowe, antibakteryjne, przeciwalergiczny, przeciwzkrzepowy, przeciwcukrzycowy i przeciwnadciśnieniowy. Komórki HeLa, niewyciszone względem p53, wykazywały wysoki poziom apoptozy po zastosowaniu inotodiolu, podczas gdy wcześniejsze wyciszenie p53 za pomocą siRNA istotnie osłabiało ten efekt [39]. Strukturalnie związek (19) jest zbliżony do lanosterolu (20). Oba sterole zawierają ten sam szkielet co cholesterol oraz nienasycony łańcuch boczny, ale różnią się grupą hydroksylową. Lanosterol, tak jak cholesterol, zawiera jedyną grupę hydroksylową przy węglu C-3, natomiast inotodiol zawiera dwie grupy hydroksylowe odpowiednio przy węglach C-3 oraz C-22. Wykazano, że triterpeny i steroidy występujące w *I. obliquus*, posiadające grupę hydroksylową oraz nienasycone wiązanie w łańcuchu bocznym, wykazują silniejsze właściwości biologiczne niż inne sterole. Spośród nich inotodiol wykazywał najsilniejszą aktywność biologiczną (Ryc. 8) [38].

W genomie *I. obliquus* wykryto 135 białek cytochromu P450. Jego podrodziny mogą być związane z bezpośrednią biosyntezą metabolitów wtórnych, w tym inotodiolu. Związek (20) powstaje w reakcji katalizowanej przez syntazę lanosterolową, z wykorzystaniem 2,3-oksydostwalenu jako prekursora, gdzie w dalszym etapie ulega on przekształceniu do inotodiolu, poprzez hydroksylację z udziałem cytochromu P450 [40].

Izolacja inotodiolu z *Inotus obliquus* jest utrudniona ze względu na niską zawartość związku oraz jego właściwości fizykochemiczne, w szczególności ograniczoną rozpuszczalność. Dotychczasowe strategie opierają się na ekstrakcji rozpuszczalnikowej i wieloetapowym oczyszczeniu chromatograficznym (Ryc. 9). Ograniczenia te

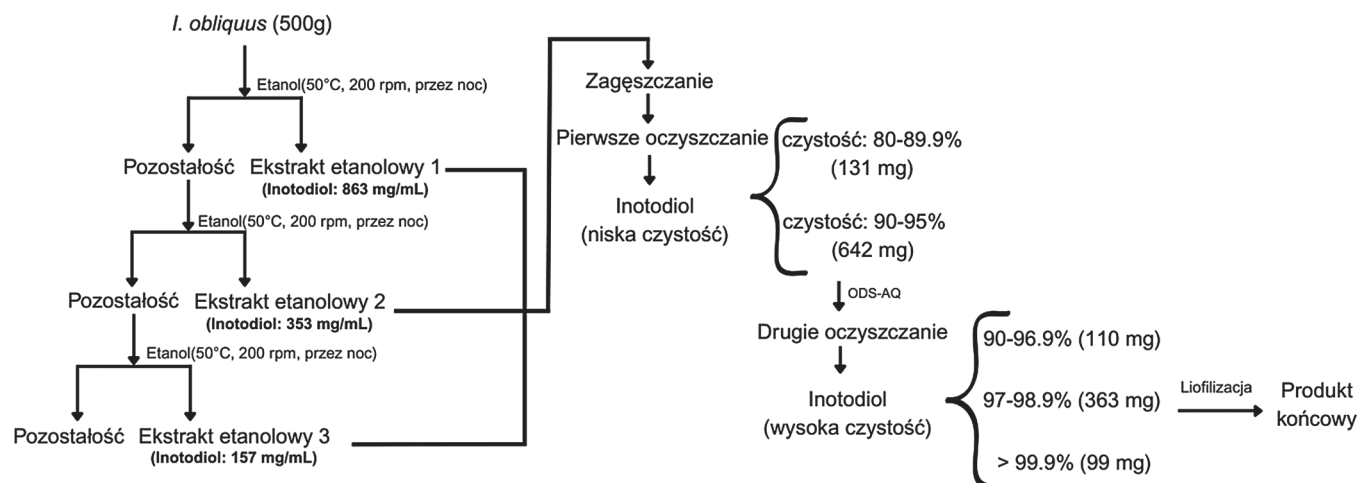
podkreślają potrzebę opracowania bardziej wydajnych metod pozyskiwania oraz alternatywnych podejść biotechnologicznych [38].

Terpenoidy grzybiczne, reprezentowane m.in. przez ophiobolinę A i inotodiol, wykazują wysoką złożoność strukturalną oraz silną aktywność biologiczną, zwłaszcza przeciwnowotworową. Ich biosynteza opiera się na rozbudowanych szlakach izoprenoidowych, często powiązanych z innymi metabolitami pierwotnymi i wtórnymi, co utrudnia jednoznaczne odtworzenie całego procesu. W wielu przypadkach mechanizmy molekularne odpowiedzialne za obserwowane efekty biologiczne pozostają nie do końca poznane. Rozwój metod hodowlanych, biokatalitycznych i syntetycznych stanowi klucz do zwiększenia dostępności tych związków i lepszego zrozumienia ich potencjału terapeutycznego.

#### INNE BIOAKTYWNE METABOLITYCH GRZYBICZNE

##### CHAETOGLOBOSYNA A

Chaetoglobosyna A (ChA, 22) jest produktem naturalnym pochodzącym z grzyba *Chaetomium globosum*. Związek ten należy do grupy cytochalazyn, charakteryzujących się zróżnicowaną strukturą oraz bioaktywnością, jednocześnie ze względu na wysokie koszty biosyntezy oraz niską wydajność, upowszechnienie i zastosowanie tego metabolitu w biomedycynie obecnie napotyka znaczne trudności. Grupa tych związków stanowi hybrydę poliketydów i



Rycina 9. Schemat ekstrakcji inotodiolu [38].

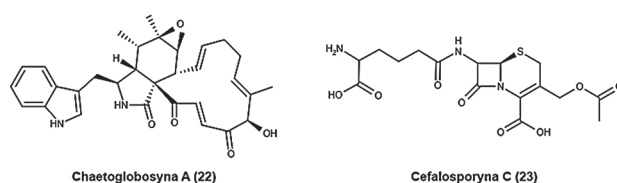
aminokwasów, wytwarzane przez syntazę poliketydową w sprzężeniu z nierybosomalną syntazą peptydową (PKS-NRPs). Ten kompleks enzymatyczny inicjuje tworzenie rdzenia cząsteczki, poprzez stopniową kondensację jednostek malonylo-CoA i aminokwasów, prowadząc do powstania charakterystycznej trójpierścieniowej struktury z podstawionym fragmentem indolowym. Centralną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywa gen *CgcheR*, kodujący czynnik transkrypcyjny [41]. Cały proces biosyntezy zachodzi w sposób precyzyjnie regulowany, a znajomość mechanizmów genetycznych leżących u jego podstaw umożliwiła konstrukcję szczepów o zwiększonej produkcji tej bioaktywnej grupy związków (Ryc. 10) [42].

ChA, zgodnie z mechanizmem typowym dla większości cytochalazyn, oddziałuje z filamentami aktynowymi w komórkach wybranych ssaków, co skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego oraz ograniczeniem zdolności komórek do migracji i marszczenia błony komórkowej. Ten mechanizm wytwarza cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych i przekłada się na aktywność immunomodulacyjną oraz przeciwgrzybiczą [42].

## CEFALOSPORYNA C

Cefalosporyny to grupa  $\beta$ -laktamowych antybiotyków z silnym działaniem przeciwbakteryjnym, względnie niską toksycznością i szerokim zastosowaniem farmakologicznym [44]. Mimo że rozwój kolejnych generacji cefalosporyn wyparł cefalosporynę C (23) z rynku farmaceutycznego, to nadal znajduje ona zastosowanie w badaniach, szczególnie tych skupiających się na antybiotykooporności. Przemysłowe pozyskiwanie cefalosporyny C skupione jest wokół fermentacji i jej regulacji. Głównym szczepem produkującym ten związek jest *A. chrysogenum*, który dzięki selektywnym modyfikacjom i warunkom procesowym może wytworzyć nawet 24-28g/L cefalosporyny C [43]. Cefalosporyna C jest zbliżona strukturalnie, jak i właściwościami, do penicyliny. Kluczowym podobieństwem jest obecność charakterystycznego pierścienia  $\beta$ -laktamowego, który wpływa na wysoką stabilność cefalosporyn oraz na ich aktywność biologiczną [45]. Występowanie grup karboksylowych, atomów siarki oraz azotu w strukturze wynika z dostępnych substratów szlaku metabolicznego.

Ścieżka bioprodukcji związku (23) w szczepie *A. chrysogenum*, dzięki dokładnemu rozpoznaniu enzymatycznemu, wykazuje wysoki potencjał do dalszych modyfikacji chemoenzymatycznych. Szlak inicjowany jest przez trzy aminokwasy: L-walinę, L-cysteinę oraz L- $\alpha$ -kwas aminoadypinowy. W cytozolu syntaza ACV tworzy tripeptyd ACV, który cyklizuje do izopenicyliny N. W peroksysomach izopenicylina N ulega epimeryzacji, a następnie w cytozolu syntaza DAOC (syntaza deacetoksycefalosporyny C) przekształca i rozszerza pięcioczłonowy pierścień do sześcioczłonowego charakterystycznego dla cefalosporyn. Po hydroksylacji i acetylacji powstaje

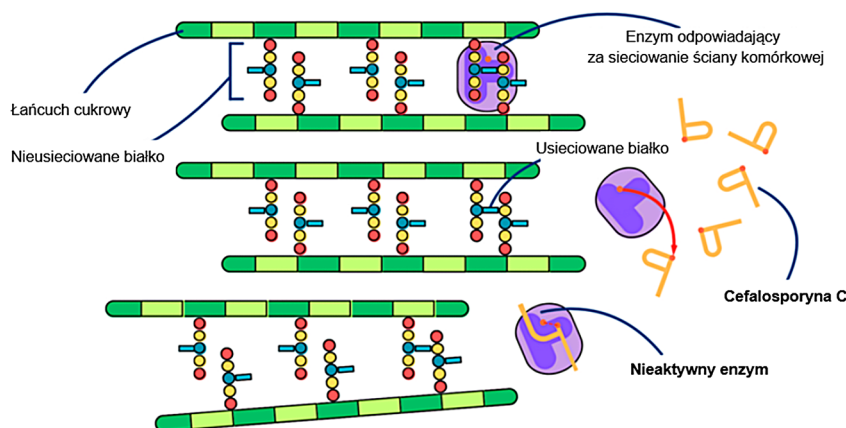


Rycina 10. Struktura chaetoglobosyny A (22) oraz cefalosporyny C (23) [41,43].

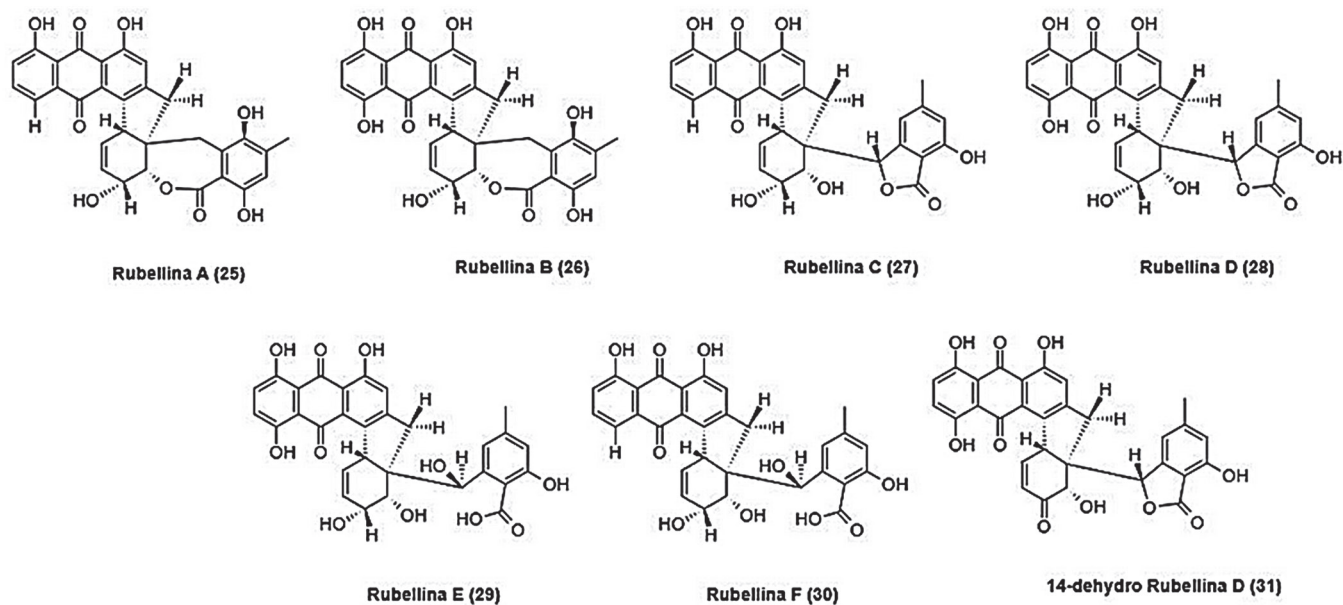
cefalosporyna C, której szybkość generacji ograniczona jest przez wieloetapowość ścieżki [43-45].

Działanie cefalosporyny C wynika z jej zdolności do nieodwracalnej inhibicji enzymów typu PBP (ang. *penicillin-binding proteins*), które katalizują kluczowe etapy biosyntezy ściany komórkowej bakterii, zwłaszcza tworzenie wiązań poprzecznych w peptydoglikanie. Struktura peptydoglikanu zapewnia mechaniczne wsparcie i ochronę osmotyczną komórkom bakteryjnym, dlatego jego destabilizacja prowadzi do ich lizy. Z chemicznego punktu widzenia,  $\beta$ -laktamowy pierścień cefalosporyny C naśladuje fragment D-Ala-D-Ala, naturalnego substratu PBP, co pozwala substancji aktywnej działać jako „pułapka” – tworząc trwale wiązanie kowalencyjne z centrum aktywnym enzymu. To mechanistyczne maskowanie sprawia, że proces syntezy ściany komórkowej zostaje trwale zatrzymany. Choć ten mechanizm jest skuteczny wobec wielu bakterii Gram-dodatnich i niektórych Gram-ujemnych, jego efektywność zależy od ekspresji określonych izoform PBP, ich dostępności w błonie oraz zdolności patogenów do produkcji  $\beta$ -laktamaz (Ryc. 11) [44,45].

Hodowla *A. chrysogenum* prowadzona jest w medium z 30 g/L sacharozy, 1 g/L fosforanu jednopotasowego, 0.3 g/L siarczanu magnezu i 15 mL roztworu metali śladowych, w temperaturze 28°C przez 6-7 dni. Początkowo obserwuje się intensywną konsumpcję sacharozy, prowadzącą do wzrostu biomasy, a największą produkcję cefalosporyny C osiąga się przy wolniejszym zużyciu węglowodanów – maksymalnie po 120 h. Optymalne warunki to pH 7.2 i poziom tlenu 30%. Wpływ na wydajność mają m.in. dodatki: metionina (optymalnie 0.4 g/L) i siarczan amonu, które wspierają syntezę poprzez dostarczanie siarki i zwiększe-



Rycina 11. Nieodwracalna inhibicja enzymów PBP w obecności cefalosporyny C [45].



Rycina 12. Struktury Rubelin A-F, a także pochodnej 14-dehydro-rubelliny D [49].

nie biomasy [44]. Cefalosporyna C jest oczyszczana przez ekstrakcję ciecz-ciecz, która obejmuje zakwaszenie, odbiałczanie i koncentrację. Ze względu na jej rozpuszczalność w wodzie, stosuje się kwaśne środowisko i acetonitryl jako stabilniejszy rozpuszczalnik niż alkohole. Mimo dobrej znajomości biosyntezy, badania skupiają się na nowych metodach konwersji cefalosporyny C do substratów cefalosporyn nowszych generacji oraz na optymalizacji fermentacji, co ma kluczowe znaczenie wobec rosnącej antybiotykoodporności [43].

## RUBELLINY

Rubelliny stanowią rodzinę fitotoksycznych metabolitów wtórnych pochodzących od prekursorów antrachinonowych. Występują w grzybie *Ramularia collo-cygni*, odpowiedzialnym za plamistość liści *Ramularia* (RLS), a także zostały wykryte u *Mycosphaerella rubella*. W *Ramularia collo-cygni* zostały zidentyfikowane i wyizolowane odmiany rubellin A-F ((25-30), Ryc. 12) oraz 14-dehydro rubellina D ((31), Ryc. 12). Na poziomie komórkowym rozwój objawów chorobowych RLS uważa się za związany z indukcją śmierci komórek roślinnych, spowodowaną uwalnianiem i działaniem w roślinie fitotoksyn rubellinowych. Znalezienie rubellin w liściach jęczmienia oraz obserwacja, że te związki są zdolne do indukowania produkcji reaktywnych form tlenu, takich jak anion ponadtlenkowy *in vitro*, sugerują ich udział w rozwoju RLS. Co więcej, podobnie jak w przypadku innych NP o strukturze antrachinonowej, rubelliny wykazały silne działanie hamujące i rozbijające formowanie filamentów helikalnych białka tau, które stanowią istotny marker terapeutyczny w chorobie Alzheimera, co sugeruje, że ta grupa związków może być istotna do opracowania narzędzi badawczych lub leków na tauopatii neurodegeneracyjne [46,47].

Rubelliny mogą wykazywać zależną od światła aktywność antybiotyczną i zaobserwowane zostały ich fotody-

namiczne właściwości. Wszystkie rubelliny przejawiają zdolność do działania jako środki lipoperoksydacyjne na wybranych substratach, co jest dodatkowo potwierdzone ich obecnością w fitotoksycznych grzybach. Mechanizm przeprowadzania reakcji zależnych od światła opiera się prawdopodobnie na kombinacji fotodynamicznych reakcji typu I i II, w których rdzeń rubelliny przechodzi w stan wzbudzony dzięki energii fotonu. Energia następnie jest przekazywana do tlenu, prowadząc do powstania jego reaktywnych form w postaci tlenu singletowego lub rodnika ponatlenkowego, poprzez przekazanie elektronu. Te formy następnie ulegają rozkładowi do rodnika hydroksylowego z udziałem komórkowego nadtlenu wodoru. Reaktywne formy tlenu mogą następnie utleniać kwasy tłuszczowe w ścianie komórkowej. Taki mechanizm działania jest szczególnie szkodliwy dla ścian komórek roślinnych i przypomina działanie spokrewnionego NP – cercosporyny C [47,48].

W nowoczesnej syntezie (+)-rubelliny C zastosowano strategię z późnoetapowym wprowadzeniem antrachinonu za pomocą reakcji anulacji Hausera, co pozwoliło uniknąć problemów z utlenianiem i poprawiło rozpuszczalność produktu. Kluczowym krokiem było przygotowanie odczynnika Grignarda z bromku otrzymanego z o-krezolu, który został następnie poddany addycji sprzężonej do enonu. Po kolejnych transformacjach, w tym addycji L-selektrydu, uzyskano alkohol allilowy z wysoką diastereoselektywnością. Alkohol allilowy przekształcono w reagent alliloborowy poprzez borylację z użyciem katalizatora palladowego i kwasu bisboronowego. Allilacja aldehydu przez ten reagent dała lakton homoallilowy, stanowiący ważny element strukturalny cząsteczki. Usunięcie grupy silylowej i utlenienie fenolu doprowadziło do powstania monoketalu p-chinonu. Reakcja anulacji Hausera z sulfonem w obecności tert-butoksydu litu umożliwiła syntezę antrachinonu. Tryflacja związku antrachinonowego, a następnie reakcja Hecka z katalizatorem palladowym doprowadziła do powstania szkieletu rubelliny. Demetylacja przy użyciu eteratu jodku

magnezu usunęła wszystkie grupy metylowe z produktu. Ostateczne usunięcie acetonidu w kwaśnych warunkach wytworzyło jeden enancjomer (+)-rubelliny C, a do jego oczyszczenia zastosowano chromatografię kolumnową w odwróconej fazie z użyciem kolumny typu C18 przy użyciu systemu CombiFlash Rf-200. Elucję prowadzono gradientowo z wykorzystaniem mieszaniny acetonitrylu i wody [47].

Pozostałe metabolity wtórne, takie jak chaetoglobosyna A, cefalosporyna C czy rubelliny, ilustrują szerokie spektrum strategii biosyntetycznych wykorzystywanych przez grzyby, obejmujących hybrydowe szlaki PKS-NRPs oraz klasyczne ścieżki aminokwasowe. Związki te odgrywają istotną rolę zarówno w medycynie, jak i w oddziaływaniach ekologicznych, np. jako fitotoksyny lub regulatory stresu oksydacyjnego. Pomimo dobrze poznanych mechanizmów działania niektórych z nich, ograniczenia w wydajności produkcji i złożoność biosyntezy nadal stanowią istotne wyzwania. Ich dalsze badania mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych oraz narzędzi badawczych w biologii i chemii medycznej.

## PERSPEKTYWY ROZWOJU BADAŃ

Postęp w odkrywaniu nowych związków bioaktywnych pochodzenia grzybicznego jest obecnie silnie napędzany przez integrację genomiki porównawczej klastrów biosyntetycznych (BGC) z narzędziami uczenia maszynowego oraz inżynierii metabolicznej. Analiza BGC na poziomie genomowym umożliwia identyfikację „cichych” lub słabo ekspresjonowanych klastrów, które nie są aktywne w standardowych warunkach hodowli, a tym samym pozostają niewykorzystanym źródłem potencjalnie nowych metabolitów wtórnych. Coraz częściej stosowane algorytmy uczenia maszynowego (ang. *machine learning* (ML)) pozwalają przewidywać zarówno klasy chemiczne metabolitów, jak i ich potencjalne właściwości biologiczne na podstawie architektury domen enzymatycznych, organizacji genów oraz danych filogenetycznych, co znacząco zawęży przestrzeń poszukiwań eksperymentalnych.

Kluczową rolę w eksperymentalnej walidacji predykcji pełni inżynieria genetyczna z wykorzystaniem systemów CRISPR-Cas, umożliwiających precyzyjne modyfikacje regulatorów transkrypcyjnych, aktywację wybranych BGC lub ich przebudowę w kierunku zwiększonej wydajności biosyntezy. Narzędzia te pozwalają również na badanie zależności pomiędzy warunkami środowiskowymi a ekspresją klastrów biosyntetycznych, co stanowi istotne rozszerzenie klasycznego podejścia. Uzupełnieniem tych strategii jest heterologiczna ekspresja całych BGC w dobrze scharakteryzowanych organizmach modelowych, co umożliwia zarówno potwierdzenie funkcji klastra, jak i uzyskanie produktu w ilościach wystarczających do badań biologicznych i strukturalnych. W połączeniu z inżynierią metaboliczną podejście to tworzy efektywny pipeline od danych genomicznych do identyfikacji i rozwoju nowych związków bioaktywnych [50].

Podsumowując, synergiczne wykorzystanie genomiki porównawczej BGC, metod uczenia maszynowego oraz narzędzi inżynierii genetycznej znacząco przyspiesza proces

odkrywania nowych metabolitów wtórnych pochodzenia grzybicznego. Integracja tych podejść pozwala nie tylko na efektywniejsze „odblokowywanie” ukrytego potencjału biosyntetycznego, lecz także na ukierunkowany rozwój związków o wysokim znaczeniu bioaktywnym i aplikacyjnym.

## PODSUMOWANIE

Metabolity wtórne grzybów są grupą związków o wysokiej bioaktywności, których biosynteza uwarunkowana jest obecnością specyficznych klastrów genów (BGC) oraz odpowiedzią na czynniki środowiskowe. Ich klasyfikacja obejmuje m.in. poliketydy, terpenoidy, peptydy nierybosomalne i alkaloidy, które wykazują działania przeciwdrobnoustrojowe, cytotoksyczne, neuroprotektoryjne czy fitotoksyczne. Przykładami takich związków są m.in. lowastatyna o działaniu obniżającym poziom cholesterolu, penicyklon A otrzymywany w warunkach OSMAC, przeciwnowotworowa ophiobolina A, neuroprotektoryjny sorbicillakton A, przeciwbakteryjna cefalosporyna C oraz rubelliny, które oprócz fitotoksyczności wykazują aktywność fotodynamiczną i potencjalne znaczenie w terapii chorób neurodegradacyjnych. Postęp w zakresie biologii syntetycznej i inżynierii metabolicznej pozwala na identyfikację reakcji w szlakach metabolicznych oraz genów odpowiadających enzymom biorącym w nich udział. Poszerzająca się wiedza prowadzi do licznych sposobów optymalizacji produkcji produktów naturalnych. Połączenie różnych metod, takich jak odpowiednie warunki hodowli, regulacja ekspresji genów klastrów biosyntetycznych oraz inżynieria szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych, umożliwia tworzenie bioaktywnych związków grzybowych o dużym znaczeniu w medycynie, produkcji żywności i ochronie środowiska. Wysoka elastyczność metaboliczna grzybów oraz rosnąca wydajność ich biosyntetycznych szlaków sprzyja stosowaniu nowoczesnych metod inżynierii, aby skutecznie otrzymywać związki bioaktywne.

## PODZIĘKOWANIE

Praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach przyznanej Politechnice Poznańskiej subwencji badawczej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Staszczak M (2021) Fungal secondary metabolites as inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Mol Sci* 22: 13367
2. Elhamouly NA, Hewedy OA, Zaitoon A, Miraples A, Elshorbagy OT, Hussien S, El-Tahan A, Peng D (2022) The hidden power of secondary metabolites in plant-fungi interactions and sustainable phytoremediation. *Front Plant Sci* 13: 964512
3. Ren A, Shi L, Zhu J, Yu H, Jiang A, Zheng H, Zhao M (2019) Shedding light on the mechanisms underlying the environmental regulation of secondary metabolite ganoderic acid in *Ganoderma lucidum* using physiological and genetic methods. *Fungal Genet Biol* 128: 43–48
4. Conrado R, Gomes TC, Roque GSC, De Souza AO (2022) Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. *Antibiotics* 11: 1536
5. Keller NP (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol* 17: 167–180
6. Abegaz BM, Kinfe HH (2019) Secondary metabolites, their structural diversity, bioactivity, and ecological functions: An overview. *Phys Sci Rev* 4: 20180100

7. Ortega HE, Torres-Mendoza D, Caballero EZ, Cubilla-Rios L (2021) Structurally uncommon secondary metabolites derived from endophytic fungi. *J Fungi* 7: 570
8. Xu D, Xue M, Shen Z, Jia X, Hou X, Lai D, Zhou L (2021) Phytotoxic secondary metabolites from fungi. *Toxins* 13: 367
9. Naz T, Ullah S, Nazir Y, Li S, Iqbal B, Liu Q, Mohamed H, Song Y (2023) Industrially Important Fungal Carotenoids: Advancements in Biotechnological Production and Extraction. *J Fungi* 9: 438
10. Jakubczyk D, Dussart F (2020) Selected fungal natural products with antimicrobial properties. *Molecules* 25: 911
11. Niu G, Wang X, Li J (2024) Leucino-statins target Plasmodium mitochondria to block malaria transmission. *Parasites Vectors* 17: 68
12. Naganandhini Srinivasan, Kiruthika Thangavelu, and Sivakumar Uthandi (2022) Lovastatin production by an oleaginous fungus, *Aspergillus terreus* KPR12 using sago processing wastewater (SWW). *Microb Cell Fact* 22: 14–21
13. Kjærboelling I, Mortensen UH, Vesth T, Andersen MR (2019) Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genet Biol* 130: 107–121
14. de Castro PA, Colabardini AC, Moraes M, Horta MAC, Knowles SL, Raja HA, Oberlies NH, Koyama Y, Ogawa M, Gomi K, Steenwyk JL, Rokas A, Gonçalves RA, Duarte-Oliveira C, Carvalho A, Ries LNA, Goldman GH (2022) Regulation of gliotoxin biosynthesis and protection in *Aspergillus* species. *PLoS Genet* 18: e1010028
15. Xue M, Hou X, Fu J, Zhang J, Wang J, Zhao Z, Xu D, Lai D, Zhou L (2023) Recent Advances in Search of Bioactive Secondary Metabolites from Fungi Triggered by Chemical Epigenetic Modifiers. *J Fungi* 9: 147
16. Lyu HN, Liu HW, Keller NP, Yin WB (2020) Harnessing diverse transcriptional regulators for natural product discovery in fungi. *Nat Prod Rep* 37: 6–16
17. Yang DJ, Hwang LS (2006) Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J Chromatogr A* 1119: 277–284
18. Barrios-González J, Pérez-Sánchez A, Bibián ME (2020) New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 8979–8998
19. Guo W, Zhang Z, Zhu T, Gu Q, Li D (2015) Penicyclones A-E, Antibacterial Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. *J Nat Prod* 78: 2699–2703
20. Talajčić G, Topić E, Meštrović J, Cindro N (2022) Total Synthesis of Penicyclone A Using a Double Grignard Reaction. *J Org Chem* 87: 16054–16062
21. Petković H, Lukežić T, Šušković J (2017) Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Food Technol. Biotechnol* 55: 3–13
22. Chukwudi CU (2016) rRNA binding sites and the molecular mechanism of action of the tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 4433–4441
23. Wang X, Yin S, Bai J, Liu Y, Fan K, Wang H, Yuan F, Zhao B, Li Z, Wang W (2019) Heterologous production of chlortetracycline in an industrial grade *Streptomyces rimosus* host. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 6645–6655
24. Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, Chiou A, McGowan JD, Hunter CD, Schlichte SL, Tian J, Klassen LW, O'dell JR, Thiele GM, Mikuls TR, Zimmerman MC, Anderson DR (2018) Novel antioxidant properties of doxycycline. *Int J Mol Sci* 19: 3378
25. Menazea AA, Eid MM, Ahmed MK (2020) Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial activity of novel Chitosan/Tigecycline composite. *Int J Biol Macromol* 147: 194–199
26. Volp KA, Harned AM (2015) Total Synthesis of Sorbicillactone A: An Inspiration for Methodology and Catalyst Development, in *Strategies and Tactics in Organic Synthesis*, Academic Press Inc 11: 253–308
27. Müller JL, Gulder TAM (2024) Chemoenzymatic total synthesis of sorbicillactone A. *Commun Chem* 7: 29
28. Salo O, Guzmán-Chávez F, Ries MI, Lankhorst PP, Bovenberg RAL, Vreeken RJ, Driessen AJM (2016) Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 82: 3971–3978
29. Guzmán-Chávez F, Salo O, Nygård Y, Lankhorst PP, Bovenberg RAL, Driessen AJM (2017) Mechanism and regulation of sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Microb Biotechnol* 10: 958–968
30. Bringmann G, Gulder TAM, Lang G, Schmitt S, Stöhr R, Wiese J, Nagel K, Imhoff JF (2007) Large-Scale Biotechnological Production of the Antileukemic Marine Natural Product Sorbicillactone A. *Mar Drugs* 5: 23–30
31. Evidente A (2023) The incredible story of ophiobolin A and sphaeropsidin A: two fungal terpenes from wilt-inducing phytotoxins to promising anticancer compounds. *Nat Prod Rep* 41: 434–468
32. Bury M, Novo-Uzal E, Andolfi A, Cimini S, Wauthoz N, Heffeter P, Lallemand B, Avolio F, Delporte C, Cimmino A, Dubois J, Van Antwerpen P, Zonno MC, Vurro M, Poumay Y, Berger W, Evidente A, De Gara L, Kiss R, Locato V (2013) Ophiobolin A, a sesterterpenoid fungal phytotoxin, displays higher in vitro growth-inhibitory effects in mammalian than in plant cells and displays in vivo antitumor activity. *Int J Oncol* 43: 575–585
33. Kim IY, Kwon M, Choi MK, Lee D, Lee DM, Seo MJ, Choi KS (2017) Ophiobolin A kills human glioblastoma cells by inducing endoplasmic reticulum stress via disruption of thiol proteostasis. *Sci Rep* 7: 40396
34. Chai H, Yin R, Liu Y, Meng H, Zhou X, Zhou G, Bi X, Yang X, Zhu T, Zhu W, Deng Z, Hong K (2016) Sesterterpene ophiobolin biosynthesis involving multiple gene clusters in *Aspergillus ustus*. *Sci Rep* 6: 34662
35. Narita K, Chiba R, Minami A, Kodama M, Fujii I, Gomi K, Oikawa H (2016) Multiple Oxidative Modifications in the Ophiobolin Biosynthesis: P450 Oxidations Found in Genome Mining. *Org Lett* 18: 1980–1983
36. Nicoletti R, Trincone A (2016) Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Mar Drugs* 14: 37
37. Xu X, Zhang X, Chen C (2016) Stimulated production of triterpenoids of *Inonotus obliquus* using methyl jasmonate and fatty acids. *Ind Crops Prod* 85: 49–57
38. Nguyen PC, Nguyen MTT, Truong BT, Kim DR, Shin S, Kim JE, Park KB, Park JH, Tran PL, Ban SY, Kim J, Park JT (2023) Isolation, Physicochemical Characterization, and Biological Properties of Inotodiol, the Potent Pharmaceutical Oxysterol from Chaga Mushroom. *Antioxidants* 12: 311
39. Zhang SD, Yu L, Wang P, Kou P, Li J, Wang LT, Wang W, Yao LP, Zhao XH, Fu YJ (2019) Inotodiol inhibits cells migration and invasion and induces apoptosis via p53-dependent pathway in HeLa cells. *Phytomedicine* 60: 152953
40. Duan Y, Han H, Qi J, Gao JM, Xu Z, Wang P, Zhang J, Liu C (2022) Genome sequencing of *Inonotus obliquus* reveals insights into candidate genes involved in secondary metabolite biosynthesis. *BMC Genomics* 23: 372
41. Cheng M, Zhao S, Liu H, Liu Y, Lin C, Song J, Thawai C, Charoensattap S, Yang Q (2021) Functional analysis of a chaetoglobosin A biosynthetic regulator in *Chaetomium globosum*. *Fungal Biol* 125: 201–210
42. Xiang B, Hao X, Xie Q, Shen G, Liu Y, Zhu X (2021) Deletion of a rare fungal pks cgpk11 promotes chaetoglobosin A biosynthesis, yet defers the growth and development of *chaetomium globosum*. *J Fungi* 7: 751
43. Lin X, Kück U (2022) Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 106: 8007–8020
44. NT K (2017) Cephalosporin C Production from *Acremonium chrysogenum*. *Enzyme Engineering*, 6: 161
45. Shahbaz K (2017) Cephalosporins: pharmacology and chemistry. *Pharm Biol Eval* 4: 234

46. Miethbauer S, Haase S, Schmidtke KU, Günther W, Heiser I, Liebermann B (2006) Biosynthesis of photodynamically active rubellins and structure elucidation of new anthraquinone derivatives produced by *Ramularia collo-cygni*. *Phytochemistry* 67: 1206–1213
47. Gartman JA, Tambar UK (2021) Synthetic Studies of the Rubellin Natural Products: Development of a Stereoselective Strategy and Total Synthesis of (+)-Rubellin C. *J Org Chem* 86: 11237–11262
48. Siewert B, Stuppner H (2019) The photoactivity of natural products – An overlooked potential of phytomedicines? *Phytomedicine* 60: 152985
49. Dussart F, Jakubczyk D (2022) Biosynthesis of Rubellins in *Ramularia collo-cygni* – Genetic Basis and Pathway Proposition. *Int J Mol Sci* 23: 3907
50. Collemare J, Seidl MF, Panstruga R (2022) Organelle- and genome-based regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* 20: 696–710

# Fungal secondary metabolites as a source of bioactive compounds: a modern approach to their acquisition and analysis

Piotr Michałowski<sup>1,2</sup>, Katarzyna Rynarzewska<sup>1</sup>, Dagmara Nowicka<sup>1</sup>, Olimpia Gawrońska<sup>3</sup>, Katarzyna Bielicka - Daszkiewicz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznań University of Technology, Poznań

<sup>2</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Centre of Chemical Biology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań

<sup>3</sup> Faculty of Computer Science and Telecommunications, Poznań University of Technology, Poznań

\* corresponding author: katarzyna.bielicka-daszkiewicz@put.poznan.pl

**Keywords:** secondary metabolites, natural products, programmable bioproduction of natural analogues

Secondary metabolites, which are natural products of fungi, perform key biological functions and have applications in medicine. The production of these compounds is subject to the control of clusters of biosynthetic genes located within the genome. It has been observed that these genes can become dormant under standard culture conditions. The advent of modern genetic and epigenetic methodologies has rendered the activation of these elements possible, thus facilitating the identification of novel bioactive compounds. The present article delineates classes of metabolites, the mechanisms of their biosynthesis, and current research strategies, combining knowledge from biology, genetics, and biotechnology.

