

Μικροβιακή Γονιδιωματική και Μεταγονιδιωματική:βιοτεχνολογικές εφαρμογές

- Μικροβιακή Γονιδιωματική: ο επιστημονικός κλάδος που εφαρμόζει μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA , αλληλούχισης και βιοπληροφορικής προκειμένου να αποκωδικοποιήσει, να συναρμολογήσει και να αναλύσει την λειτουργία και την δομή *γονιδιωμάτων* μικρο-οργανισμών.

Γιατί να μελετήσουμε μικροβιακά γονιδιώματα?

- Οι επιστήμες ζωής μέχρι πρόσφατα βασιστήκαν στην λεγόμενη αναγωγική προσέγγιση (reductionism), δηλαδή στην «αποσυναρμολόγηση» των κυττάρων και των κυτταρικών συστημάτων σε «κομμάτια» για την περαιτέρω μελέτη τους.
- Η δυνατότητα αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων σήμερα μας επιτρέπει την μελέτη και την ανάλυση για το πώς τα «κομμάτια» ενός οργανισμού δρουν και αλληλεπιδρούν ώστε να επηρεάζουν (καθορίζουν) τις δραστηριότητες και την συμπεριφορά ολόκληρου του οργανισμού οδηγώντας σε αυτό που ονομάζουμε **Βιολογία Συστημάτων (Systems Biology)**
- Οι μικροοργανισμοί αποτελούν ένα εξαιρετικό μοντέλο για μελέτες τέτοιου τύπου καθώς διαθέτουν μικρότερα και απλούστερα γονιδιώματα σε σχέση με τους πολυκύτταρους οργανισμούς.

Γιατί να μελετήσουμε μικροβιακά γονιδιώματα?

- Η ανάλυση ολόκληρων μικροβιακών γονιδιωμάτων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για την μικροβιακή ποικιλότητα όσο και την μικροβιακή εξέλιξη και αποτελεί αντικείμενο της Συγκριτικής Γονιδιωματικής (Comparative Genomics)
- Όσον αφορά τις πρακτικές εφαρμογές, η ανάλυση ολόκληρων μικροβιακών γονιδιωμάτων είναι ένα ισχυρότατο εργαλείο στην ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών και στην θεραπεία και τον έλεγχο παθογόνων μικρο-οργανισμών.

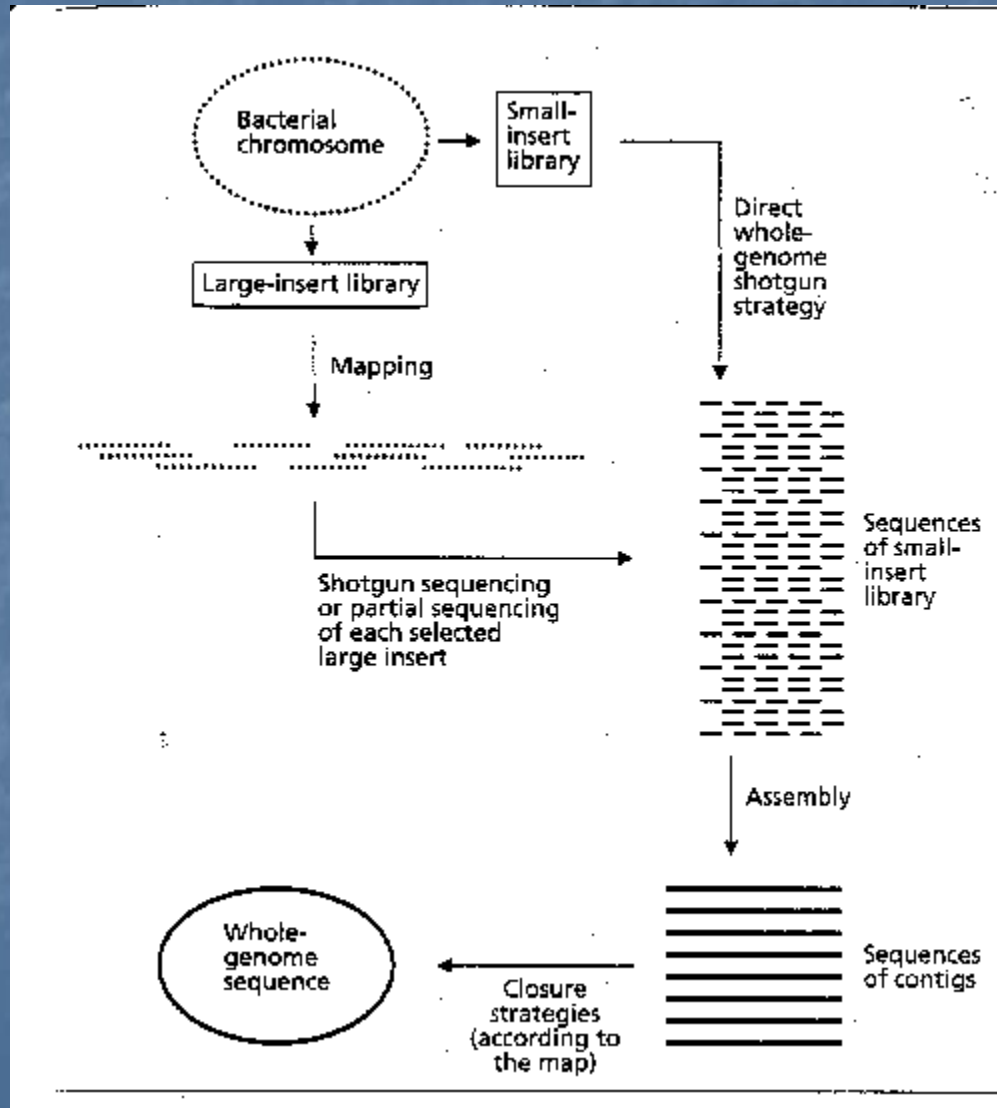
Ιστορική αναδρομή αλληλούχισης μικροβιακών γονιδιωμάτων

- 1977 – ολοκληρωμένη αλληλούχιση του βακτηριοφάγου φX174 - 5386 bp
- Αρχές 90's - κυτταρομεγαλιός (229 kb) και Vaccinia (192 kb)
- 1995 – αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Haemophilus influenzae* (1.83 Mb)
- Τέλος 1990's – Πολλά περισσότερα μικροβιακά γονιδιώματα αλληλουχήθηκαν περιλαμβάνοντας Αρχαία (*Methanococcus jannaschii* - 1996) και Ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (*Saccharomyces cerevisiae* - 1996)
- Σήμερα περισσότερα από 2700 βακτηριακά και 150 γονιδιώματα Αρχαίων έχουν αλληλουχηθεί. Η αλληλούχιση περίπου 7.700 είναι σε εξέλιξη (καθημερινά ολοκληρώνονται κάποια από αυτά)
- Πηγή GOLD data base (www.genomesonline.org)

Στρατηγικές αλληλούχισης μικροβιακών γονιδιωμάτων

- Έχουν χρησιμοποιηθεί δύο βασικές στρατηγικές αλληλούχισης: ο προσδιορισμός αλληλουχίας βάσει γενετικού χάρτη (Ordered Clone Approach) και η «τυφλή» κλωνοποίηση ή κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης (Shotgun Cloning Approach)
- Και οι δύο στρατηγικές απαιτούν την κατασκευή βιβλιοθηκών του γενετικού υλικού που περιλαμβάνει κλώνους με μικρά και μεγάλα ενθέματα.

Διάγραμμα αλληλούχισης μικροβιακού γονιδιώματος

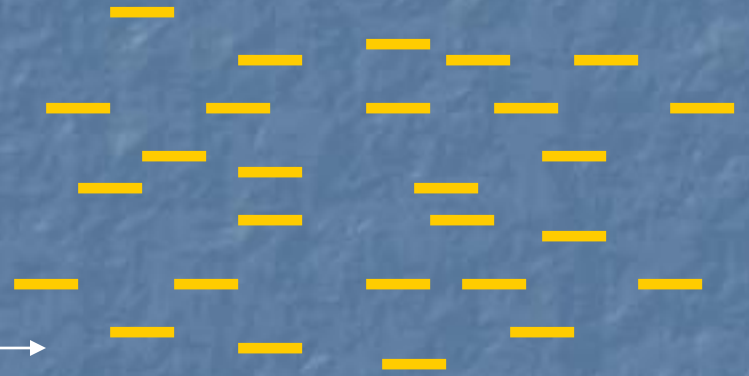


«Τυφλή» κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας

- Η στρατηγική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα για την αλληλούχιση των μικροβιακών γονιδιωμάτων
- Μεγάλος αριθμός κλώνων αλληλουχούνται και από τα δύο άκρα και οι επικαλυπτόμενες αλληλουχίες που προκύπτουν ενώνονται για να σχηματίσουν “contigs”
- Ο αριθμός των κλώνων που αλληλουχούνται είναι μεγάλος ώστε να υπάρχει κάλυψη (coverage) του γονιδιώματος 7-10 φορές (αυτό σημαίνει ότι κάθε περιοχή του γονιδιώματος έχει αλληλουχηθεί 7-10 φορές). Στην συνέχεια με την βοήθεια λογισμικών βιοπληροφορικής γίνεται η «συναρμολόγηση» των επικαλυπτόμενων αλληλουχιών. Το 90-95% του γονιδιώματος προκύπτει σχετικά εύκολα με αποτέλεσμα την δημιουργία αρκετών εκατοντάδων contigs
- Η κάλυψη των κενών που προκύπτουν ανάμεσα στα διάφορα contigs ώστε να σχηματιστεί ολόκληρο το γονιδίωμα είναι το πιο δύσκολο και χρονοβόρο κομμάτι αυτής της διαδικασίας.
-



Shear and
subclone



Randomly
sequence
fragments



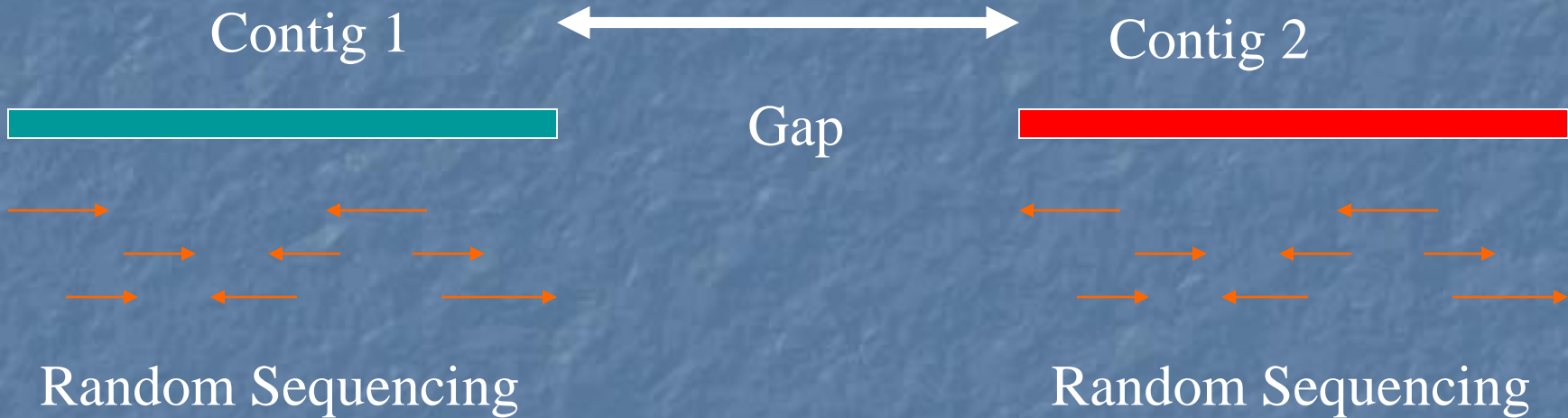
Fill gaps

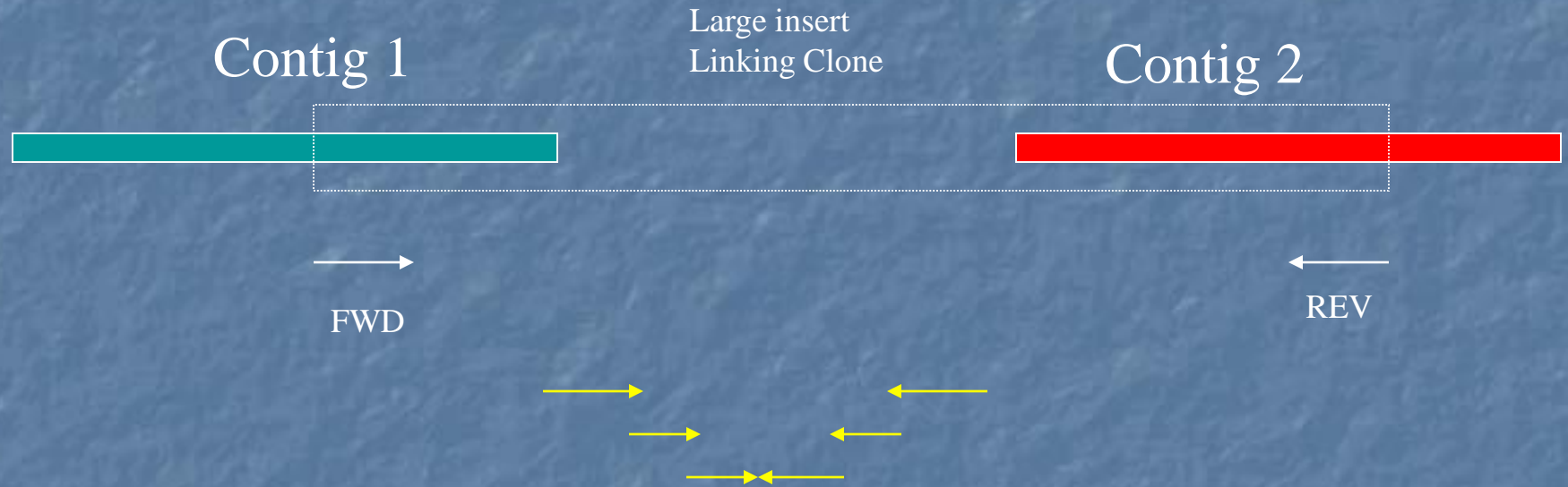
«Τυφλή» κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας

- Συνοπτικά ΟΛΑ τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι τα ακόλουθα
- 1) Κατασκευή βιβλιοθηκών (μικρά και μεγάλα ενθέματα)
- 2) Αλληλούχιση κλώνων
- 3) Συναρμολόγηση αλληλουχιών
- 4) Δημιουργία και τακτοποίηση των contigs
- 5) Κάλυψη των κενών ανάμεσα στα contigs
- 6) Λειτουργική ερμηνεία των αλληλουχιών (Annotation)

Συναρμολόγηση αλληλουχιών και κάλυψη κενών

- 4 είναι τα βασικά βήματα αυτής της διαδικασίας
- 1) Οι τυχαίες αλληλουχίες ελέγχονται για την ποιότητα τους (λάθη διορθώνονται) και συναρμολογούνται σε πρωταρχικά contigs με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού π.χ PHRAP
- 2) Εργαλεία βιοπληροφορικής και πειραματικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό συνδεσμικών κλώνων (linking clones) και για την τακτοποίηση των contigs
- 3) Κάλυψη των κενών ανάμεσα στα contigs είτε με PCR είτε με αλληλούχηση με διαδοχικούς εκκινήτες (primer walk sequencing)
- 4) Επιβεβαίωση της σειράς των contigs με PCR





Primer Walking ή PCR και
αλληλούχιση του προϊόντος

Γονιδίωμα του *Haemophilus influenzae*

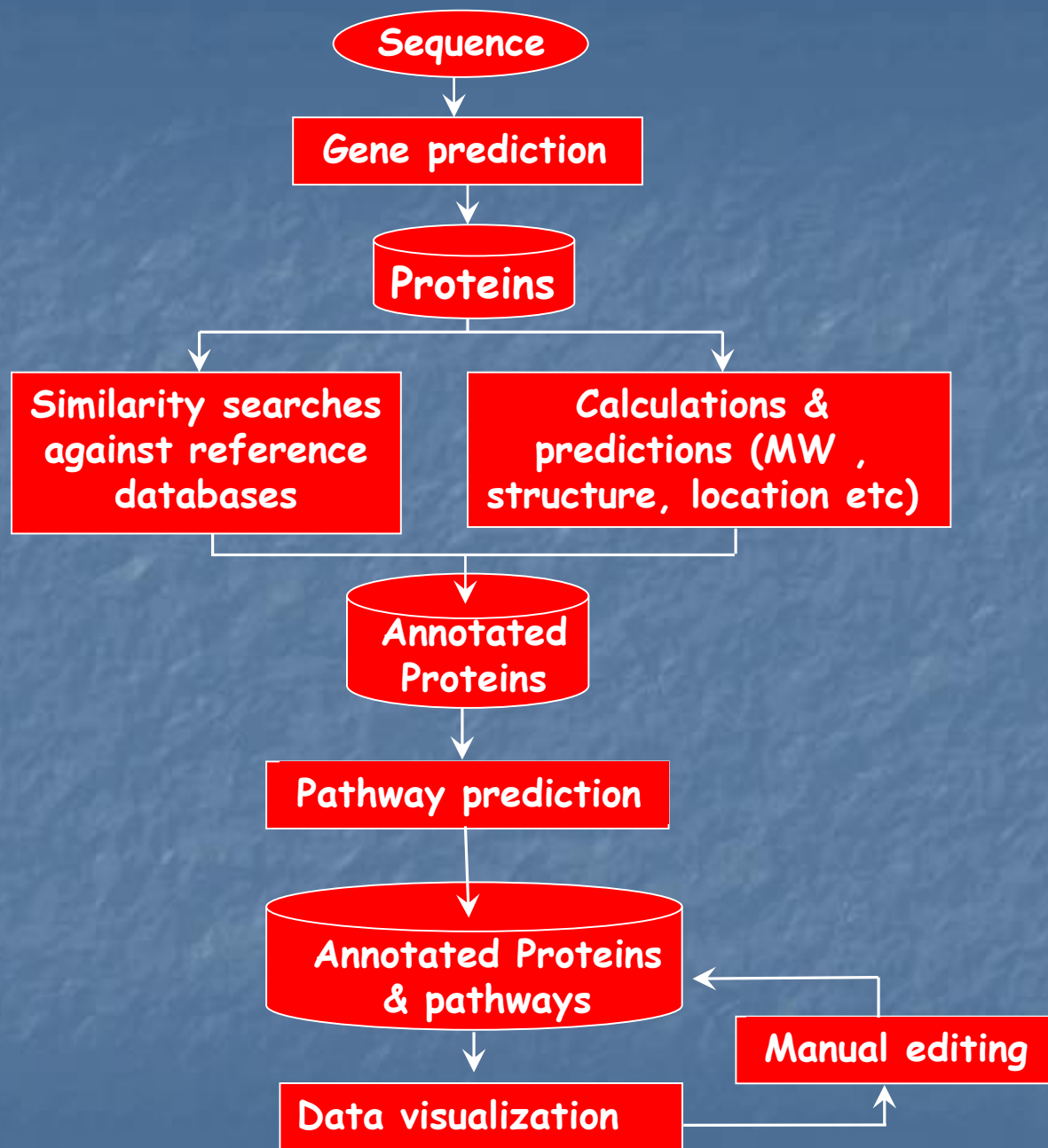
- Το πρώτο γονιδίωμα ενός παθογόνου βακτηρίου (1995)
- Το μέγεθος του είναι 1.83 Mb
- Τυχαία αλληλούχιση κλώνων από βιβλιοθήκες με μικρά και μεγάλα ενθέματα
- Οι αντιδράσεις αλληλούχισης έγιναν από 8 άτομα χρησιμοποιώντας 14 αυτόματες συσκευές αλληλουχίσης (ABI 377 DNA sequencers) σε 3 μήνες (33000 αντιδράσεις αλληλούχισης)
- Δεδομένα που αντιστοιχούν σε 11 Mb αναλύθηκαν και έδωσαν 140 contigs
- Τα κενά ανάμεσα στα contigs έκλεισαν με την βοήθεια lambda linking clones (23) και PCR (42)

Λειτουργική ερμηνεία γονιδιωμάτων

- Η αλληλουχία ενός γονιδιώματος από μόνη της δεν έχει ιδιαίτερη αξία. Πρέπει να ερμηνευτεί προκειμένου να αντλήσουμε επιστημονική πληροφορία
- Η διαδικασία με την οποία εντοπίζουμε την θέση και την λειτουργία γονιδίων μέσα σε ένα γονιδίωμα ονομάζεται λειτουργική ερμηνεία (Annotation)
- Ένα γονιδίωμα στο οποίο έχει ολοκληρωθεί η λειτουργική ερμηνεία προσφέρει το αρχικό σημείο για τον πλήρη χαρακτηρισμό της βιολογίας ενός μικροοργανισμού
- Τα γονιδιώματα βρίσκονται σε Βάσεις Δεδομένων:
 - Listing of genomes: Genomes online database (GOLD)
 - Comprehensive Genome Databases : GenBank, EMBL, DDBJ, JGI, TIGR, HAMAP, IMG, PEDANT

Λειτουργική Ερμηνεία

- Απαιτούμενα Εργαλεία
- *Βιοπληροφορική (Εύρεση ομόλογων γονιδίων)*
- *Βάσεις δεδομένων*
- *Βιβλιογραφία*
- *Πειράματα (π.χ φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμάτων)*



Διάγραμμα της λειτουργικής ερμηνείας

Εντοπισμός Ανοιχτών Αναγνωστικών Πλαισίων (ORF's)

- Το πρώτο βήμα της λειτουργικής ερμηνείας ενός γονιδιώματος είναι ο εντοπισμός των γονιδίων του
- Η πιο αποτελεσματική διαδικασία εντοπισμού γονιδίων περιλαμβάνει 2 βασικά βήματα
- 1) Υποβολή της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος και στα 6 πιθανά αναγνωστικά πλαίσια, στο BLAST προκειμένου να εντοπιστούν γνωστά γονίδια με υψηλή ομολογία σε άλλους οργανισμούς
- 2) Ανάλυση των αρχικών δεδομένων για χαρακτηριστικά όπως το περιεχόμενο GC, αλληλουχίες Shine-Dalgarno, προτίμηση κωδικονίου κτλ ώστε να διαχωριστούν περιοχές κωδικοποίησης από άλλες που δεν κωδικοποιούν. Εύρεση γονιδίων που κωδικοποιούν tRNA και rRNA (εξαιρετικά συντηρημένα)

Εντοπισμός Ανοιχτών Αναγνωστικών Πλαισίων (ORF's)

- Με αυτή την διαδικασία έχει αποδειχτεί ότι το 94% των γονιδίων μπορούν να ευρεθούν σωστά
- Το GLIMMER είναι λογισμικό για την απευθείας πρόβλεψη που χρησιμοποιείται από πολλά ινστιτούτα γονιδιωματικής π.χ
 - JCVI (formerly TIGR)- <http://www.tigr.org/>
 - SABIA- <http://www.sabia.lncc.br/>

Απόδοση λειτουργίας στα εντοπισμένα ORF's

- Όλα τα εντοπισμένα ORF's μεταφράζονται σε αμινοξικές αλληλουχίες (πρωτεΐνες) και υποβάλλονται σε βάσεις δεδομένων (συνήθως Genbank) για να βρεθούν ομόλογες πρωτεΐνες.

Για κάθε ORF υπάρχουν 3 πιθανά αποτελέσματα

- i) Υψηλή ομολογία με γνωστές πρωτεΐνες σε όλο το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας είναι πολύ καλή ένδειξη λειτουργίας
- ii) Τμήματα της πρωτεΐνης δείχνουν υψηλή ομολογία με λειτουργικά μοτίβα άλλων πρωτεϊνών- Πειραματική απόδειξη είναι απαραίτητη
- iii) Δεν υπάρχει σημαντική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες ή υψηλή ομολογία με πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας.

ORF's μη γνωστής λειτουργίας

- Στα περισσότερα γονιδιώματα εντοπίζονται ORF's για τα οποία δεν μπορεί να αποδοθεί κάποια λειτουργία (το ποσοστό ποικίλει άλλα μπορεί να φτάσει και το 50-60%) Προφανώς αυτό δημιουργεί έλλειμμα γνώσης της βιολογίας του μικροοργανισμού
- Αυτά τα ORF's κατηγοριοποιούνται σε
 - i) Συντηρημένες υποθετικές πρωτεΐνες - ORF's που παρουσιάζουν χαμηλή ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας αλλά υψηλή ομολογία με πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας σε άλλα είδη.
- ORF's που δεν παρουσιάζουν ομολογία με άλλες πρωτεΐνες –Αυτά τα ORF's πιθανόν αντιπροσωπεύουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την προσαρμογή και την επιβίωση του συγκεκριμένου οργανισμού π.χ. *Deinococcus radiodurans*

<i>Organism (total ORF's)</i>	<i>Homologues to known proteins (%)</i>	<i>Homologues to conserved hypothetical proteins (%)</i>	<i>No homologues (%)</i>
<i>E. coli (4277)</i>	33.3	10.3	56.4
<i>Pyrococcus horikoshii (2064)</i>	35	33.3	31.7
<i>Haemophilus influenzae (1709)</i>	58.8	18.2	23
<i>B. subtilis (4099)</i>	58	5	37
<i>Methanococcus jannaschii (1735)</i>	38.1	40.6	21.3

Δομική Γονιδιωματική

- Ένας τρόπος για την εύρεση και απόδοση λειτουργίας σε ORF's που δεν παρουσιάζουν ομολογία με καμία άλλη πρωτεΐνη είναι η δομική γονιδιωματική
- Με την βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής από την αμινοξική αλληλουχία καθορίζονται οι τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών για κάθε εντοπισμένο ORF.
- Στην συνέχεια οι δομές αυτές (στην ουσία μοντέλα) συγκρίνονται με δομές πρωτεϊνών γνωστής λειτουργίας.
- Η λογική πάνω στην οποία βασίζεται η δομική γονιδιωματική λέει ότι η δομή καθορίζει την λειτουργία. Παρόλο που δύο πρωτεΐνες με παρόμοιες αμινοξικές αλληλουχίες πολύ πιθανόν έχουν παρόμοιες δομές, έχει δείχτει σε πολλές περιπτώσεις ότι δυο πρωτεΐνες με παρόμοια δομή δεν έχουν αναγκαστικά και παρόμοιες αμινοξικές αλληλουχίες.

Συγκριτική γονιδιωματική και μικροβιακή εξέλιξη

- Πριν από την δυνατότητα αλληλούχισης ολόκληρων μικροβιακών γονιδιωμάτων οι μελέτες της μικροβιακής εξέλιξης εστίαζαν στην «κάθετη» μεταφορά γενετικής πληροφορίας π.χ. μεταλλάξεις, ανασυνδυασμός εντός του μικροβιακού πληθυσμού
- Η ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων έδειξε ότι «οριζόντια γονιδιακή μεταφορά» είναι πολύ συχνή ανάμεσα στους μικροοργανισμούς ακόμα και αν φυλογενετικά διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό ή ακόμα και αν ανήκουν σε διαφορετικά «βασίλεια» π.χ βακτήρια και μύκητες.
- Πολύ συχνά στα γονιδιώματα μικροοργανισμών εντοπίζονται «γονιδιωματικά νησίδα» (genomic islands) στα οποία εντοπίζονται ολόκληρες ομάδες γονιδίων που μεταφέρθηκαν από άλλους μικροοργανισμούς (πέρα από πλασμίδια ή γενετικά μεταθετά στοιχεία)

Συγκριτική γονιδιωματική και μικροβιακή εξέλιξη

Γονίδια που εντοπίζονται στα γονιδιωματικά νησίδια σχετίζονται με την προσαρμογή του μικροοργανισμού στο περιβάλλον ή στο ξενιστή του καθώς του προσδίδουν νέες ιδιότητες π.χ καταβολισμό ξενοβιοτικών, σύνθεση αντιβιοτικών, σύνθεση μολυσματικών παραγόντων

Επιπλέον η ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων δείχνει συχνά εκτεταμένο διπλασιασμό γονιδίων (gene duplication) που οδηγεί συχνά στην γρήγορη εξέλιξη γονιδίων που εμπλέκονται κυρίως στον δευτερογενή μεταβολισμό.

Μικροβιακή γονιδιωματική και άλλα “omics”

- Ένα γονιδίωμα στο οποίο έχει ολοκληρωθεί η λειτουργική του ερμηνεία είναι ένα ισχυρό επιστημονικό εργαλείο αλλά δεν παύει να δίνει μια στατική εικόνα του βιολογικού δυναμικού ενός οργανισμού και όχι τις δυναμικές αλληλεπιδράσεις του με το περιβάλλον του (κλασσικό παράδειγμα η πεταλούδα και η κάμψια)
- Για τον πλήρη χαρακτηρισμό της βιολογίας ενός μικροοργανισμού πρέπει να προσδιοριστεί το τμήμα του γονιδιώματος που εκφράζεται υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες με αποτέλεσμα την επιβίωση και την προσαρμογή του μικροοργανισμού.
- Οι μικροσυστοιχίες DNA χρησιμοποιούνται πλέον ευρύτατα για την μελέτη της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων ολόκληρου του γονιδιώματος (transcriptomics) σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η πρωτεωμική (proteomics) αντιστοίχως αναλύει το σύνολο των πρωτεϊνών ενός μικροοργανισμού που εκφράζονται σε κάποια συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης ή περιβάλλον

Εξέλιξη της Γονιδιωματικής: Μεταγονιδιωματική

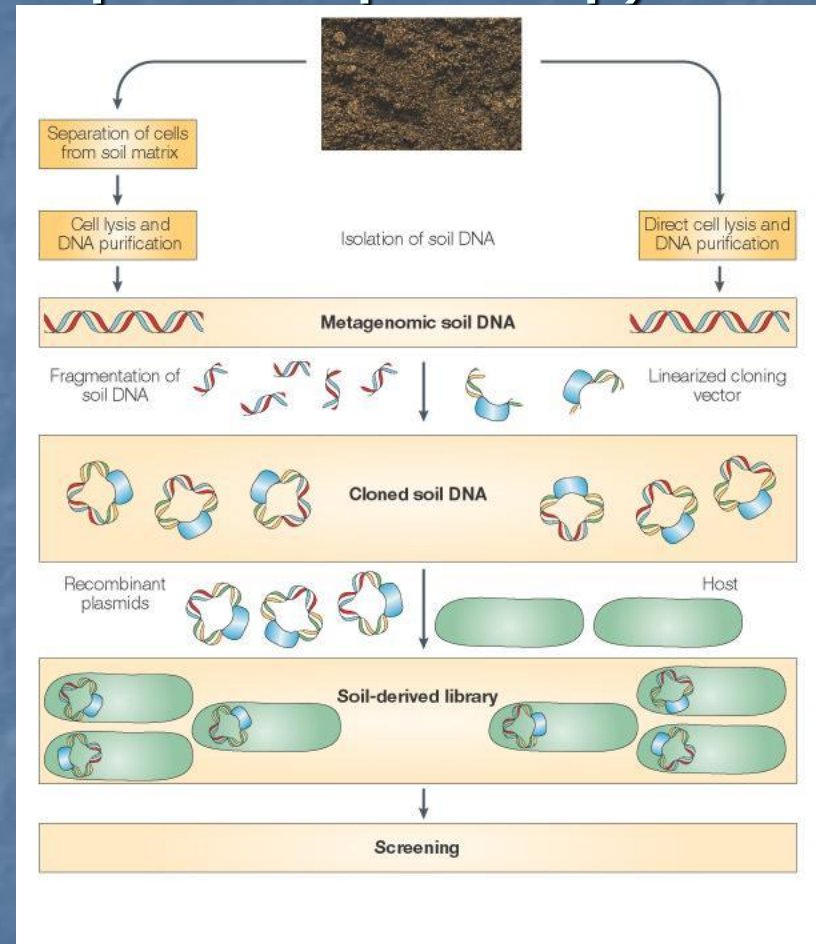
- Η μικροβιακή ποικιλότητα στην γη είναι τεράστια. Λιγότερο του 1% μικροβιακών ειδών είναι γνωστά. Η συντριπτική πλειοψηφία δεν έχει απομονωθεί και δεν έχει καλλιεργηθεί ποτέ στο εργαστήριο.
- Πώς μπορούμε να μελετήσουμε το γονιδίωμα των μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών?
- Πώς μπορούμε να ξέρουμε ποια πραγματικά γονίδια των μικροοργανισμών εκφράζονται στη φύση?

Τι είναι η Μεταγονιδιωματική

- **Μεταγονιδιωματική** είναι η αλληλούχιση γενετικού υλικού απευθείας από περιβαλλοντικά δείγματα. Αντίστοιχα **μεταγονιδίωμα** είναι το σύνολο των γονιδίων (από διαφορετικούς οργανισμούς) που περιέχονται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα και μπορούν να αναλυθούν με τρόπο ανάλογο με αυτόν ενός μοναδικού γονιδιώματος
- Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεταγονιδιωματικής είναι ότι ΔΕΝ απαιτείται καλλιέργεια και απομόνωση σε καθαρή μορφή των οργανισμών που περιέχονται σε ένα δείγμα (πχ βακτήρια και ιοί σε ένα δείγμα θαλασσινού νερού ή στο έδαφος).
- Σύνθεση μικροβιακών κοινοτήτων, μεταβολικές μελέτες βιοκοινοτήτων
- Μεγάλες δυνατότητες για βιοτεχνολογικές εφαρμογές (καινούρια ένζυμα, μεταβολικά μονοπάτια, αντιβιοτικά κτλ.)

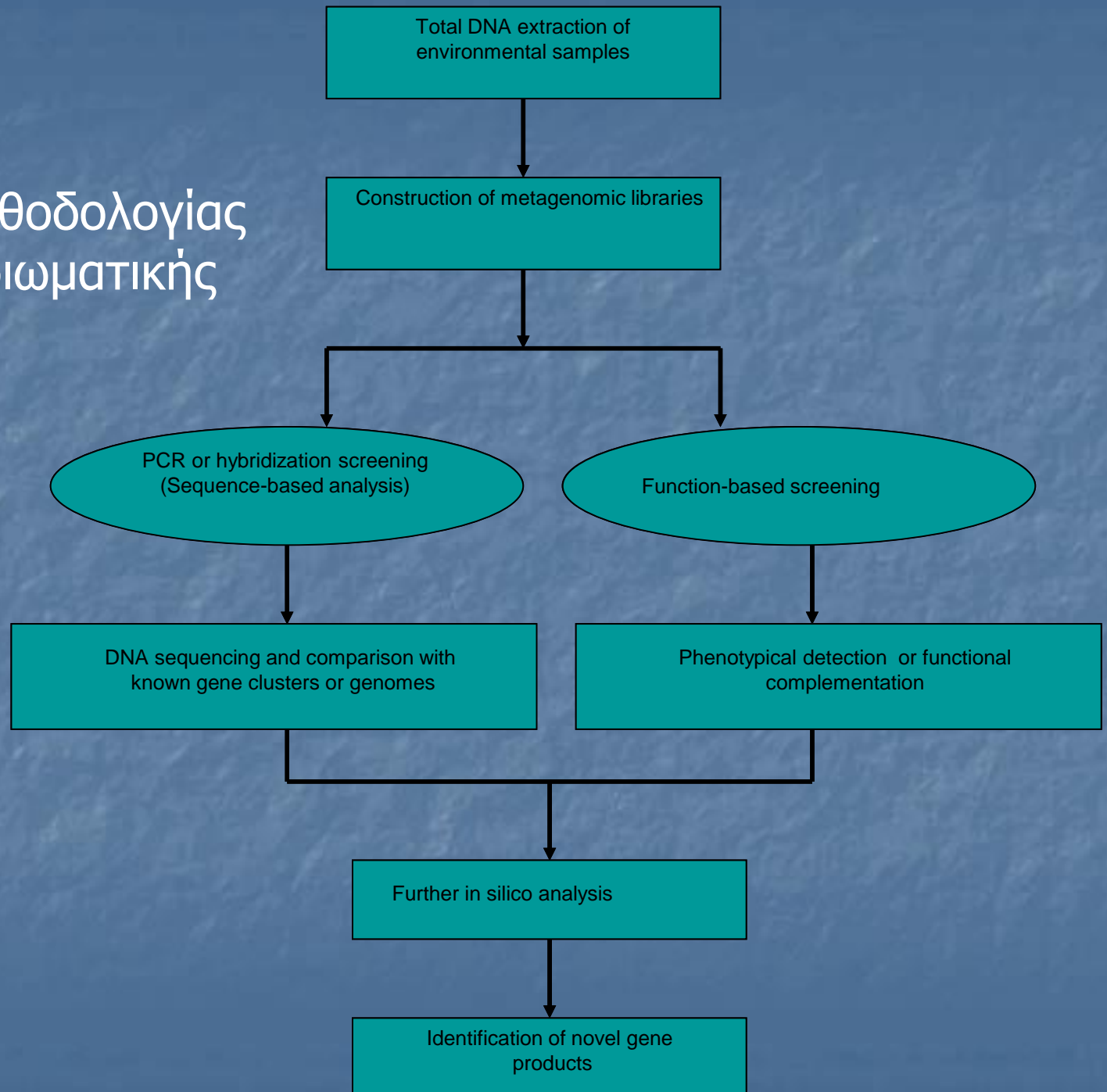
Μεθοδολογία Μεταγονιδιωματικής

- Απομόνωση DNA
 - Εξαρτάται από το δείγμα
- Κλωνοποίηση DNA
- Κατασκευή βιβλιοθηκών του δείγματος
- Διαλογή κλώνων με βάση επιθυμητό φαινότυπο ή απευθείας αλληλούχιση



"Metagenomics of Soil" Nature Reviews Microbiology 3: 470-478.

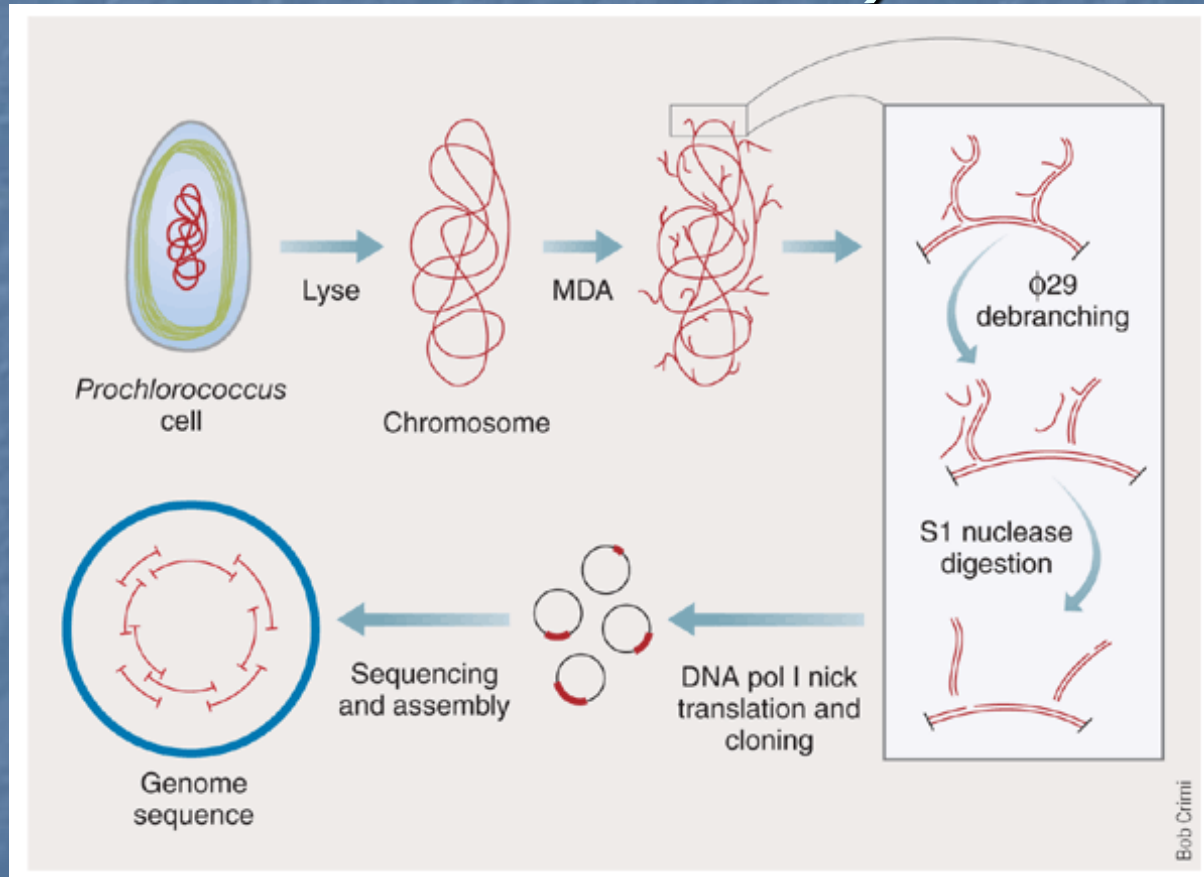
Διάγραμμα μεθοδολογίας της μεταγονιδιωμικής



Μεθοδολογικά προβλήματα

- Προβλήματα στην απομόνωση DNA
- Επιμόλυνση δειγμάτων
- Προβλήματα αλληλούχισης
 - Τεράστιο μέγεθος Μεταγονιδιώματος (gigabases)
 - Λάθη συναρμολόγησης (Ποιο κομμάτι ανήκει πού , ιδιαίτερα έντονο ανάμεσα σε συγγενικούς μικροοργανισμούς)
 - Δυσκολίες αλληλούχισης μη καλά αντιπροσωπευόμενων γονιδιωμάτων

Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου (Single Cell Genomics)



A single cell is isolated by dilution or by cell sorting. The cell is lysed and the chromosome is denatured by alkaline treatment. The cellular DNA is amplified $>10^9$ -fold by multiple displacement amplification (MDA) using random primers. The hyperbranched DNA product is resolved by shearing and enzymatic treatments, then cloned and shotgun sequenced. Ideally, a complete genome sequence could be assembled from the data and then annotated.

Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές

- Εύρεση βιοδραστικών μορίων που συνθέτονται από μη-ριβωσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες και πολυκετιδικές συνθάσες μέσω:
 - A) Εξόρυξης Γονιδιωμάτων (Genome Mining)
 - B) Μεταγονιδιωματική

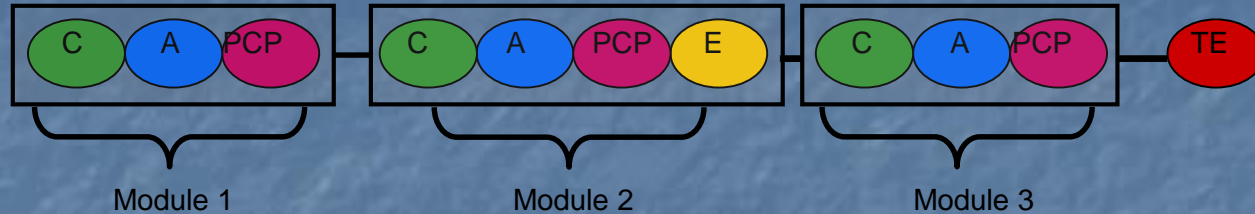
Μη-ριβωσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPS)

- Βιοσυνθέτουν ολιγοπεπτίδια μεγάλης ιατρικής και βιοτεχνολογικής σημασίας (αντιβιοτικά, ανοσορυθμιστικά μόρια, τοξίνες) χωρίς την συμμετοχή ριβωσωμάτων
- Μη-ριβωσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες: μεγάλου μοριακού βάρους (ως 1600 kDa) ένζυμα.
- Λειτουργική υπομονάδα συνθετάσης (Module): Ενεργοποιεί συγκεκριμένο αμινοξύ, σε μερικές περιπτώσεις επιμερίζει το αμινοξύ, και τελικά συμβάλλει στην δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.

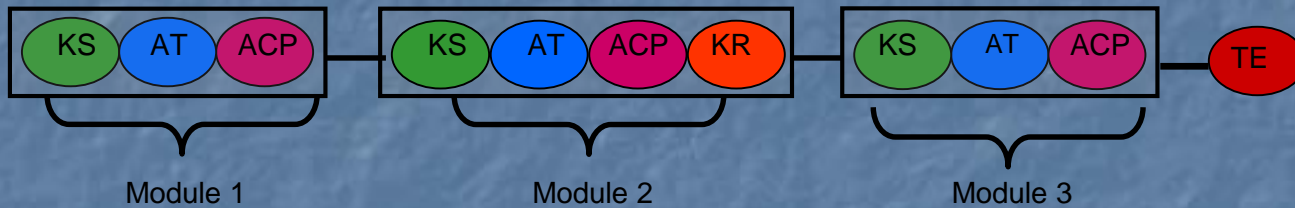
Πολυκετιδικές Συνθάσεις (PKS)

- Βιοσυνθέτουν **Πολυκετίδια** (δευτερογενείς μεταβολίτες) μεγάλης ιατρικής και βιοτεχνολογικής σημασίας (αντιβιοτικά, ανοσορυθμιστικά μόρια, αντικαρκινικά,)
- Μεγάλου μοριακού βάρους ένζυμα που έχουν αρχιτεκτονική παρόμοια με αυτή των NRPS των FAS
- Λειτουργική υπομονάδα συνθετάσης (Module): Ενσωματώνει μονομερή (συνήθως μαλονικό ή μέθυλο-μαλονικό CoA), επιφέρει τροποποιήσεις των μονομερών και τελικά συμβάλλει στην δημιουργία δεσμού C-C

A.



B.



A: Each module of the nonribosomal peptide synthetase consists of three main domains: C, A and PCP. The condensation domain (C) is responsible for the formation of the C-N bond between the elongated chain and the activated amino acid. The adenylation (A) domain activates its related amino acid and catalyzes the transfer of the activated substrate to the peptidyl-carrier (PCP) domain of the same module. The epimerization domain (E) is an auxiliary domain that changes an L-amino acid into a D- amino acid. TE domain releases the final peptide product from the enzyme through cyclization or hydrolysis.

B: Each module of PKS type I consists of the following main domains KS, AT and ACP. The AT domains are responsible for the incorporation of malonyl or methylmalonyl-CoA monomers, while the KS domains form a C-C bond. ACP domains are equivalent to PCP domains of NRPS. The KR domain performs ketoreduction and TE domain releases the final product.

Εξόρυξη Γονιδιωμάτων

- Ανάλυση γονιδιωμάτων με κατάλληλα εργαλεία βιοπληροφορικής
- BLAST (Εύρεση ομόλογων γνωστών NRPS και PKS)
- HMMER (hidden Markov model suite of tools)
Αλγόριθμοι για την εύρεση λειτουργικών περιοχών των NRPS και PKS)
- Εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων (NORINE (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>), SBSPKS (<http://www.nii.ac.in/~pkfdb/sbspks/master.htm>), antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>))

Μεταγονιδιωματική

- Διαλογή μεταγονιδιωματικών βιβλιοθηκών με PCR ή Southern blot χρησιμοποιώντας εκκινητές ή ιχνηθέτες για συγκεκριμένα λειτουργικά μοτίβα των NRPS και PKS
- Εύρεση κλώνων που περιέχουν ομάδες γονιδίων NRPS και PKS. Αλληλούχηση, ανάλυση και λειτουργικός χαρακτηρισμός των προϊόντων τους.

Compound	Enzyme	Discovering Approach	Microbial Source	Mode of Action	Reference
Orfamide A	NRPS	Genome mining	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Antibiotic	Gross et al. 2007
Salinilactam	PKS	Genome mining	<i>Salinispora tropica</i>	Antibiotic	Udwary et al. 2007
Aspyridones	PKS-NRPS	Genome mining	<i>Aspergillus nidulans</i>	Cytotoxic	Bergmann et al. 2007
Coelichelin	NRPS	Genome mining	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Siderophore	Challis & Ravel 2000
Laspartomycin	NRPS	Genome mining	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Antibiotic	Wang et al. 2011
Holomycin	NRPS	Genome mining	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Antibiotic	Li & Walsh 2010
Pyridomycin	PKS-NRPS	Genome mining	<i>Streptomyces pyridomyceticus</i> NRRL B-2517	Antibiotic	Huang et al. 2011
Chaxamycins A-D	PKS	Genome mining	<i>Streptomyces</i> sp. strain C34	Antibiotic	Rateb et al. 2011
Pederin	PKS	Metagenomics	<i>Paederus fuscipes</i>	Antitumor	Piel 2002
Bryostatin	PKS	Metagenomics	<i>Endobugula sertula</i>	Antitumor	Hildebrand et al. 2004
Apratoxin A	NRPS-PKS	Metagenomics	<i>Lyngbya bouillonii</i>	Antitumor	Grindberg et al. 2011
Salinosporamide K	NRPS	Genome mining	<i>Salinispora pacifica</i>	Antitumor	Eustáquio et al. 2011