UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko BLAŽIČ

METABOLNE POTI GRADBENIH ENOT ZA BIOSINTEZO FK506 IN STRUKTURNO-PODOBNIH SEKUNDARNIH METABOLITOV PRI BAKTERIJAH RODU Streptomyces

DOKTORSKA DISERTACIJA

METABOLIC PATHWAYS PROVIDING BUILDING BLOCKS IN FK506 AND STRUCTURALLY RELATED SECONDARY METABOLITES BIOSYNTHESIS IN Streptomyces

DOCTORAL DISSERTATION

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21.9.2011 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Hrvoje Petković.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v podjetju Acies Bio d.o.o.

Mentor: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ Acies Bio d.o.o.
Član:	prof. dr. Daslav HRANUELI Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Pri izvedbi določenih eksperimentov so bili soudeleženi tudi drugi raziskovalci, kot je to navedeno v besedilu. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorand: Marko Blažič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK UDK 604.4:615.322:577.2.083(043)=163.6
- KG streptomicete/ *Streptomyces tsukubaensis*/ sekundarni metaboliti/ poliketidi/ takrolimus/ biosinteza FK506/ genom/ bioinformatika/ sekvenciranje genoma
- AV BLAŽIČ, Marko, univ. dipl. mikr.
- SA PETKOVIC, Hrvoje (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
- LI 2014
- IN METABOLNE POTI GRADBENIH ENOT ZA BIOSINTEZO FK506 IN STRUKTURNO-PODOBNIH SEKUNDARNIH METABOLITOV PRI BAKTERIJAH RODU Streptomyces
- TD Doktorska disertacija (s področja biotehnologije)
- OP XV, 134 str., 26 pregl., 42 sl., 6 pril., 212 vir.
- IJ Sl
- JI sl/en
- AI FK506 (takrolimus), njegov strukturni analog, FK520 in rapamicin so medicinsko pomembni sekundarni metaboliti iz skupine poliketidnih makrolaktonskih. So naravni produkti s kompleksno kemijsko strukturo, kar se odraža tudi v kompleksni biosintezni metabolni poti, ki temelji na poliketid / neribosomalni peptid sintazi (PKS/NRPS). FK506 je, podobno kot rapamicin zgrajen iz številnih manjših gradbenih enot, ki vključujejo derivat šikimata kot začetno enoto, preproste CoA-aktivirane kisline za izgradnjo poliketidne verige (malonil-CoA, karboksilne metilmalonil-CoA, metoksimalonil-ACP, alilmalonil-CoA) in derivata aminokisline L-lizin pipekolata. Eden izmed mikroorganizmov, ki producirajo sekundarni metaboliti FK506 je Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488. Genom tega organizma smo uspeli v celoti sekvencirat za to je bil namen našega dela, da v nukleotidnem zaporedju celotnega genoma določimo verjetne biosintezne gene vpletene v preskrbo gradbenih enot za nastanek FK506, proučimo njihovo povezavo s primarnim metabolizmom ter izvedemo anotacijo predvidenih genskih skupin za nove nepoznane sekundarne metabolite. Pri tem smo se osredotočili na identifikacijo genskih skupin ki kodirajo biosintezo sekundarnih metabolitov, s posebnim poudarkom na genskih skupinah z osnovo PKS in/ali NRPS. Takšni metaboliti lahko glede na mehanizem biosinteze in vrsto uporabljenih gradbenih enot, predstavljaj konkurenčne biosintezne poti za nastanek FK506. V nukleotidnem zaporedju genoma Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488 smo s filogenetskim pristopom in s pomočjo programa ClustScan identificirali štiri PKS genske skupine in šest novih NRPS genskih skupin ki kodirajo biosintezo sekundarnih metabolitov. Dodatno smo eksperimentalno s pomočjo RT-PCR analize na nivoju transkripcije uspeli potrdit izražanje biosinteznih genov za sekundarni metabolit St-PKS2, ki je verjetno strukturno podoben bafilomicinu A. Številne genske skupine za biosintezo sekundarnih metabolitov, kažejo na kompetitivnost biosinteznih poti za gradbene enote in s tem posledično potencialen vpliv na produkcijo (donos) FK506.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

- DC UDC 604.4:615.322:577.2.083(043)=163.6
- CX streptomycetes/ *Streptomyces tsukubaensis*/ secondary metabolites/ tacrolimus/ pharmacological compounds/ polyketides/ FK506 biosynthesis/ genome/ bioinformatics/ genome sequencing
- AU BLAŽIČ, Marko
- AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
- PY 2014
- TI METABOLIC PATHWAYS PROVIDING BUILDING BLOCKS IN FK506 AND STRUCTURALLY RELATED SECONDARY METABOLITES BIOSYNTHESIS IN Streptomyces
- DT Doctoral Dissertation
- NO XV, 134 p., 26 tab., 42 fig., 6 ann., 212 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB FK506 (tacrolimus) and its structural analogues, FK520 and rapamycin are secondary metabolites of great medical importance belonging to a class of polyketide / macrolactone compounds. Their complex chemical structures are mirrored in the complex biosynthetic machinery based on the megaenzymes of the polyketide synthase /non-ribosomal-peptide synthetase families (PKS/NRPS). FK506, similarly to rapamycin, is made from diverse building blocks, including shikimate-derived starter unit, simple CoA-activated carboxylic acids for the formation of polyketide backbone (malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA, allylmalonyl-CoA), methoxymalonyl-ACP (acyl carrier protein) and L-lysine-derived pipecolic acid. Whole genome sequencing of Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488, the producer of FK506, and annotation of the FK506 gene cluster, in the scope of this work allowed us to identify putative genes and biosynthetic pathways providing building blocks for FK506 biosynthesis. Interaction of primary and secondary metabolic pathways providing building blocks was also investigated. Importantly, diverse pathways for biosynthesis of other secondary metabolites present in the same genome, which compete for the same building blocks, were also identified. A phylogenetic approach and ClustScan program were used to identify four PKS clusters and six new NRPS clusters. Domain analysis of one PKS cluster, designated as St-PKS2 showed that it could potentially produce a bafilomycin-like compound. The chemical structure of the product biosynthesised by St-PKS2 cluster has not yet been identified. However, using reverse transcription (RT)-PCR approach, we have demonstrated that the cluster St-PKS2 is actively transcribed, suggesting that numerous gene clusters present in the genome of S. tsukubaensis most likely compete for substrate supply, thereby reducing the production capacity for FK506.

KAZALO VSEBINE

str.

V

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) III		
KEY WO	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	
KAZAL	KAZALO VSEBINE V	
KAZALO PREGLEDNIC IX		IX
KAZAL	KAZALO SLIK X	
KAZAL	KAZALO PRILOG XII	
OKRAJ	ŠAVE IN SIMBOLI X	Ш
1	UVOD	1
1.1	NAMEN NALOGE	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU Streptomyces	3
2.1.1	Taksonomija streptomicet	3
2.1.2	Ekologija streptomicet	4
2.1.3	Morfologija in življenjski cikel	4
2.1.4	Značilnosti genomov streptomicet	5
2.2	METABOLIZEM STREPTOMICET	6
2.2.1	Primarni metabolizem streptomicet	6
2.2.1.1	Glioksilatni cikel	8
2.2.1.2	Pot etilmalonil-CoA	10
2.2.2	Sekundarni metabolizem streptomicet	12
2.2.3	Biosinteza poliketidov	13
2.2.3.1	Modularne poliketid sintaze tipa I	13
2.2.4	Neribosomske peptid sintetaze	15
2.3	BIOSINTEZA FK506 IN NEKATERIH STRUKTURNO SORODNIH SPOJIN	16
2.3.1	Biosinteza FK506 in FK520	17
2.3.1.1	Nastanek osnovne poliketidne verige	18
2.3.1.2	Pripenjanje L-pipekolata in ciklizacija	21
2.3.1.3	Post-PKS modifikacije	21
2.3.2	Biosinteza rapamicina	21
2.3.3	Biosinteza meridamicina	23
2.3.4	Antaskomicin	24
2.3.5	Mehanizem delovanja	24
2.3.5.1	FK506	24
2.4	GRADBENE ENOTE ZA SINTEZO FK506 IN SORODNIH SPOJIN	27
2.4.1	Malonil-CoA	27
2.4.2	Metilmalonil-CoA	29
2.4.3	Etilmalonil-CoA	30
2.4.4	Alilmalonil-CoA	33

2.4.5	Metoksimalonil-ACP	34
2.4.6	L-ninekolna kislina	36
2.4.7	Dihidrocikloheksenilkarboksilna kislina (DHCHC)	37
3	MATERIAL IN METODE	
3.1	KEMIKALUE	40
3.1.1	Raztopine in pufri	40
3.1.2	Standarda za določanje velikosti DNA fragmentov	40
3.1.3	Antibiotiki in indikatorii	40
3.1.4	KOMERCIALNI KOMPLETI KEMIKALIJ	41
3.1.4.1	Komplet za izolacijo genomske DNA	41
3.1.4.2	Komplet za izolacijo plazmidne DNA	41
3.1.4.3	Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela	41
3.1.4.4	Komplet za čiščenje DNA iz reakcijskih mešanic	41
3.1.4.5	Komplet za izolacijo RNA	41
3.1.4.6	Standardi za določanje velikosti DNA in RNA fragmentov	41
3.1.5	Encimi	42
3.1.5.1	Restrikcijske endonukleaze	42
3.2	BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI	42
3.2.1	Sevi Streptomyces tsukubaensis	42
3.2.2	Sevi Escherichia coli	43
3.2.3	Bakterijski vektorji	43
3.3	GOJIŠČA IN ANTIBIOTIKI	43
3.3.1	Gojišča za <i>E. coli</i>	43
3.3.2	Gojišča za S. <i>tsukubaensis</i>	44
3.4	MikroBIOLOŠKE METODE	46
3.4.1	Priprava suspenzije spor S. tsukubaensis	46
3.4.2	Shranjevanje sevov E. coli in S. tsukubaensis	47
3.4.3	Priprava kompetentnih celic in transformacija	47
3.4.3.1	Priprava elektrokompetentnih celic E. coli	47
3.4.3.2	Elektroporacija sevov E. coli	47
3.4.4	Konjugacija spor bakterije <i>S. tsukubaensis</i>	48
3.4.5	Biosintezni postopek za produkcijo FK506 in FK520	49
3.5	MOLEKULARNE METODE	49
3.5.1	Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>E. coli</i>	49
3.5.2	Izolacija genomske DNA iz bakterije <i>S. tsukubaensis</i>	49
3.5.3	Shranjevanje izolirane DNA	49
3.5.4	Določanje koncentracije DNA	50
3.5.5	Elektroforeza DNA na agaroznem gelu	50
3.5.6	Izolacija DNA iz agaroznega gela	50
3.5.7	Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	51
3.5.7.1	Pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov	52
3.5.8	Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami	52
3.5.9	Encimsko združevanje DNA fragmentov po Gibsonu	53

VI

3.5.10	Fosforilacija	53
3.5.11	Defosforilacija	54
3.5.12	Ligacija	54
3.5.13	RT-PCR analiza	54
3.5.13.1	Izolacija RNA iz bakterije S. tsukubaensis	54
3.5.13.2	Razgradnja prisotne DNA	55
3.5.13.3	Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo	55
3.5.14	Sekvenciranje	56
3.6	Bioinformacijske metode	56
3.6.1	»In silico« analiza genoma S. tsukubaensis NRRL 18488	56
3.6.1.1	Strežnik RAST in podatkovna baza SEED	56
3.6.1.2	KEGG	57
3.6.1.3	ClustScan	57
3.6.2	Analize krajših nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij	57
3.6.2.1	BLAST	58
3.6.2.2	FramePlot	58
3.6.2.3	Vector NTI	58
3.7	ANALITSKE METODE	59
3.7.1	Ekstrakcija produkcijskih brozg	59
3.7.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	59
4	REZULTATI	60
4.1	SEKVENCIRANJE GENOMA IN BIOINFORMACIJSKA ANALIZA	60
4.1.1	Sekvenciranje genoma S. tsukubaensis	60
4.1.2	Splošne lastnosti genoma S. tsukubaensis	60
4.1.3	Avtomatsko sestavljanje sekvenc in anotacija celotnega genoma	61
4.2	ANALIZA PREDVIDENIH METABOLNIH POTI GRADBENIH ENOT ZA	
	BIOSINTEZO FK506 IN FK520	64
4.2.1	Biosinteza malonil-CoA	65
4.2.2	Biosinteza metilmalonil-CoA	69
4.2.3	Biosinteza metoksimalonil-ACP	72
4.2.4	Biosinteza L-pipekolne kisline	74
4.2.5	Biosinteza dihidroksicikloheksenil karboksilne kisline (DHCHC)	76
4.3	ANOTACIJA SEKUNDARNIH METABOLITOV	77
4.3.1	Podrobnejša analiza genske skupine <i>St</i> -PKS2	79
4.3.1.1	Analiza izražania genske gruče <i>St</i> -PKS2	85
4.3.2	Podrobnejša analiza genske skupine <i>St</i> -PKS4	88
4.3.2.1	Analiza in povezovanje sosesk c43. c213 in c288	89
4322	Analiza zaporedij s predvidenim zamikom v bralnem okvirju	90
4.4	VPLIV PRIMARNEGA METABOLIZMA NA BIOSINTEZO FK506/FK520	92
4.4.1	Anotacija genov metabolne poti etilmalonil-CoA	92
4.4.2	Primeriava aminokislinskih zaporedij encimov Ccr in AllR	93
4.4.3	Vloga operona za pot etilmalonil-CoA in vpliv na primarni metabolizem	94
4.4.3.1	Prekomerno izražanje ecm operona	94

4.4.3.2	Konstruiranje umetnega operona allR_ecmOp'	96
4.4.3.3	Prekomerno izražanje gena <i>ccr1</i>	96
4.4.3.4	Vpliv pripravljenih konstruktov na rast na acetatu	97
4.4.4	Vpliv ECM poti na produkcijo FK506 in FK520	98
4.4.4.1	Prekinitev gena allR	98
4.4.4.2	Prekomerno izražanje gena allR	99
4.4.4.3	Prekomerno izražanje gena <i>ccr1</i>	99
4.4.4.4	Rezultati produkcije FK506 in FK520	99
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	. 102
5.1	RAZPRAVA	102
5.1.1	Predstavitev problema	102
5.1.2	Cilji naloge	104
5.1.3	Bioinformacijska analiza nukleotidnega zaporedja genoma S. tsukubaensis	105
5.1.4	<i>»In silico«</i> analiza prisotnosti metabolnih poti gradbenih enot za sintezo FK	506
	in FK520	106
5.1.5	Novo odkrite genske skupine za sintezo sekundarnih metabolitov	107
5.1.6	Podrobna analiza genske skupine St-PKS4	108
5.1.7	Analiza izražanja genske skupine <i>St</i> -PKS2	109
5.1.8	Vpliv primarnega metabolizma na produkcijo FK506 in FK520	110
5.2	SKLEPI	112
5.3	POTRDITEV HIPOTEZ	114
6	POVZETEK (SUMMARY)	. 115
6.1	POVZETEK	115
6.2	SUMMARY	117
7	VIRI	. 119

ZAHVALA PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Antibiotiki in indikatorji, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu,	Z
navedenimi koncentracijami založnih raztopin	40
Preglednica 2: Uporabljene restrikcijske endonukleaze	42
Preglednica 3: Plazmidi, ki smo jih uporabljali v okviru te študije	43
Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča ISP4	45
Preglednica 5: Sestava mineralne založne raztopine za VG3	46
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA	51
Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja DNA s PCR	51
Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo G	С
baznih parov	52
Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov s PCR	52
Preglednica 10: Mešanica za RT-PCR analizo (prva stopnja)	55
Preglednica 11: Mešanica za RT-PCR analizo (druga stopnja)	56
Preglednica 12: Skupine predvidenih proteinov S. tsukubaensis NRRL 18488 identificirani	h s
storitvijo RAST	62
Preglednica 13: Identificirani proteinski homologi za sintezo malonil-CoA	66
Preglednica 14: Identifikacija proteinskega homologa encima malonil-CoA sintetaza	. 69
Preglednica 15: Identificirani proteinski homolog propionil-CoA karboksilaze, ki sodeluje	pri
sintezi metilmalonil-CoA	71
Preglednica 16: Identificirani proteinski homologi alternativnih metabolnih poti sinteze	
metilmalonil-CoA	71
Preglednica 17: Odsotnost iskanih metabolnih poti oz. proteinskih homologov v genomu S.	•
tsukubaensis za biosintezo metilmalonil-CoA	72
Preglednica 18: Organizacija in vloga genov metoksimalonilne regije znotraj genske gruče	za
biosintezo FK506	73
Preglednica 19: Organizacija metoksimalonilne skupine genov v genski gruči za biosintezc)
St-PKS2 in primerjava z homologi iz FK506	74
Preglednica 20: Rezultati analize encimov udeleženih pri biosintezi pipekolata identificirar	1ih
v genomu S. tsukubaensis NRRL18488	76
Preglednica 21: Encimi udeleženi pri oskrbi začetne enote (DHCHC) za biosintezo FK506	.77
Preglednica 22: V genomu S. tsukubaensis NRRL18488 identificirane PKS in NRPS	
modularne genske skupine (Blažič in sod., 2012)	79
Preglednica 23: Oligonukleotidni začetniki za RT-PCR analizo izražanja <i>St</i> -PKS2 genske	~ ~
skupine	85
Preglednica 24: Spektrofotometrična analiza koncentracije RNA v vzorcih izoliranih za RT	Γ-
PCR	87
Preglednica 25: Oligonukleotidni začetniki za povezovanje sosesk c43, c213 in c288	90
Preglednica 26: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za analizo zamikov bralnih okvirjev	VV
genski skupini za St-PKS4	91

KAZALO SLIK

Х

Slika 1: Življenjski cikel Streptomyces sp. (Flardh in Buttner, 2009)	5
Slika 2: Glioksilatni cikel (Dunn in sod., 2009: Erb in sod., 2007: Kim in sod., 2004)	9
Slika 3: Shematski prikaz poti etilmalonil-CoA vkliučno z dodatnimi vhodnimi in izhodnimi	
metabolnimi potmi (Alber, 2011)	1
Slika 4. Molekularni mehanizem biosinteze poliketidov (McDaniel in sod 2005)	4
Slika 5: Podobnost modularne organiziranosti NRPS (A) in DKS tin I (B) (Nikolouli in	т
Maggialag 2012)	۷
Niossialos, 2012)	5
Sinka 6: Strukturno in diogenetsko podobili sekundarni metadoliti FK500, FK520, rapannen	_
in meridamicin (Wu in sod., 2011; Zhou in sod., 2010)	5
Slika 7: Predlagane biosintezne poti za izgradnjo molekule FK506 (Mo in sod., 2009) I	/
Slika 8: Biosinteza FK506 in analogov na hibridnem PKS/NRPS sistemu (Mo in sod., 2011).	_
	9
Slika 9: Organizacija genskih skupin za biosintezo FK506 in FK520 (Goranovič in sod.,	
2010)	0
Slika 10: Posamezni koraki biosinteze rapamicina (Schwecke in sod., 1995)	2
Slika 11: Biosintezna pot za izgradnjo molekule rapamicina pri S. rapamycinicus (Jung in	
sod., 2011)	3
Slika 12: Shematski model mehanizma delovanja FK506, ciklosporina in rapamicina (Kang in	n
sod. 2008)	б
Slika 13: Shema CoA in ACP vezanih gradbenih enot za biosintezo poliketidov (Chan in sod.	
2009) 2/	, 7
Slika 14: Metabolne poti, ki sodelujejo pri nastanku (2S)-metilmalonil-CoA in (2S)-	'
etilmalonil- $C_0\Delta$ (Chan in sod 2009) 3'	2
Slika 15: Predlagan mehanizem sinteze gradhene enote alilmalonil-CoA (Goranovič in sod	-
2010)	1
Slike 16: Dradlagan mahanizam sintaza gradhana anata mataksimalanil ACD (Chan in sad	+
Sinka To. Fredragan menanizem sinteze gradbene enote metoksimatoini-ACF (Chan in sou.,	5
(2009)	5
Slika 17: Prediagan menanizem delovanja encima lizin cikiodeaminaze (Gatto in sod., 2006)	_
	b
Slika 18: Predlagan mehanizem sinteze in vgradnje L-pipekolata vosnovni poliketidni skelet	_
(Gatto in sod., 2005)	/
Slika 19:Predlagan mehanizem sinteze začetne gradbene enote DHCHC (Ban in sod., 2013;	
Lowden in sod., 2001)	9
Slika 20: Metabolna rekonstrukcija S. tsukubaensis NRRL 18488 iz sekvence genoma s	
pomočjo storitve RAST	1
Slika 21: Nenavadne gradbene enote za biosintezo FK506	5
Slika 22: Shematski prikaz biosinteze gradbene enote malonil-CoA iz intermediatov	
primarnega metabolizma	б
Slika 23: Aminokislinska poravnava za proteinske homologe acetil-CoA karboksilaze iz	
organizmov S. tsukubaensis, S. avermitilis, S. coelicolor in S. griseus	7
Slika 24: Anotacija genske skupine in organizacija encimskega kompleksa acetil-CoA	
karboksilaze	8
Slika 25: Predvidene metabolne poti za sintezo metilmalonil- CoA (Chan in sod 2009) 70	n
Slika 26: Shematski prikaz biosinteze gradhene enote metoksimalonil- ΔCP iz intermediatov	9
7^{\prime}	2
primarioga metabolizma	4
sinka 27. i finicijeva organizacije metoksinarolni regije za prosintezo podarjsevalne enote matoksimolonil ACD pri gonalzi slupini EK506 iz 54 DK52	2
Inclorshinatohii-ACr ph genski skuphii FK300 III SI-FK52	3

Slika 28: Prikaz poteka metabolne poti za biosintezo pipekolne kisline preko nastanka aminokisline L-lizin
Slika 29: Predvidena organizacija genske skupine <i>St</i> -PKS2 (analiza s programom ClustScan)
Slika 30: Podrobna analiza modularne organizacije gena 1 genske skupine <i>St</i> -PKS2 (analiza s programom ClustScan)
Slika 31: Podrobna analiza modularne organizacije gena 2 genske skupine <i>St</i> -PKS2 (analiza s programom ClustScan)
Slika 32: Podrobna analiza modularne organizacije gena 3 genske skupine <i>St</i> -PKS2 (analiza s programom ClustScan)
Slika 33: Podrobna analiza modularne organizacije gena 4 in 5 genske skupine <i>St</i> -PKS2 (analiza s programom ClustScan)
Slika 34: Organizacija genske gruče za biosintezo <i>St</i> -PKS2 in prileganje uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov za analizo RT-PCR
Slika 35: Preverjanje specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih za RT-PCR, kjer je matrično DNA za pomnoževanje predstavljala izolirana genomska DNA
Slika 36: RT-PCR analiza treh biosinteznih genov iz genske skupine <i>St</i> -PKS2 in gena <i>hrdB</i> kot pozitivno kontrolo
Slika 37: Predvidena mesta zamika bralnega okvirja (1-4) in predvideno zaporedje sosesk (c43, c213 in c288) gruče genov za sintezo <i>St</i> -PKS4
Slika 38: Anotacija genov pot etilmalonil-CoA v genomu bakterije <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488
Slika 39: Poravnava aminokislinskega zaporedja produkta gena <i>allR</i> in <i>ccr1</i>
ermE*+allR_ecmOp' in pSet152 ermE*+ ccr1
ogljika

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do biosinteze začetne enote (dihidroksicikloheksan karboksilne kisline) za biosintezo FK 506
Priloga B: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do biosinteze metilmalonil-CoA za biosintezo FK506
Priloga C: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka malonil-CoA za biosintezo FK506.
Priloga D: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka metoksimalonil-ACP za biosintezo FK506.
Priloga E: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka L- pipekolne kisline za biosintezo FK506.
Priloga F: Nukleotidna zaporedja sekvenciranih PCR produktov za povezovanje sosesk genske skupine <i>St</i> -PKS4

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACP –	acil prenašalni protein
AK –	aminokislina
Amp -	ampicilin
Apr -	apramicin
AT –	acil transferaza
ATP –	adenozin-3-fosfat
ATCC -	zbirka sevov (American Type Culture Collection)
bp –	bazni par
C –	citozin
CCR –	krotonil-CoA redutaza/karboksilaza
CDA –	calcium-dependent antibiotics
CFU -	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
CoA –	koencim A
CsA –	ciklosporin A
DEB -	deoxyerythronolide B
DHCHC –	4,5-dihidroksicikloheks-1-en karboksilna kislina
DH –	dehidrataza
dH2O -	deionizirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA –	deoksiribonukleinska kislina
dNTP -	deoksinukleotid trifosfat
DSM -	zbirka sevov (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
EDTA	etilendiamintetraacetat
EF -	elongacijski transkripcijski faktor
EMP –	pot etilmalonil-CoA (ethylmalonyl pathway)
ER –	enoil reduktaza
FAD	flavin adenin dinukleotid (angl. Flavin Adenine Dinucleotide)
FAS	sintaza maščobnih kislin
FDA –	Food and Drug Administration
FKBP –	FK506 binding protein
G –	gvanin
GDP –	gvanozin difosfat
GTP –	gvanozin trifosfat
HPLC -	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance
	Liquid Chromatography)
IL-2 –	interlevkin 2
JNK –	c-Jun NH2-terminalna kinaza
kb –	kilobaza
kDa –	kilodalton
KR –	ketoreduktaza
KS –	ketosintaza
Mb –	megabaza

- NF-AT nuklearni faktor aktiviranih limfocitov T
- NRPS non-ribosomal peptide synthetase (neribosomska peptid sintetaza)
- NRRL zbirka sevov (Northern Regional Research Laboratory)
- OD optična gostota
- ORF odprt bralni okvir (angl. Open Reading Frame)
- PCR verižna reakcija s polimerazo
- PKS poliketid sintaza
- RNA ribonukleinska kislina
- TE tioesteraza
- Tm temperatura tališča (angl. Melting Temperature)
- tRNA prenašalna RNA (angl. transfer RNA)

1 UVOD

FK506 (takrolimus) in njegovi strukturno in biogenetsko podobni analogi FK520, meridamicin ter rapamicin so sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo bakterije rodu *Streptomyces spp*. Glede na kemijsko strukturo te spojine spadajo v skupino poliketidnih makrolaktonskih antibiotikov in so registrirane za klinično uporabo kot imunosupresivi po transplantacijah organov, za zdravljenje rakastih obolenj ter za zdravljenje vnetnih bolezni kože in ekcemov. V zadnjem času klinične študije kažejo, da imajo te učinkovine velik potencial tudi za zdravljenje bolezni srca in ožilja, avtoimunskih in nevrodegenerativnih bolezni (Allison, 2000; Demain, 2006; Easton in Houghton, 2004).

Glede na biosintezni izvor rapamicin, meridamicin, FK506 in FK520 uvrščamo med poliketide, ki jih sintetizirajo encimski kompleksi, imenovani poliketid-sintaze (PKS) v povezavi z neribosomskimi peptid sintetazami (NRPS). Celotne genske skupine za biosintezo rapamicina (Molnar in sod., 1996; Schwecke in sod., 1995), FK520 (Wu in sod., 2000) in meridamicina, delno pa tudi FK506 (Motamedi in sod., 1997), so že bile klonirane in sekvencirane. Mehanizmi biosinteze teh strukturno podobnih spojin so bili predmet številnih raziskav, kljub temu pa še vedno pomanjkljivo razumemo sintezo nekaterih njihovih gradnikov.

V primerjavi s študijami nekaterih strukturno enostavnejših spojin iz primarnega metabolizma, so študije biosinteze kompleksnih sekundarnih metabolitov, kot je FK506, veliko bolj zahtevna naloga, saj vključujejo razumevanje kompleksnih in večslojnih povezav primarnega in sekundarnega metabolizma, številnih multiencimskih kompleksov, ki so vključeni v biosintezo strukturno kompleksnih sekundarnih metabolitov, ter zapletene poti delovanja globalnih in pot-specifičnih regulatorjev. Kompleksna regulacija metabolnih poti pri biosintezi FK506 in njemu podobnih metabolitov, je rezultat zapletenega prepletanja različnih metabolnih procesov. Te procese lahko razdelimo na več skupin (i) procesi primarnega metabolizma, ki neposredno ali posredno vplivajo na oskrbo s substrati za biosintezo FK506, (ii) procesi povezani z oskrbo z gradbenimi enotami (nekateri so locirani znotraj FK506 genske skupine, (iii) regulatorni procesi, ki uravnavajo biosintezo sekundarnih metabolitov; in (iv) konkurenčne biosintezne poti, kot npr. PKS, ki kodirajo biosintezo drugih sekundarnih metabolitov v istem mikroorganizmu. Rezultati številnih projektov sekvenciranja genomov streptomicet in drugih aktinomicet so pokazali, da posamezni sev vsebuje genetski zapis za številne sekundarne metabolite (Bentley in sod., 2002; Ikeda in sod., 2003; Oliynyk in sod., 2007), ki med seboj pogosto tekmujejo za iste substrate.

FK506 in strukturno sorodne metabolite v industrijskem merilu proizvajamo s pomočjo bioprocesnega postopka z različnimi sevi *Streptomyces* sp. Donosi teh metabolitov so

relativno nizki, običajno nekaj sto mg/L, kar je malo v primerjavi z nekaterimi drugimi sekundarnimi metaboliti, kot so npr. tetraciklini in penicilin, kjer donosi v industriji že dosegajo nekaj deset g/L (Wilkinson in Bachmann, 2006). Boljše poznavanje biosinteznih in regulatornih poti, ki posredno ali pa neposredno vplivajo na končni donos FK506 in njemu sorodnih metabolitov, lahko doprinese k povečanju končnega donosa ali zmanjšanju količine neželenih intermediatov in stranskih produktov. Navedeno bo lahko bistveno izboljšalo ekonomiko proizvodnje metabolita FK506, tako na nivoju biosintezne kot tudi zaključnih procesov in istočasno zmanjšalo okoljske obremenitve pri proizvodnji teh medicinsko pomembnih spojin.

1.1 NAMEN NALOGE

Cilj raziskave je identifikacija potencialnih ključnih genov in metabolnih poti, ki so vpletene v preskrbo gradbenih enot za biosintezo FK506 pri *S. tsukubaensis* NRRL 18488, vključno s biosinteznimi potmi, ki kodirajo biosintezo začetne gradbene enote, kot tudi gradbenih oziroma podaljševalnih enot za biosintezo poliketidne verige in biosintezo Lpipekolne kisline v sevih rodu *Streptomyces*, ki proizvajajo FK506.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na dosedanje raziskave na področju biosinteze in regulacije FK506 in sorodnih metabolitov FK520 in rapamicina lahko trdimo:

- da je mogoče s pomočjo metod bioinformacijske analize genoma Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488, identificirati verjetne metabolne poti; ključne primarne metabolne poti, ki so neposredno vpletene v biosintezo sekundarnih metabolitov seva S. tsukubaensis NRRL 18488 in metabolne poti, ki so udeležene v biosintezo FK506
- da bomo lahko s pomočjo bioinformacijskih analiz v sekvencah genoma poiskali in identificirali ostale potencialne (konkurenčne biosintezne poti FK506) sekundarne metabolite, s posebnim poudarkom na genskih skupinah z osnovo PKS in/ali NRPS
- da bo mogoče, na osnovi bioinformacijskih analiz določiti verjetne ključne genske homologe oziroma metabolne poti, v katerih so udeleženi, in s pomočjo metabolnega inžineringa (metode genske inaktivacije oziroma prekomernega izražanja) ciljano vplivati na njihovo delovanje, ki bo posledično tudi vplivalo na biosintezo FK506 in/ali medproduktov oziroma stranskih produktov FK506

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU STREPTOMYCES

Streptomicete sodijo v skupino filamentoznih, aerobnih, po Gramu pozitivnih bakterij, ki rastejo v obliki razvejanega micelija, na katerem lahko tvorijo verige spor. Streptomicete so poznane predvsem zaradi proizvodnje številnih sekundarnih metabolitov, med katerimi je veliko farmakološko pomembnih učinkovin (Dworkin in sod., 2006).

2.1.1 Taksonomija streptomicet

Družino *Streptomycetaceae* sta leta 1943 prvič predlagala Waksman in Henrici. Družina je najprej vsebovala samo tipski rod *Streptomyces* in rod *Micromonospora*, kasneje pa sta se pridružila še rodova *Kitasatospora* (Zhang in sod., 1997) in *Streptacidiphilus* (Kim in sod., 2003). Rod *Streptomyces* je bil takrat prvič opisan kot »*Streptomycetaceae*«, ki tvorijo spore v verigah na zračnih hifah (Dworkin in sod., 2006).

V letu 1943 je Waksman s sodelavci prvič izoliral streptomicin. To je bil prvi antibiotik, ki ga proizvaja bakterija iz rodu *Streptomyces* in se je v medicini začel uspešno uporabljati za zdravljenje tuberkuloze. Waksman je za to odkritje leta 1953 dobil Nobelovo nagrado, streptomicete pa so zaradi bogatega nabora sekundarnih metabolitov postale medicinsko in ekonomsko zelo pomembni mikroorganizmi (Hopwood, 2007). V preteklosti je bilo opisanih že več kot 3000 streptomicetnih vrst (Anderson in Wellington, 2001), kar je bila večinoma posledica intenzivnega iskanja novih medicinskih učinkovin in različnega poimenovanja proizvodnih mikroorganizmov v patentni literaturi. Kasnejše taksonomske študije so pokazale, da je število novih vrst močno precenjeno in mnoge ne ustrezajo kriterijem za razvrstitev v ločene taksonomske enote (Kieser in sod., 2000). Zato so leta 2003 v »List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature« in leta 2007 v »Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea« predlagali preureditvi rodu *Streptomyces*, tako da le-ta zdaj zajema skupaj več kot 580 vrst (Garrity in sod., 2007).

Primer podrobne taksonomske uvrstitve bakterije *Streptomyces tsukubaensis* je povzet po »List of prokaryotic names with standing in nomenclature« (LPSN, 2013).

domena: Bacteria

deblo: Actinobacteria razred: Actinobacteria podrazred: Actinobacteridae red: Actinomycetales podred: Streptomycineae družina: *Streptomycetaceae* rod: *Streptomyces* vrsta: *S. tsukubaensis*

2.1.2 Ekologija streptomicet

Streptomicete so aerobne, po Gramu pozitivne bakterije. So kemoorganotrofne, z oksidativnim tipom metabolizma. Večinoma so prostoživeče saprofitske bakterije, redke vrste živijo kot simbionti v rizosferah rastlin ali pa so patogeni rastlin in živali. Njihov najpogostejši habitat je zemlja, nekatere vrste pa so prisotne v sedimentih in vodnem oziroma morskem okolju (Challis in Hopwood, 2003). Vzorci zemlje lahko vsebuje 10^4 do 10^7 CFU streptomicet na gram prsti, kar predstavlja 1-20 % vseh viabilnih celic.

Večina streptomicetnih vrst je mezofilnih in optimalno raste v temperaturnem območju 25-35 °C pri nevtralnih do rahlo alkalnih pH vrednostih (6,5-8,0) (Dworkin in Falkow, 2006). Streptomicete so v zemlji pomembni razkrojevalci organskega materiala. Proizvajajo mnogo ekstracelularnih encimov, s katerimi lahko razgrajujejo kompleksne rastlinske in živalske materiale, kot so škrob, pektin, celuloza, hitin, keratin, elastin, lignoceluloza in aromatske spojine (Dworkin in Falkow, 2006). Razgrajujejo lahko tudi nekatere sintetične produkte, kot so guma, plastika, bombažni tekstil in papir.

Prednost, ki jo imajo streptomicete pred gram-negativnimi talnimi bakterijami, je v tem, da se lahko razširjajo preko relativno suhe zemlje z rastjo hif (Kieser in sod., 2000).

2.1.3 Morfologija in življenjski cikel

Življenjski cikel streptomicet je v primerjavi z ostalimi bakterijami kompleksen. Sestavljen je iz faze rasti z razvojem micelija ter faze nastanka in zorenja spor. Fazi se izmenjujeta v odvisnosti od pogojev v okolju.

Življenjski cikel se začne s kalitvijo posamezne spore, pri čemer nastane filament. Filamenti so običajno premera 0,5–1,0 μ m, so različno dolgi in jim med vegetativno fazo rasti pogosto manjka prečna stena, zato so multigenomski. Rast je opazna na koncih filamentov, ki se razvejajo v t.i. substratni micelij. Substratni micelij se razrašča po površini rastnega medija in v njega. S staranjem kolonije se zaradi izrabe hranil na substratnem miceliju začnejo razvijati zračne hife, ki tvorijo t. i. zračni micelij. Rast zračnega micelija na trdnih gojiščih pri streptomicetah sovpada z zagonom sekundarnega metabolizma, s katerim si poskušajo v pozni fazi rasti zagotoviti prednost pred ostalimi organizmi (Chater in sod., 2010). Na koncih zračnih hif v zadnji fazi rasti nastanejo sporofori, v katerih se s segregacijo protoplazme in sinhrono tvorbo prečne stene oblikujejo verige spor. Dozorele spore so pogosto ovalnih ali cilindričnih oblik in so enogenomske. Spore se razpršijo in ko nastanejo ugodni življenjski pogoji, začnejo cikel nove generacije (Chater, 2006; Kieser in sod., 2000). Morfološke lastnosti zračnega micelija in proces nastanka spor ter njihova oblika se med vrstami razlikujejo in spadajo med pomembne fenotipske klasifikacijske lastnosti. Konidiji in sporofori so pogosto pigmentirani, kar prispeva k značilni barvi zrele kolonije in omogoča dodatno razlikovanje med posameznimi vrstami (Dworkin in Falkow, 2006; Flardh in Buttner, 2009).



Slika 1: Življenjski cikel *Streptomyces* sp. (Flardh in Buttner, 2009) Figure 1: The life cycle of *Streptomyces* sp. (Flardh and Buttner, 2009)

2.1.4 Značilnosti genomov streptomicet

Genomi streptomicet spadajo med največje genome bakterijskih vrst. V povprečju so genomi veliki od 8 do 10 Mb, z izjemami večjimi od 12 Mb, kot je pred kratkim sekvenciran genom *Streptomyces rapamycinicus* (Baranasic in sod., 2013). Kromosomi streptomicet so linearni in imajo visoko vsebnost nukleotidov G (gvanin) in C (citozin), ki znaša 70 % - 74 %. Večina streptomicetnih sevov vsebuje tudi plazmide, ki so lahko krožni ali linearni. Plazmidi so pogosto konjugativni, posebej zanimivo pa je, da na njih le redko najdemo zapise za očitne selekcijske prednosti oziroma zapise za biosintezo sekundarnih metabolitov (Dworkin in Falkow, 2006; Dyson, 2011; Kieser in sod., 2000).

Prvi genom streptomicete, ki je bil v celoti sekvenciran, je genom bakterije *S. coelicolor* A3(2). Genom so sekvencirali leta 2002. Po analizi je bilo ugotovljeno, da je njegova velikost 8.667 Mbp. Anotirali so bilo 7825 genov, kar je več kot pri preprostih evkariontih, kot je npr. kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki ima 6203 gene. V genomu *S. coelicolor* so identificirali kar 20 gruč genov za biosintezo sekundarnih metabolitov, od katerih so jih je bilo pred tem poznali le polovico (Bentley in sod., 2002). S prihodom novih in cenejših tehnologij sekvenciranja (NGS) se je število sekvenciranih genomov v zadnjih letih zelo povečalo. Tako je do danes javno dostopnih že 14 popolnoma in 41 delno sekvenciranih in anotiranih genomov streptomicet (NCBI, 2012).

Linearen kromosom je v splošnem razdeljen na osrednjo regijo in dve roki. V osrednji regiji kromosoma so koncentrirani geni, pomembni za osnovni oz. primarni metabolizem bakterije. V tej regiji se nahajajo geni za celično delitev, podvojevanje, transkripcijo, translacijo, sintezo aminokislin in pogosto tudi mesto začetka replikacije (*oriC*). Na levi in desni roki kromosoma so prisotni neesencialni geni, kot so geni za sekundarni metabolizem in geni za prevzem alternativnih virov hranil. Takšna razporeditev genov je smiselna, saj so zaradi linearnosti kromosoma zunanji predeli bistveno bolj izpostavljeni mutacijam, delecijam in podvojitvam ali preureditvam večjih segmentov DNA (Bentley in sod., 2002; Donadio in sod., 2002). Posledično so lahko industrijski sevi, ki se uporabljajo za proizvodnjo sekundarnih metabolitov in so nastali tekom dologoletnih postopkov naključne mutageneze in selekcije, genetsko nestabilni, kar lahko tekom kultivacije vpliva na donos produktov (Smolke, 2010).

Na obeh koncih kromosoma se nahaja telomera, kjer so prisotne dolge obrnjene ponovitve (terminal inverted repeats) in 5' kovalentno vezani terminalni proteini (TP). Telomera omogoča, da se podvojitev linearnega kromosoma lahko pravilno zaključi in da pri tem ne prihaja do krajšanja DNA (Yang in sod., 2002).

2.2 METABOLIZEM STREPTOMICET

Streptomicete so kemoorganotrofne bakterije z oksidativnim tipom metabolizma. S svojimi genomi, ki so med bakterijami med večjimi, in številnimi geni nakazujejo na bogat metabolni potencial primarnega in sekundarnega metabolizma. Streptomicete lahko za rast uporabljajo širok nabor virov ogljika, nekatere vrste tudi več kot 50 različnih virov (Hodgson, 2000; Kieser in sod., 2000).

Za razgradnjo kompleksnih substratov izločajo številne ekstracelularne encime (Chater in sod., 2010). Po razgradnji polisaharidov s hidrolitičnimi encimi lahko tako pridobljene enostavne sladkorje v celico prenesejo s pomočjo specifičnih ATP-vezavnih kasetnih transporterjev (ABC) (Dworkin in Falkow, 2006). Večina streptomicet za rast ne potrebuje organskih virov dušika, vitaminov ali rastnih hormonov, potrebujejo pa esencialne mineralne soli (Kämpfer, 2006).

2.2.1 Primarni metabolizem streptomicet

S pomočjo primarnega metabolizma organizmi pridobijo vse življenjsko pomembne osnovne gradnike, ki jih potrebujejo za rast, razvoj in razmnoževanje. Primarni metabolizem imenovan tudi centralni metabolizem pa zagotavlja tudi potrebne prekurzorske spojine za biosintezo sekundarnih metabolitov (Dworkin in Falkow, 2006).

Zaradi številnih virov ogljika, ki so jih streptomicete sposobne izrabljati za rast, so raznolike tudi njihove primarne metabolne poti. Večina streptomicet za katabolizem glukoze uporablja Embden–Meyerhof–Parnasovo (EMP) pot oz. glikolizo in pentoza fosfatno pot (PP). Vrste, kot je npr. *S. lividans*, so sposobne prilagajati metabolni fluks med potema glede na razpoložljivi vir ogljika in energije. Znani pa so tudi primeri streptomicet, ki v času sekundarnega metabolizma iz EMP poti preidejo na pot pentoze fosfata (Kieser in sod., 2000). Dolgo je veljalo, da streptomicete ne uporabljajo Entner-Doudoroffove (ED) poti, ki jo pogosto najdemo pri po Gramu negativnih bakterijah. Vendar so Borodina in sod. (2005) pri bakteriji *S. tenebrarius* ob delovanju EMP poti potridili tudi prisotnost in aktivnost ED poti. V času eksponentne rasti, so analize metabolnih fluksov celo pokazale, da sta obe poti enakovredno aktivni (Borodina in sod., 2005).

Cikel citronske kisline (CCK) oz. Krebsov cikel, imenovan tudi TCA cikel, je naslednja stopnja centralnega metabolizma, ki aerobnim organizmom omogoča popolno razgradnjo monosaharidov, aminokislin in maščobnih kislin. V mikroorganizmih ima dve pomembni vlogi. Je pot respiracije, hkrati pa je vir prekurzorjev za biosintezo esencialnih makromolekul v celici (Lehninger in sod., 2005). Zaradi odliva prekurzorskih metabolitov je potrebno za nadaljevanje CCK določene spojine cikla nadomestiti, kar omogočajo anaplerotične reakcije kot je npr. glioksilatni cikel (Poglavje 2.2.1.1) (Slika 2) (Han in Reynolds, 1997)

Streptomicete lahko večino prekurzorskih metabolitov za celično biosintezo s strani metabolizma ogljika zagotovijo z glikolizo, pentoza fosfatno potjo in ciklom citronske kisline. Ključni prekurzorski metaboliti, ki pri tem nastajajo, so acetil-CoA (C₂ spojina), piruvat (C_3 spojina), oksaloacetat (C_4 spojina) in α -ketoglutarat(C_5 spojina) (Borodina in sod.. 2005). V bakterijah tako kar 50 % celičnega ogljika izvira iz piruvata/fosfoenolpiruvata, ki je osnovni prekurzor za sintezo celične stene in nukleotidov. Sledijo mu acetil-CoA (30 %), oksaloacetat (13 %) in α-ketoglutarat (7 %) (Alber, 2011).

Mnoge streptomicete so sposobne rasti na spojinah z enim oziroma dvema oglijokovima atomoma (C₁ in C₂), kot edinih virih ogljika. Taki spojini sta npr. metanol in acetat, v smislu metabolizma pa so jim podobne tudi druge spojine (kot so maščobne kisline, voski in alkeni), ki v centralni metabolizem prav tako vstopajo na stopnji acetil-CoA. Pretvorbo acetil-CoA do ključnih prekurzorskih metabolitov, kot so piruvat/fosfoenolpiruvat, oksaloacetat in α -ketoglutarat, imenujemo tudi asimilacija acetil-CoA. Takšna asimilacija pri streptomicetah lahko poteka po dveh poznanih poteh: z glioksilatnim ciklom (Kornberg in Madsen, 1958) in po poti etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007).

V raziskavi, ki so jo opravili Erb in sod., so pregledali 1215 v celoti poznanih bakterijskih genomov, razporejenih v 413 različnih rodov. Iskali so prisotnost značilnih specifičnih

genov, vključenih v pot etilmalonil-CoA in glioksilatni cikel. Pri tem so ugotovili, da ima približno tretjina v raziskavo vključenih bakterijskih rodov genske homologe za encim glioksilatnega cikla (izocitrat liazo), ključne gene za encime poti etilmalonil-CoA (krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza, etilmalonil-CoA mutaza, metilsukcinil-CoA dehidrogenaza) (Slika 3) so našli pri 8 % rodov in pri 1 % bakterijskih rodov so našli gene za obe metabolni poti (Erb in sod., 2009b). Obstaja več razlogov, zakaj preostalih 60 % rodov teh dveh metabolnih poti ne potrebuje. Verjetno takšne skupine bakterij zaradi svojega spektra uporabljenih substratov ne potrebujejo poti za asimilacijo acetil-CoA, uporabljajo druge trenutno še neznane poti, ali pa so to anaerobne bakterije, ki acetil-CoA pretvorijo neposredno v piruvat z reduktivno karboksilacijo (Alber, 2011).

2.2.1.1 Glioksilatni cikel

Acetil-CoA je centralni intermediat v metabolizmu ogljika. Izključna rast na acetatu ali nekaterih drugih komponentah, ki vstopajo v centralni metabolizem na nivoju acetil-CoA (npr. maščobne kisline, alkoholi ali polihidroksialkanoati), je lahko problematična zaradi pretvorbe acetil-CoA v vse ostale celične komponente. Katabolizem acetil-CoA namreč generalno poteka preko cikla trikarboksilnih kislin (TCA), pri čemer pa je sinteza celičnih komponent onemogočena, če se vse C4 –kisline preko TCA cikla iz obtoka izločajo v obliki CO₂ (Meister in sod., 2005). Za premostitev te omejitve nekateri mikroorganizmi, ki rastejo na acetatu kot edinem viru ogljika, uporabljajo metabolne reakcije glioksilatnega cikla.

Glioksilatni cikel sta prvič definirala Kornberg in Madsen (1958) kot metabolno pot bakterije E. coli. Znano je bilo, da lahko nekatere bakterije, med njimi tudi E. coli, rastejo na acetatu kot edinem viru ogljika. V tej raziskavi pa je uspelo identificirati dva ključna encima glioksilatnega cikla: izocitrat liazo (ICL) in malat sintazo (MS), ki skupaj omogočata obvod nekaterih stopenj CCK, pri katerih prihaja do nastanka CO₂ (Kornberg in Madsen, 1958). Glioksilatni cikle zato predstavlja anaplerotično pot CCK, saj v glioksilatnem ciklu kumulativno iz dveh molekul acetil-CoA nastane ena molekula sukcinata. Glioksilatni cikel je zato posebej pomemben, kadar prihaja do porabe trikarboksilnih kislin iz cikla CCK v biosintezne namene, večina oziroma ves vir ogljika pa vstopa v metabolizem preko acetil-CoA (Dunn in sod., 2009). Ta korak se razlikuje od TCA cikla, v katerem izocitrat dehidrogenaza (ICD) pretvori skupen substrat, izocitrat, v α-ketoglutarat. V glioksilatnem ciklu, malat sintaza (MS) v procesu aldolne kondenzacije spoji glioksilat s še eno molekulo acetil-CoA v malat. Od tukaj naprej je cikel spet identičen TCA ciklu (Kim in sod., 2004). Skupna kataliza teh dveh encimov zagotovi obvoz dveh dekarboksilacijskih korakov TCA cikla v sintezi sukcinata. Na ta način sta za biosintezo kompleksnejših komponent na voljo dva ogljikova atoma več, ki bi sicer preko TCA cikla izstopila iz sistema v obliki CO₂. V vsakem krogu glioksilatnega cikla se tako neto porabita dve molekuli acetil-CoA, sprosti pa se ena molekula malata oziroma sukcinata (Soh in sod., 2001).



Slika 2: Glioksilatni cikel. Slika prikazuje običajno pot razgradnje acetata – cikel citronske kisline in alternativno pot – glioksilatni cikel, ki je označena s puščicami v sredini (Dunn in sod., 2009; Erb in sod., 2007; Kim in sod., 2004)

Figure 2: The glyoxylate cycle. The citric acid cycle is modified to bypass the two decarboxylation steps by the action of its two key enzymes isocitrate lyase and malate synthase (Dunn et al., 2009; Erb et al., 2007; Kim et al., 2007)

Pri rastlinah in glivah glioksilatna pot poteka v posebnih organelih, imenovanih glioksisomi in je s tem prostorsko ločena od TCA poti. Pri bakterijah, ki nimajo podobnih celičnih kompartmentov, pa morata zato biti glioksilatni in TCA cikel diferencialno regulirana. Pri *E. coli* sta regulacija in prehajanje med metabolnima potema dobro raziskana. Ključna je regulacija aktivnosti encima izocitrat dehidrogenaze (ICD) s pomočjo fosforilacije oz. defosforilacije. ICD, encim TCA poti, in izocitrat liaza (ICL) tekmujeta za isti substrat izocitrat. Kadar je znotrajcelična koncentracija ATP visoka, pride do fosforilacije ICD, kar povzroči drastičen upad aktivnosti encima. To posledično preusmeri ogljikov fluks proti glioksilatnemu ciklu in h glukoneogenezi (Dunn in sod., 2009; Huttner in sod., 1997; LaPorte in sod., 1985).

Večina študij o glioksilatnem ciklu je bila narejenih zaradi razumevanja vloge te poti v primarnem metabolizmu, zlasti pri rasti organizmov na molekulah z dvema ogljikovima

atomoma kot edinim virom ogljika. Vendar je glioksilatni cikel pomemben tudi za sekundarni metabolizem. Maščobne kisline se večinoma razgradijo do acetil-CoA in nato katabolizirajo v ciklu CCK. Ravno povezava z glioksilatno potjo omogoča ohranjanje ključnih intermediatov v ciklu CCK, ki se lahko porabljajo za sintezo celičnih komponent in sekundarnih metabolitov (Chan in Sim, 1998; Huttner in sod., 1997).

2.2.1.2 Pot etilmalonil-CoA

Nekatere študije narejene po odkritju glioksilate poti so pokazale, da številne C2asimilatorne bakterije ne vsebujejo enega ali obeh ključnih encimov glioksilatnega cikla (Ensign, 2006). Takšne so nekatere vrste škrlatnih ne-žveplovih fotosintetskih bakterij, kot so *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* in *Rhodobacter sphaeroides*, ki vsebujejo samo malat sintazo, izocitrat liaze pa ne (Meister in sod., 2005).

Albert in sodelavci so ob proučevanju bakterije *Rhodobacter sphaeroides*, ki lahko raste na acetatu kot edinem viru ogljika brez prisotnega encima izocitrat liaze, odkrili novo asimilatorno pot acetata, imenovano pot etilmalonil-CoA. Zmožnost rasti na C2-komponentah kot edinem viru ogljika kljub odsotnosti izocitrat liaze pa lahko opazimo tudi pri mnogih vrstah iz rodu *Streptomyces* (Erb in sod., 2008).

Pot etilmalonil-CoA je sestavljena iz dveh delov. V prvem delu se dve molekuli acetil-CoA združita v acetoacetil-CoA, ki se pretvori v C4 intermediat krotonil-CoA. Ta se nato reduktivno karboksilira do etilmalonil-CoA. Etilmalonil-CoA se preko metilsukcinil-CoA pretvori v mezakonil-CoA (Ensign, 2006). V *Rhodobacter sphaeroides* so prvič identificirali gen *mch*, ki domnevno kodira encim za hidracijo mezakonil-CoA v β -metilmalil-CoA (kodira mezakonil-CoA hidratazo) (Erb in sod., 2008). Drugi del poti etilmalonil-CoA pa je sestavljen iz razgradnje β -metilmalil-CoA na propionil-CoA in na glioksilat. Propionil-CoA se karboksilira do metilmalonil-CoA in se nato lahko pretvori v sukcinat, glioksilat pa se podobno kot pri glioksilatnem ciklu kondenzira z novo molekulo acetil-CoA in pri tem nastane L-malat (Slika 3) (Erb in sod., 2008).

Začetne reakcije, ki vodijo do nastanka krotonil-CoA, in reakcije, ki sledijo po nastanku (2R, 3S)- β -metilmalil-CoA, niso omejene na pot etilmalonil-CoA in so poznane iz drugih metabolnih poti (npr. metabolizem polihidroksibutirata, 3-hidroksipropionatni cikel, asimilacija propionata). Osrednji, značilen del poti etilmalonil-CoA pa vsebuje 5 encimov. Ti encimi so krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr), etilmalonil-CoA/metilmalonil-CoA epimeraza (Epi), (2*R*)-etilmalonil-CoA mutaza (Ecm), (2*S*)-metilsukcinil-CoA dehidrogenaza (Mcd) in mezakonil-CoA hidrataza (Mch) (Erb in sod., 2007).

Encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza pretvori krotonil-CoA v (2*S*)-etilmalonil-CoA. Ta intermediat nato s pomočjo encima etilmalonil-CoA/metilmalonil-CoA epimeraze (Epi) epimerizira v (2*R*)-etilmalonil-CoA. (2*R*)-etilmalonil-CoA nato encim (2*R*)-etilmalonil-

CoA mutaza (Ecm) pretvori v (2S)-metilsukcinil-CoA. Slednjega nato encim (2S)metilsukcinil dehidrogenaza (Mcd) pretvori v mezakonil-(C1)-CoA, ta intermediat pa mezakonil-CoA hidrataza (Mch) pretvori v (2R, 3S)- β -metilmalil-CoA (Erb in sod., 2009a).

Končna produkta poti etilmalonil-CoA sta malat in sukcinil-CoA, dva anaplerotska intermediata Krebsovega cikla, kar mikroorganizmom omogoča uporabo acetil-CoA za gradnjo celičnih komponent (Alber, 2011).



Slika 3: Shematski prikaz poti etilmalonil-CoA vključno z dodatnimi vhodnimi in izhodnimi metabolnimi potmi (Alber, 2011).

Figure 3: Schematic diagram of ethylmalonyl-CoA pathway for acetyl-CoA assimilation (Alber, 2011)

Za pot etilmalonil-CoA so značilni C₅ intermediati, ki so drugače v metabolizmu redko prisotni: (2*S*)-etilmalonil-CoA, (2*R*)-etilmalonil-CoA, (2*S*)-metilsukcinil-CoA, mezakonil-(C1)-CoA, in (2*R*, 3*S*)- β -metilmalil-CoA (Erb in sod., 2007) Med temi je še posebej

zanimiv (2*S*)-etilmalonil-CoA, ki ga sintetizira encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr). (2*S*)-etilmalonil-CoA se namreč uporablja tudi kot podaljševalna enota pri biosintezi nekaterih poliketidnih antibiotikov. S tem intermediatom pot etilmalonil-CoA povezuje centralni ogljikov metabolizem s sekundarnim metabolizmom (Alber, 2011; Chan in sod., 2009).

2.2.2 Sekundarni metabolizem streptomicet

Sekundarni metaboliti so produkti celičnega metabolizma, ki niso nujno potrebni za preživetje, rast ali celično delitev organizma. Po kemijski strukturi so zelo raznoliki, pogosto nenavadni in z nizko molekulsko maso (Demain in Sanchez, 2009; Li in Vederas, 2009; Solecka in sod., 2012).

Sekundarni metaboliti so široko razširjeni, proizvajajo jih bakterije, glive, rastline, lišaji in nekateri morski organizmi, mnogi pa imajo biološko aktivnost. Samo aktinomicete proizvajajo preko 10000 bioaktivnih spojin, od katerih jih večino, več kot 75 %, proizvajajo bakterije iz rodu *Streptomyces*. Po nekaterih predvidevanjih pa naj bi odkrite spojine predstavljale le 3 % vseh sekundarnih metabolitov, ki jih proizvajajo streptomicete (Watve in sod., 2001).

Pomen sekundarnih metabolitov v naravi ni povsem znan. Organizmom, ki jih proizvajajo, največkrat omogočijo kompetitivno prednost v pogojih s pomanjkanjem hranil, nekateri pa imajo vlogo pri komunikaciji znotraj iste vrste ali z okoljem (Dworkin in Falkow, 2006). Tako kot pri večini sekundarnih metabolitov je tudi pri streptomicetah sinteza podvržena kompleksnim kontrolnim mehanizmom. Biosintezne poti sekundarnega metabolizma se aktivirajo v zgodnji stacionarni fazi rasti, ko prične v okolju primanjkovati osnovnih nutrientov, s čimer sovpada tudi diferenciacija kolonij z razvojem zračnih hif in sporulacije (Kieser in sod., 2000). Mikroorganizmi sekundarne metabolite večinoma sintetizirajo po kompleksnih biosinteznih poteh, ki jih sestavljajoštevilne encimske reakcije in modifikacije. Geni vpleteni v biosintezo sekundarnih metabolitov so povečini zbrani v genske gruče, velike od 20 do 100 kb, v okviru katerih so lahko locirani tudi geni za rezistenco in regulatorni elementi (Dyson, 2011).

Za mnoge produkte sekundarnega metabolizma poznamo biološko delovanje in jih uspešno uporabljamo v medicini, veterini in agroživilstvu, za številne pa biološka vloga in delovanje še vedno ostajata nepoznana. Sekundarne metabolite lahko glede na kemijsko strukturo razvrstimo v številne skupine, kot so: poliketidi, peptidi, glikopeptidi, terpeni, alkaloidi, nukleosidi, kinoni, kumarini in drugi (Chater, 2006; Maplestone in sod., 1992).

2.2.3 Biosinteza poliketidov

Poliketidi predstavljajo veliko družino strukturno raznolikih naravnih spojin s širokim spektrom farmakoloških učinkov. Med njimi je veliko medicinsko pomembnih spojin z protibakterijskim (eritromicin, tetraciklin), protiparazitskim (avermektin, milbemicin), imunosupresorskim (FK506), protirakastim (rapamicin, epotilon) ter drugim delovanjem (Menzella in Reeves, 2007). Kot sekundarne metabolite jih sintetizirajo predvsem bakterije in glive, med katerimi pa daleč največji delež pripada streptomicetam (Procopio in sod., 2012).

Poliketide sintetizirajo veliki multi-encimski kompleksi, imenovani poliketid sintaze (PKS), podobno kot poteka biosinteza maščobnih kislin s sintazami maščobnih kislin (angl. Fatty Acid Synthases, FAS). Sinteza poliketidne verige poteka v nizu dekarboksilacijskih Claisenovih kondenzacij krajših karboksilnih kislin, aktiviranih v obliki koencim A (CoA) tioestrov (Hopwood, 1997; Staunton in Weissman, 2001).

Pri biosintezi nasičenih maščobnih kislin, po vsakem koraku kondenzacije nove podaljševalne enote sledijo β -keto-redukcija, dehidracija in enolna redukcija. Biosinteza poliketidov se v tem razlikuje, saj redukcija nastale β -keto vezi ne poteče vedno do enojne C-C vezi, ampak lahko poteče le delno ali pa sploh ne. H kompleksnosti končne zgradbe poliketidov pa še dodatno prispevajo: vključevanje različnih začetnih enot, izbira različnih podaljševalnih enot, različne oblike ciklizacije nastale verige in številne možne post-PKS modifikacije kot so glikozilacije, metilacije, oksidacije, itd (McDaniel in sod., 2005).

Poliketid sintaze glede na strukturo in mehanizem delovanja razdelimo na tri glavne skupine: PKS tipa I, PKS tipa II in PKS tipa III. PKS tipa I in tipa II so strukturno analogne, medtem ko so PKS tipa III strukturno in katalitsko manj kompleksne ter evolucijsko bolj oddaljene kot ostala dva tipa. PKS tip I glede na način sinteze dodatno delimo še na modularne in na iterativne (Chan in Thomas, 2009; Staunton in Weissman, 2001).

2.2.3.1 Modularne poliketid sintaze tipa I

Modularne PKS tipa I so veliki (od 100 kDa do 2 MDa) multifunkcionalni encimski kompleksi (Keatinge-Clay, 2012). Organizirani so v zaporedje domen, znotraj katerih se nahajajo katalitična mesta, ki so v biosintetskem procesu uporabljena le enkrat. Zaporedja domen, ki sodelujejo v posameznem kondenzacijskem ciklu, so organizirana v module. Modul je tista enota, ki v posameznem koraku biosinteze določi izbiro podaljševalne enote in stopnjo redukcije β -keto vezi. Število podaljševalnih korakov in s tem števo vgrajenih podaljševalnih enot je določeno s številom modulov PKS (Keatinge-Clay, 2012).

Moduli, ki v biosintezi poliketidov vgradijo začetno enoto (pogosto acetil-CoA ali propionil-CoA) so pogosto krajši in z manjšo raznolikostjo domen. Moduli, ki pa vnašajo podaljševalne enote (pogosto malonil-CoA, etilmalonil-CoA ali metilmalonil-CoA), pa so sestavljeni iz treh osnovnih domen in do treh dodatnih reduktivnih domen za procesiranje β -keto skupine. Osnovne domene so ketosintaza (KS), acil-transferaza (AT) in proteinski prenašalec acilne skupine (acyl carrier protein - ACP). AT domena specifično prepozna s koencimom A (CoA) aktivirano podaljševalno enoto in jo prenese na tiolni ostanek fosfopanteteinskega dela acil prenašalne domene (ACP). KS domena katalizira dekarboksilativno Claisenovo kondenzacijo med tioesterificiranim derivatom podaljševalne enote in tioestrom rastoče verige (Keatinge-Clay, 2012). V modulu se lahko nahajajo tudi dodatne domene, ki določajo stopnjo redukcije nastale β-keto skupine. To so ketoreduktazna domena (KR), dehidratazna domena (DH) in enoil reduktazna domena (ER) (Chan in Thomas, 2009; Sherman in Smith, 2006).

Zadnji modul PKS tipa I običajno vsebuje še tioesterazno (TE) domeno, ki nastali linearni β -ketonski intermediat odcepi z encimskega kompleksa in katalizira nastanek makrocikličnega obroča z uporabo oddaljene hidroksilne skupine na poliketidni verigi (Staunton in Weissman, 2001).



Slika 4: Molekularni mehanizem biosinteze poliketidov. Prikazane so domene, ki sodelujejo pri podaljševanju verige, in sicer gre za beta-ketosintetazo (KS), aciltranferazo (AT) in acil prenašalni protein (ACP). Poleg teh domen pa lahko vsak modul vsebuje še dodatne domene, ki sodelujejo v redukciji beta-keto skupine podaljševalnih gradnikov. Te domene so beta-keto reduktaza (KR), dehidrataza (DH) in enoilreduktaza (ER). Prisotnost specifičnih kombinacij reduktivnih domen vpliva na stopnjo redukcije, do katere pride v določeni stopnji podaljševanja verige.(McDaniel in sod., 2005)

Figure 4: Molecular mechanism of polyketide biosynthesis. Structural PKS domains are shown: KS (betaketosynthase), ACP (Acyl Carrier Protein), KR (ketoreductase), DH (dehydratase), ER (enoyl reductase), AT (acyltransferase) (McDaniel et al., 2005)

Modularna organiziranost PKS tipa I ponuja velike možnosti »reprogramiranja« teh encimov s pomočjo genskega inženiringa. Veliko dosežkov s tega področja je že bilo

opisanih v literaturi (Kuščer in sod., 2005). S kombiniranjem modulov ali povezovanjem različnih domen je mogoče doseči spremenjeno biosintezo poliketida (dolžina poliketida, stopnja redukcije, prepoznavanje in dodajanje drugih podaljševalnih ali začetnih enot). Z modifikacijami izbranih PKS genov in s tem encimov vpletenih v sintezo poliketidov ali z dodajanjem sintetičnih prekurzorskih enot je mogoče doseči nastanek analogov obstoječih poliketidnih molekul. Dodatne spremembe na osnovni strukturi poliketidne verige, t.i. post-PKS modifikacije, lahko še povečajo raznolikost končnih spojin (Park in sod., 2010).

2.2.4 Neribosomske peptid sintetaze

Neribosomske peptid sintetaze (NRPS) so podobno kot PKS veliki multiencimski kompleksi, z modularno organizacijo katalitičnih domen. NRPS sintetizirajo neribosomske peptide, ki za razliko od peptidov sintetiziranih na ribosomih, lahko vsebujejo tudi neproteinogene aminokisline in nekatere neobičajne modifikacije peptidnega ogrodja (Schwarzer in sod., 2003).

Neribosomalno sintetizirani peptidi predstavljajo veliko skupino sekundarnih metabolitov, opisanih je že preko 700 strukturno različnih produktov. Med spojine, ki se sintetizirajo s pomočjo NRPS sistema, so β -laktamski antibiotiki, kot sta penicilin in cefalosporin, ter nekatere druge peptidne učinkovine, kot je imunosupresiv ciklosporin A (Caboche in sod., 2008). Strukturna raznolikost je posledica različne organiziranosti domen znotraj modulov in različnih mehanizmov sinteze produkta. Podobno kot pri PKS poznamo tri osnovne mehanizme sinteze: linearni, iterativni in nelinearni.

NRPS, organizirane v module vključujejo: kondenzacijsko domeno (C), adenilacijsko (A) domeno in peptidil prenašalni protein (ang. peptidyl carrier protein; PCP). Adenilacijska domena prepozna in s pomočjo adenilacije aktivira aminokislinsko gradbeno enoto. Ta se nato prenese na fosfopanteteinsko skupino PCP, ki je analogen acil prenašalnemu proteinu (ACP) pri PKS. PCP ima funkcijo prenašalca in omogoča prenos verige in podaljševalnih enot med aktivnimi centri v domenah. Kondenzacijska domena (C) posreduje kondenzacijo med aminokislinskimi enotami, tako da tvori peptidno vez. Na koncu zadnjega modula se nahaja tioesterazna domena (TE), ki je odgovorna za odcepitev linearne peptidne verige in njeno ciklizacijo. Poleg osnovnih domen pa lahko moduli NRPS vsebujejo tudi epimerazno (E), metiltransferazno (MT), ciklizacijsko (Cy) in oksidacijsko domeno (Ox), ki med sintezo vnašajo dodatne modifikacije polipeptida (Marahiel in sod., 1997; Nikolouli in Mossialos, 2012)



Slika 5: Podobnost modularne organiziranosti NRPS (A) in PKS tip I (B) (Nikolouli in Mossialos, 2012) Figure 5: The similarity of the modular NRPS (A) and PKS type I (B) organization (Nikolouli and Mossialos, 2012)

2.3 BIOSINTEZA FK506 IN NEKATERIH STRUKTURNO SORODNIH SPOJIN

Poznamo več kot 100.000 naravnih produktov sekundarnega metabolizma različnih organizmov, od tega predstavlja skupina makrocikličnih spojin, ki imajo 12 ali več členske makrociklične obroče, približno 3 %. Kljub majhnemu deležu, ki ga predstavljajo makrociklične spojine, pa v to skupino spada veliko biološko aktivnih spojin s farmakološkim oziroma terapevtskim delovanjem. Ena od teh naravnih spojin je FK506 in njemu strukturno sorodne spojine, kot so rapamicin, FK520, meridamicin in antaskomicin.



Slika 6: Strukturno in biogenetsko podobni sekundarni metaboliti FK506, FK520, rapamicin in meridamicin (Wu in sod., 2011; Zhou in sod., 2010)

Figure 6: Structural and biogenic similarity of secondary metabolites FK506, FK520, rapamycin and meridamycin (Wu et al., 2011; Zhou et al., 2010)

2.3.1 Biosinteza FK506 in FK520

FK506 je po strukturi 23-členski makrolidni lakton, skupaj z zgoraj omenjenimi strukturno in biogenetsko sorodnimi spojinami pa spada v skupino poliketidov, ki jih sintetizirajo hibridni sistem modularnih poliketid sintaz (PKS) tipa I in neribosomskih peptid sintetaz (NRPS). Poliketidni del molekule sintetizira PKS, po zadnji stopnji podaljševanja poliketidne verige pa se ta prenese na NRPS modul, kjer specifične domene katalizirajo dodatek pipekolne kisline in ciklizacijo verige. Delovanje takšnih hibridnih PKS/NRPS sistemov je mogoče zaradi podobne modularne organiziranosti in zaradi podobnosti v delovanju nekaterih katalitičnih domen (Fischbach in Walsh, 2006; Schwarzer in Marahiel, 2001).



Slika 7: Predlagane biosintezne poti za izgradnjo molekule FK506. Poliketid sintaza (PKS) sestavljena iz FkbA, B in C uporabi kot začetno enoto 4,5-dihidroksicikloheks-1-enkarboksilno kislino (DHCHC) nato pa nadaljuje s podaljševanjem poliketidne verige z gradbenimi enotami, kot so malonil-CoA, metilmalonil-CoA, alilmalonil-CoA in metoksimalonil-ACP. FkbP zaključi sintezo z vgradnjo L-pipekolne kisline in makrolidni obroč se zapre. Pri dokončanju sinteze FK506 so vpleteni tudi encimi (FkbD, O in M) s post-PKS delovanjem, ki dodatno vnesejo nekatere modifikacije na obroč FK506 (Mo in sod., 2009)

Figure 7: The proposed biosynthetic pathway for FK506 FkbA, B, and C use a dihydroxycyclohexanecarboxylic acid (DHCHC) as a starter unit, and malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA, propionylmalonyl- CoA and methoxylmalonyl-ACP as extender units. The FkbP then incorporates the L-pipecolic acid unit, and the macrolide ring is closed. Post-polyketide synthases (PKS) enzymes (FkbD, O, and M) produce FK506 (Mo et al., 2009)

Biosintezo FK506, FK520 in rapamicina lahko razdelimo na štiri ključne stopnje in sicer: začetek sinteze z neobičajno začetno enoto 4,5-dihidroksicikloheks-1-en karbokslilno kislino (DHCHC), ki izvira iz šikimske kisline, podaljševanje poliketidne verige z aktiviranimi gradbenimi enotami na PKS sistemu, zaključek in ciklizacija verige z

vgradnjo L-pipekolne kisline, ki jo katalizira NRPS in zadnja stopnja, post-PKS procesiranje z *O*-metiltransferazo in monooksigenazo.

2.3.1.1 Nastanek osnovne poliketidne verige

Sinteza poliketidne verige FK506 poteka na PKS sistemu, ki ga tvorijo tri velike poliketid sintaze FkbA (630660 Da), FkbB (790139 Da) in FkbC (374438 Da). Sinteza se prične na encimu FkbB (7540 aminokislinskih preostankov), ki vsebuje 21 domen razdeljenih v 5 modulov. Prvi modul, imenovan začetni modul, je sestavljen iz treh domen. Začetna enota za biosintezo FK506 je 3,4-dihidroksicikloheksenilkarbonil-CoA, šikimatu podoben prekurzor začetne enote pa je 3,4-dihidroksicikloheksenkarboksilna kislina (dihydroxycyclohexenylcarboxylic acid; DHCHC). Za tvorbo prekurzorja začetne enote je odgovoren gen *fkbO*, ki omogoča hidrolizo korizmata do 3,4-dihidroksicikloheksen karboksilne kisline (Andexer in sod., 2011).

Prva domena začetnega modula najverjetneje katalizira aktivacijo 3,4dihidroksicikloheksenkarboksilne kisline. Naslednja domena je 3,4-dihidroksicikloheksenil karbonil-CoA reduktaza in verjetno katalizira redukcijo dvojne vezi v 4,5dihidroksicikloheksenil karbonil-CoA v dihidroksicikloheksil karbonil-CoA. Tretja domena začetnega modula pa je ACP-domena, ki je ključna komponenta in katalizira povezavo dihidroksicikloheksil karbonil-CoA s prvo podaljševalno enoto (Motamedi in Shafiee, 1998).



Slika 8: Biosinteza FK506 in analogov na hibridnem PKS/NRPS sistemu (Mo in sod., 2011). Figure 8: Biosynthesis of FK506 and its analogues on hybrid PKS/NRPS system (Mo et al., 2011)

Ostali štirje moduli pri FkbB kot tudi vsi moduli v produktih genov *fkbC* in *fkbA* v biosintezi FK506 so podaljševalni. V genski skupini za biosintezo FK506 genu *fkbB* sledi gen *fkbC*, ki kodira protein FkbC (3592 aminokislinskih preostankov), ki je vsebuje dva modula. Zadnji gen v biosintezi poliketidne verige je *fkbA*, ki se prepisuje v nasprotni smeri kot *fkbB* in *fkbC* in kodira FkbA, ki je vsebuje štiri module (Motamedi in Shafiee, 1998). Na modulih encimov FkbA, FkbB in FkbC poteka podaljševanje poliketidne verige z gradbenimi enotami, ki vključujejo dve molekuli malonil-CoA, dve molekuli metoksimalonil-ACP, pet molekul metilmalonil-CoA in ena molekula alilmalonil-CoA (Goranovič in sod., 2010; Mo in sod., 2011).

Molekuli FK506 je strukturno zelo podobna molekula FK520, ki pogosto nastaja tekom biosinteze FK506 kot nečistoča. Edina strukturna razlika med FK506 in FK520 je stranska skupina na mestu C21, kjer je pri FK506 prisotna alilna skupina, pri FK520 pa etilna skupina (Slika 8). Za vključevanje stranske skupine na tem mestu je odgovoren modul 4 FkbB PKS. Pri organizmih, ki sintetizirajo FK506, je AT domena modula 4 (AT4) do določene mere nespecifična in lahko sprejema različne substrate. Če modul 4 vgradi

podaljševalno enoto alilmalonil-CoA, pride do sinteze FK506, če pa se na tem mestu vgradi podaljševalna enota etilmalonil-CoA, se sinteza zaključi z nastankom FK520. Znano je, da *S. tsukubaensis* poleg FK506 proizvaja tudi nizke koncentracije nečistoč FK520 (etilna skupina), FK523 (metilna skupina) in 36,37-dihidro-FK506 (propilna skupina) (Slika 8) (Mo in sod., 2011). Ključna razlika med sevi, ki proizvajajo pretežno FK506, poleg tega pa tudi FK520 kot nečistočo, in sevi, ki proizvajajo FK520 kot glavni produkt je, da proizvajalci FK520 vsebujejo tudi gene za učinkovito oskrbo s potrebno podaljševalno enoto etilmalonil-CoA (Slika 9). Pri proizvajalcih FK506 pa etilmalonil-CoA nastaja v majhnih količinah z doslej slabo poznanim mehanizmom.



Slika 9: Organizacija genskih skupin za biosintezo FK506 in FK520. Organizacija genov osrednje PKS biosintezne regije pri bakteriji *Streptomyces* sp. MA6548 (a) in genska skupina za biosintezo FK520 in organizacija sosednjih genskih skupin za sintezo metoksimalonil-ACP in etilmalonil-CoA (b) ter genska skupina za biosintezo FK506 pri bakteriji *S. tsukubaensis* NRRL 18488 z označeno regijo genov za sintezo gradbene enote z alilno stransko skupino (c) (Goranovič in sod., 2010)

Figure 9: Schematic representation of gene clusters encoding FK506 and FK520 biosynthetic pathways. in FK506-producing species *Streptomyces sp.* MA6548 (a); the FK520 biosynthetic cluster PKS core architecture with additional genes encoding biosynthesis of methoxymalonyl-ACP and ethylmalonyl-CoA extender units (b) and FK506 biosynthetic cluster from *S. tsukubaensis* NRRL 18488 with a conserved area of methoxymalonyl-ACP biosynthetic genes and sequence of genes encoding biosynthesis of allyl group (c) (Goranovič et al., 2010)

2.3.1.2 Pripenjanje L-pipekolata in ciklizacija

Sinteza makrocikličnega obroča FK506 se ne zaključi z delovanjem sicer za PKS običajne domene terminalne esteraze (TE), temveč z vgradnjo L-pipekolata s pomočjo neribosomske peptid sintetaze, produktom gena *fkbP*. Encim poveže L-pipekolat in poliketidno verigo z amidno vezjo, hkrati pa zapre makrociklično strukturo z estrsko vezjo. Pri oskrbi s pipekolatom ima pomembno vlogo tudi gen *fkbL*, ki kodira encim lizin ciklodeaminazo, ki katalizira ciklizacijo proteinogene aminokisline L-lizina do L-pipekolata (Motamedi in Shafiee, 1998).

2.3.1.3 Post-PKS modifikacije

V zaključnih stopnjah biosinteze FK506 pride tudi do dveh post-PKS modifikacij, in sicer hidroksilacije in metilacije. Ugotovili so, da pri post-PKS spremembah sodelujeta produkta genov *fkbD* in *fkbM*. FkbM je O-metiltransferaza, ki metilira hidroksilno skupino ogljika C31, produkt gena *fkbD* pa je citokrom P-450 hidroksilaza, ki hidroksilira ogljik C9 (Motamedi in Shafiee, 1998).

2.3.2 Biosinteza rapamicina

Rapamicin (sirolimus) je 31-členski makrociklični poliketid, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces rapamycinicus* (Schwecke in sod., 1995). Gručo genov za biosintezo rapamicina so uspešno sekvencirali leta 1995. Celotna skupina je dolga 107 kb in vsebuje 27 odprtih bralnih okvirjev (Slika 10) ter spada med največje skupine, ki kodirajo kombinirane modularne PKS tip I in neribosomalne peptidne sintaze (NRPS).



Slika 10: Posamezni koraki biosinteze rapamicina. Predstavljena je organizacija modulov in domen znotraj PKS genov. Za sintezo rapamicina je potrebnih 14 modulov, ki se nahajajo na treh velikih polipeptidih. Na Raps1 (~900 kDa) se nahajajo nanašalni modul in še moduli 1-4, Raps2 (~1070 kDa) moduli 5-10 in Raps3 (~660 kDa) moduli 11-14 (Schwecke in sod., 1995)

Figure 10: Steps in rapamycin biosynthesis. Domain organization and biosynthetic intermediates. Raps1 (~900 kDa) with loading domain and modules 1-4, Raps2 (~1070 kDa) modules 5-10 and Raps3 (~660 kDa) modules 11-14 (Schwecke et al., 1995)

Biosinteza rapamicina se podobno kot pri FK506 začne z začetno enoto, ki izvira iz šikimske kisline (Lowden in sod., 2001), tej pa sledi izgradnja poliketidne verige s 14 kondenzacijskimi stopnjami, kjer se poveže 7 enot metilmalonil-CoA in 7 enot malonil-CoA (Aparicio in sod., 1996). Sinteza poliketidne verige se, spet podobno kot pri FK506, zaključi z vgradnjo aminokisline L-pipekolata s pomočjo NRPS proteina, ki tvori estersko in amidno vez ter s tem zapre makrociklično strukturo (König in sod., 1997).

Molekula pre-rapamicina je v naslednji stopnji biosinteze podvržena modifikacijskim (post-PKS) procesom. Na makrolakton deluje pet post-PKS encimov: RapI, RapN, RapQ, RapM in RapJ. Protein RapI deluje kot O-metiltranferaza, ki metilira OH skupino na mestu C39, RapJ (citokrom P-450 monooksigenaza) nato vnese karbonilno skupino na mesto C9, temu sledi delovanje RapM z O-metilacijo C16 mesta. Post-PKS reakcije se zaključijo z delovanjem encima RapN (citokrom P-450 monooksigenaza), ki na mestu C27 vgradi hidroksilno skupino, ki jo nato RapQ O-metilira (Slika 11) (Molnar in sod., 1996).


Slika 11: Biosintezna pot za izgradnjo molekule rapamicina pri *S. rapamycinicus* (Jung in sod., 2011) Figure 11: Rapamycin biosynthesis in *S. rapamycinicus* (Jung et al., 2011)

2.3.3 Biosinteza meridamicina

Meridamicin je bil prvič opisan leta 1995 kot produkt bakterije Streptomyces hygroscopicus (sev F004,081; zbirka La Mitisu Merida, Venezuela). Strukturno je meridamicin podoben FK506 in rapamicinu, saj se biosinteza makrolaktonskega obroča prav tako zaključi z L-pipekolatom (Salituro in sod., 1995). Organizacija genske gruče, odgovorne za biosintezo meridamicina, je bila natančno proučena leta 2006. Takrat so He in sod. iz bakterije Streptomyces sp. NRRL 30748 s pomočjo kozmidne knjižnice klonirali in sekvencirali celotno gensko gručo. Glede na podobnosti aminokislinskih sekvenc z drugimi znanimi homologi so anotirali ključne gene. V osrednji regiji genske gruče so prepoznali šest odprtih bralnih okvirjev, za katere so predvidevali, da skupaj tvorijo en velik operon (~78 kb), ki je pod kontrolo skupnega promotorja. V operon so po prvotnih ugotovitvah vključeni geni za štiri proteinske podenote PKS (MerA, MerB, MerC in MerD), citokrom P450 monooksigenazo (MerE) in NRPS (MerP). Protein MerP kaže veliko stopnjo homologije (46 %) s neribosomskima peptid sintetazama RapP in FkbP, in je potreben za vgradnjo L-pipekolata v poliketidno verigo. Leta 2009 so po ponovnem sekvenciranju skupine biosinteznih genov za meridamicin ugotovili nekatere napake v prvotni sekvenci. Ena napaka z manjkajočim baznim parom je med drugim pokazala, da sta gena za PKS merC in merD zdužena in se prepisujeta skupaj kot en velik gen merC (Liu in sod., 2009). Podobna organizacija genske gruče je bila odkrita pri drugem proizvajalcu meridamicina bakteriji Streptomyces sp. DSM 4137 (Sun in sod., 2006).

Biosinteza meridamicina poteka na PKS sistemu, ki je sestavljen iz enega začetnega in 14 podaljševalnih modulov. Glede na specifičnost AT domen in strukturo molekule sklepajo, da je za sintezo ene molekule meridamicina potrebnih 7 molekul gradbene enote malonil-CoA, 7 molekul metilmalonil-CoA in ena molekula etilmalonil-CoA. Sinteza se nadaljuje na NRPS (MerP), ki vključi L-pipekolat na poliketidno verigo, po ciklizaciji makrolaktonskega obroča pa deluje še post-PKS encim P450 monooksigenaza (MerE).

V primerjavi z genskimi gručami za biosintezo rapamicina in FK520/FK520, je zanimiva odsotnost gena, ki kodira encim lizin ciklodeaminazo, kar nakazuje na možnost drugačne metabolne poti sinteze L-pipekolata (He in sod., 2006). To ugotovitev je kasneje potrdila tudi raziskava Jiang in sod., kjer so s pomočjo eksperimentov izotopsko označenega lizina, substrata za nastanke L-pipekolata, dokazali prisotnost dveh novih poti sinteze, ki se razlikujeta v transaminaciji amino skupine lizina na mestu α ali ϵ (Jiang in sod., 2011).

2.3.4 Antaskomicin

Fehr in sodelavci so leta 1995 objavili rezultate obširne raziskave, kjer so pregledali več kot 12000 različnih sevov iz reda aktinomicet. Iskali so metabolite, ki bi kazali afiniteto vezave na FKBP12. V ekstraktu gojišča nove vrste iz rodu *Micromonospora* n.sp. DSM 8429, so odkrili novo skupino makrolidov, ki so jih poimenovali antaskomicini. Skupino sestavlja pet identificiranih spojin (antaskomicin A, B, C, D in E), ki imajo enak osnovni makrocikličen obroč in se razlikujejo v stranskih skupinah. Pri antaskomicinih niso odkrili imunosupresivnega delovanja, zaradi vezave na FKBP12 pa delujejo antagonistično na strukturno sorodni spojini FK506 in FK520 (Fehr in sod., 1996).

2.3.5 Mehanizem delovanja

Mnogi sekundarni metaboliti so se tekom evolucije v naravi razvili in ohranili kot rezultat koristnega delovanja za organizem, ki jih proizvaja. Mehanizmi delovanja sekundarnih metabolitov pa pogosto vključuje interakcijo s številnimi tarčnimi proteini. Zaradi specifičnosti iterakcije so sekundarni metaboliti pogosto odlični kandidati za raznovrstne farmakološke aktivnosti. Vezava sekundarnih metabolitov na človeške proteine lahko izhaja kot posledica strukturne ali funkcionalne podobnosti človeških proteinov s proteini npr. enoceličnih evkariontov, ki so v okolju mikroorganizma naravna tarča teh spojin (Breinbauer in sod., 2002).

FK506 (takrolimus) in njegovi strukturno in biogenetsko podobni analogi FK520, meridamicin, antaskomicin in rapamicin si delijo skupno lastnost, sposobnost vezave na proteinsko tarčo imunofilin FKBP12 (angl. FK506-binding protein) imenovan tudi FKBPA1. Predvideva se, da je za biološko aktivnost omenjenih spojin ključnega pomena strukturni motiv, ki se veže na FKBP12, imenovan »FKBP12-vezavni motiv«. Homologi FKBP12 so med evkarionti strukturno in funkcionalno ohranjeni proteini, kjer sodelujejo kot elementi poti signalne transdukcije (Arndt in sod., 1999), kar lahko razloži širok spekter delovanja FKBP12 vezavnih spojin od kvasovke do človeka.

2.3.5.1 FK506

FK506 (takrolimus) so prvič odkrili leta 1984 raziskovalci japonskega farmacevtskega podjetja Fujisawa Pharmaceuticals, ki so testirati številne streptomicetne vrste z namenom

odkritja spojine z inhibitornim delovanjem na limfocite (Kino in sod., 1987a). Spojina je bila odkrita kot sekundarni metabolit mikroorganizma, ki so ga kasneje poimenovali *Streptomyces tsukubaensis*. Ime izhaja iz regije Tsukuba na Japonskem, od koder je bil izoliran bakterijski sev (Wallemacq in Reding, 1993).

Spojina FK506 kaže močno imunosupresivno aktivnost in je bila s strani FDA odobrena in registrirana leta 1994 kot imunosupresiv, ki preprečuje zavrnitev organov po transplantaciji. Zdravilo je registrirano že v več kot 70 državah in je v letu 2011 preseglo prodajo v skupni vrednosti 1886 milijonov ameriških dolarjev, kar predstavlja 27,6 % celotne letne prodaje vseh imunosupresivnih zdravil na trgu (Martinez-Castro in sod., 2013). FK506 se poleg terapije po transplantaciji uporablja tudi v obliki mazila za zdravljenje kožnih vnetnih obolenj (Assmann in sod., 2000; Meingassner in Stutz, 1992). V zadnjih letih pa zaradi obetavnega terapevtskega potenciala postaja FK506 in nekateri njegovi derivati zanimivi tudi na področju nevroprotektivnega in nevroregenerativnega delovanja (Sierra-Paredes in Sierra-Marcuno, 2008).

FK506 kot imunosupresiv prepreči T celični imunski odziv organizma tako, da se v citoplazmi limfocitov T veže na imunofilin, FK506-vezavni protein 12 (FKBP12) s peptidil-prolil izomerazo aktivnostjo. Nastali kompleks FKBP12-FK506 se veže na kalcij/kalmodulin odvisno kalcinevrin fosfatazo (CaN) in prepreči njeno aktivacijo (Slika 12). Neaktivna oblika CaN ni sposobna defosforilacije jedrnega faktorja NF-AT (jedrni faktor aktiviranih T celic), ki zato ostaja v neaktivni obliki in ne spodbudi transkripcije zgodnjih genov za sintezo interlevkina 2 (IL-2) in posledično ne pride do aktivacije limfocitov T (Liu in sod., 1991). FK506 pa T-celični odziv dodatno blokira tudi z inhibicijo aktivacije JNK (c-Jun NH₂-terminalne kinaze) (Weston in Davis, 2007) in p38 signalne poti (Zarubin in Han, 2005), ki se sprožita ob prepoznavanju antigena (Allison, 2000).



Slika 12: Shematski model mehanizma delovanja FK506, ciklosporina in rapamicina (Kang in sod., 2008) Figure 12: A schematics for mode of action in FK506, rapamycin and cyclosporin (Kang et al., 2008)

FK506 je kar 100-krat močnejši (Kino in sod., 1987a) od drugega poznanega in v medicini uporabljenega inhibitorja imunskega sistema ciklosporina A. Ciklosporin A spada med ciklične neribosomske peptide. Kljub strukturni nesorodnosti deluje podobno kot FK506, saj aktivacijo limfocitov T prav tako prepreči z inhibicijo kalcinevrina.

2.4 GRADBENE ENOTE ZA SINTEZO FK506 IN SORODNIH SPOJIN



Slika 13: Shema CoA in ACP vezanih gradbenih enot za biosintezo poliketidov (Chan in sod., 2009)

Figure 13: Schematic of CoA, holo-ACP, and the associated extender units for polyketide biosynthesis (Chan et al., 2009)

2.4.1 Malonil-CoA

Nastanek malonil-CoA je prva stopnja biosinteze maščobnih kislin pri mnogih organizmih, zato je prisoten kot pogost primarni metabolit. Glede na evolucijsko sorodnost biosnteze maščobnih kislin in biosinteze poliketidov ni presentljivo, da je malonil-CoA pogosta podaljševalna enota v vseh tipih PKSs. Splošno sta poznani dve metabolni poti sinteze malonil-CoA. Bolj pogosta metabolna pot vključuje karboksilacijo acetil-CoA in nastanek malonil-CoA s pomočjo acetil-CoA karboksilaz (ACC). Druga poznana pot vključuje pretvorbo malonata v malonil-CoA s pomočjo encima malonil-CoA sintaza (Tong, 2005).

Encimi ACCs v seriji reakcij katalizirajo karboksilacijo acetil-CoA. Reakcije so odvisne od prisotnosti biotina in ATP. Encimi ACCs imajo tri aktivne domene: biotin karboksilaze (BC), biotin karboksil prenašalni protein (BCCP) in karboksiltransferazo (CT) (Choi-Rhee in Cronan, 2003; Cronan in Waldrop, 2002). BC katalizira ATP odvisno aktivacijo bikarbonata in posledično karboksilacijo N1 atoma prostetične skupine biotina. Po nastanku karboksil-BCCP intermediata, CT aktivira metilno skupino acetil-CoA za nukleofilni napad aktivirane karboksilne skupine vezane na BCCP, kar ima za posledico prenos karboksilne skupine na acetil-CoA in nastanek malonil-CoA.

ACC encimski kompleks je pomemben tudi v primarnem metabolizmu (Gago in sod., 2006; Hunaiti in Kolattukudy, 1982), kar je bilo pokazano pri *S. coelicolor*, kjer je bila prekinitev gena za protein AccA2 (z aktivnostjo BC in BCCP) letalna, medtem ko so bile mutante *S. coelicolor*, s prekinjenim *accB* genom (CT aktivnost) sposobne rasti le na gojiščih z dodanimi dolgoverižnimi maščobnimi kislinami (Rodriguez in sod., 2001). Kljub temu pa zaradi prekinitve *accB* gena takšni mutanti še vedno niso bili sposobni biosinteze nekaterih sekundarnih metabolitov, kot sta aktinorodin in prodigin. Pri sintezi teh naravnih produktov PKS encimi potrebujejo podaljševalno enoto malonil-CoA. Dodajanje dolgoverižnih maščobnih kislin omogoča biosintezo vseh ključnih maščobnih kislin potrebnih za rast, ne povrne pa nastajanja malonil-CoA in posledično sinteze poliketidnih produktov. Prekomerno izražanje genov *accA2*, *accB* in *accE* pri *S. coelicolor* pa je po drugi strani zaznavno povečalo biosintezo aktinorodina, kar direktno kaže, na pomembnost encima ACC pri sintezi poliketidov, primarna vloga pa je sinteza malonil-CoA, ki se porablja za sintezo maščobnih kislin.

Drug znan mehanizem za sintezo malonil-CoA je direktna kondenzacija malonata in CoA s pomočjo encima malonil-CoA sintetaza. Ta metabolna pot se nahaja le pri nekaterih bakterijah in ne predstavlja dominantne poti pri nastajanju malonil-CoA za potrebe biosinteze maščobnih kislin in poliketidov. Delovanje encima je namreč omejeno na prisotnost prostega malonata, ki lahko nastaja pri razgrajevanju pirimidinov. Je pa takšna metabolna pot verjetno biološko pomembna za nekatere bakterije, ki živijo v neposredni povezavi z rastlinami. Znano je da leguminozne rastline v povezavi bakterijskimi fiksatorji dušika, proizvajajo malonat, ki lahko bakterijam služi kot vir ogljika. Skladno s tem so pri bakterijah *Rhizobium trifolii* odkrili gensko skupino, ki vsebuje zapis za dikarboksilatni transporter, malonil-CoA sintetazo in malonil-CoA dekarbosilazo. Ti encimi bi naj omogočali transport malonata v celico, pretvorbo v malonil-CoA in dekarboksilacijo malonil-CoA in CO₂.

Zaenkrat ni znano, ali malonil-CoA sintetaza pomembno prispeva k znotrajceličnim zalogam malonil-CoA, ki se uporablja za biosintezo poliketidov. Je pa malonil-CoA sintetaza s stališča metabolnega inžineringa zanimiv encim (Park in sod., 2011), saj kot poroča Khosla in sod. ta encim v *Rhizobium trifolii* istočasno prepoznava tudi metilmalonat in ga pretvarja v metilmalonil-CoA, prav tako pogost gradnik poliketidov (Lombo in sod., 2001).

Malonil-CoA je splošen gradnik in ga uporabljajo vse PKSs (Cerdeno in sod., 2001; Malpartida in Hopwood, 1986; Ryu in sod., 2006). V vseh primerih gre za vgrajevanje malonil-CoA v nastajajočo verigo z dekarboksilacijsko Claisenovo kondenzacijo karboksilne skupine tioestra in enolatnega iona, ki nastane pri dekarboksilaciji malonil-CoA. To omogoči dodajanje 2-C enote na nastajajočo poliketidno verigo. Vgradnjo malonil-CoA je mogoče spremlajti s pomočjo ¹³C ali ¹⁴C izotopsko označenega acetata, ki ga med rastjo organizma dodamo v gojišče. Tako so bila pri biosintezi rapamicina dokazana mesta vgradnje malonil-CoA v poliketidno verigo. [$^{13}C_2$] izotopsko označen acetat se je vgradil na mesta C8-C9, C12-C13, C14-C15, C18-C19, C20-C21, C26-C27 in C32-C33. Ti podatki so se skladali z analizo genske skupine za biosintezo rapamicina, kjer so znotraj PKS identificirali 14 AT domen (Paiva in sod., 1991). Izmed teh jih je sedem vsebovalo motiv specifični za prepoznavo malonil-CoA. Zaporedje AT domen je sovpadalo s pozicijo acetatnih skupin v poliketidni verigi rapamicina (Schwecke in sod., 1995).

2.4.2 Metilmalonil-CoA

(2S)-metilmalonil-CoA je druga najpogostejša podaljševalna enota biosinteze molekul poliketidnega izvora. To ni presentljivo, saj ta metabolit sodeluje v primarnem metabolizmu kot podaljševalna enota biosinteze maščobnih kislin (Gokhale in sod., 2007) in kot intermediat pri razgradnji maščobnih kislin z lihim številom C atomov. Pri biosintezi poliketidov se metilmalonil-CoA vključuje v biosintezo poliketidov, ki jo katalizirajo večinoma bakterijske iterativne in modularni tipa I PKS sistemi (Schroder in sod., 1998). Vgradnja (2S)-metilmalonil-CoA podaljša poliketidno verigo za dva ogljikova atoma, od katerih ima eden pripeto še metilno skupino (Chan in sod., 2009).

(2S)-metilmalonil-CoA nastaja kot produkt v številnih metabolnih poteh, glavne poti so: a) karboksilacija propionil-CoA, b) preureditev in epimerizacija sukcinil-CoA, c) katabolizem valina, d) večstopenjska pretvorba acetoacetil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA preko krotonil-CoA odvisne metabolne poti (glej poglavje 2.2.1.2) (Slika 3). Nekatere teh metabolnih poti vključujejo intermediate iz katabolizma β -oksidacije maščobnih kislin (Gokhale in sod., 2007). Katera metabolna pot bo prevladovala, je odvisno od metabolnih zmožnosti organizma in od rastnih pogojev v katerih ga gojimo, predvsem od glavnega vira ogljika. Zaradi teh variacij, je pri biosintezi nekaterih poliketidov težavno določiti glavno metabolno pot nastanka (2S)-metilmalonil-CoA (Chan in sod., 2009).

Propionil-CoA ja pogost prekurzor pri nastanku (2S)-metilmalonil-CoA. Nastaja kot produkt β -oksidacije maščobnih kislin z lihim številom C-atomov, razvejanih maščobnih kislin, pri katabolizmu izolevcina, metionina in valina ter pri razgradnji holesterola (Van der Geize in sod., 2007). Propionil-CoA pa lahko nastane tudi kot posledica direktnega prevzemanja propionata iz okolja, ki ji sledi thioesterifikacija propionata s CoA s pomočjo encima acil-CoA ligaze (Horswill in Escalante-Semerena, 1999). Propionil-CoA se lahko pretvori v (2S)-metilmalonil-CoA po dosedaj dveh znanih metabolnih poteh. Glavna metabolna pot je po mehanizmu podobna ACC poti pri nastanku malonil-CoA. Propionil-CoA karboksilaza (PCC) je od ATP in biotin odvisen encimski kompleks, ki katalizira aktivacijo karbonata in dekarboksilacijsko kondenzacijo med aktivirano karbonilno skupino in C-2 metilno skupino propionil-CoA. Pri ACC in PCC gre za podoben mehanizem, kar dokazuje ugotovitev, da je pri bakteriji *S. coelicolor* v encimskem

kompleksu ACC in PCC sodeluje ista proteinska α -podenota. β -podenota pa se pri PCC in ACC razlikuje in določa specifičnost do acil-CoA substratov, ki jih lahko karboksilira (Diacovich in sod., 2002). Drugi znan mehanizem pretvorbe propionil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA vključuje metilmalonil-CoA transkarboksilazo (Northrop, 1969). Ta encim katalizira karboksilacijo propionil-CoA, kjer sodeluje oksalacetat kot donor karboksilne skupine, pri reakciji nastane piruvat in (2S)-metilmalonil-CoA.

Drugi znani prekurzor za nastanek (2S)-metilmalonil-CoA podaljševalne enote je sukcinil-CoA, ki izvira iz primarnega metabolizma, predvsem ciklusa citronske kisline (TCA). Pretvorba sukcinil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA poteka v dveh stopnjah. Najprej metilmalonil-CoA mutaza, v od B_{12} odvisni reakciji, pretvori sukcinil-CoA v (2R)-metilmalonil-CoA. Takšna spojina ima napačno sterično konformacijo za vgradnjo v poliketid, zato metilmalonil-CoA epimeraza preoblikuje (2R)-metilmalonil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA (Chan in sod., 2009; Haydock in sod., 2004).

Tretja znana pot za nastanek (2S)-metilmalonil-CoA je katabolizem L-valina. Prvotno predlagan mehanizem predvideva razgradnjo L-valina do izobutiril-CoA, ki se nato v seriji reakcij preko intermediata (2S)- β -hidroksi-izobutiril-CoA pretvori v propionil-CoA. Propionil-CoA pa nato PCC karboksilira do (2S)-metilmalonil-CoA (Donadio in sod., 1996; Reeves in sod., 2006). Vendar so kasnejši eksperimentalni podatki, pridobljeni z dodajanjem ¹³C izotopsko označenega izobutirata, pokazali, da biosinteza nekaterih poliketidov kot so monesin A in B, lasalcoid A ter tilosin, ne poteka po tej poti (Friedman in sod., 1964). Zato je predlagana alternativna pot B, ki predvideva, da se izobutiril-CoA, ki nastane iz L-valina, pretvori v (2S)-metilmalonil-CoA preko intermediata (2S)-metilmalonil-CoA semialdehid (Vrijbloed in sod., 1999).

2.4.3 Etilmalonil-CoA

Številni poliketidi, ki jih sintetizirajo PKS tipa I, vsebujejo gradbeno enoto (2S)etilmalonil-CoA, med njimi so monenzin A (Day in sod., 1973), elaiofilin, konkanamicin A, indanomicin, spiramicin (Inoue in sod., 1983), tilosin (Omura in sod., 1977) in FK520. Znani pa so tudi primeri PKS tipa III, ki vgrajujejo to gradbeno enoto, takšen primer je sinteza poliketidov iz skupine germicidinov iz bakterije *S. coelicolor* (Song in sod., 2006).

Dalj časa je veljalo, da je butiril-CoA edini direkten prekurzor za sintezo (2S)-etilmalonil-CoA. Nedavno pa so študije potrdile obstoj alternativne metabolne poti, kjer ima encim krotonil CoA reduktaza (CCR) ključno vlogo pri nastanku etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2009a). V tej metabolni poti etilmalonil-CoA nastaja v seriji reakcij iz acetil-CoA.

V metabolni poti, kjer je butiril-CoA direkten prekurzor za sintezo (2S)-etilmalonil-CoA, lahko butiril-CoA izvira iz katabolizma L-valina ali pa β -oksidacije maščobnih kislin. Pri

razgradnje L-valina v seriji reakcij nastane intermediat izobutiril-CoA, ki je skupen biosintezi metilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA. Izobutiril-CoA se nato s pomočjo koencima B₁₂-odvisne izobutiril-CoA mutaze (ICM) pretvori v butiril-CoA (Vrijbloed in sod., 1999). Ta intermediat deluje karboksilaza in nastane etilmalonil-CoA, vendar identiteta karboksilaze ni povsem poznana. Glede na rezultate raziskave Kelly in sod. se predvideva, da bi reakcijo lahko katalizirala posebna vrsta propionil-CoA karboksilaze (PCC) (Roege in Kelly, 2009). V genski gruči za biosintezo poliketida indanomicina so identificirali gen, ki kodira homolog v streptomicetah najdene β -podenote ACC in PCC. β podenota te skupine encimov, kjer se nahaja CT domena, nadzoruje specifičnost za substrat. Zato so predvidevali, da bi lahko najden homolog znotraj genske gruče za biosintezo indanomicina, morda prepoznaval butiril-CoA kot substrat in ga karboksilira v etilmalonil-CoA, gradbeno enoto za biosintezo tega poliketida (Li in sod., 2009). Do podobnih spoznanj so prišli Arabolaza in sod., ki so proučevali skupino acil-CoA karboksilaz pri S. coelicolor. Ugotovili so, da β-podenota PCC encima lahko karboksilira propionil-CoA in z nekoliko manjšo afiniteto karboksilira tudi butiril-CoA (Arabolaza in sod., 2010). Uspelo jim je tudi vnest spremembo v aminokislinsko zaporedje aktivnega mesta β -podenote PCC encima in s tem spremeniti specifičnost encima do substratov, kot so acetil-, propionil- in butiril-CoA.

Druga metabolna pot za nastanek te gradbene enote je pot etilmalonil-CoA, kjer je encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (CCR) ključnega pomena. Ta metabolna pot nekaterim bakterijam služi kot alternativa glioksilatni metabolni poti in prav tako omogoča rast na acetatu kot edinem viru ogljika. Pot etilmalonil-CoA so prvič predlagali pri bakterije *Rhodobacter sphaeroides* (Alber in sod., 2006) in je bila kasneje identificirana tudi pri nekaterih streptomicetah. Pri streptomicetah so ob genih, ki kodirajo biosintezno poti etilmalonil-CoA lahko dodatno prisotni tudi homologi *ccr* gena, ki se pogosto nahajajo znotraj genskih skupinah za biosintezo poliketidov. Glavna vloga teh genov ni v primarnem metabolizmu, ampak sodelujejo pri biosintezi različnih gradbenih enot s 5 ali več ogljikovimi atomi. Poznani so homologi CCR, ki sintetizirajo nekatere za PKS nenavadne gradbene enote kot so heksilmalonil-CoA pri sintezi cinabaramida A, kloroetilmalonil-CoA pri sintezi tugacina A, alilmalonil-CoA pri sintezi FK506 in drugih (Gandecha in sod., 1997; Haydock in sod., 2005; Karray in sod., 2007). Encim CCR pa ne sodeluje samo v pretvorbi krotonil-CoA v (2S)-etilmalonil-CoA, ampak lahko v odsotnosti CO₂ katalizira karboksilacijo in pretvori krotonil-CoA v butiril-CoA.

Homologi CCR so bili identificirani že v mnogih genskih skupinah za biosintezo poliketidov, kot so tilozin, elaiofilin, spiramicin konkanamicin A in FK520. Pri proučevanju biosinteze FK520 organizma *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* identificirali tudi homologe polihidroksibutirat depolimeraze, 3-hidroksiacil-CoA dehidrataze in CCR (Wu in sod., 2000). To nakazuje, da je pomemben vir za nastanek (2S)-etilmalonil-CoA v tej bakteriji tudi polihidroksibutirat (PHB), ki lahko depolimerizira

v 3-hidroksibutiril in se nato pretvori v krotonil-CoA. PHB je polimer, ki ga nekatere streptomicete uporabljajo za skladiščenje energije oz. ogljika in ga lahko uporabljajo v času sekundarnega metabolizma (Ranade in Vining, 1993).



Slika 14: Metabolne poti, ki sodelujejo pri nastanku (2S)-metilmalonil-CoA in (2S)-etilmalonil-CoA (Chan in sod., 2009)

Figure 14: Metabolic pathways leading to the formation of (2S)-methylmalonyl-CoA and (2S)- ethylmalonyl-CoA (Chan et al., 2009)

2.4.4 Alilmalonil-CoA

Alilmalonil-CoA je zelo nenavadna gradbena enota poliketidov, ki je bila do sedaj identificirana le pri biosintezi molekule FK506 na mestu C-21 (Motamedi in Shafiee, 1998). Izvor in biosinteza te gradbene enote dolgo nista bila poznana. Predvidevali so, da bi se na to mesto lahko vgradila podaljševalna enota z petimi ogljikovimi atomi propilmalonil-CoA. Takšna gradbena enota bi lahko nastala kot intermediat β -oksidacije maščobnih kislin z lihim številom C-atomov (Motamedi in Shafiee, 1998; Chan in sod., 2009). Nedavno pa sta dve neodvisni študiji, Goranovič in sod. (2010) (izvedena v okviru naše raziskovalne skupine) in Mo in sod. (2011), pojasnili mehanizem nastanka in vlogo encimov, ki sodelujejo pri nastanku alilmalonil-CoA. Identificirali smo skupino devetih genov *»all«*, ki se nahajajo na levem koncu genske gruče za biosintezo FK506.

Za nastanek alilmalonil-CoA, je najverjetneje odgovorna majhna neodvisna diketid sintaza zapisana na dveh genih (allA in allK). Bioinformacijska analiza je pokazala, da gen allA nosi zapis za protein z AT in ACP domeno in da se v proteinu zapisanem na allK genu nahaja KS domena. Predvideva se da ta majhna PKS katalizira Claisenovo kondenzacijo med propionil-CoA in malonil-CoA kar vodi v nastanek 3-oksopentanoil-ACP, enote s petimi ogljikovimi atomi. Sledi redukcija 3-β-keto skupine in nastanek 2-pentenoil-ACP vendar za to reakcijo še ni identificiranega encima. Predvideva se, da bi to stopnjo reakcije lahko potekal na sintazam maščobnih kislin (FAS) podobnem encimu, ki pa ni zapisan znotraj genske gruče za biosintezo FK506. Na nastali 2-pentenoil-ACP nato deluje encim AllR, homolog krotonil-CoA reduktaze/karboskilaze, ki katalizira pretvorbo 2-pentenoil-ACP do propilmalonil-ACP ali do propilmalonil-CoA. Naslednjo stopnjo pretvorbe katalizira acil-CoA dehidrogenaza, zapisana na genu *allD*. Encim ustvari dvojno vez na 4. C atomu, pri tem nastane alilmalonil-ACP ali alilmalonil-CoA. Nosilec alilmalonilne skupine, na tej stopnji ni povsem znan saj v genski gruči za biosintezo FK506 še ni bil identificiran gen, ki bi nosil zapis za ACP:CoA transacilazo. To je encim, ki s transesterifikacijo prenese 5-C intermediat z ACP na CoA.



Slika 15: Predlagan mehanizem sinteze gradbene enote alilmalonil-CoA (Goranovič in sod., 2010) Figure 15: Proposed mechanism of allylmalonyl-CoA biosynthesis (Goranovič et al., 2010)

Prekinitve genov *allA*, *allK*, *allR* in *allD* (oz. homologov *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* in *tcsD*) v *all* skupini, vpletenih v biosintezo alilmalonil-CoA, so potrdile njihovo vlogo. V sevih z inaktiviranimi geni je prišlo do prekinitve produkcija FK506, le-ta pa se je povrnila, ko so v gojišče dodali alilmalonil-SNAC, sintetični analog podaljševalne enote alilmalonil-CoA. Rezultati inaktivacije *all* genov so tudi pokazali, da je s prekinitvijo sinteze podaljševalne enote alilmalonil-CoA ustavljena le produkcija FK506. *S. tsukubaensis* je še vedno nespremenjeno proizvajal FK520, ki ga organizem v manjšem deležu proizvaja skupaj s FK506 kot nečistočo. To je dodaten dokaz, da se v mestu C-21 na molekuli, vgrajujeta dve različni gradbeni enoti, alilmalonil-CoA pri FK506 in etilmalonil-CoA pri FK520, ki izvira iz različnih metabolnih poti, pri čemer encim AllR sodeluje pri obeh poteh.

2.4.5 Metoksimalonil-ACP

Podaljševalna enota, vezana na proteinski prenašalec acilne skupine (acyl carrier protein - ACP), je bila prvič predlagana kot del biosinteze FK520 v organizmu *Streptomyces hygroscopicus* (Wu in sod., 2000). (2*R*)-metoksimalonil-ACP je bil kasneje prepoznan tudi kot podaljševalna enota pri bisintezi poliketidov, kot so bafilomicin A1, konkanamicin A, oksazolomicin, midekamicin, ansamitocin P-3, tautomicin in nekaterih drugih (Kakavas in sod., 1997; Ligon in sod., 2002; Zhao in sod., 2006). Pri teh poliketidih se namreč pojavlja metoksi skupina, ki je vezana na α -ogljikov atom. Pri proučevanju biosinteze FK520, so ugotovili, da se izotopsko označene spojine uporabljene v študiji, kot so acetat, metoksiacetat in metoksimalonat, ne vključujejo v strukturo FK520 (Reeves in sod., 2002). Zato so predvideli, da je prekurzor najverjetneje nek drug intermediat, ki izhaja iz glikolize. Raziskovalci so preverjali tudi možnost, da substrat za nastanek (2*R*)-metoksimalonil-ACP, izhaja iz prekurzorja, ki je s tioestrsko vezjo vezan na CoA. Med

bioprocesom sinteze ansamitocina P-3, so zato dodajali C^{13} označene N-acetilcisteamin (SNAC) tioestre hidroksimalonil in metoksimalonila. Kljub temu da je derivati SNAC-a prehajajo celično membrano in da SNAC skupina dobro posnema v celici naravno prisoten CoA ter ga PKS lahko direktno vključi v poliketidno verigo (Frykman in sod., 2001), vgradnje izotopsko označenih gradbenih enot v sintetiziran poliketid ni bilo mogoče zaznati.

Prekurzor za nastanek (2*R*)-metoksimalonil-ACP so nato uspešno identificirali pri proučevanju biosinteze oksazolomicina. Shen in sodelavci so pridobili biokemijske dokaze, da je protein OzmB, homolog FkbH, veže 1,3-difosfo-D-glicerat (1,3-bPG), intermediat, ki prihaja iz glikolize. Podrobna analiza je pokazala, da se 1,3-bPG lokalno veže na specifično aminokislinsko zaporedje CRVV znotraj proteina OzmB. Pri tem najprej nastane kovalentna tioesterska vez med cisteinskim ostankom vezavnega mesta OzmB in 1,3-bPG (Zhao in sod., 2006). Pri tem nastane 3-fosfogliceril-OzmB, ki je nato defosforiliran, pri čemer nastane gliceril-OzmB. To predstavlja prvo stopnjo pri nastanku (2*R*)-metoksimalonil-ACP (Walton in sod., 2006).

Pomembna prelomnica pri proučevanju mehanizma biosinteze te gradbene enote, je bila analiza sekvenirane skupine genov vpletenih v biosintezo FK520. Reeves in sodelavci, so predlagali, da je skupina petih genov z zapisom za proteine FkbG, FkbH, FkbI, FkbJ in FkbK, vpletenih v biosintezo (2*R*)-metoksimalonil-ACP. Za štiri izmed petih proteinov so uspeli s pomočjo podobnosti z znanimi proteinskimi homologi identificirat njihovo funkcijo. FkbG je homolog *O*-metiltransferaze, FkbI je acil-CoA dehidrogenaza, FkbJ je ACP in FkbK 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza. Eksperimentalno je bilo ugotovljeno, da protein FkbH prvi veže 1,3-bPG. Po defosforilaciji intermediata se sinteza nadaljuje z prenosom in nastankom gliceril-FkbJ. Nato s pomočjo encima FkbK poteče oksidacija gliceril-FkbJ in nastanek aldehidnega intermediata tega nato FkbI nadalje oksidira do (2R)-hidroksimalonil-FkbJ. V zadnjem koraku FkbG katalizira *O*-metilacijo in nastanek gradbene enote (2*R*)-metoksimalonil-FkbJ (Reeves in sod., 2006).



Slika 16: Predlagan mehanizem sinteze gradbene enote metoksimalonil-ACP (Chan in sod., 2009) Figure 16: Proposed mechanism of methoxymalonyl-ACP biosynthesis (Chan et al., 2009)

Skupina genov *fkb*GHIJK za sintezo gradbene enote (2R)-metoksimalonil-ACP, je pri organizmu *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) (Wu in sod., 2000), proizvajalcu FK520 in pri organizmu *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 (Goranovič in sod., 2010), proizvajalcu FK506 in FK520 je že identificirana in delno proučena. Pri biosintezi FK506 in FK520 omogoča ta podaljševalna enota nastanek metoksi skupine v molekuli na mestih C-13 in C-15 (Wu in sod., 2000; Goranovič in sod., 2010).

2.4.6 L-pipekolna kislina

Zadnja gradbena enota ki se vgradi v nastajajočo verigo pri PKS/NRPS hibridni biosintezi spojin, kot so FK506, FK520, rapamicin, meridamicin in antaskomicin, je L-pipekolna kislina. Za oskrbo z L-pipekolno kislino je odgovoren encim, RapL (oz. njegov homolog FkbL pri biosintezi FK506/FK520). Ta encim deluje kot lizin ciklodeaminaza in katalizira direktno pretvorbo aminokisline L-lizin v L-pipekolno kislino.



Slika 17: Predlagan mehanizem delovanja encima lizin ciklodeaminaze (Gatto in sod., 2006) Figure 17: Proposed mechanism of enzyme lysine cyclodeaminase (Gatto et al., 2006)

Ključna vloga proteina RapL, je bila potrjena s študijo biosinteze rapamicina pri organizmu *S. rapamycinicus* NRRL 5491, kjer so prekinili gen za RapL. Takšen sev ni proizvajal rapamicina, produkcija pa se je povrnila, če so v gojišče direktno dodali L-pipekolno kislino in s tem zaobšli neaktivnost encima RapL (Konig in sod., 1997).

Sinteza L-pipekolne kisline je tesno povezana z biosintezo aminokisline L-lizina. Ta aminokislina lahko v seriji encimskih reakcij nastane iz oksaloacetata, intermediata CCK. Oksaloacetat se s transaminacijo pretvori v asparaginsko kislino, ki se pri bakterijah po metabolni poti diaminopimelata (DAP) pretvori v L-lizin (Dairi in sod., 2011).

L-pipekolna kislina se kot zaključna enota, se pri biosintezi rapamicina vgradi v poliketidno verigo s pomočjo NRPS sistema RapP oz. homologa FkbP, pri biosintezi FK506/FK520. Gre za protein z štirimi aktivnimi domenami, kondenzacijsko C1 in C2, adenilacijsko (A) domeno ter peptidil prenašalnim proteinom (PCP). Te domene so ključne tako pri vgradnji derivata L-pipekolne kisline, kot tudi za zaključno ciklizacijo makrolaktonskega obroča in odcepljanje iz PKS/NRPS sistema. Pri organizmu *Streptomyces hygroscopicus* ssp. *ascomyceticus*, je bil dobro proučen mehanizem delovanja tega NRPS sistema. Ugotovljeno je bilo, da L-pipekolat z adenilacijo aktivira A domena, aktiviran substrat pa se lahko nato kovalentno veže na PCP domeno. C1 domena sodeluje pri napadu sekundarnega amina pipekolnega derivata na tioester terminalne ACP domene na FkbA PKS proteina. Pri tem nastane acil-pipekolilni derivat, na katerega deluje C2 domena (Slika 18). Ta domena omogoča nukleofilni napad mesta C-26 na pipekoliltioester in s tem odcepitev nastale verige makrolaktona iz proteina (Gatto in sod., 2005).



Slika 18: Predlagan mehanizem sinteze in vgradnje L-pipekolata vosnovni poliketidni skelet (Gatto in sod., 2005)

Figure 18: Proposed mechanism of synthesis and incorporation of L-pipecolic acid (Gatto et al., 2005)

2.4.7 Dihidrocikloheksenilkarboksilna kislina (DHCHC)

Začetna enota biosinteze FK506, FK520 in rapamicina je 4,5-dihidrocikloheks-1enilkarboksilna kislina (DHCHC). Kot je bilo pred kratkim potrjeno, začetna enota nastane s hidrolizo korizmata, ki jo pri *Streptomyces hygroscopicus* katalizira produkt gena *rapK* oz. pri bosintezi FK506/FK520 njegov homolog *fkbO* (Andexer in sod., 2011). Korizmat je intermediat šikimatne poti, ki povezuje glikolizo in pentoza fosfatno pot z metabolizmom aromatskih aminokislin (Lowden in sod., 2001).

V prvem koraku šikimatne poti encim DAHP (3-deoksi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat) sintaza spoji fosfoenolpiruvat, intermediat glikolize in D-eritrozo-4-fosfat, intermediat pentoza fosfatne poti. Tej reakciji sledi še šest encimskih reakcij, s pomočjo katerih preko šikimata nastane korizmat, ključen intermediat, ki pri biosintezi L-tirozina, L-triptofana in L-fenilalanina.

Ob podrobnem proučevanju nastanka začetne enote DHCHC pri biosintezi rapamicina so identificirali gen rapK. Ugotovili so, da prekinitev tega gena povzroči pri S. hygroscopicus, prekinitev biosinteze rapamicina. Sinteza se je povrnila, ko so prekinjen gen komplementirali z nativno kopijo gena rapK ali z genskim homologom fkbO iz genske gruče za biosintezo FK520 (Gregory in sod., 2004). Eksperimenti dohranjevanja s sintetiziranimi analogi DHCHC začetne enote pa so pri takšnih sevih celo omogočili sintezo novih rapamicinu podobnih spojin oz. »rapalogov« (Gregory in sod., 2005). Vendar te raziskave niso povsem potrdile, ali je RapK direktno vpleten kot encim pri nastanku začetne enote ali pa sodeluje kot ključen regulator te metabolne poti. Funkcija in mehanizem delovanja RapK in njegovih homologov je bila pojasnjena z in vitro meritvami aktivnosti tega encima (Andexer in sod., 2011). Predlagan je bil mehanizem delovanja RapK prepoznanega kot korizmat hidrolaze in sicer se šikimska kislina najprej pretvori v 4,5-dihidroksicikloheksa-1,5-dienekarboksilno kislino (DCDC), temu sledi redukcija ter preureditve α , β -dvojen vezi. Končna produkt reakcije DHCHC se lahko nato od ATP odvisne adenilacijske domene začetnega modula PKS aktivira in prenese na ACP domeno, kjer se prične sinteza poliketida.



Slika 19:Predlagan mehanizem sinteze začetne gradbene enote DHCHC (Ban in sod., 2013; Lowden in sod., 2001)

Figure 19: Proposed mechanism for synthesis of starter unit DHCHC (Ban et al., 2013; Lowden et al., 2001)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Za izvajanje eksperimentov smo uporabljali kemikalije in komponente gojišč različnih proizvajalcev: Difco (ZDA), Biolife (Italija), Fluka (Nemčija), Sigma-Aldrich (Nemčija), Merck (Nemčija) in Oxoid Ltd. (Anglija). Kemikalije so bile kakovostnega razreda »pro analysis« (p.a.) oziroma primerne kakovosti za HPLC meritve (angl. HPLC-grade).

3.1.1 Raztopine in pufri

50× pufer TAE

Zatehtali smo 242,0 g baze Tris, dodali 57,1 mL ledocetne kisline, 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8,0), dopolnili z dH₂O do 1 litra in avtoklavirali (Sambrook in Russell, 2001).

Pufer TE

10 mM Tris-HCl (pH 8,0) in 1 mM EDTA v dH₂O (Sambrook in Russell, 2001).

3.1.2 Standarda za določanje velikosti DNA fragmentov

GeneRulerTM DNA Ladder Mix

Standard zajema fragmente DNA velikosti 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp (Fermentas).

3.1.3 Antibiotiki in indikatorji

Preglednica 1: Antibiotiki in indikatorji, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, z navedenimi koncentracijami založnih raztopin

Table 1: Antibiotics and indicators used during experimental work, with stated concentrations of stock solutions and solvents

Antibiotik ali indikator	Koncentracija za selekcijo	Koncentracija založne raztopine
Ampicilin (Amp)	100 µg/mL	100 mg/mL v dH ₂ O
Kloramfenikol (Cm)	10 μg/mL	10 mg/mL v etanolu
Kanamicin (Kan)	25 μg/mL	25 mg/mL v dH ₂ O
Apramicin (Apr)	50 μg/mL	50 mg/mL v dH ₂ O
Tiostrepton (Ts)	30 μg/mL	30 mg/mL v DMSO
X-gal	20 μg/mL	20 mg/mL v DMSO
IPTG	100 µg/mL	$100 \text{ mg/mL v } dH_2O$

Antibiotike raztopljene v dH₂O smo po pripravi filtrirali skozi 0,2 µm filter. Vse založne raztopine smo hranili pri -20 °C. X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktozidaza) in IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) smo v kombinaciji uporabljali za selekcijo sevov *E. coli* DH10 β , ki so po elektroporaciji sprejeli vektor pUC19. Sevi s plazmidi, ki so imeli gen *lacZ* prekinjen z insertom so se na gojišču obarvali belo (belo-modri test). Založne raztopine smo dodajali v sterilna gojišča z agarjem, ki smo jih predhodno ohladili do 55 °C.

3.1.4 KOMERCIALNI KOMPLETI KEMIKALIJ

S pomočjo navedenih komercialnih kompletov smo v skladu z navodili proizvajalca iz bakterijskih sevov izolirali genomsko in plazmidno DNA ter celotne RNA. S komercialnimi kompleti smo si pomagali tudi pri čiščenju DNA iz agaroznih gelov in reakcijskih mešanic za encime.

3.1.4.1 Komplet za izolacijo genomske DNA

Genomsko DNA smo iz sevov *S. tsukubaensis* izolirali s pomočjo komercialnih kompletov:

- PureLink Genomic DNA Purification (Invitrogen)
- GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich)

3.1.4.2 Komplet za izolacijo plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo iz različnih transformant *E. coli* izolirali s pomočjo komercialnih kompletov:

- GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- EconoSpinTM All-in-One Mini Spin Columns (Epoch Life Science)

3.1.4.3 Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- 3.1.4.4 Komplet za čiščenje DNA iz reakcijskih mešanic
 - GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich)
 - Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

3.1.4.5 Komplet za izolacijo RNA

• RNeasy[®] Kit (Qiagen)

3.1.4.6 Standardi za določanje velikosti DNA in RNA fragmentov

Velikost pomnožkov PCR, izoliranih plazmidov in produktov DNA iz različnih reakcij z restrikcijskimi encimi, smo določili s pomočjo primerjave s standardi DNA znanih

velikosti. Tudi po izolaciji RNA smo kakovost in velikost ocenili s komercialno lestvico različnih velikosti.

• GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas)

Standard zajema fragmente DNA velikosti 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 in 100 bp.

• RiboRulerTM High Range RNA Ladder (Fermentas)

Standard zajema fragmente RNA velikosti 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 in 200 bp.

3.1.5 Encimi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili različne restrikcijske encime, DNA-polimeraze, kinaze, ligaze, reverzno transkriptazo in druge encime.

3.1.5.1 Restrikcijske endonukleaze

Restrikcijske endonukleaze smo uporabili v reakcijskih mešanicah za restrikcijo plazmidne DNA in za restrikcijo PCR pomnožkov. Uporabljali smo različne restrikcijske encime (Preglednica 2) FastDigest (Fermentas) s spriloženimi pufri, po protokolu proizvajalca.

Preglednica 2: Uporabljene restrikcijske endonukleaze

Restrikcijski encim	Proizvajalec	Restrikcijsko mesto
EcoRI	Fermentas (FastDigest)	5'G↓A A T T C3'
		3'C T T A A†G5'
BamHI	Fermentas (FastDigest)	5'G\G A T C C3'
		3'C C T A G†G5'
HindIII	Fermentas (FastDigest)	5'A\A G C T T3'
		3'T T C G A^A5'
NdeI	Fermentas (FastDigest)	5'C A↓T A T G3'
		3'G T A T^A C5'
XbaI	Fermentas (FastDigest)	5'T↓C T A G A3'
		3'A G A T C^T5'
SmaI	Fermentas (FastDigest)	5'C C C↓G G G3'
		3'G G G↑C C C5'
<i>Eco</i> RV	Fermentas (FastDigest)	5'G A T↓A T C3'
		З'С Т А↑Т А G5'

 Table 2: Used restriction endonucleases

3.2 BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI

3.2.1 Sevi Streptomyces tsukubaensis

Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488 (ARS Culture Collection).

S. tsukubaensis $\Delta allR$ (Goranovič in sod., 2010). S. tsukubaensis $\Delta ecmOp$ (Kosec in sod., 2012).

3.2.2 Sevi Escherichia coli

Sev DH10 β z genotipom: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ 80*lac*Z Δ M15 Δ *lac*X74 *recA1 end*A1 *ara*D139 Δ (*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ - *rpsL nup*G (Invitrogen). Sev smo uporabljali za kloniranje transformiranih plazmidov.

Sev ET12567 z genotipom: F- *dam*13::Tn9, *dcm*6, *hsdM*, *hsdR*, *zjj*-202::Tn10, *recF*143::Tn11, *galK*2, *galT*22, *ara*14, *lacY*1, *xyl5*, *leuB*6, *thi*1, *tonA*31, *rpsL*136, *hisG*4, *tsx*78, *mtl*1 *glnV*44 (MacNeil in sod., 1992). Ta sev zaradi prekinitve *dam* in *dcm* metilaze ne metilira DNA. Takšna DNA je zaradi restrikcijsko-metilacijskih sistemov v streptomicetah primernejša za prenos.

Sev ET12567/pUZ8002 dodatno vsebuje konjugativnim plazmidom pUZ8002. Rezistenca proti kloramfenikolu je prisotna v genomu *E. coli* ET12567, rezistenco proti kanamicinu pa nosi plazmid pUZ8002.

3.2.3 Bakterijski vektorji

Preglednica 3: Plazmidi, ki smo jih uporabljali v okviru te študije

Ime vektorja	Velikost	Organizem	Vir	Rezistenca
pUC19		E. coli	Invitrogen	Amp ^r
pVM1	2,7 kb	E. coli	(Magdevska in sod., 2010)	Amp ^r
pSET152	5,5 kb	E. coli –	(Bierman in sod., 1992)	Apr ^r
		S. tsukubaensis		
pSET152ermE*	6,0 kb	E. coli –	Acies Bio	Apr ^r
		S. tsukubaensis		
pSOK804	5,5 kb	E. coli –	(Enriquez in sod., 2006)	Apr ^r
		S. tsukubaensis		
pSOK804b	6,1 kb	E. coli –	Acies Bio	Kn ^r
		S. tsukubaensis		
pKC1139	6,4 kb	E. coli –	(Bierman in sod., 1992)	Apr ^r
		S. tsukubaensis		
pCR2.1-TOPO	3,9 kb	E. coli	Invitrogen	Kn ^r , Amp ^r

Table 3: Plasmids used within the scope of this study

3.3 GOJIŠČA IN ANTIBIOTIKI

3.3.1 Gojišča za E. coli

Komercialno pripravljena gojišča smo pripravili skladno z navodili proizvajalcev in jih avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Sestavljenim gojiščem smo po potrebi pred avtoklaviranjem umerili pH na ustrezno vrednost.

Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani)

Za en liter gojišča smo zatehtali 10,0 g kazein triptona, 5,0 g kvasnega ekstrakta in 5,0 g NaCl ter dopolnili z d H_2O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 7,5 (Sambrook in Russell, 2001).

Agar LB (Luria-Bertani)

Za en liter gojišča smo zatehtali 10,0 g kazein triptona, 5,0 g kvasnega ekstrakta, 5,0 g NaCl in 15 g bakteriološkega agarja ter dopolnili z d H_2O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 7,5 (Sambrook in Russell, 2001).

Tekoče 2TY

Za en liter gojišča smo zatehtali 16,0 g kazein triptona, 10,0 g kvasnega ekstrakta in 5,0 g NaCl ter dopolnili z d H_2O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 7,0 (Sambrook in Russell, 2001).

Agar 2TY

Za en liter gojišča smo zatehtali 16,0 g kazein triptona, 10,0 g kvasnega ekstrakta, 5,0 g NaCl in 15 g bakteriološkega agarja ter dopolnili z d H_2O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 7,0 (Sambrook in Russell, 2001).

3.3.2 Gojišča za S. tsukubaensis

Komercialno pripravljena gojišča smo pripravili skladno z navodili proizvajalcev in jih avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Sestavljenim gojiščem smo po potrebi pred avtoklaviranjem umerili pH na ustrezno vrednost.

TSB

Zatehtali smo 30 g Tryptic Soy Broth (TSB) proizvajalca Oxoid (Anglija) in z d H_2O dopolnili do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost

NMMB (minimalno gojišče)

Za preizkus rasti na gojišču z acetatom kot edinim virom ogljika smo uporabili minimalno gojišče NMMB (Kieser in sod., 2000). Za en liter gojišča smo zatehtali 1,0 g amonijevega sulfata, 0,5 g dikalijevega fosfata, 0,2 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,01 g FeSO₄ x 7 H₂O, 6,25 mL 1 M raztopine NaH₂PO₄, 8,75 mL 1 M raztopine K2HPO4, 2,0 g natrijevega acetata in 20 g bakteriološkega agarja ter dopolnili z dH₂O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 6,8.

Sporulacijsko gojišče ISP4

ISP4 (Atlas in Kelly, 2004) gojišče smo uporabljali kot osnovno gojišče za rast in sporulacijo *Streptomyces tsukubaensis*.

Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča ISP4

Table 4:	Composition of ISP4 medium	

Raztopina	Sestavina	Količina (g)
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
Mineralna raztopina*	MnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
	dH ₂ O	do 100 mL
Paztonina I	topni škrob	10
Kaztopina I	dH ₂ O	do 950 mL
Raztopina II	K ₂ HPO ₄	10
	MnSO ₄ x 7H ₂ O	10
	NaCl	10
	$(NH_4)_2SO_4$	20
	CaCO ₃	20
	mineralna raztopina*	10 ml
	dH ₂ O	do 100 mL
	Bakteriološki agar	20

*pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121 °C in tlaku 120 kPa

Konjugacijsko gojišče MMAM

MMAM gojišče (Kieser in sod., 2000) smo uporabili za konjugacijo, pri čemer smo na trdno gojišče MMAM hkrati nacepili pripravljene spore *Streptomyces tsukubaensis* in kulturo celic transformiranega seva *E. coli*.

Za en liter gojišča smo zatehtali 10,0 g koruznega škroba, 5,0 g koruzne namakalne vodice, 3,0 g kvasnega ekstrakta, 3,0 g $CaCO_3$, 0,3 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$ in 20,0 g bakteriološkega agarja ter dopolnili z dH₂O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 5,8.

Kompleksno vegetativno gojišče VG3

VG3 vegetativno gojišče smo uporabili za pripravo inokuluma *Streptomyces tsukubaensis*, pri postopku preverjanja produkcije FK506 in FK520 (Goranovič in sod., 2010).

Za en liter gojišča VG3 smo zatehtali 2,5 g sojine moke, 10,0 g koruznega dekstrina, 1,0 g glukoze, 5,0 g kvasnega ekstrakta, 7,0 g kazein hidrolizata, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl in dodali 1 mL mineralne raztopine (sestava opisana v preglednici 5) ter dopolnili z dH_2O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH po potrebi umerili na vrednost 7,0.

Preglednica 5: Sestava mineralne založne raztopine za VG3

	1	1
Sestavina	Količina	Proizvajalec
MnCl x 4H ₂ O	0,5 g	Merck (Nemčija)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,5 g	Sigma-Aldrich (Nemčija)
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g	Merck (Nemčija)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g	Sigma-Aldrich (Nemčija)
CaCl ₂	2,0 g	Sigma-Aldrich (Nemčija)
dH ₂ O	do 100 mL	

Table 5: Composition of minerals stock solution for VG3 medium

Kompleksno produkcijsko gojišče PG3

PG3 produkcijsko gojišče smo uporabili pri postopku preverjanja produkcije FK506 in FK520 pri *Streptomyces tsukubaensis* (Goranovič in sod., 2010).

Za en liter gojišča PG3 smo zatehtali 10,0 g sojine moke, 90,0 g koruznega dekstrina, 5,0 g glukoze, 10,0 g sojinega peptona, 10,0 g glicerola, 1,0 g K₂HPO₄, 2,5 g L-lizina, 1,5 g CaCO₃ in polietilen glikola (PEG 1000) ter dopolnili z dH₂O do 1 L. Pred avtoklaviranjem smo pH gojišča po potrebi umerili na vrednost 6,5 in ga alikvotirali po 5 mL v 50 mL centrifugirke (TPP, Švica) oz. po 50 mL v 250 mL erlenmajerjeve steklenice.

3.4 MIKROBIOLOŠKE METODE

3.4.1 Priprava suspenzije spor S. tsukubaensis

Seve *S. tsukubaensis* smo na gojišču ISP4 nacepili do posameznih kolonij. Plošče smo gojili 7 – 10 dni pri temperaturi 28 °C do nastanka spor. Plošče smo prelili z 3 – 5 mL sterilno raztopino 20 % glicerola in z mikrobiološko zanko nežno pobrali spore s površine kulture. Suspenzijo spor smo razdelili na alikvote in ustrezno shranili (Nybo in sod., 2010).

3.4.2 Shranjevanje sevov E. coli in S. tsukubaensis

Vse bakterijske seve smo shranjevali v sterilni raztopini 20 % (v/v) glicerola pri temperaturi -80 °C. Izjemoma smo do največ štiri tedne *S. tsukubaensis* seve shranjevali pri temperaturi -20 °C.

3.4.3 Priprava kompetentnih celic in transformacija

3.4.3.1 Priprava elektrokompetentnih celic E. coli

Izhodno kulturo E. coli (sevi DH10β, ET12567 in ET12567/pUZ8002) shranjeno pri temperaturi -80 °C, smo nacepili do posameznih kolonij na trdno gojišče 2TY (z glede na sev ustrezno dodanim antibiotikom) in inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C v statičnem inkubatorju. Naslednji dan smo s posameznimi kolonijami inokulirali 5 mL gojišča 2TY in inkubirali na rotacijskem stresalniku preko noči pri temperaturi 37 °C in 220 rpm. Naslednji dan smo z enim mililitrom bakterijske kulture inokulirali 100 mL 2TY gojišča pripravljenega v Erlenmajerjevih steklenicah in inkubirali na stresalniku 2-3 h pri temperaturi 37 °C in 220 rpm. Celice smo poželi pri vrednosti OD₆₀₀ med 0,7 in 0,9 ter 20 min inkubirali na ledu. Od tu naprej smo vse postopke s celicami izvajali na ledu oz. v centrifugi ohlajeni na 4 °C. Po inkubaciji na ledu smo celice 10 min centrifugirali pri 4000 rpm (Hettich, Nemčija). Celice smo trikrat sprali v 30 mL ledeno hladne raztopine 1 mM HEPES-a (pH 7,0) in vsakič ponovili postopek centrifugiranja. Po tretjem spiranju smo celice resuspendirali v 30 mL ledeno hladne raztopine 10 % (v/v) glicerola in 1 mM HEPES-a. Ponovno smo centrifugirali pri 4000 rpm in celice resuspendirali v 1 mL raztopine 10 % (v/v) glicerola in 1 mM HEPES-a. Suspenzijo celic smo nato razdelili v alikvote po 40 µL in shranili pri temperaturi -80 °C.

3.4.3.2 Elektroporacija sevov E. coli

Plazmidno DNA smo v celice *E. coli* (sevi DH10β, ET12567 in ET12567/pUZ8002) vnašali s pomočjo elektroporacije, pri čemer smo uporabljali aparat Gene Pulser II in Pulse Controller Plus (BioRad). Elektrokompetentne celice *E. coli* smo odtajali na ledu, jim dodali $1 - 5 \mu L$ (100 – 500 ng) vektorja ali ligacijske mešanice, previdno premešali in prenesli v ohlajeno sterilno elektroporacijsko kiveto (Gene Pulser/*E. coil* Pulser Cuvette, 0,2 cm electrode gap, BioRad). Celice smo elektroporirali pri napetosti 2,5 kV, električni kapaciteti 25 μ F in upornosti 200 Ω. Po transformaciji smo dodali 960 μ L gojišča 2TY in celice regenerirali 45 min pri temperaturi 37 °C. Celice smo po inkubaciji centrifugirali 2 min pri 6.000 rpm (Eppendorf, Nemčija) in pelet nacepili na trdno gojišče 2TY z dodanim antibiotikom za selekcijo vnesenih plazmidov.

3.4.4 Konjugacija spor bakterije S. tsukubaensis

Vektorje pripravljen na osnovi pSet152, pSOK804 ali pKC1139 smo v bakterijske seve *S. tsukubaensis* vnesli s konjugativnim prenosom iz bakterij *E. coli* ET12357 pUZ8002 (Flett in sod., 1997). Med postopkom konjugacije pride do prenosa plazmidne DNA med bakterijama, ki sta vspostaviljo neposreden stik, pogosto preko pilov, celičnih struktur na površini donorske celice. Pri konjugaciji plazmidov iz *E. coli* v streptomicete seve, pa lahko prepreko predstavlja tudi metilacije heterologne DNA, ki jo lahko metilacijsko-specifični restrikcijski mehanizmi prepoznajo kot tujo. Temu se izognemo z uporabo seva E. coli ET12357, ki ima onesposobljene mehanizme metilacije DNA.

Bakterije *E. coli* ET12357 pUZ8002, transformirane z izbranim plazmidnim konstruktom, smo inokulirali v 5 ml gojišča 2TY z ustreznimi antibiotiki (kanamicin 25 μ g/mL, kloramfenikol 10 μ g/mL in z antibiotikom, katerega rezistenca je bila prisotna na plazmidnem vektorju) ter jih gojili preko noči pri temperaturi 37 °C pri stresanju 220 obr./min. Z 1 mL prekonočne kulture smo nato inokulirali 20 ml gojišča ter bakterije gojili do optične gostote 0,4 pri valovni dolžini 600 nm. Kulturo bakterijskih celic smo nato v postopku spiranja 2x centrifugirali 10 min pri hitrosti 4000 obr./min ter pelet bakterijskih celic resuspendirali z 20 ml gojišča 2TY. V zadnjem koraku spiranja smo celice resuspendirali v končnem volumnu 1 mL gojišča 2TY brez antibiotikov. V istem času smo na ledu 10 min odtalili spore bakterije *S. tsukubaensis* in jih prav tako 2x centrifugirali 2 min pri hitrosti 6000 obr./min in sprali v 1 mL gojišča 2TY. V zadnjem koraku smo jih resuspendirali v 400 μ l gojišča 2TY. Spore smo nato izpostavili toplotnem šoku tako, da smo jih najprej 10 min inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 50-52 °C in jih nato takoj ohladili na ledu. Bakterijske celice in spore smo združili v razmerju 2,5:1 ter alikvote 350 μ L razmazali na plošče gojišča MMAM.

Plošče smo inkubirali v inkubatorju čez noč pri 28 °C. Naslednje jutro smo plošče MMAM najprej prelili z 1 mL raztopin nalidinske kisline koncentracije 25 μ g/g gojišča, ki je ustavila rast *E. coli*. Plošče smo po sušenju inkubirali 8 ur pri 28 °C, nato pa prelili še z 1 mL ratopine apramicina koncentracije 50 μ g/g gojišča. Dodatek apramicina je povzročil selekcijo konjugant *S. tsukubaensis*, ki so uspešno prejele izbrani plazmidni vektor. Konjugante smo inkubirali nadaljnjih 7 dni pri temperaturi 28 °C, do sporulacije posameznih kolonij, ki smo jih nato prenesli na sveže ISP4 gojišče ustrezno koncentracijo antibiotika in nalidinske kisline. Plošče smo nadaljnjih 10-14 dni do sporulacije inkubirali pri 28 °C. Po sporulaciji smo kolonije precepili na plošče ISP4, ki so vsebovale le antibiotik apramicin 50 μ g/mL (oz. antibiotik, katerega rezistenca je bila prisotna na plazmidnem vektorju). Kolonije so po 10-14 dnevih bile pripravljene za postopek testiranje produkcije FK506 ali za shranjevanje spor (Poglavje 4.3.2).

3.4.5 Biosintezni postopek za produkcijo FK506 in FK520

Kolonije *S. tsukubaensis* smo v 5 mL gojišča VG3 inokulirali s 50 µL suspenzije spor ali z 0,2 cm² velikim koščkom gojišča ISP4 preraslim z 7-10 dni starim micelije. Po 24 h stresanja pri 28 °C in 220 rpm smo 0,5 mL inokuluma kulture prenesli v 5 mL produkcijskega gojišča (PG3). Kultivacija v PG3 gojišču je potekala 6 dni pri 28 °C, 60 % relativni zračni vlažnosti in 220 rpm na stresalniku.

3.5 MOLEKULARNE METODE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali standardne molekularno-biološke postopke (Kieser in sod., 2000; Nybo in sod., 2010) in različne komercialne komplete navedene v poglavju 3.1.4. Pri delu smo uporabljali encime proizvajalcev Promega, Invitrogen, New England Biolabs, Finnzymes in Fermentas. Za določanje velikosti DNA fragmentov pa smo uporabljali standard proizvajalca Fermentas.

3.5.1 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije E. coli

S posameznimi kolonijami *E. coli* smo inokulirali 5 mL 2TY gojišča z ustreznim antibiotikom za selekcijo plazmida. Kulturo smo na stresalniku inkubirali preko noči (12 – 16 h) pri 37 °C in 220 rpm. Plazmidno DNA smo iz celic izolirali s pomočjo komercialnega kompleta GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma). V zadnjem koraku smo elucijo DNA s kolone izvajali s 100 μ L ddH₂O, s čimer smo pri izhodiščnem volumnu kulture 2 mL dosegali koncentracijo plazmidov okrog 70 ng/ μ L.

3.5.2 Izolacija genomske DNA iz bakterije S. tsukubaensis

Za hitro izolacijo DNA iz sevov *S. tsukubaensis* smo uporabljali komercialni komplet PureLink Genomic DNA Purification (Invitrogen). Kulturo smo v 5 mL gojišča TSB gojili 24 h na stresalniku pri 28 °C in 220 rpm. Za izolacijo DNA smo potrebovali 2 mL kulture in sledili navodilom proizvajalca. DNA smo s kolone eluirali s 100 µL ddH₂O in dosegali izkoristke približno 70 ng/µL. Tako izolirano genomsko DNA smo uporabili za PCR in za namen sekvenciranje genoma.

3.5.3 Shranjevanje izolirane DNA

Izolirano plazmidno DNA, produkte PCR in očiščene restrikcijske fragmente smo shranjevali v ddH2O pri -20 °C. Izolirano genomsko DNA pa smo shranjevali v sterilnem pufru TE pri 4 °C.

3.5.4 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA smo v agaroznih gelih ocenili s primerjavo z znanimi koncentracijami standardov s pomočjo UV-transiluminatorja (BioRad, Nemčija) in programske opreme Quantity One (BioRad, Nemčija). Za natančno določanje koncentracije in čistosti izolirane DNA pa smo uporabili spektrofotometer NanoDrop (NanoDrop Technologies, ZDA). Pri tej metodi smo merili optično gostoto pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm in upoštevali, da so izolirani vzorci DNA čisti pri razmerju $OD_{260}/OD_{280} \approx 1,8-2,0$. Za določitev koncentracije smo upoštevali, da vrednost $OD_{260} = 1$ ustreza koncentraciji 50 µg/mL dvoverižne DNA.

3.5.5 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverjali količino, velikost in kakovost izolirane DNA oziroma dobljenih pomnožkov PCR. Metodo smo uporabljali tudi za ločevanje DNA fragmentov po encimskih modifikacijah (ligacija, restrikcija), ki smo jih po ločevanju očistili in izolirali s pomočjo komercialnih kompletov za čiščenje DNA iz agaroznega gela.

Izolirano genomsko in plazmidno DNA smo preverjali na 0,8 % (w/v), za pomnožke PCR in fragmente po restrikciji pa smo uporabljali 1,2 % (w/v) agarozni gel. Agarozo (Sigma, Nemčija) smo zatehtali v 1× pufru TAE, in jo zatalili v mikrovalovni pečici. Pred vlivanjem smo dodali barvilo SYBR Safe (Invitrogen) (1 µL barvila v 100 mL gela). Za elektroforezo smo uporabljali elektroforezne kadičke Mini-SubR Cell GT in Sub-CellR GT ter napajalnik Power PAC 3000 proizvajalca Bio-Rad, kjer smo električno napetost nastavili glede na velikost gela in sicer 8 V/cm. Vzorce smo pred nanosomo v žepke gela zmešali z 1× nalagalnim pufrom (6× DNA Loading Dye, Fermentas). Za določanje velikosti in koncentracije DNA smo uporabljali standard GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas) v koncentraciji 1 µg na jamico. Elektroforeza DNA na agaroznem gelu je potekala pri napetosti, detekcijo DNA fragmentov in fotografiranje gela pa smo izvedli s pomočjo UV transiluminatorja ter obdelali s programom Quantity One (Bio-Rad).

3.5.6 Izolacija DNA iz agaroznega gela

Fragmente DNA smo po izrezovanju iz agaroznega gela ali po obdelavi z encimi očistili s pomočjo komercialnega kompleta Wizard®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) po navodilih proizvajalca. V zadnjem koraku smo DNA iz kolonce eluirali v 50 µl ddH2O.

3.5.7 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Za pomnoževanje določenih odsekov DNA smo uporabljali verižno reakcijo s polimerazo PCR. V primerih pomnoževanja celih operonov ali delov kodirajočih regij posameznih genov smo uporabili termostabilno DNA polimerazo Phusion (Finnzymes). Za pomnoževanje regij DNA za namen povezovanja prekinjenih sosesk po sekvenciranju genoma pa smo uporabili DNA polimerazo, prilagojeno za zahtevno pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (Invitrogen) (Poglavje 3.5.7.1).

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA

Table 0. FCK IIIXture for ambiniving DNA	Table 6	6: PC	R mixtu	re for a	mplifving	DNA
------------------------------------------	---------	-------	---------	----------	-----------	-----

Komponenta	Volumen [µL]
polimerazni pufer - Phusion GC (5×)	10
dNTP (25 mM)	5
začetni oligonukleotid 1 (10 µM)	2,5
začetni oligonukleotid 2 (10 μM)	2,5
DMSO	1,5
matrična DNA (70 ng/μL)	1
Phusion DNA polimeraza (Finnzymes) (2 U/µL)	0,5
ddH ₂ O do končnega volumna	27
skupni volumen reakcijske mešanice	50

PCR reakcije smo izvedli v aparatu TProfessional Thermocycler (Biometra). Program pomnoževanja DNA je obsegal več standardnih korakov navedenih v preglednici 7. Od navedenih korakov PCR reakcij smo posebej optimizirali temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov na DNA matriko. Temperatura vezave oziroma naleganje parov začetnih oligonukleotidov je bila določena glede na izračunano temperaturo tališčat (T_m) (navadno 1 do 4 °C nižje od najnižje T_m izbranih oligonukleotidnih začetnikov) vendar smo v posameznih primerih morali ta korak dodatno optimizirali oziroma empirično določili. Uporabljena temperatura vezave začetnih oligonukleotidov je v takšnih primerih posebej navedena.

Preglednica	7: Pogoji	pomnoževanja	DNA s PCR
		r · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Table 7: PCR conditions

Stopnja	Čas	Temperatura	Število ciklov
Začetna denaturacija DNA	2 min	98 °C	1
Denaturacija DNA	15 s	98 °C	
Vezava začetnih oligonukleotidov	30 s	Tm – (1 do 3) °C	30
Prepisovanje DNA	30 s/kb	72 °C	
Zaključek prepisovanja DNA	10 min	72 °C	1

3.5.7.1 Pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov

Za pomnoževanje regij DNA za namen analize nukleotidnih zaporedij s predvidenim zamikom bralnega okvirja in za namen povezovanja prekinjenih sosesk genske skupine *St*-PKS4 (Poglavje 4.3.2) po sekvenciranju genoma smo uporabili DNA polimerazo, prilagojeno za zahtevno pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (Invitrogen).

Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov Table 8: PCR mixture for amplification of difficult GC-rich templates

Komponenta	Volumen [µL]
začetni oligonukleotid 1 (10 μM)	0,5
začetni oligonukleotid 2 (10 µM)	0,5
polimerazna mešanica AccuPrime A (5×)	5
matrična DNA (70 ng/µl)	1
AccuPrime GC-Rich DNA polimeraza (Invitrogen) (2 U/µl)	1
ddH ₂ O do končnega volumna	17
skupni volumen reakcijske mešanice	25

Pogoji uporabljeni za izvedbo reakcij pomnoževanje DNA s polimerazo AccuPrime GC-Rich DNA (Invitrogen) so predstavljeni v preglednici 8 in preglednici 9.

Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov s PCR

Stopnja	Čas	Temperatura	Število ciklov
Začetna denaturacija DNA	2 min	95 °C	1
Denaturacija DNA	30 s	95 °С	
Vezava začetnih oligonukleotidov	30 s	Tm – 5 °C	30
Prepisovanje DNA	1 min/kb	72 °C	
Zaključek prepisovanja DNA	10 min	72 °C	1

Table 9: Conditions for PCR amplification of DNA with a high GC content

Podobno kot pri običajni PCR, smo temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov prilagodili glede na izračunano temperaturo tališča (T_m) , čas prepisovanja DNA pa prilagodili glede na pričakovano velikosti pomnožkov PCR.

3.5.8 Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami

Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami smo uporabili za pripravo PCR produktov in vektorjev na ligacijo ter za preverjanje izoliranih rekombinantnih plazmidov po ligaciji. DNA smo rezali s pomočjo restrikcijskih endonukleaznih encimov FastDigest (Fermentas) s priloženimi pufri (Preglednica 2) po protokolu proizvajalca. Glede na ocenjeno koncentracijo tarčne DNA s pomočjo agaroznega gela smo določili potrebno količino za reakcijo. Za rutinsko preverjanje plazmidne DNA smo pripravili 10 µL reakcijske mešanice dvojne restrikcije:

	Preverjanje plazmidov:	Restrikcija pred ligacijo:
10× pufer za restrikcijo	1 μL	5 μL
restrikcijska nukleaza 1	0,3 μL	2 μL
restrikcijska nukleaza 2	0,3 μL	2 μL
tarčna DNA	5–8,4 µL (~0,2 µg DNA)	30 µL
dH ₂ O	dopolnili do 10 µL	11 µL

Reakcijsko mešanico smo inkubirali od 10 do 60 min pri temperaturi 37 °C. Za rezanje večjih količin DNA smo volumne ustrezno povečali, čas inkubacije pa podaljšali na 1-2 h. Reakcijo smo pred nanosom na gel ustavili z dodatkom nanašalnega pufra (Fermentas). Nanašalni pufer vsebuje kelator EDTA, ki veže Mg²⁺ ione, pomembne za aktivnost restrikcijskih encimov ter tako popolnoma ustavi restrikcijo. V primerih, ko smo restrikcijsko mešanico uporabili za postopke kloniranja smo fragmente DNA očistili s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij Wizard®SV Gel and PCR clean-up System (Promega).

3.5.9 Encimsko združevanje DNA fragmentov po Gibsonu

Metodo »Gibson assembly« smo uporabili za združavanje več daljših ločenih DNA fragmentov, ki smo jih pridobili s pomočjo PCR reakcij. Vsi oligonukleotidni začetniki uporabljeni za PCR so bili zasnovani tako, da so vsebovali 15-20 bp dolga nukleotidna prekrivajoča zaporedja homologije s sosednjimi DNA fragmenti. Produkte PCR smo identificirali na gelski elektroforezi ter jih izrezali in očistili (Poglavje 3.5.6). Encimsko združevanje DNA fragmentov po Gibsonu smo izvedli s pomočjo komercialnega kompleta reagentov Gibson assembly (New England Biolabs). Reakcijsko mešanico smo inkubirali eno uro pri 50 °C in nato transformirali s pomočjo elektroporacije v sev *E. coli* DH10β (Poglavje 3.4.3.2)

3.5.10 Fosforilacija

Dodatek fosfatnih skupin na 5'-konec PCR fragmentov je bil nujen za nadaljnjo ligacijo z vektorjem. Zato smo uporabili encim T4 PKN (T4 Polynucleotide Kinase) - polinkleotidno kinazo (Fermentas), ki katalizira prenos Pi z ATP na 5'-hidroksilni konec polinukleotida. 50 µl reakcija je vsebovala očiščen PCR produkt, 1× pufer PNK A, 1 mM ATP in 10 U T4 PNK. Mešanico smo inkubirali 1 h pri 37 °C in reakcijo ustavili z inaktivacijo encima pri 75 °C za 20 min.

3.5.11 Defosforilacija

Z encimom FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) – termosenzitivno alkalno fosfatazo (Fermentas) smo s 5'-koncev lineariziranih plazmidov odstranili fosfatno skupino, kadar smo želeli preprečiti ponovno zlepljanje vektorjev. 50 μ l reakcija je vsebovala približno 5 μ g DNA, 1× pufer FastAP in 3 U FastAP. Inkubacija je potekala 20 min pri 37 °C. Reakcijo smo ustavili z inkubacijo pri 80 °C za 10 min.

3.5.12 Ligacija

Molarno razmerje med insertom in vektorjem v ligacijski mešanici je bilo ponavadi 3:1. Ligacijska mešanica s skupnim volumnom 10 μ l je vsebovala po 0,2 μ g vektorja in inserta, 1× T4 ligacijski pufer in 2,5 U T4 ligaze (Fermentas). Ligacijsko reakcijo smo inkubirali 3 h na sobni temperaturi ali preko noči pri 4 °C.

3.5.13 RT-PCR analiza

3.5.13.1 Izolacija RNA iz bakterije S. tsukubaensis

RNA smo izolirali iz 62 h stare tekoče kulture *S. tsukubaensis* NRRL 18488 v gojišču PG3. To smo pripravili tako, da smo najprej s 500 µL suspenzije spor inokulirali 50 mL VG3 gojišča. Po 24 urah stresanja pri 28 °C in 220 rpm smo 10 % inokulumom (v/v) prenesli v 50 mL gojišča PG3. Po 62 h kultivaciji v kompleksnem produkcijskem gojišču PG3, smo odvzeli 2 mL kulture in takoj premešali z 4 mL komercialnega reagenta za stabilizacijo celokupne RNA (mRNA in rRNA) RNAlater (Qiagen, Nemčija). Homogeno pripravljene vzorce smo zamrznili in jih pri temperaturi -80 °C hranili največ 2 tedna do nadalnje obdelave. Za obdelavo vzorcev smo uporabljali samo poseben laboratorijski material, kjer so predhodno bile odstranjene RNAaze. RNA smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta FastPrep (MP Biomedicals, Francija) in RNeasyMini (Qiagen, Nemčija) po nekoliko spremenjenem protokolu.

Vzorce za izolacija RNA smo iz -80 °C prenesli in odmrznili na sobni temperaturi in jih med nadalnjim delom hranili na ledu pri 4 °C. 2 mL vzorca smo prenesli v mikrocentrifugo, centrifugirali 1 min pri 1000 rpm (Eppendorf, Nemčija) in nato odlili supernatant. Preostali pelet smo nadalje encimsko lizirali po protokulu komercialnega kompleta RNeasyMini (Qiagen, Nemčija). Pelet smo resuspendirali v 18 μ L raztopine lizocima (končna koncentracija 15 mg/mL), 78 μ L TE pufra in 10 μ L proteinaze K ter ga inkubirali na sobni temperaturi 10 min. Vzorec smo nato še dodatno mehansko lizirali z uporabo homogenizatorja FastPrep-24 (MP Biomedicals, Francija) in pripadajočih FastPrep kolon. Po mehanski lizi smo vzorec centrifugirali 5 min pri 14.000 rpm in s supernatantom izolacijo nadaljevali po protokolu RNeasyMini (Qiagen, Nemčija). Izolirano RNA smo po izolaciji iz kolon eluirali s 30 μ L dH₂O segreta na 65 °C.

Vzorce smo pred nadalnjo obdelavo analizirali s pomočjo spektrofotometra Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, ZDA), določili smo koncentracijo celokupne RNA in s pomočjo razmerja absorbanc A_{260}/A_{280} sklepali na prisotnost proteinov v vzorcih. Za nadaljnjo obdelavo smo uporabili vzorce, katerih koncentracija RNA je bila večja kot 200 ng/uL in A_{260}/A_{280} razmerjem večjim kot 1,8.

3.5.13.2 Razgradnja prisotne DNA

Po izolaciji celokupne RNA smo s pomočjo DNaze (Fermentas) v razgradili morebitno DNA prisotno v vzorcih. Izbrane vzorce (3 µg celokupne RNA) smo tretirali z DNazo (Fermentas) po protokolu proizvajalca.

3.5.13.3 Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo

Izvedli smo dvostopenjski RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo), kjer smo v prvem koraku s pomočjo reverzne transkriptaze sintetizirali enoverižno c-DNA in v drugem koraku s PCR specifično pomnožili željene segmenete DNA. Za reverzno transkripcijo in sintezo c-DNA smo uporabili Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas) in mešanico naključnih začetnih oligonukleotidov (Fermentas), reakcijo smo izvedli po protokolu proizvajalca (Preglednica 6). Reakcijsko mešanico A smo pripravili pri temperaturi 4 °C, nato pa zaradi visoke vsebnosti GC baz in potencialnih sekundarnih struktur reakcijo izpostavili temperaturi 65 °C za 5 minut. Reakcijsko mešanico A smo ohladili na ledu in nato nadaljevali po protokolu (Preglednica 7). Pripravili smo 20 μL reakcijske mešanice B in jo najprej inkubirali 30 min na 60 °C, da je potekla reakcija reverzne transkripcije. V zadnjem koraku pa smo s segrevanjem na 85 °C za 5 min inaktivirali vse prisotne encime. Enoveriženo prepisano c-DNA smo hranili pri -20 °C največ en teden.

Preglednica 10: Mešanica za RT-PCR analizo (prva stopnja)

Table 10: RT-PCR mix for first stage

Komponenta	Volumen [µL]
celokupna izolirana RNA	12,5
naključni heksamerni začetni oligonukleotidi (100μM)	1,0
mešanica dNTP (vsak 10 mM)	1,0
skupni volumen (reakcijska mešanica A)	14,5

Preglednica 11: Mešanica za RT-PCR analizo (druga stopnja)

Table 11: RT-PCR mix for second stage

Komponenta	Volumen [µL]
rookajisko mašanico A	14.5
S× RT nufer	4.0
RiboLock (Fermentas) RNazni inhibitor	4,0
Maxima (Fermentas) reverzna transkriptaza	1,0
skupni volumen (reakcijska mešanica B)	20

Drugo stopnjo RT-PCR smo izvedli s pomočjo termostabilne DNA polimeraze Phusion High Fidelity DNA (Finnzymes) in specifičnih začetnih oligonukleotidov.

3.5.14 Sekvenciranje

Vzorce za sekvenciranje smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Promega) in pošiljali v ddH2O (20 µL plazmida v koncentraciji 70 ng/µL) pri sobni temperaturi podjetju Macrogen (Seoul, Korea).

3.6 BIOINFORMACIJSKE METODE

3.6.1 »In silico« analiza genoma S. tsukubaensis NRRL 18488

Genom lahko razumemo kot množico vseh genov v organizmu, ki kodirajo sekvence proteinov. Pri čemer je funkcija gena določena z aktivnostjo proteina, ki ga le-ta kodira. Anotacija genoma pa je proces, kjer genom v genomu pripišemo oz. predvidimo njihovo funkcijo. To lahko storimo na več načinov, najbolj direkten pristop je eksperimentalna določitev funkcije gena. Tak način anotacije gena je zagotovo najbolj zanesljiv, vendar se v primerih sekvenciranja celotnih genomov pogosteje uporabljajo indirektne metode, ki genu pripiše funkcijo glede na podobnost njegove sekvence z genom, katerega funkcija je že poznana.

3.6.1.1 Strežnik RAST in podatkovna baza SEED

Avtomatsko anotacijo genoma smo izvedli s pomočjo strežniške storitve RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) verzija 4.0 (Aziz in sod., 2008). Ta storitev omogoča hitro in zanesljivo anotacijo celotnih ali delno sekvenciranih genomov bakterij in arhej. Na strežnik RAST smo naložili nukleotidno zaporedje genoma v obliki formata FASTA. Strežnik pa je glede na izbrane možnosti izvedel avtomatsko anotacijo predvidenih genov, proteinom, ki jih kodirajo pa je dodelil funkcijo ter jih razvrstil v funkcionalne skupine. Pridobljene podatke smo lahko dodatno uredili s pomočjo podatkovne baze SEED (Henry in sod., 2010), dodatno izvedli primerjavo genoma *S*.

tsukubaensis NRRL 18488 z drugimi bakterijskimi genomi ter v povezavi z podatkovno zbirko KEGG pripravili rekonstrukcijo prisotnih metabolnih poti.

3.6.1.2 KEGG

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genom) je podatkovna zbirka, ki vsebuje združene podatke o večini znanih metabolnih poti, njihovih kemijskih reakcij in znanih encimov, ki pri tem sodelujejo. S pomočjo podatkovne baze KEGG PATHWAY smo pridobili osnovne informacije o iskanih metabolnih poteh, ključnih encimih, ki pri tem sodelujejo, njihovo klasifikacijo (EC številko – angl. Enzyme Commission number) in tudi referenčno aminokislinsko zaporedje encimov (Kanehisa in Goto, 2000). Podatkovno bazo KEGG smo največkrat uporabljali v povezavi s podatkovno storitvijo SEED (Poglavje 3.6.1.1).

3.6.1.3 ClustScan

Za iskanje, identifikacijo in anotacijo novih še nepoznanih genskih skupin za sekundarne metabolite, ki jih sintetizirajo PKS in NRPS, smo uporabljali za to posebej razvit in prilagojen programsko paket Cluster Scanner (»ClustScan«) (Starcevic in sod., 2008). S programskim paketom ClustScan smo v sekvenci genoma *S. tsukubaensis* NRRL 18488 izvedli podrobno analizo identificiranih PKS in NRPS genskih skupin, predvidel aktivnost in specifičnost njihovih modulov, katalitično aktivnost posameznih domen ter na podlagi tega predvideli tudi kemijsko strukturo novih sekundarnih metabolitov. Programski paket pri svojem delovanju uporablja svojo podatkovno bazo ClustScan DataBase (http://bioserv.pbf.hr/cms/), ki vsebuje večino poznanih in dobro karakteriziranih PKS in NRPS genskih skupin.

S pomočjo ClustScan smo uspeli tudi predvidet sosledje prekinjenih sosesk (angl. contigs) na katerih so se nahajali iskane genskih skupin ter celo določit mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do napake v prvotnem sekvenciranju genoma. Te rezultate bioinformacijske analize pa smo kasneje s pomočjo molekularnih metod tudi eksperimentalno potrdili.

3.6.2 Analize krajših nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

Po bioinformacijski analizi celotnega genoma smo izbrana krajša nukleotidna oz. aminokislinska zaporedja, predvidoma vpletena v biosintezo gradbenih enot za sekundarne metabolite, podrobneje analizirali. Pri anotaciji izbranih genov smo tako uporabili prosto dostopni bioinformacijskih orodji FramePlot (Ishikawa in Hotta, 1999) in za poravnavo zaporedi algoritem BLAST (Altschul in sod., 1997).

3.6.2.1 BLAST

Algoritem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) je dostopen na strežniku NCBI (National Center for Biotechnology Information). Algoritem omogoča primerjavo nukleotidnih ali proteinskih zaporedij z drugimi zaporedji iz javno dostopnih bazah, kot so nukleotidne baze GenBank, EMBL, DDBJ in PDB ter proteinske baze GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR in PRF.

Rezultati primerjave in poravnave iskanih zaporedij so podani v obliki zadetkov, ki so razvrščeni glede na odstotek identičnosti (angl. Identity) oz. podobnosti in glede na Evrednost. Podobnost (angl. Positives) je definirana na podlagi ohranjenih aminokislinskih substitucij v zaporedjih. Za izračune uporabljen algoritem BLOSUM 62 upošteva, da ni vsako neujemanje aminokislin enakovredno. Algoritem uporablja matriko, ki definira odnos med posameznimi aminokislinami glede na velikost, naboj in polarnost ter tako izračuna podobnost (Henikoff in Henikoff, 1992). E-vrednost ali pričakovana vrednost je parameter, ki nam opiše število zadetkov, ki jih lahko pričakujemo, če bi naključno iskali zaporedje enake velikosti. Nižja kot je vrednost E, manjša je verjetnost, da so zadetki rezultat naključja (Altschul in sod., 1990).

3.6.2.2 FramePlot

Za pomoč pri iskanju odprtih bralnih okvirjev v nukleotidnem zaporedju smo uporabljali program Frameplot 4.0 beta (Ishikawa in Hotta, 1999). Odprte bralne okvirje (ORF; angl. Open Reading Frame) lahko definiramo kot zaporedje kodonov (sestavljen iz treh nukleotidov), ki se začnejo s start in končajo s stop kodonom. Analizo prisotnih ORF smo izvedli tako, da smo prevedli nukleotidno zaporedje v vseh 6 bralnih okvirjih, nato pa poiskali zaporedja, ki se pričnejo s start in končajo s stop.

Program FramePlot je prilagojen za delo z nukleotidnimi sekvencami, pridobljene iz organizmov z višjo vsebnostji GC baznih parov. S programom smo izračunali odstotka GC baznih parov, ki se nahajajo na tretjem mestu kodona. Za streptomicete je znano, da se znotraj kodirajočih nukleotidnih zaporedij GC bazna para pojavljata na tretjem mestu v kodonu v povprečju 92 % (Nakamura in sod., 1997).

3.6.2.3 Vector NTI

Za »*in silico*« analize nukleotidnega zaporedja, kot so restrikcijske analize, poravnava nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij ter translacije nukleotidnih zaporedij v
aminokislinsko zaporedje, smo uporabljali tudi programski paket Vector NTI Advance[™] 10 (Invitrogen Corporation, ZDA).

3.7 ANALITSKE METODE

3.7.1 Ekstrakcija produkcijskih brozg

Po kultivaciji testnih kolonij smo iz produkcijske brozge izvedli ekstrakcijo produktov FK506 in FK520. Ekstrakcija smo izvedli tako, da smo 5 ml bioprocesne brozge dodali 5 ml metanola (1:1) in mešali eno uro na stresalniku pri 220 rpm. Po končanem stresanju smo 1,5 ml ekstrakta prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 14000 rpm. 750 µl supernatanta smo nato odpipetirali v viale, ki smo jih pri 4 °C shranili do analize s HPLC.

3.7.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Vsebnost FK506 in FK520 smo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti - HPLC (high performance liquid cromatography) na aparatu Spectra System HPLC z binarno črpalko P2000 in UV detektorjem UV1000. Vzorce smo s pomočjo dozirne zanke velikosti 100 μ l injicirali na kolono Nucleosil EC100-3 C18 (3 μ m, 150 x 4 mm, Machery-Nagel, Nemčija), ogreto na temperaturo 60 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz vode, acetonitrila (34,4 %), MTBE (7,29 %) in fosforne kisline (0,02 %). Pri tem je pretok skozi kolono znašal 1,5 mL/min. Pridobljene podatke smo analizirali s pomočjo programskega paketa ChromeQuest.

4 REZULTATI

4.1 SEKVENCIRANJE GENOMA IN BIOINFORMACIJSKA ANALIZA

Sekvenciranje celotnega genoma *S. tsukubaensis* NRRL 18488 je generiralo veliko količino podatkov, kar je predstavljalo svojevrsten izziv pri njihovi obdelavi in analizi. Pri bioinformacijskih analizah smo zato uporabljali več različnih programskih orodij in javno dostopnih podatkovnih baz (Poglavje 3.6).

4.1.1 Sekvenciranje genoma S. tsukubaensis

Iz organizma *S. tsukubaensis* NRRL 18488 smo, za namen *de novo* sekveniranje genoma, izolirali visoko kakovostno DNA. DNA smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta (GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kit), proizvajalca Sigma-Aldrich. Tak način izolacije nam je omogočil, pridobivanje nerazgrajenih, velikih fragmentov DNA, brez prisotnosti kloroforma ali drugih topil, ki bi lahko motile postopek sekvenciranja. Kakovost izolirane DNA smo ocenili s pomočjo gelske elektroforeze in jo spektrofotometrično določili, pri čemer je bila vrednost količnika absorbanc A_{260}/A_{280} večja kot 1,8. S tem smo zadovoljili osnovnim zahtevam izvajalca sekvenciranja, podjetja Macrogen Korea Inc. DNA smo sekvencirali s sistemom Roche 454 GS-FLX ,ki temelji na principu pirosekvenciranja in spada med metode t.i. nove genaracije sekvenciranja (NGS) Podatke smo dobili v obliki 300 – 500 bp dolgih odčitkih nukleotidnih zaporedij, naključnih razporejenih po celotnem genomu (metoda »shotgun« sekvenciranja). S to metodo sekvenciranja smo pridobili podatke za skupaj več kot 285 Mbp. Dobljeni podatki predstavljajo 36 kratno povprečno pokritost sekvence genoma.

4.1.2 Splošne lastnosti genoma S. tsukubaensis

S pomočjo analize pridobljenih sekvenc genoma bakterije *S. tsukubaensis* NRRL 18488, smo določili dolžino linearnega genoma, ki znaša 7,62 Mbp in ima visoko GC vsebnost 71,5 %. Barreiro in sodelavci pa so pred kratkim poročali, da se v organizmu *S. tsukubaensis* NRRL 18488 nahajata tudi dva krožna plazmida in sicer pSTS1 (24,7 kbp) in pSTS2 (31,1 kbp). Na 5' koncih genomske DNA se nahajata telomeri, ki sta podobni drugim opisanim telomeram iz rodu *Streptomyces*, vendar z bolj robustno sedem delno lasno (angl. hairpin) strukturo (Barreiro in sod., 2012).

4.1.3 Avtomatsko sestavljanje sekvenc in anotacija celotnega genoma

S sekvenciranjem smo pridobili 751410 odčitkov (angl. reads) neprekinjenih sekvenc, katerih povprečna dolžina je znašala 381 bp. Za avtomatsko sestavlanje odčitkov v neprekinjene soseske (angl. contigs) smo uporabili dva različna algoritma programski paket Newbler Assembler verzija 2.3 (Roche) (Miller in sod., 2010) in programski paket MIRA 3 (Chevreux in sod., 2004).

Avtomatsko anotacijo genoma smo izvedli s pomočjo javno dostopne medmrežne storitve RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) verzija 4.0 (Aziz in sod., 2008). Storitev omogoča prepoznavanje in anotacijo genov ter njihovo razvrščanje v skupine metabolnih poti.



Slika 20: Metabolna rekonstrukcija S. tsukubaensis NRRL 18488 iz sekvence genoma s pomočjo storitve RAST

Figure 20: Metabolic reconstruction of *S. tsukubaensis* NRRL 18488 from genome sequence by using RAST service

V genomu *S. tsukubaensis* smo z uporabo storitve strežnika RAST prepoznali 6852 predvidoma kodirajočih sekvenc oz. domnevnih genov. Od tega je bilo 2731 kodirajočih sekvenc prepoznanih kot zapisi za hipotetične proteine, za 2688 kodirajočih sekvenc, pa smo na podlagi podobnosti zaporedja lahko poiskali znane proteinske homologe ter tako predvideli njihovo funkcijo.

Preglednica 12: Skupine predvidenih proteinov S. tsukubaensis NRRL 18488 identificiranih s storitvijo RAST

Table 12: Protein groups identified in S. tsukubaensis NRRL 18488 using RAST service

Skupina proteinov razdeljena po funkciji	Število najdenih proteinov
Aminokisline in derivati	493
razvejane aminokisline	147
lizin, treonin, metionin in cistein	93
alanin, serin in glicin	62
arginin, poliamini in cikel sečnine	54
aromatske aminokisline in derivati	45
glutamin, glutamat, aspartat, asparagin in asimilacija amonija	35
metabolizem histidina	27
prolin in 4-hidroksiprolin	26
ostalo	4
Ogljikovi hidrati	426
centralni metabolizem ogljika	140
metabolizem butanola in butirata	104
metabolizem C1 spojin	62
aminosladkorji	30
monosaharidi	27
sladkorni alkoholi	25
di- in oligosaharidi	24
organske kisline	11
polisaharidi	3
Maščobne kisline, lipidi in izoprenoidi	296
izoprenoidi	113
maščobne kisline	94
ostalo	46
fosfolipidi	43
Kofaktorji, vitamini, prostetične skupine in pigmenti	223
biotin	57
folati in pterini	41
tetrapiroli	36
riboflavini, FMN, FAD	19
pirodoksin	18
NAD in NADP	13
koencim A	11
koencim F420	5
ostalo	23
	se nadaljuj

nadali	ievani	e P	regle	dnice	12
nauan	o vunj	U I	regie	amee	12

Skupina proteinov razdeljena po funkciji	Število najdenih proteinov
Metabolizem proteinov	204
biosinteza proteinov	138
razgradnja proteinov	32
zvijanje proteinov	16
modifikacija proteinov	15
selenoproteini	3
Celična stena in kapsula	148
ekstracelularni polisaharidi	63
ostalo	85
Centralni metabolizem in respiracija	124
reakcije oksidacije	50
reduktivne reakcije	41
ATP sintaze	10
ostalo	23
Metabolizem DNA	108
popravljanje DNA	74
CRISP	13
ostalo	12
DNA replikacija	4
DNA rekombinacija	3
privzemanje DNA, kompetenca	2
Nukleozidi in nukleotidi	98
pirimidini	33
purini	49
ostalo	16
Odziv na stres	92
oksidativni stres	34
ostalo	22
osmotski stres	17
toplotni šok	15
detoksifikacija	12
ohladitveni šok	2
Membranski transport	65
ABC transport	36
ostalo	27
uni-, sim- in antiport	2
Odpornost proti težkim kovinam in antibiotikom	57
odpornost proti težkim kovinam	22
ostalo	20
odpornost proti antibiotikom	15

se nadaljuje

Skupina proteinov razdeljena po funkciji	Število najdenih proteinov
Metabolizem aromatskih spojin	56
metabolizem osrednjih aromatskih intermediatov	27
katabolizem aromatskih spojin	24
ostalo	5
Metabolizem RNA	53
transkripcija	28
procesiranje in modifikacija RNA	25
Metabolizem fosforja	40
Celični cikel in delitev	39
Prevzemanje in metabolizem železa	33
Celična regulacija in signalizacija	28
Metabolizem žvepla	28
Drugo	22
Metabolizem dušika	20
Metabolizem kalija	16
Sporulacija in dormanca	13
Bakteriofagi in transpozicijski element	3
Kemotaksa	3

nadalievanie Preglednice 12

Iz pridobljenih sosesk nukleotidnega zaporedja genoma *S. tsukubaensis* in aminokislinskih zaporedij vseh predvidenih proteinov smo nato oblikovali bazo podatkov, s čimer smo omogočili njihovo bolj podrobno analizo. Osredotočili smo se na analizo poti primarnega metabolizma, ki so pomembne za oskrbo s substrati za komercialno pomembno spojino FK506 in pa konkurenčne poti sekundarnega metabolizma. Te analize genoma so podrobneje opisane v naslednjih poglavjih.

4.2 ANALIZA PREDVIDENIH METABOLNIH POTI GRADBENIH ENOT ZA BIOSINTEZO FK506 IN FK520

Sinteza sekundarnih metabolitov FK506 in FK520 poteka s pomočjo PKS/NRPS hibridnega sistema. Sinteza se prične z neobičajno začetno enoto 4,5-dihidroksicikloheks-1-enkarboksilno kislino (DHCHC), biosinteza se nadaljuje z vgradnjo desetih podaljševalnih enot in sicer petih molekul metilmalonil-CoA, dveh molekul malonil-CoA, dveh molekul metoksimalonil-ACP in ene molekula alilmalonil-CoA (FK506) oziroma etilmalonil-CoA (FK520). Sinteza osnovne poliketidne verige se zaključi z pripenjanjem L-pipekolata in ciklizacijo v makrolaktonski obroč (Goranovič in sod., 2010; Mo in sod., 2011; Motamedi in Shafiee, 1998).



Slika 21: Nenavadne gradbene enote za biosintezo FK506 Figure 21: Unusual bilding blocks for FK506 biosynthesis

Glede na znane gradbene enote potrebne za biosintezo FK506 in FK520 smo v sekvenciranem genomu S. tsukubaensis NRRL 18488 (Poglavje 4.1) poiskali in identificirali verjetne metabolne poti, ki so vpletene v njihov nastanek. Analizo metabolnih poti smo opravili s pomočjo različnih računalniških orodij (Poglavje 3.6). Podatke o znanih metabolnih poteh za biosintezo gradbenih enot smo zbrali s pomočjo podatkovne baze KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) in sicer podatkovne zbirke KEGG PATHWAY, KEGG GENES, KEGG REACTION in KEGG COMPOUND (Kanehisa in Goto, 2000). Pridobljena nukleotidna in aminokislinska zaporedija, ključnih encimov v metabolnih poteh, smo nato s pomočjo algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul in sod., 1990) primerjali s sekvenciranim genomom S. tsukubaensis. Rezultati primerjav so podani v obliki zadetkov, ki so razvrščeni glede na odstotek identičnosti in podobnosti oz. glede na E-vrednost. Zaporedja z najvišjim odstotkom podobnosti in najnižjo E-vrednostjo smo s programom FramePlot 4.0 beta (Ishikawa in Hotta, 1999) natančneje analizirali in locirali odprte bralne okvirje, določili začetne in stop kodone ter orientacijo in velikost genov. Identificiranim genom smo po anotaciji, glede na dobljene rezultate primerjave aminokislinskega zaporedja z že karakteriziranimi proteinskimi homologi iz drugih organizmov, pripisali njihovo funkcijo.

4.2.1 Biosinteza malonil-CoA

Karboksilacijo acetil-CoA in nastanek gradbene enote malonil-CoA katalizira encim acetil-CoA karboksilaza (ACC) EC: 6.4.1.2. Encim deluje kot kompleks sestavljen iz dveh različnih proteinskih podenot zapisanih na genu *accA* (α -podenota) in *accB* (β -podenota). Pri *S. tuskubaensis* ima predviden gen *accB* (Preglednica 13) dolžino 1653 bp in se začne s start kodonom ATG ter konča s TGA. V skupnem operonu se 14 nt stran od *accB* nahaja predviden gen *accA*, ki je dolg 1956 bp in se prične s start kodonom ATG ter konča s stop kodonom TGA.



Slika 22: Shematski prikaz biosinteze gradbene enote malonil-CoA iz intermediatov primarnega metabolizma Figure 22: Schematic representation of the biosynthesis suply unit malonyl-CoA from primary metabolism

Proteinsko zaporedje AccB kaže veliko podobnost z dobro proučenim encimskim kompleksom ACC pri bakteriji *S. coelicolor*. Analiza je pokazala da je med α -podenotama ACC encima 83 % identičnost in 87 % podobnost (pri čemer je E-vrednost < e⁻¹⁷⁰) ter med β -podenotama 87 % identičnost in 91 % podobnost (E-vrednost < e⁻¹⁷⁰).

Preglednica 13: Identificirani	proteinski	homologi za	a sintezo	malonil-CoA
--------------------------------	------------	-------------	-----------	-------------

Table 13: Identified	protein hor	nologs for a	synthesis of	of malonyl-CoA
----------------------	-------------	--------------	--------------	----------------

Gen	Predlagana funkcija	Dolžina	Najbližji proteinski homolog	Identičnost /
		(ak)		podobnost
accA	biotin karboksil	651	biotin karboksil prenašalni protein /	83/88
EIF89857	prenašalni protein /		acetil/propionil CoA karboksilaza	
	acetil/propionil CoA		(a podenota)	
	karboksilaza		Streptomyces filamentosus	
	(a podenota)		EFE74720.1	
accB	acetil-CoA	550	acetil-CoA karboksilaza	91/95
EIF89858	karboksilaza		(β podenota)	
	(β podenota)		Streptomyces avermitilis MA-4680	
			WP_010986682.1	

Da lahko z večjo gotovostjo potrdimo, da identificirana β podenota (EIF89858) deluje kot acetil-CoA karboksilaza in ni sorodna propionil-CoA karboksilaza, smo dodatno naredili še podrobno analizo aktivnih domen (Slika 24) in poravnavo aminokislinskih zaporedij z že karakteriziranimi acetil-CoA karboksilazami iz organizmov *S. avermitilis* (WP_010986682.1), *S. coelicolor* (NP_627006.1) in *S. griseus* (WP_003969004.1) (Slika 23). Analiza je pokazala na visoko stopnjo ujemanja aminokislinskega zaporedja katalitičnih domen acetil-CoA karboksilaze iz *S. tsukubaensis* s proteinskimi homologi iz ostalih organizmov.

Stsu	Acc-beta	(1)	MQQTPVPPR <mark>QAPVLTSAADPAS</mark> A <mark>AWQANEAGHR</mark> EL <mark>A</mark> DALRTALAAARLGG
Save	Acc-beta	(1)	<mark>MQ</mark> E <mark>AP</mark> E <mark>LTS</mark> AADPAS <mark>EAWR</mark> ANEAAHRTLG <mark>E</mark> ELRAKLAAARLGG
Scoe	Acc-beta	(1)	<mark>M</mark> HE <mark>APELTTAADPASEAFRANEEAHAAL</mark> VQ <mark>ELRAKLAAARLGG</mark>
Sgri	Acc-beta	(1)	<mark>MQQ</mark> AP <mark>V</mark> LA <mark>SAADPASEAWQANEAAHRALSDEL</mark> A <mark>GR</mark> LATARLGG
Stsu	Acc-beta	(51)	GEKARARHTARGKI.I. DRDRVDTI.I. DDGSDFI.FI.ADI.AAHGMYEGOADAAG
Save	Acc-beta	(31)	GERARARHTARGKLI, DRDRVDTI, DDGSDFI, FI, ADI, AADCMYFGOADAAG
Save	Acc beta	(11)	
Cani	Acc-beta	(11)	CENARARIITARGRUUPRDRVDTUUDPGSPFUELAPLAADGUIDGAAPAAG
SGLT	ACC-Dela	(44)	GERARARHEARGELLPRDRVD1LLDPGSPFLELAPLAADGL1GGAAPAAG
Stsu	Acc-beta	(101)	V <mark>V</mark> AGIGRV <mark>A</mark> GRE <mark>TVI</mark> VANDATVKGGTYYPMTVKKHLRAQEVALENRLPC <mark>V</mark>
Save	Acc-beta	(94)	V V AGIGRVGGRE <mark>CLV</mark> VANDATVKGGTYYPMTVKKHLRAQEVALENRLPC <mark>V</mark>
Scoe	Acc-beta	(94)	V <mark>I</mark> AGIGRV <mark>S</mark> GRE <mark>CVI</mark> VANDATVKGGTYYPMTVKKHLRAQEVALENRLPC <mark>L</mark>
Sgri	Acc-beta	(94)	V <mark>I</mark> AGIGRV <mark>S</mark> GRE <mark>CVI</mark> VANDATVKGGTYYPMTVKKHLRAQEVALENRLPC <mark>L</mark>
Stsu	Acc-beta	(151)	YLVDSGGAFLP <mark>L</mark> QDEVFPDREHFGRIFYNQARMSGAGIPQIAAVLGSCTA
Save	Acc-beta	(144)	YLVDSGGAFLP <mark>M</mark> QDEVFPDR <mark>E</mark> HFGRIFYNQARMSGAGIPQIAAVLGSCTA
Scoe	Acc-beta	(144)	YLVDSGGAFLP <mark>M</mark> QDEVFPDREHFGRIFYNQARMSGAGIPQIAAVLGSCTA
Sgri	Acc-beta	(144)	YLVDSGGAFLP <mark>M</mark> QDEVFPDR <mark>D</mark> HFGRIFYNQARMSGAGIPQIAAVLGSCTA
Stan	Acc-beta	(201)	CCAVUDAMODEAUTUR
Save	Acc-beta	(194)	CONVERSE VIVE COCTIFICED VEATOR VIA ELOCOLINE
Save	Acc beta	(10/)	CONVERSE COLORING CONVERSE CONVERSE
Scue	Acc-beta	(10/)	CCAVUDAMSDEAUTURCOCTIELCCDDI WKAATCEVUTAEELCCCEVUS
SGLT	ACC-Dela	(194)	GOVI ALVIODENA I AKGĀGI IL IGGLE DAKANI GEAA IMEEIGOGEAUDK
Stsu	Acc-beta	(251)	ISGVTDHLAEDDAHALRIVRTIVETLPARGPLPWAVAPVEEPAVDPAGLY
Save	Acc-beta	(244)	VSGVTDHLAEDDAHALRIVRNIVSTLPARGPLPWAVEPSVEPKVDPYGLY
Scoe	Acc-beta	(244)	<mark>VSGVTDHLAEDD</mark> PHALRIVR <mark>QIVS</mark> TLPE <mark>RG</mark> ALPW <mark>G</mark> VEAAAEPKADPQDLY
Sgri	Acc-beta	(244)	T <mark>SGVTDHLAEDDAHALRIVRN</mark> IVATLPDRAPLPW <mark>SVEPAEEPK</mark> ADPAGLY
Stsu	Acc-beta	(301)	GAVPVDPRTPYDVREVIAR <mark>I</mark> TDGSRFAEFK <mark>S</mark> EFGQTLVTGFARIHGHPVG
Save	Acc-beta	(294)	GAVPVDSRTPYDVREVIARVVDGSRFAEFKAEFGOTLVTGFARIHGHPVG
Scoe	Acc-beta	(294)	GVVPVDSRTPYDVREVIARVVDGSRFAEFKSEYGOTLVTGFARIHGHPVG
Sgri	Acc-beta	(294)	G <mark>AVPVDS</mark> RTPYDVREVIAR <mark>VV</mark> DGSRF <mark>Q</mark> EFK <mark>AEY</mark> GQTL <mark>I</mark> TGFARIHGHPVG
Ctan	Aga bota	(251)	TUNNETT ENERADVCNUETET COODCTDT FETONTCCEMUCEDVEUCCT
Corro	Acc-Deta	(301)	IVANNGILFAESAQKGAHFIELCDQKGIPLUFLQNISGFMVGRDIEHGGI
Save	Acc-Deta	(344)	IVANNGILFSESAQAGAHFIELCDQAGIPLVFLQNISGFMVGRQIEAGGI
Scoe	Acc-Deta	(344)	IVANNGILFSESAQAGAHFIELCDQAGIPLVFLQNISGFMVGRDIEAGGI
Sgri	ACC-Deta	(344)	IVANNGILF <mark>S</mark> ESAQKGAHFIELCDQRGIPL <mark>V</mark> FLQNISGFMVGRDYEAGGI
Stsu	Acc-beta	(401)	AKHGAKMVTAVACTRVPKLTVV <mark>V</mark> GGSYGAGNYSMCGRAYSPRFLWMWP <mark>N</mark> A
Save	Acc-beta	(394)	AKHGAKMVTAVACTRVPKLTVV <mark>I</mark> GGSYGAGNYSMCGRAYSPRFLWMWP <mark>G</mark> A
Scoe	Acc-beta	(394)	AKHGAKMVTAVACTRVPKLTVV <mark>V</mark> GGSYGAGNYSMCGRAYSPRFLWMWP <mark>N</mark> A
Sgri	Acc-beta	(394)	AKHGAKMVTAVACTRVPKLTVV <mark>V</mark> GGSYGAGNYSMCGRAYSPRFLWMWP <mark>N</mark> A
Stsu	Acc-beta	(451)	KISVMGGEQAASVLATV <mark>R</mark> RDQA <mark>EARGEEWPA</mark> A <mark>EEEAFKAPIRS</mark> RYEEQG <mark>S</mark>
Save	Acc-beta	(444)	KISVMGGEQAASVLATVKRDQLEARGESWPVDDEEAFKDPIRAOYEOOGS
Scoe	Acc-beta	(444)	KISVMGGEQAASVLATVKRDQLE <mark>G</mark> RGEEWPAEEEESFKAPVRAQYEROGN
Sgri	Acc-beta	(444)	KISVMGGEQAASVLATVKRDQLGDDWSAEDEEAFKAPIRAQYETQGN
Stsu	Acc-beta	(501)	AYYATARLWDDGT IDPLETRRVLGLALTVCANAPI.PAKDPSAPCFCVFRM
Save	Acc-beta	(494)	AYYATARLWDDGVIDPLETROVLGLALTACANAPLPOKDYTAPGFGVFRM
Scoe	Acc-beta	(494)	AYYATARLWDDGVIEPADTROVLGLALTACANAPLGEPRFGVFRM
Sgri	Acc-beta	(491)	AYYATARLWDDG <mark>VID</mark> P <mark>VD</mark> TRQVLGLALTACANAPLPOKDPAGPGFGVFRM

Slika 23: Aminokislinska poravnava za proteinske homologe acetil-CoA karboksilaze iz organizmov S. tsukubaensis, S. avermitilis, S. coelicolor in S. griseus

Figure 23: Amino acid sequence alignment of the acetyl-CoA carboxylase protein homologs from *S. tsukubaensis, S. avermitilis, S. coelicolor* and *S. griseus*

Podrobna proteinska analiza z BLASTp in BLAST Conserved domains je pokazala, da se na α -podenoti ACC nahajata dve aktivni domeni, to sta biotin karboksilaza (BC) in biotin karboksil prenašalni protein (BCCP). Medtem ko se na β -podenoti nahaja karboksiltransferazna aktivna domena (CT), ki določa specifičnost do acil-CoA substratov.



Slika 24: Anotacija genske skupine in organizacija encimskega kompleksa acetil-CoA karboksilaze Figure 24: Annotation and organization of gene groups for the acetyl-CoA carboxylase enzyme complex

Organizacija encimskega kompleksa acetil-CoA karboksilaze je bila pri bakteriji *S. coelicolor* (Diacovich in sod., 2004) dobro proučena. Kristalna struktura encima je omogočila proučevanje organizacije kompleksa, povezovanje α in β podenot, natančno določitev domen in njihovih aktivnih mest ter pripomogla pri razlagi specifičnosti CT domene do substrata (Arabolaza in sod., 2010). Rezultati meritev encimske kinetike so pokazali, da encimski kompleks ACC pri svojem delovanju ni ozko specifičen, saj lahko poleg karboksilacije acil-CoA z manjšo učinkovitostjo karboksilira tudi propionil-CoA in butiril-CoA. Dodatno je bilo ugotovljeno, da lahko α -podenota tvori komplekse z različnimi β -podenotami, katerih zapisi se nahajajo v genomu *S. coelicolor*. Te β -podenote pa izkazujejo različno stopnjo specifičnosti do različnih acil-CoA substratov (Diacovich in sod., 2002). Glede na visoko stopnjo podobnosti med ACC kompleksom pri *S. tsukubaensis* in ACC kompleksi, opisanih pri nekaterih streptomicetah (Demirev in sod.,

2010), lahko pričakujemo podobno nespecifično delovanje tudi pri identificiranih homologih.

Druga poznana pot biosinteze malonil-CoA je direktna kondenzacija malonata in CoA s pomočjo encima malonil-CoA sintetaze (MCS). Ta pot je bila odkrita pri bakteriji *Rhizobium trifolii*, ki lahko zunajcelični malonat v celico prenese s pomočjo specifičnega transporterja. Malonat se nato aktiviran s pomočjo ATP odvisne malonil-CoA sintetaze v malonil-CoA (An in Kim, 1998). Homolog encima malonil-CoA sintetaze (MCS), ki ga kodira gen *matB*, so kasneje našli tudi pri bakteriji *S. coelicolor* (Hughes in Keatinge-Clay, 2011). Podrobnejša karakterizacija tega encima je pokazala, da MCS ne deluje specifično le na malonat, ampak lahko katalizira nastanek številnih na CoA vezanih podaljševalnih enot, kot so metilmalonil-CoA, etilmalonil-CoA, metoksimalonil-CoA in hidroksimalonil-CoA. Izoliran encim je *in vitro* pokazal tudi sposobnost sinteze podaljševalnih enot vezanih na (N-acetilcisteamin) SNAC, sintetičnen analog CoA (Hughes in Keatinge-Clay, 2011).

Prisotnost morebitnih homologov MCS smo preverili tudi v genomu *S. tsukubaensis*. Rezultati bioinformatične analize s programom BLASTp so pokazali prisotnost verjetnega proteinskega homologa MCS. Proteinska sekvenca homolga kaže 71 % identičnost in 80 % podobnost z malonil-CoA sintetazo iz *S. coelicolor*. Predviden gen *matB*, ki kodira malonil-CoA sintetazo je dolg 1578 bp, začne se s start kodonom GTG in konča s TGA.

Preglednica 14: Identifikacija proteinskega homologa encima malonil-CoA sintetaza

Table 14: Identified protein homolog of malonyl-CoA synth	ietase
-----------------------------------------------------------	--------

Gen	Predlagana funkcija	Dolžina (ak)	Najbližji proteinski homolog	Identičnost / podobnost
matB	malonil-CoA	525	acil-CoAsintetaza	74/82
WP_006349443.1	sintetaza		Streptomyces avermitilis	
	EC 6.2.1.n3		WP_010987125.1	

4.2.2 Biosinteza metilmalonil-CoA

(2S)-metilmalonil-CoA, pogosto uporabljena gradbena enota za sintezo poliketidov, nastaja kot produkt številnih metabolnih poti. Glavne metabolne poti, ki vodijo do nastanka (2S)-metilmalonil-CoA so: (i) karboksilacija propionil-CoA, (ii) preureditev in epimerizacija sukcinil-CoA, (iii) katabolizem valina in (iv) večstopenjska pretvorba acetoacetil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA preko krotonil-CoA odvisne metabolne poti. V večini od naštetih poti se kot ključen intermediat pojavlja propionil-CoA, ki nastaja pri katabolizmu valina, izoleucina, treionina, metionina in razgradnji maščobnih kislin z lihim številom C atomov (Poglavje 2.4.2).

Pri naši raziskavi smo v genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488 s pomočjo analize BLAST in storitve RAST (Aziz in sod., 2008) iskali zapise za ključne proteinske homologe, ki v poznanih metabolnih poteh nastanka (2S)-metilmalonil-CoA sodelujejo. Identifikacija ključnih encimov metabolnih poti je omogočila rekonstrukcijo metabolizma nastanka metilmalonil-CoA.



Slika 25: Predvidene metabolne poti za sintezo metilmalonil-CoA (Chan in sod., 2009) Figure 25: Proposed metabolic pathway for biosynthesis of methylmalonyl-CoA (Chan et al., 2009)

Karboksilacijo propionil-CoA in nastanke (2S)-metilmalonil-CoA katalizira encim propionil-CoA karboksilaza (PCC) EC: 6.4.1.3. Encim je podobno kot acetil-CoA karboksilaza (ACC) sestavljen iz α in β podenote, pri čemer je α -podenota skupna ACC in PCC kompleksu. β -podenota, na kateri se nahaja karboksiltransferazna domena (CT), pa določa afiniteto do substrata in s tem specifičnost delovanja encima PCC (Diacovich in sod., 2004). Preglednica 15: Identificirani proteinski homolog propionil-CoA karboksilaze, ki sodeluje pri sintezi metilmalonil-CoA

Table 15: Identified homolog proteins of propionyl-CoA carboxylase involved in the synthesis of methylmalonyl-CoA

Gen	Dolžina (ak)	Proteinski homolog	Identičnost / podobnost/ E-vrednost	Predlagana funkcija
<i>pccB</i> 2527 EIF92093	531 CT	propionil-CoA karboksilaza (beta podenota [Streptomyces clavuligerus] EFG08906	93 %//94 % E<1e ⁻¹⁷⁰	propionil-CoA karboksilaza (beta podenota (EC 6.4.1.3) / EIF92093

Analiza genoma *S. tsukubaensis* z tBLASTn je pokazala, da se zapis za β -podenoto propionil-CoA karboksilaze nahaja na 1596 bp velikem genu *pccB*, ki se začne z začetnim kodonom ATG in konča s stop kodonom TGA. Proteinska sekvenca homolga kaže 89 % identičnost in 93 % podobnost z propionil-CoA karboksilazo iz *S. coelicolor* (NP_629079).

Preglednica 16: Identificirani proteinski homologi alternativnih metabolnih poti sinteze metilmalonil-CoA

Encim	Podenota	Reakcija			GenBank	Dolžina
					oznaka	proteina (ak
propionil-CoA	β (PCCB)	propionil-CoA	=>	(S)-	EIF92761	527
karboksilaza				metilmalonil	EIF92093	531
EC: 6.4.1.3				-CoA		
matilmalanil Ca A		(R)-	<=>	sukcinil-	EIF94243	528
metilmaionii-CoA		metilmalonil-		CoA	EIF92071	531
mutaza	α	CoA			EIF88239	733
EC: 5.4.99.2	β				EIF88240	636
metilmalonil-CoA		(R)-	<=>	(S)-	EIF92570	142
epimeraza		metilmalonil-		metilmalonil		
EC: 5.1.99.1		CoA		-CoA		
izobutiril-CoA	α	izobutiril			EIF92591	566
mutase	β	CoA	<=>	butiril -CoA	EIF91987	139
EC 5.4.99.13		COA				
metilmalonil-CoA		(S)-	<=>	propionil-	EIF92761	527
karboksiltransferaza		metilmalonil-		CoA +		
EC 2.1.3.1		CoA + piruvat		oksalacetat		

Table 16: Identified homolog proteins involved in alternative pathways for synthesis of methylmalonyl-CoA

Nekateri poznani encimi, ki sodelujejo pri nastanku (2S)-metilmalonil-CoA in jih v sekvenci genoma *S. tsukubaensis* spomočjo analize BLAST nismo uspeli identificirati so predstavljeni v preglednici 17.

Preglednica 17: Odsotnost iskanih metabolnih poti oz. proteinskih homologov v genomu S. tsukubaensis za biosintezo metilmalonil-CoA

Table 17: The absence of some metabolic pathways or protein homologues for biosynthesis of methylmalonyl-CoA in the genome of *S. tsukubaensis*

Encim		Reakcija		
(S)-metilmalonil-	ni prisoten	(S)-metilmalonil-	<=>	metilmalonat
EC 3.1.2.17		COA		
metilmalonil-CoA	ni prisoten	(S)-metilmalonil-	<=>	propionil-CoA
dekarboksilaza		CoA		
EC 4.1.1.41				

4.2.3 Biosinteza metoksimalonil-ACP

Nastanek gradbene enote metoksimalonil-ACP je pri biosintezi FK520, produktu bakterije *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (Wu in sod., 2000) in biosintezi FK506, produktu bakterije *S. tsukubaensis* NRRL18488 (Goranovič in sod., 2010) že dobro proučen. Pri sintezi te gradbene enote sodelujeje skupina proteinov FkbG, FkbH, FkbI, FkbJ in FkbK, katerih geni se običajno nahajajo znotraj genske skupine za biosintezo določenega metabolita. Začetni substrat za to biosintezno pot je 1,3-bifosfoglicerat.



Slika 26: Shematski prikaz biosinteze gradbene enote metoksimalonil-ACP iz intermediatov primarnega metabolizma

Figure 26: Schematic representation of biosynthesis for metoksimalonil-ACP building block intermediates of primary metabolism

S pomočjo algoritma BLAST, smo v sekvenci genoma *S. tsukubaensis* NRRL18488 poleg poznanih genov, ki se nahajajo v genski skupini FK506, identificirali prisotnost še dodatne skupine genov, predvidoma odgovorne za biosintezo podaljševalne enote metoksimalonil-ACP, ki se nahaja v neposredni bližini PKS biosinteznih genov za sekundarni metabolit *St*-PKS2 (Poglavje 4.3.1). V nukleotidnem zaporedju identificirane regije smo zato natančno določili predvidene odprte bralne okvirje in jih analizirali s pomočjo programa FramePlot 4.0 beta (Ishikawa in Hotta, 1999). Domnevne funkcije genov smo določili s pomočjo analize BLASTp in s programskim orodjem za iskanje ohranjenih proteinskih domen (Conserved Domain Search na strani NCBI).



Slika 27: Primerjeva organizacije metoksimalonil regije za biosintezo podaljševalne enote metoksimalonil-ACP pri genski skupini FK506 in *St*-PKS2.

Figure 27: Comparison of organization FK506 and *St*-PKS2 gen regions for biosynthesis of extender unit methoxymalonyl-CoA.

Identificirana metoksimalonilna regija (Slika 27) se nahaja na 121146 bp dolgem nukleotidnem zaporedju soseske newbler- contig00001, ki smo ga shranili v podatkovni bazi GenBank pod oznako JX081656.

Preglednica 18: Organizacija in vloga genov metoksimalonilne regije znotraj genske gruče za biosintezo FK506

Ime gena	GenBank oznaka	Dolžina proteina (ak)	Predvidena funkcija gena	Vlog pri sintezi metoksimalonil- ACP
fkbG	EIF88204	222	O-metiltransferaza	hidroksimalonil-CoA \rightarrow
				metoksimalonil-CoA
fkbH	EIF88203	362	haloacid dehalogenase-hidrolaza	vezava substrata 1,3-bPG
fkbI	EIF88202	366	acil-CoA dehidrogenaza	3-okso-2-hidroksipropionil-CoA \rightarrow
				hidroksimalonil-CoA
fkbJ	EIF88201	86	ACP	prenos intermediata
fkbK	EIF88200	292	3-hidroksiacil dehidrogenaza	gliceril-ACP \rightarrow 3-okso-2-
				hidroksipropionil-CoA

Table 18: Organization and the role of genes in methylmalonyl region within FK506 gene cluster

Rezultate, ki smo jih pridobili med podrobno anotacijo 4 kb dolgega nukleotidnega zaporedja skupine genov, ki predvidoma sodelujejo pri sintezi metoksimalonil-ACP znotraj *St*-PKS2 so predstavljeni v preglednici 19. Prav tako smo naredili primerjavo novo identificiranih genov z znanimi homologi, ki sodelujejo pri sintezi metoksimalonil-ACP znotraj genske skupine FK506 (Goranovič in sod., 2010) (Preglednica 19).

Preglednica 19: Organizacija metoksimalonilne skupine genov v genski gruči za biosintezo *St*-PKS2 in primerjava z homologi iz FK506

Table 19: Organization of genes in methylmalonyl region in *St*-PKS2 gene cluster and comparison to homologues in FK506 gene cluster

Ime gena	Predvidena funkcija gena	Kodon start	Kodon stop	Dolžina proteina	Homologija s proteini za sintezo metoksimalonil-ACP pri FK506		
				(ak)	Identičnost	Podobnost	E-vrednost
orfG2	homolog gena fkbG	ATG	TGA	220	62 %	71 %	$2e^{-88}$
orfH2	homolog gena fkbH	GTG	TGA	361	68 %	79 %	$2e^{-172}$
orfI2	homolog gena fkbI	GTG	TGA	371	68 %	77 %	$6e^{-153}$
orfJ2	homolog gena fkbJ	ATG	TGA	93	56 %	70 %	6e ⁻²⁹
orfK2	homolog gena <i>fkbK</i>	GTG	TGA	268	65 %	74 %	3e ⁻¹¹¹

4.2.4 Biosinteza L-pipekolne kisline

Pri biosintezi FK506 in FK520 se kot zaključna enota v poliketidno verigo vgradi Lpipekolna kislina. Sinteza pipekolne kisline poteka s pomočjo encima FkbL, ki deluje kot lizin ciklodeaminaza in katalizira direktno pretvorbo aminokisline L-lizin v L-pipekolno kislino. Gen za encim FkbL je bil v genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488 že identificiran, nahaja se med skupino genov za biosintezo podaljševalne enote metoksimalonil-ACP in biosinteznimi PKS geni (Goranovič in sod., 2010). Sinteza L-pipekolne kisline je preko biosinteze aminokisline L-lizina povezana s primarnim metabolizmom.



Slika 28: Prikaz poteka metabolne poti za biosintezo pipekolne kisline preko nastanka aminokisline L-lizin Figure 28: Metabolic pathways for the biosynthesis of pipecolic acid via L-lysine intermediate

Biosinteza L-lizina se v streptomicetah začne iz oksaloacetata, intermediata CCK, ki se s pomočjo transaminacije pretvori v asparaginsko kislino. Naprej poteka sinteza preko aspartata, 4-aspartilfosfata, aspartat 4-semialdehida, di- in tetrahidropikolinata, ki se nato veže na še eno molekulo sukcinata, da nastane N-sukcinil-L-2-amino-6-oksopimelat. Temu koraku sledita reakciji transaminacije in desukcinilacije, kjer nastane intermediat 2,6-diaminopimelat, ki se karboksilira do L-lizina.

Rezultati identifikacije genskih homologov v genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488, ki so predvidoma udeleženi pri oskrbi s pipekolno kislino, so prikazani v preglednici 28. Identificirani genski homologi lahko predvidoma v bakteriji omogočajo funkcionalno metabolno pot biosinteze L-lizina z mehanizmom sukcinilacije (McCoy in sod., 2006) in preko diaminopimelatnega (DAP) intermediata (Dairi in sod., 2011).

Preglednica 20: Rezultati analize encimov udeleženih pri biosintezi pipekolata identificiranih v genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488

Table 20: The results of the analysis of enzymes involved in the biosynthesis of pipecolate in *S. tsukubaensis* NRRL18488 genom

Encim	Sinteza		GenBank oznaka	Dolžina proteina (ak)	
	oksaloa	retat		proteina (ak)	
aspartat aminotransfe	era7a		EIF91871	408	
(FC 2 6 1 1)	i uzu	1	EIF91299	413	
(LC 2.0.1.1)		↓	EIF89052	271	
	asj	oartat	En 07032	271	
aspartat kinaza			EIF91452	423	
(EC 2.7.2.4)		↓			
	4-aspartil f	osfat		•	
aspartat-semialdehid	dehidrogenaza	1	EIF89749	344	
(EC 1.2.1.11)	U	\downarrow	EIF91451	402	
L-	aspartat 4-semial	dehid		•	
dihidrodipikolinat sir	itaza	1	EIF92932	299	
(EC 4.3.3.7)		↓	EIF94033	310	
	(2S,4S)-4-hidr	oksi-		•	
2,3,4,	5-tetrahidrodipiko	olinat			
dihidrodipikolinat rec	luktaza	1	EIF92937	257	
(EC 1.17.1.8)					
L-2,3,4,	5-tetrahidrodipiko	olinat		•	•
2,3,4,5-tetrahidropiridin-2,6-			EIF89096	329	
dikarboksilat N-sukc	iniltransferaza				
(EC 2.3.1.117)					
N-sukcinil-L-2	2-amino-6-oksopi	melat			
N-sukcinildiaminopin	melat		EIF92321	386	
aminotransferaza					
(EC 2.6.1.17)		¥			
N-Sukcinil-I	LL-2,6-diaminopi	nelat			
sukcinil-diaminopime	elate		EIF92335	359	
desukcinilaza					
(EC 3.5.1.18)		•			
I	LL-2,6-diaminopi	melat			
diaminopimelat epim	eraza		EIF92974	317	
(EC 5.1.1.7)		↓			
me	so-2,6-diaminopi	melat			
diaminopimelat deka	rboksilaza		EIF87974	439	
(EC 4.1.1.20)			EIF88142	450	
		↓	EIF90174	446	
			EIF92527	463	
	L	lizin		1	1
lizin ciklodeaminaza			ADU56320	345	
(EC 4.3.1.28)		↓			
	pipekolna k	islina			

4.2.5 Biosinteza dihidroksicikloheksenil karboksilne kisline (DHCHC)

4,5-dihidrocikloheks-1-enilkarboksilna kislina (DHCHC) je začetna enota biosinteze FK506 in FK520. Sinteza DHCHC poteka preko korizmata, intermediata šikimatne poti, ki

povezuje glikolizo in pentoza fosfatno pot z biosintezo aromatskih aminokislin L-tirozina, L-triptofana in L-fenilalanina (Lowden in sod., 2001). V prvem koraku šikimatne poti encim DAHP (3-deoksi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat) sintaza združi fosfoenolpiruvat, intermediat glikolize in D-eritrozo-4-fosfat, intermediat pentoza fosfatne poti. Tej reakciji sledi serija šestih encimskih reakcij, s pomočjo katerih preko šikimata nastane korizmat.

Rezultati identifikacije genskih homologov v genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488, ki so predvidoma udeleženi pri nastanku 4,5-dihidrocikloheks-1-enilkarboksilne kisline so prikazani v preglednici 17. Seznam identificiranih genskih homologov je potrdil prisotnost vseh encimov, ki v bakteriji predvidoma omogočajo funkcionalno metabolno pot biosinteze DHCHC.

Encim	Substrat	Produkt	Ime in oznaka gena	Dolžina proteina (ak)
3-deoksi-7-fosfo- heptulonat sintaza EC: 2.5.1.54	D-eritroza-4-fosfat + fosfoenolpiruvat	3-deoksi-D-arabino- heptulosonat-7-fosfat (DAHP)	<i>aroH</i> (EIF89271)	448
3-dehidrokinat sintaza EC: 4.2.3.4	3-deoksi-D-arabino- heptulosonat-7-fosfat (DAHP)	3- dehidrokinat	<i>aroB</i> (EIF88702)	363
3-dehidrokinat dehidrataza EC: 4.2.1.10	3- dehidrokinat	3-dehidrošikimat	<i>aroQ</i> (EIF88703)	146
šikimate 5- dehidrogenaza EC: 1.1.1.25	3- dehidrošikimat	šikimat	<i>aroE</i> (EIF88699)	295
šikimat kinaza EC: 2.7.1.71	šikimat	šikimat 3-fosfat	<i>aroK</i> (EIF88701)	173
3-fosfošikimat 1- carboxyvinyltransferase EC: 2.5.1.19	šikimat 3-fosfat + fosfoenolpiruvat	5-O-(1- karboksivinil)-3- fosfošikimat	<i>aroA</i> (EIF92404)	450
korizmat sintaza EC: 4.2.3.5	5-O-(1-Carboxyvinyl)- 3-fosfošikimat	korizmat	<i>aroF</i> (EIF88700)	394
korizmat hidrolaza	korizmat	piruvat + 4,5- dihidroksicikloheksan karboksilna kislina	<i>fkbO</i> (AFD22865)	344

Preglednica 21: Encimi udeleženi pri oskrbi začetne enote (DHCHC) za biosintezo FK506

Table 21: Enzymes	involved in	provision	of starter un	nit (DHCHC)	for biosynthesis	of FK506
-------------------	-------------	-----------	---------------	-------------	------------------	----------

4.3 ANOTACIJA SEKUNDARNIH METABOLITOV

Sekvenciranje genoma *S. tsukubaensis* nam je omogočilo vpogled in poskus razumevanja metabolnega potenciala celotnega sekundarnega metabolizma proučevanega organizma. Bogat sekundarni metabolizem streptomicet je v mnogih pogledih poseben in specifičen, zato standardna bioinformacijska orodja za takšno analizo niso primerna. Pri našem delu

identifikacije in anotacije genskih gruč novih sekundarnih metabolitov smo zato uporabljali posebej razvit in prilagojen programski paket Cluster Scanner (»ClustScan«) (Zucko in sod., 2012). Programsko orodje je bilo razvito s strani raziskovalne skupine prof. dr. Daslava Hranuelija iz Prehrambeno biotehnološki fakultet Univerze v Zagrebu. V raziskovalnem sklopu združevanja očitkov sekvenciranja v soseske, filogenetske analize genskih gruč in napovedi kemijske strukture novih sekundarnih metabolitov sem sodeloval z raziskovalcema dr. Jurica Žučko in dr. Antonio Starčević, ki sta pripomogla k razvoju in nadgradnji programskega paketa ClustScan. Omenjeni rezultati zato v tem doktorskem delu niso prikazani, so pa objavljeni v skupni znanstveni publikaciji (Blažič in sod., 2012).

Za identifikacijo potencialnih modularnih PKS in NRPS genskih skupin, smo pridobljeno DNA sekvenco genoma S. tsukubaensis (Poglavje 4.1), v vseh šestih bralnih okvirjih, prevedli v aminokislinsko sekvenco. S programskim paketom HMMER smo nato iskali visoko ohranjene domene PKS in NRPS modulov (KS in C domene). Našli smo 60 predvidenih KS domen (PKS) in 46 predvidenih C domen (NRPS). Pri tem nismo upoštevali domen, ki so se nahajale na koncih sestavljenih sosesk in zato njihova sekvenca ni bila popolna. Zaradi velikosti modularno organiziranih PKS in NRPS genskih skupin, so se KS oz. C domene posameznega gena pogosto nahajale na več ločenih soseskah. Prisotnost C domen (NRPS) smo potrdili na 13 oz. 20 soseskah, KS domene (PKS) pa smo potrdili na 16 oz. 19 soseskah, odvisno od uporabljene metode združevanja sekvenc v soseske (Newbler oz. MIRA3). Soseske, na katerih smo identificirali KS oz. C domene, smo nato s pomočjo analize filogenetskih dreves razporedili v posamezne predvidene genske skupine. Glede na prejšnje objavljene analize (Jenke-Kodama in sod., 2006) je znano, da so si domene iz posamezne PKS ali NRPS genske skupine, zaradi evolucijskih mehanizmov nastanka, sorodnejše med seboj kot pa z domenami drugih genskih skupin (Zucko in sod., 2012). V filogenetski analizi smo primerjali KS in C domene identificirane v genomu S. tsukubaensis z domenami iz 36 PKS in 21 NRPS genskih skupin, ki so dobro karakterizirane in se nahajajo v javni podatkovni bazi ClustScan DataBase (http://bioserv.pbf.hr/cms/). Filogenetska analiza je pokazala, da so domene, ki se nahajajo na isti soseski, praviloma združujejo skupaj v gruče tudi na filogenetskem drevesu. V primerih, kjer so genske skupine za PKS ali NRPS razdrobljene na več sosesk, smo lahko le-te s pomočjo filogenetske analize združili v gruče in predpostavili njihovo povezavo (Blažič in sod., 2012). S pomočjo takšne analize smo uspeli v genomu S. tsukubaensis NRRL 18488 predvideti 4 PKS (FK506 in St-PKS2-4) in 6 NRPS (St-NRPS1-6) genske skupine.

Preglednica 22: V genomu *S. tsukubaensis* NRRL18488 identificirane PKS in NRPS modularne genske skupine na soseskah sestavljenih s pomočjo Newbler in MIRA 3 (Blažič in sod., 2012)

	Newbler		MIRA 3	
Genske skupine	Število sosesk	Število modulov	Število sosesk	Število modulov
PKS geni				
FK506	5	10	1	9
St-PKS2	2	11	3	12
St-PKS3	10	12	10	15
St-PKS4	3	5	3	5
NRPS geni				
St-NRPS1	1	21	1	21
St-NRPS2	1	6	6	6
St-NRPS3	3	3	3	3
St-NRPS4	3	6	3	6
St-NRPS5	2	3	2	3
St-NRPS6	3	5	5	5

Table 22: PKS and NRPS modular gene groups identified in *S. tsukubaensis* NRRL18488 genome showing the distribution between the Newbler and MIRA 3 contigs (Blažič et al., 2012)

Soseske, ki so vsebovale KS in C domene, smo podrobneje analizirali s pomočjo programskega paketa ClustScan (Starcevic in sod., 2008). Program omogoča anotacijo DNA zaporedja, ki kodira zapis za PKS ali NRPS sisteme, podrobno analizo modularne organizacije teh genov ter na podlagi prisotnosti in specifičnosti katalitičnih domen lahko predvidi strukturo novih sekundarnih metabolitov. S programom smo analizirali 4 PKS (FK506 in *St*-PKS2-4) in 6 NRPS (*St*-NRPS1-6) genskih skupin in kjer je bilo mogoče, predvideli modularno organiziranost in identificirali tudi ostale prisotne domene (AT, KR, DH, ER, ACP). Analiza je prav tako pokazala, da so genske gruče *St*-PKS2, *St*-PKS3 in *St*-PKS4 po svoji organizaciji podobne konkanamicinu A, lasalocidu in nigericinu ter da so *St*-NRPS1, *St*-NRPS2 in *St*-NRPS4, *St*-NRPS5 in *St*-NRPS6 genske skupine pa ni bilo mogoče najti podobnosti z drugimi NRPS za biosintezo poznanih produktov.

4.3.1 Podrobnejša analiza genske skupine St-PKS2

Filogenetska analiza domen in analiza organizacije in specifičnosti modulov je pokazala, da je genska skupina *St*-PKS2 podobna organizaciji genske skupine za sintezo konkanamicina A (Haydock in sod., 2005) predvidena struktura makrocikličnega obroča pa nakazuje podobnost s konkanamicinu sorodnim bafilomicinom (Werner in sod., 1984). Izvedli smo anotacijo genske skupine za sintezo sekundarnega metabolita *St*-PKS2 in

identificirali pet biosinteznih genov, ki kodirajo PKS. Te gene (označeni s *St*-PKS2 gen1-5) smo analizirali s programskim paketom ClustScan in določili prisotnost PKS domen, njihovo katalitično aktivnost, substratno in kiralno specifičnost ter modularno organizacijo genov. Biosintezni geni za *St*-PKS2 vsebujejo skupaj 11 modulov, v katerih se nahaja skupaj predvidoma 51 aktivnih katalitičnih domen.

Rewbler_con	ntig00001 🖾											
Annotation edito	r: newbler_contig00	001									[
				10								
	ili.	0		- U								
	<u>1</u> 0000	L20000	L <u>3</u> 0000	<u>40000</u>	<u>50000</u>	<u>6</u> 0000	70000_1	80000	1 <u>9</u> 0000	<u>1</u> 00000	<u>110000</u>	120000
<u>1</u> 21146	<u>1</u> 11146 <u>1</u> 1	101146 <u>ل</u>	<u>9</u> 1146	<u>18</u> 1146	<u>1146 </u>	<u>6</u> 1146	51146	<u>4</u> 1146	<u>3</u> 1146	<u>1146ع</u>	<u>L</u> 1146	<u>L</u> 146
					_							
					In							

Slika 29: Predvidena organizacija genske skupine *St*-PKS2 (analiza s programom ClustScan) Figure 29: Predicted organization of the *St*-PKS2 genetic group (analysis with ClustScan program)

St-PKS2 gen 1 M0 M1 M2 M3 AT ACP KS AT ACP KS AT ACP

Začetni mod	lul (M0)
- DKO AT	

PKS_AT		PKS_ACP	
 Domain properties 	6	▼ Domain properties	
DNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates: Score:	106254107217 (963 pb) Reverse 1 46434964 (321 aa) 423.28	DNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates:	105876106071 (195 pb) Reverse 1 50255090 (65 aa)
E-value:	3.8021E-128	Score:	53.545
Specificity:	Prediction: non-predictable	E-value: Specificity:	7.60936E-17

Modul 1 (M1)

PKS_KS	PKS_AT	• PKS_KR	PKS_ACP
Domain properties [NA coordinates: 104526105795 (1259 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 51175540 (423 ea) Score: 1060.27 E-value: 0.0 Specificity:	Domain properties DNA coordnates: 103272104220 (948 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordnates: 56425958 (316 aa) Score: 481.02 E-value: 1.57959E-145 Specificity: Prediction: methylmalonyl		▼ Domain properties DNA coordinates: 101238101439 (201 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 6559.6636 (67 aa) Score: 65.926 E-value: 1.42658E-20 Specificity: 1.42658E-20

Modul 2 (M2)

PKS_KS	PKS_AT	• PKS_KR	PKS_ACP
▼ Domain properties <u>DNA coordinates:</u> 99852101127 (1275 pk) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 66737098 (425 aa) Score: 1058.52 E-value: 0.0 Specficity:	▼ Domain properties DNA coordinates: 9850299504 Protein frame: Reverse 1 Proten coordinates: 72147548 (3) Score: 230.239 E-value: 4.910786:70 Specificity: Prediction: make	▼ Demain properties 0002 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 9721597716 (501 pb) Protein coordinates: 9207777 (167 co) # aa) Score: 263.737 E-value: 4.04011E-00 Activity: Ø.Active type Specificity: Md Specificity:	Domoin preperties DNA coordinates: 9665496055 (201 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 80978164 (67 aa) Score: 58.275 E-valuer: 2.86732E-18 Specificity:

Modul 3 (M3)

• PKS_KS		PKS_AT		• PKS_ACP	
* Domain properties		▼ Domain properties		* Domain properties	
DNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates:	9528996570 (1281 pb) Reverse 1 8192. 8619 (427 aa)	DNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates:	9401194965 (954 pb) Reverse 1 8727 9045 (318 aa)	DNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates:	9353193732 (201 pb) Reverse 1 91389205 (67 aa)
Score:	1044.41	Score:	465.555	Score:	55.583
E-value: Specificity:	0.0	E-value: Specificity:	7.14468E-141 Prediction: <u>ethylmalonyl</u>	E-value: Specificity:	1.85289E-17

Slika 30: Podrobna analiza modularne organizacije gena 1 genske skupine St-PKS2 (analiza s programom ClustScan)

Figure 30: Detailed analysis of modular organization gene 1 of *St*-PKS2 genetic group (analysis with ClustScan program)

St-PKS2 gen 2						
M4	M5	M6				
KS AT KR ACP KS	AT KR ACP	KS AT	DH KR A	CP		
Modul 4 (M4)						
• PKS_KS	PKS_AT		• PKS_KR		• PKS_ACP	
▼ Domain properties	▼ Domain properties		Domain properties	s	▼ Domain properties	
DNA coordinates: 9186393135 (1272 pb) Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 93359759 (424 aa) Score: 1075.8 E-value: 0.0 Specificity:	DNA coordinates: 9057691 Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 9666101 Score: 454.989 E-value: 1.0831E-1 Specificity: Prediction	1542 (966 pb) 3 188 (322 aa) 137 :: <u>methylmalonyl</u>	DNA coordinates: Protein coordinates: Score: E-value: Activity: Specificity:	8911289613 (501 pb) Reverse 3 1050510676 (167 aa) 263.711 4.121730-00 Chirality of Mei S Chirality of Mei S Chirality of Ofiti S	DNA coordinates: 8 Protein frame: R Protein coordinates: 11 Score: 6 E-value: 4 Specificity:	353988740 (201 pb) everse 3 180010867 (67 aa) 4.254 54589E-20
Modul 5 (M5) • PKS_KS	• PKS_AT		• PKS_KR		• PKS_ACP	
Domain properties	 Domain properties 		▼ Domain propertie	s	▼ Domain properties	
DNA coordinates: 8717788452 (1275 pb) Probein frame: Reverse 3 Probein coordinates: 1089611321 (425 aa) Score: 1086.89 E-value: 0.0 Specificity:	DNA coordinates: 858878 Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 114301 Score: 431.683 E-value: 1.12324E Specificity: Prediction	6850 (963 pb) 3 1751 (321 aa) -130 h: <u>ethylmalonyl</u>	CNA coordinates: Protein frame: Protein coordinates: Score: E-valuo: Activity: Soecilicity:	0++2904927 (+98 pb) Reverse 3 : 1207112237 (166 aa) 309.535 6.61228E-04 IV Active Chiraity of Me: R Chiraity of Me: R	DNA coordinates: 8 Protein frame: R Protein coordinates: 1 Score: 6 E-value: 2 Specificity:	387184072 (201 pb) everse 3 235612423 (67 aa) 8.653 .1547E-21
Modul 6 (M6)	• PKS AT		PKS_DH		• PKS_KR	

PKS_KS	PKS_AT	• PKS_DH	PKS_KR
▼ Domain properties DNA coordinates: 8249783772 (1275 pb) Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 1245612881 (425 aa) Score: 1106.39 E-value: 0.0 Specificity:	▼ Domain properties DNA coordinates: 8117482140 (966 pb) Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 1300013322 (322 aa) Score: 211.509 E-value: 2.13524E-64 Specificity: Prediction: malonyl	Domain properties <u>DNA coordinates:</u> 8053581051 (516 pb) Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 1336313535 (172 ae) Score: 290.062 E-value: 4.01542E-88 Activety: Active Specificity:	✓ Domain properties <u>DNA coordinates:</u> 7906579566 (501 pb) Protein frame: Reverse 3 Protein coordinates: 1395814025 (167 as) Score: 320.508 E-value: 3.29215E-97 Activity:
PKS_ACP			
Domain properties			
DNA coordinates: 7849278693 (201 pb) Protein frame: Reverse 3			

Slika 31: Podrobna analiza modularne organizacije gena 2 genske skupine St-PKS2 (analiza s programom ClustScan)

Protein coordinates: 14149..14216 (67 aa) 73.786

6.14048E-23

Score:

E-value: Specificity:

Figure 31: Detailed analysis of modular organization gene 2 of St-PKS2 genetic group (analysis with ClustScan program)

St-PKS2 gen 3



Modul 7 (M7)

PKS_KS	PKS_AT	PKS_DH	• PKS_KR
• Domain properties DNA coordinates: 7680678081 (1275 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1435514780 (425 aa) Score: 1086.54 E-value: 0.0 Specificity: • PKS_ACP	Domain properties DNA coordinates: 7549576455 (960 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1489715217 (320 aa) Score: 488.223 E-value: 1.07208E-147 Specificity: Prediction: methylmalcny	▼ Domain properties CNA coordinates: 7400275369 (567 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1525915448 (189 ae) Scoree: 295.678 E-value: 9.81882E-90 Activity: ♥ Active Specificity:	▼ Domain properties DNA coordinates: 7338673887 (501 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1575315920 (167 aa) Score: 321.165 E-value: 2.05912E-97 Activity: ✓ Active Specificity: Chirality of Mer.R Chirality of OH: R
* Domain properties			
DNA coordinates: 72822.73023 (201 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1604116108 (67 aa) Score: 64.592 E-value: 3.59641E-20			

Modul 8 (M8)

Specificity:

PKS_KS	PKS_AT	• PKS_DH	PKS_ER
▼ Domain properties <u>DNA coordinates:</u> 7143372711 (1278 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1614516571 (426 aa) Scorre: 1096.01 E-value: 0.0 Specificity:	Domain properties DNA coordinates: 7017371121 (948 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1667516991 (316 aa) Score: 466.579 E-value: 3.51344E-141 Specificity: Prediction: methylmalorud	Comain properties <u>DNA coordinates:</u> 5952870050 (522 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 170217206 (174 aa) Score: 272.633 E-value: 8.49749€.83 Active Specificity: @ Active Specificity: Actively probability: 80%	
PKS_KR Domain properties DNA coordinates; 5711667617 (501 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordinates: 1794318010 (167 aa) Score: 306.109 E-value: 7.11239E-93 Active; Active Specificity: Charakty of Me: R	PKS_ACP Domain properties DNA coordnates: 6659466795 (201 pb) Protein frame: Reverse 1 Protein coordnates: 1811718184 (67 aa) Score: 71.132 E-value: 3.86486E-22 Specificity:		

Slika 32: Podrobna analiza modularne organizacije gena 3 genske skupine St-PKS2 (analiza s programom ClustScan)

Figure 32: Detailed analysis of modular organization gene 3 of *St*-PKS2 genetic group (analysis with ClustScan program)

St-PKS2 gen 4



Modul 9 (M9)

• PKS_KS		• PKS_AT		PKS_KR		• PKS_ACP	
Domain proper DNA coordinates Protein frame:	ties <u>5</u> 6490866162 (1254 pb) Reverse 3	Domain properties DNA coordinates: Protein frame:	s 6354664509 (963 pb) Reverse 3	Domain properties <u>DNA coordinates</u> Protein frames Protein coordinatess	s 6209162589 (498 pb) Reverse 3 1951719583 (166 aa)	Domain properties DNA coordinates: Protein frame:	6151261713 (201 pb) Reverse 3
Protein coordinal	tes: 1832618744 (418 aa)	Protein coordinates:	1887719198 (321 aa)	Score :	236.512	Protein coordinates:	1980919876 (67 aa)
Score:	1048.34	Score:	486.06	E-value:	6.35032E-72	Score:	68.898
E-value:	0.0	E-value:	4.80133E-147	Activity:	Active	E-value:	1.81818E-21
Specificity:		Specificity:	Prediction: methylmalonyl	Specificity:	Chirality of Me: 5	Specificity:	

Modul 10 (M10)

▼ Domain properties

Score:

E-value:

Specificity:

PKS_KS	PKS_AT		• PKS_DH		• PKS_KR	
▼ Domain properties <u>DNA coordinates:</u> Protein frame: Protein coordinates: 1990520329 (424 aa) Score: 1090.83 E-value: 0.0 Specificity: E-value: 0.0 Specificity:	Domain properties DNA coordinates: Protein frame: Protein frame: Score: E-value: Specificity:	5889959047 (948 pb) Reverse 3 2043120747 (316 aa) 442.193 7.70274E-134 Prediction: <u>methylmalonyl</u>	 Domain propertie DNA coordnates: Protein frame: Protein coordnates: Score: E-value: Activity: Specificity: 	5825756779 (522 pb) Reverse 3 2070720961 (174 os) 276.476 7.40179E-05 T Active	Domain propertie <u>DNA coordinates:</u> Protein frame: Protein coordinates: Soure: E-value: Activity: Specificity:	5678457285 (501 pb) Reverse 3 2128521452 (167 ea) 320.103 4.12391E-97 © Active Chirality of Mer. R Chirality of Ott: R

St-PKS2 gen 5



 DNA ccordinates:
 56223..56424 (201 pb)

 Protein frame:
 Reverse 3

 Protein coordinates:
 21572..21639 (67 aa)

76.773

7.74508E-24

Modul 11 (M11)

PKS_KS	• PKS_AT	PKS_DH	• PKS_KR
▼ Domain preperties DNA coordinates: 5451955794 (1275 pb) Protein frame: Reverse 2 Protein coordinates: 2178322208 (425 aa) Score: 1069.16 E-value: 0.0 Specificity: 1000	▼ Domain properties DNA coordinates: \$326254213 (951 pb) Protein frame: Reverse 2 Protein coordinates: 2231022627 (317 aa) Score: 473.784 E-value: 2.38125E-143 Specificity: Prediction: methylmaloryd	✓ Domain properties <u>DNA coordinates:</u> 5261453139 (525 pb) Proten frame: Reverse 2 Proten coordinates: 2265822643 (175 aa) Score: 252.64 E-value: 8.8871(E-77 Active; ☑ Active Specificky: Activity probability. 80%	✓ Domain properties
PKS_ACP Domain properties DMA coordinates: 5059250793 (201 pb) Protein frame: Reverse 2 Protein coordinates: 2345023517 (67 aa) Score: 55.062 E-value: 2.6588E-17 Specificity:			

Slika 33: Podrobna analiza modularne organizacije gena 4 in 5 genske skupine *St*-PKS2 (analiza s programom ClustScan)

Figure 33: Detailed analysis of modular organization gene 4 and 5 of *St*-PKS2 genetic group (analysis with ClustScan program)

4.3.1.1 Analiza izražanja genske gruče St-PKS2

Analizo transkripcije predvidenih biosinteznih genov za PKS1, 2 in 4 smo izvedli s pomočjo metode RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo). Po anotaciji konkanamicinu podobne genske gruče *St*-PKS2 smo s pomočjo programa Primer-BLAST (Ye in sod., 2012) določili optimalna mesta (Slika 34) in sekvenčno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za RT-PCR analizo (Preglednica 23).



AfsR homolog (transkripcijski regulator)

Slika 34: Organizacija genske gruče za biosintezo *St*-PKS2 in prileganje uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov za analizo RT-PCR

Figure 34: The organization of gene cluster for the biosynthesis of *St*-PKS2 and annealing the primers used for RT-PCR analysis

Ime	Oligonukleotidno zaporedje	Temperatura	Velikost PCR
	$5' \rightarrow 3'$	naleganje	produkta (bp)
Concanlike1-Fw	TACGGGATCGCCCTTCCTCTGGA	68 °C	1088
Concanlike1-Rv	TTTCGAGCAGTACGTCGTGGCCG		
Concanlike2-Fw	AACTGCTGTGGGGACCTGCTGTCC	67 °C	1024
Concanlike2-Rv	ACCATCTTGATGACCCCGCCGAC		
Concanlike3-Fw	TCCTGTGAGCGACCAGAAGCTGC	68 °C	1111
Concanlike3-Rv	GGACTTCAGCGATCCGAGCCACA		
HrdB-Fw	GCCGACCCGGTCAAGGACTATCT	65 °C	899
HrdB-Rv	TCGAGGTAGTCGCGAAGGACCTG		

Preglednica 23: Oligonukleotidni začetniki za RT-PCR analizo izražanja St-PKS2 genske skupine

Table 23: Primers for RT-PCR analysis of the expression St-PKS2 gene cluster

Pred izvedbo RT-PCR analize smo preizkusili sintetizirane oligonukleotidne začetnike (Preglednica 23) in optimizirali reakcijske pogoje za PCR (Slika 35). Pri tem smo za matrično DNA uporabili izolirano genomsko DNA bakterije *S. tsukubaensis* NRRL18488.



Slika 35: Preverjanje specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih za RT-PCR, kjer je matrično DNA za pomnoževanje predstavljala izolirana genomska DNA.

Figure 35: Specificity confirmation of primers used for RT-PCR, where the isolated genomic DNA was used as template for PCR amplification

Vzorce za izolacijo RNA smo pridobili iz dveh ločenih bioloških ponovitev, kjer smo *S. tsukubaensis* NRRL 18488 gojili v kompleksnem produkcijskem gojišču PG3 (Glej poglavje 3.3.2). Glede na znane podatke o časovnem poteku produkcije FK506 in FK520 v gojišču PG3 (Goranovič in sod., 2012) smo pri analizi transkripcije novo identificirane genske skupine za sekundarni metabolit *St*-PKS2 uporabili vzorce odvzete po 62 urah kultivacije v produkcijskem gojišču. Izolacijo celokupne RNA (mRNA in rRNA) (Glej poglavja 3.5.1) smo iz vsake biološke ponovitve izvedli v paralelkah, ki smo jim nato s pomočjo spektrofotometra NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, ZDA) izmerili koncentracijo RNA in izračunali razmerje A_{260}/A_{280} . Za vzorce izolirane RNA kjer je bilo to razmerje večje od 1,8, smo sklepali, da niso kontaminirani s proteini in so primerni za nadaljnje analize (Preglednica 24).

Vzorec		Koncentracija RNA (ng/uL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1. biološka	Α	322,85	1,93
ponovitev	В	317,05	1,93
2. biološka	C	397,88	1,96
ponovitev	D	390,48	1,90

Preglednica 24: Spektrofotometrična analiza koncentracije RNA v vzorcih izoliranih za RT-PCR Table 24: Spectrophotometric analysis of RNA concentration in samples for RT-PCR

RT-PCR analizo smo izvedli v dveh ločenih stopnjah (Poglavje 3.5.3). V prvi stopnji smo s pomočjo reverzne transkriptaze Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas) in naključnimi začetnimi oligonukleotidi prepisali celokupno mRNA v cDNA. Tako pridobljeno cDNA smo v drugi stopnji uporabili za pomnoževanje ciljnega fragmenta DNA z verižno reakcijo s polimerzo. PCR smo izvedli s pomočjo polimeraze Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes) in specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. PCR pomnožke smo ločili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze in s pomočjo DNA standarda določili velikost fragmentov (Slika 36). Za dodatno potrditev pravilne identifikacije s PCR pomnoženih nukleotidnih zaporedij, smo le-te tudi sekvencirali. Za ta namen smo uporabili komercialni komplet TA Cloning Kit (Invitrogen) in priložen vektor za kloniranje pCR 2.1. Rezultati sekvenciranja so potrdili identiteto pomnoženih nukleotidnih zaporedij kot fragmentov genov *St*-PKS2.



Slika 36: RT-PCR analiza treh biosinteznih genov iz genske skupine *St*-PKS2 in gena *hrdB* kot pozitivno kontrolo.

Figure 36: RT-PCR analysis of three difrent genes in St-PKS2 cluster and hrdB gene as positive control.

RT-PCR analizo smo opravili tudi s pozitivno in negativno kontrolo. Za negativno kontrolo so uporabili izolirano RNA po obdelavi z DNazo, ki je nismo prepisali v cDNA. Uporabljena kontrola nam je omogočala preverjanje prisotnosti ostankov genomske DNA po obdelavi z DNAazo, ki bi lahko povzočila lažno pozitiven rezultat. Za pozitivno kontrolo RT-PCR analize smo v drugi stopnji RT-PCR uporabili gen *hrdB*. Gen kodira sigma faktor RNA polimeraze, ki se tekom rasti organizma konstantno izraža (Buttner in sod., 1990).

4.3.2 Podrobnejša analiza genske skupine St-PKS4

Glede na filogenetsko analizo identifikacije KS domen, smo predvideli, da se genska gruča za sintezo *St*-PKS4 nahaja na treh ločenih soseskah. Podrobnejša analiza organizacije PKS modulov z programom ClustScan je pokazala predvideno zaporedje, po katerem si sledijo z MIRA 3 sestavljene soseske, to je c43, c213 in c288 (Slika 37). Predvideno zaporedje sosesk sovpada z opažanjem, da so PKS domene v soseski c213 razporejene po celotni dolžini, medtem ko so na soseskah c43 in c288 PKS domene prisotne le na enem koncu

sekvence. Predvideno zaporedje smo s pomočjo PCR preverili in dopolnili manjkajoče dele nukleotidnega zaporedja.

Analiza s ClustScan pa dodatno je nakazala tudi na prisotnost štirih mest v DNA sekvenci, kjer je glede na zamik bralnega okvirja identificiranih genov v sekvenci verjetno prišlo do napak med postopkom sekvenciranja genoma. Kratke regije genoma okoli teh mest v sekvenci (Slika 37) smo zato pomnožili s PCR in dodatno sekvencirali s Sangerjevo metodo. Matrična DNA za pomnoževanje s PCR je bila genomska DNA izolirana iz *S. tsukubaensis* NRRL 18488.





Figure 37: Predicted positions for frameshifts that cause the reading frames (1-4) and predicted sequence of contigs for *St*-PKS4 gene cluster

4.3.2.1 Analiza in povezovanje sosesk c43, c213 in c288

Bioinformacijska analiza, ki smo jo opravili s programom ClustScan je pokazala (Slika 37), da se na soseski c43 (dolžine 62433 bp) nahaja prekinjen PKS biosintezni gen, ki se zaključi z domeno KR (60684-61185). Soseska, ki sledi, je c213 (dolga 11437 bp), ki se prične z domeno AT (156-1110) ter zaključi z domeno ER (9372-10287). Sledi ji domena c288 (dolga 33717), ki se prične z AT domeno (123-1080). Predvideno zaporedje sosesk smo potrdili s povezovanjem s pomočjo PCR. Najprej smo na koncih sosek s pomočjo algoritma PrimerBLAST poiskali ustrezne pare oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica 25). Za zagotavlanja specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov smo izbrali tiste pare, ki so v izračunih algoritma PrimerBLAST nakazovali na visoko temperaturo (>69 °C) prileganja oligonukleotidnih začetnikov na matriko med postopkom PCR.

Oznaka	Oligonukleotidno zaporedje	Temperatura naleganja	Predvidena
	$5' \rightarrow 3'$	oligonukleotidnih	velikost PCR
		začetnikov	produkta (bp)
M43Fw:	TCCACACCGATCAGCCGGGCGAG	70 °C	~1,5 kb
M213Rv:	CCCTGGAGGCCTTGGTGGCCGAA		
M213Fw:	ACCGATGATCGCGTACCGCCGGG	71 °C	~1,7 kb
M288Rv:	GCGGGTACGGGAGGGATGGCGTC		

Preglednica 25: Oligonukleotidni začetniki za povezovanje sosesk c43, c213 in c288 Table 25: Primers used for close gaps between contigs c43, c213 and c288

Za izvedbo PCR smo uporabili komercialni encimski komplet, prilagojen za DNA z visoko vsebnostjo baznih parov GC AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (Invitrogen) s priloženim pufrom A za pomnoževanje težavnih nukleotidnih sekvenc. Pomnožke PCR, smo glede na velikost fragmentov ločili na agaroznem gelu in očistili s kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Za kloniranje pomnoženih sekvenc smo uporabili komercialni komplet TA Cloning Kit (Invitrogen) skupaj s plazmidom pCR2.1. mešanico transformirali Tako pripravljeno ligacijsko smo v pripravljene elektrokompetentne celice E. coli DH10β, iz katerih smo izolirali po tri plazmide pričakovane velikosti (~5,5 kb), ki so vsebovali tudi inserte pričakovane velikosti (~1,5 kb za PCR pomnožek c43-c213 in ~1,7 kb za pomnožek c213-c288). Sekvenciranje smo izvedli pri podjetju Macrogen (Republika Koreja). Ker standardni pogoji sekvenciranja niso bili uspešni, smo izbrali storitev »difficult sequencing« z uporabo modificiranih deoksinukleotidov (Dierick in sod., 1993). Pridobljene sekvence dolžine 1,459 bp in 1,695 bp (Priloga B) so potrdile predlagano sosledje sosesk in dopolnile mankajoče nukleotidno zaporedje med njimi.

4.3.2.2 Analiza zaporedij s predvidenim zamikom v bralnem okvirju

Bioinformacijska analiza, ki smo jo opravili s programom ClustScan je pokazala tudi štiri predvidena mesta z zamikom v bralnem okvirju (Slika 37). Mesta smo prepoznali zaradi spremembe bralnega okvirja znotraj prepisa PKS biosinteznih genov. Geni s takšno sekvenco bi bili prekinjeni in se ne bi mogli prepisovati. Zamik bi povzročil tudi prekinitev domen in rušil modularno organizacijo. Zato je odkrivanje in potrditev takšnih napak v sekvenci ključna za predvidevanje potencialne aktivnosti prepisovanja genske skupine za *St*-PKS4.

V regiji predvidenega mesta zamika bralnega okvirja smo s pomočjo algoritma PrimerBLAST poiskali ustrezne pare oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica 26).

Preglednica 26: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni za analizo zamikov bralnih okvirjev v genski skupini za *St*-PKS4

Table 26: PCR primers used analyzing predicted frame shifts in St-PKS4 gene cluster

Oznaka	Oligonukleotidno zaporedje $5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ}$	Temperatura naleganja	Predvidena velikost PCR
		oligonukleotidnih	produkta (bp)
		začetnikov	
mm1noviB288Fw	CGGCTGAACTCGATGAAAGTCGC	66 °C	1704
	С		
mm1noviB288Rv:	GTCATCTGGTCACGGAGCACGGT		
mm1novim288Fw:	GACCTTCAAGACCGAGGGCGTAG	65 °C	1219
	G		
mm1novim288Rv	GTTCGTCCTGTTCTCGTCGCTCG		
mm2m213Fw	AGACAGCCAGCAGCTCGTCCAGC	71 °C	949
	GCTT		
mm2m213Rv	CTCCTCACCACCACCAGAACTG		
	GCCC		
mm3novi_m213Fw	GGAGGTGGACGAGAACAGCACG	66 °C	1547
	Α		
mm3novi_m213Rw	GCGGACACCACACGTTTCTGGAG		
mm3veliki_m213Fw	GTGGAAACGGCCCCAGTCGATGT	66 °C	2045
mm3veliki_m213Rv	AGGTGGACTACGCCTCGCATTCG		
mm4novi_m43Fw	CAACCCCGACGACCTCTGGAACC	67 °C	1763
mm4novi_m43Rv	TGCAGAAGCAGACGGTGGAGAGC		
mm4noviBm43Fw	GTACTGGGTACGGGTGAGGAGAG	65 °C	1396
	С		
mm4noviBm43Rv	GGAGTGATGTACGGCGATTACGG		
	С		

Soseska c288 je v PKS modulu 1 med KR domeno (3300-3801) in ACP (2751-2952) v povezovalni regiji (2953-3299) vsebovala predviden zamik iz bralnega okvirja -1 na bralni okvir -3. Zamik bralnega okvirja smo glede na prvotno sekvenco celotnega genoma po sekvenciranju PCR pomnožka narejenega z oligonuklotidnimi začetniki (mm1novim288Fw - mm1novim288Rv) potrdili na mestu 3081.

Soseska c213 je v PKS modulu 3 med KS domeno (6507-7779) in AT (5238-6201) v povezovalni regiji (6202-6506) vsebovala predviden zamik iz bralnega okvirja -1 na bralni

okvir -2. Zamik bralnega okvirja smo glede na prvotno sekvenco celotnega genoma po sekvenciranju PCR pomnožka narejenega z oligonuklotidnimi začetniki (mm2m213Fw - mm2m213Rv) potrdili na mestu 6517.

Soseska c213 je v PKS modulu 3 med AT domeno (5238-6201) in KR (3780-4278) v povezovalni regiji (4279-5237) vsebovala predviden zamik iz bralnega okvirja -1 na bralni okvir -3. Zamik bralnega okvirja smo glede na prvotno sekvenco genoma po sekvenciranju PCR pomnožkov narejenih z dvema različnima paroma oligonuklotidnih začetnikov (mm3novi_m213Fw - mm3novi_m213Rw in mm3veliki_m213Fw - mm3veliki_m213Rv) potrdili na mestu 4378.

Soseska c43 je v PKS modulu 5 med KS domeno (58368-59640) in AT (57081-58056) v regiji povezovalne sekvence (58057-58367) vsebovala predviden zamik iz bralnega okvirja -1 na bralni okvir -2. Zamik bralnega okvirja smo glede na prvotno sekvenco genoma po sekvenciranju PCR pomnožkov, pridobljenih z dvema različnima paroma oligonuklotidnih začetnikov (mm4novi_m43Fw - mm4novi_m43Rv in mm4noviBm43Fw - mm4noviBm43Rv) potrdili na mestu 58376.

Povezano nukleotidno zaporedje v skupni velikosti 108,2 kb s popravljenimi napakami iz prvotnega sekvenciranja genoma, smo shranili v podatkovno bazo Genbank z dodeljeno oznako (GI:389478798).

4.4 VPLIV PRIMARNEGA METABOLIZMA NA BIOSINTEZO FK506/FK520

Del tega doktorskega dela vključuje tudi proučevanje vpliva primarnega metabolizma na biosintezo FK506/FK520. Pri tem smo se osredotočili na oskrbo z dvema gradbenima enotama, alilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA, ki je ključna za razmerje v katerem pri biosintezi nastajata FK506 in FK520. V okviru tega smo anotirali gene primarne metabolne poti etilmalonil-CoA (ECM) in ovrednotili vpliv te poti pri rasti *S. tsukubaensis* na acetatu kot edinem viru ogljika. Prav tako smo proučevali možnost, da encima krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (gen *ccr1*) iz ECM poti in njegov homologom AllR (2-pentenoil-ACP karboksilaza/reduktaza), ki sodeluje pri nastanku alilmalonil-CoA oziroma FK506, delujeta navzkrižno.

4.4.1 Anotacija genov metabolne poti etilmalonil-CoA

Pot etilmalonil-CoA je primarna metabolna pot, ki omogoča organizmom, ki nimajo delujočega glioksilatnega cikla, asimilacijo (hranil, ki se metabolizirajo do) acetil-CoA kot edinega vira ogljika, za biosintezo lastnih celičnih komponent. Med intermediati te metabolne poti je za sekundarni metabolizem še posebej pomemben (2*S*)-etilmalonil-CoA,

ki ga sintetizira encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr). (2*S*)-etilmalonil-CoA se uporablja tudi kot podaljševalna enota pri biosintezi nekaterih poliketidnih antibiotikov, med njimi tudi FK520, ter na takšen način povezuje centralni ogljikov metabolizem s sekundarnim metabolizmom (Chan in sod., 2009; Alber in sod., 2010). Osrednji, značilen del poti etilmalonil-CoA vsebuje 5 encimskih reakcij, ki jih katalizirajo krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr), etilmalonil-CoA/metilmalonil-CoA epimeraza (Epi), (2*R*)etilmalonil-CoA mutaza (Ecm), (2*S*)-metilsukcinil-CoA dehidrogenaza (Mcd) in mezakonil-CoA hidrataza (Mch) (Erb in sod., 2007).

Z analizo tBLASTn genoma *S. tsukubaensis* smo anotirali in identificirali gene za encime poti etilmalonil-CoA, ki se nahajajo v skupnem operonu (ecmOp) velikosti 6067 bp. Organizacija operona (Slika 38) kaže podobno ohranjeno strukturo, kot pri drugih streptomicetah z ECM potjo (Akopiants in sod., 2006; Bentley in sod., 2002; Ikeda in sod., 2003).



Slika 38: Anotacija genov pot etilmalonil-CoA v genomu bakterije *S. tsukubaensis* NRRL 18488 Figure 38: Annotation of genes for ethylmalonyl-CoA pathway in the genome of *S. tsukubaensis* NRRL 18488

4.4.2 Primerjava aminokislinskih zaporedij encimov Ccr in AllR

Raziskave genske skupine odgovorne za nastanke alilmalonil-CoA pri organizmu *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Goranovič in sod., 2010) in nekaterih drugih producentih FK506 (Mo in sod., 2011), so omogočile identifikacijo protein AllR oz. TcsC, ki deluje kot 2-pentenoil-ACP karboksilaza/reduktaza. Bioinformacijska analiza AllR, ki smo jo opravili s pomočjo algoritma BLASTp, je pokazala veliko podobnost z encimom Ccr1 (krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza). Poravnava aminokislinskih sekvenc je pokazala, da je med njima 62 % identičnost in 75 % podobnost pri čemer je E-vrednost manjša od 10⁻¹⁷⁰ (Slika 39).

AllR	(1)	MTHVRD <mark>AAA</mark> TDD <mark>P</mark> QAI <mark>AA</mark> CE <mark>VP</mark> AG <mark>YRA</mark> AV <mark>V</mark> LAA <mark>D</mark> HQAL <mark>AG</mark> SPVE <mark>DRDPRKTV</mark> Q
Ccrl	(1)	VKEILDAI <mark>SSA</mark> DATPADF <mark>AA</mark> LA <mark>VP</mark> ES <mark>YRA</mark> VT <mark>V</mark> HKD <mark>E</mark> AEMF <mark>AG</mark> LPSR <mark>DKDPRKSL</mark> H
AllR	(54)	VQEVPTPEPDHGEVLIATMASSINYNTVW <mark>SAL</mark> FEPVPTFRFLRTLGRTSPEAARH
Ccrl	(56)	VEDVAVPELGPGEALVAVMASSVNYNSVWTSIFEPLSTFGFLERYGRVSELTRRH
AllR	(109)	DQPYHVLGSDL <mark>S</mark> GVVLRTGPGVREWKPGDEVVAHCLQPDLQ <mark>T</mark> PGGHDDTLLDPGQ
Ccrl	(111)	DLPYHV <mark>I</mark> GSDL <mark>A</mark> GVVLRTGPGVNAWKPGDEVVAHCLSVELE <mark>S</mark> SD <mark>GH</mark> NDTMLDPEQ
AllR	(164)	R <mark>V</mark> WG <mark>YETNFGGLAEL</mark> SLVKANQLMPKPAHLTWEEAASLG <mark>V</mark> ALSTAYRQLVSHHGA
Ccr1	(166)	R <mark>I</mark> WGFETNFGGLAELALVKSNQLMPKPAHLSWEEAAAPGLVNSTAYRQLVSRNGA
AllR	(219)	AMKQG <mark>E</mark> RVL <mark>VWGAA</mark> GG <mark>VGAYATQ</mark> LALN <mark>GGA</mark> VPICVVSSQAKADLCRQMGAELVID
Ccr1	(221)	R <mark>MKQGD</mark> NVLIWGA <mark>S</mark> GGLG <mark>SYATQ</mark> FALA <mark>GGA</mark> NPICVVSSDRKADICRSMGAEAIID
AllR	(274)	RAAEGFSFWEGRDRPRLSEWSRFR <mark>G</mark> AVRSLAG-DDPDIVIEHPGRDTFGVSVMIA
Ccrl	(276)	RSAEDYRFWKDERSQDPREWKRFGARIRELTGGEDVDIVFEHPGRETFGASVYV
AllR	(328)	A <mark>RGG</mark> K <mark>VVTCASTTGYQH</mark> TYDNRHLWMR <mark>VKRIIGSHMANYREAW</mark> AANELVARGSIH
Ccrl	(331)	R <mark>K</mark> GGT <mark>IVTCAST<mark>S</mark>GYQHE<mark>YDNRYLWM</mark>SLKRIIGSHFANYREAWEANRLIAKG</mark> KIH
AllR	(383)	PVLS <mark>RVYPL</mark> DATGDATHAVANNSHHGKVGVLCLADRPGMGVRDPELRARKLDSIN
Ccr1	(386)	PTLSKVYPLAETGQAAHD <mark>V</mark> HRNAHQGKVGVLCLAPREGMGVRDEETRARHLGAIN
AllR	(438)	L <mark>FR</mark> KGQPR-
Ccrl	(441)	R <mark>FR</mark> NV

Slika 39: Poravnava aminokislinskega zaporedja produkta gena *allR* in *ccr1* Figure 39: Amino acid sequence alignment of the gene product *allR* and *ccr1*

4.4.3 Vloga operona za pot etilmalonil-CoA in vpliv na primarni metabolizem

Za namen potrditve vloge poti etilmalonil-CoA (ECM) kot ključne metabolne poti za rast na acetatu pri *S. tsukubaensis* NRRL 18488 smo pripravili različne mutante. Vsi pripravljeni sevi so izvirali iz starševskega seva ΔecmOp, ki ima inaktiviran celoten ecm operon. Sev ΔecmOp je bil pripravljen v okviru predhodnih raziskav v okviru doktorske disertacije dr. Dušana Goranovića (Kosec in sod., 2012). V okviru te doktorske disertacije smo ta sev uporabili za študijo vpliva ECM poti na sintezo FK506/FK520 ter prepletenost poti etilmalonil-CoA z metabolno potjo nastanka alilmalonil-CoA.

4.4.3.1 Prekomerno izražanje ecm operona

Za pripravo vektorja pSet152 ermE* + ecmOp smo najprej z reakcijo PCR pomnožili 6067 bp velik fragment DNA na katerem se je nahajal ecm operon (geni *ccr1, ecm, mcl, mch* in *mcd*). Za PCR smo kot matrico uporabili izolirano genomsko DNA *S. tsukubaensis* NRRL 18488 ter oligonukleotidna začetnika Ccr1ExpF: (5'-AA<u>CATATG</u>AAGGA AATCCTGGACGCGATCTC–3'), ki vsebuje restrikcijsko mesto *Nde*I in ecmOpRev: (5'-A<u>TCTAGA</u>ATCAACCCTGGATTCGGTACTCCTCC–3') z restrikcijskim mestom *Xba*I.
PCR pomnožek smo identificirali s pomočjo gelske elektroforeze, ga očistili iz gela in rezali z restrikcijskima encimoma *Nde*I in *Xba*I. Dobljeni fragment smo ligirali v vektor pSET152+ermE*, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma *Nde*I in *Xba*I. Tako konstruiran vektor pSET152+ermE*+*ccr1*, smo potrdili s postopkom sekvenciranja in nato s pomočjo konjugacije prenesli iz bakterije *E. coli* ET12567/pUZ8002 v sev *S. tsukubaensis* Δ ecmOp in Δ allR.



Slika 40: Shema plazmidnih vektorjev pSet
152 erm E^*+ ecmOp, pSet152 erm E^*+ all
R_ecmOp' in pSet152 erm E^*+ ccr1

Figure 40: Plasmid vectors pSet152 ermE*+ ecmOp, pSet152 ermE*+allR_ecmOp' in pSet152 ermE*+ ccr1

4.4.3.2 Konstruiranje umetnega operona allR_ecmOp'

Za namen proučevanja prepletenosti delovanja produkta gena *allR* in poti etilmalonil-CoA smo konstruirali umetni operon, kjer smo v naravnem operonu za etilmalonil-CoA pot (ecmOp) (Slika 40) zamenjali gen *ccr1* z *allR*. Umetni operon smo pripravili tako, da smo s PCR ločeno pomnožili dva segmenta novega operona, gen allR in v drugem segmentu operon etilmalonil-CoA poti (gen ecm, mcl, mch in mcd) brez gena ccr1. Za pomnožitev 1335 bp velikega fragmenta z genom allR smo uporabili oligonukleotidna začetnika Erm-(5'-GGAGGACCCCACATATGATGACCCACGTTCGCGACG-3') ccr2-F in ccr2-(5'-<u>TCCCGCACACCCATGCC</u>CTCACCGGGGCTGCCCCTT-3'). ecmOpV3-R Za pomožitev drugega fragmenta v velikosti 4835 bp smo uporabili oligonukleotidna (5'-GCAGCCCCGGTGAGGGCATGGGTGTGCGGGA začetnika ccr2-ecmOpV3-F ecmOp-pSet-R (5'-TGCAGGTCGACTCTAGATCAACCCTGGA CGAGGA-3') in TTCGGTACTCCT-3'). Vsi uporabljeni oligonukleotidni začetniki za PCR so bili zasnovani tako, da so vsebovali 15-20 bp dolga nukleotidna prekrivajoča zaporedja homologije. V prvem segmentu z allR genom pokrivajo oligonukleotidni začetniki levo vektor pSet152+ermE* in desno začetek gena ecm. Oligonukleotidni začetniki za drugi segment pa vsebujejo levo prekrivajoče zaporedje z genom allR in v desnem delu homologijo z vektorjem pSet152+ermE*. PCR pomnožke smo identificirali na gelski elektroforezi s pomočjo standarda za določanje velikosti DNA fragmentov. Fragmente smo očistili iz gela in jih s pomočjo komercialnega kompleta reagentov Gibson assembly (New England Biolabs) ligitali skupaj z vektor pSET152+ermE*, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma NdeI in XbaI. Tako konstruiran vektor pSET152 ermE*+ allR_ecmOp' smo transformirali v sev E. coli DH10β in po izolaciji plazmidov lete preverili s sekvenciranjem nukleotidnega zaporedja. Pravilno sestavljen plazmid smo nato s postopkom konjugacije prenesli iz bakterije E. coli ET12567/pUZ8002 v sev S. *tsukubaensis* Δ ecmOp in Δ allR.

4.4.3.3 Prekomerno izražanje gena ccr1

Gen *ccr1*, iz primarnega metabolizma *S. tsukubaensis*, smo skupaj z ermE* promotorsko regijo iz vektorja pSet152 ermE*+ccr1 (Poglavje 4.4.4.3) izrezali z restrikcijskima encimoma *EcoR*I in *Xba*I. Fragmen v velikosti 1649 bp smo po elektroforezi očistili iz gela in ga klonirali v integrativni plazmid pSok804, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma *EcoR*I in *Xba*I. pSok804 je mesto specifičen integrativen plazmid, ki se v genom streptomicet vgradi stabilno na mestu *attP*^{VWB} s pomočjo na plazmidu prisotnega gena za integrazo iz bakteriofaga VWB (Chen in sod., 2012; Enriquez in sod., 2006). V genomu *S. tsukubaensis* NRRL 18488, se nahaja VWB integracijsko mesto, kar nam je omogočilo stabilno sočasno integracijo s plazmidom pSet152, ki za vgradnjo v genom uporablja integrazo iz bakteriofaga ϕ C31. Plazmid pSok804 je prvotno tako kot pSet152 vseboval gensko kaseto, ki omogoča rezistenco proti apramicinu, ki pa

smo jo moral zaradi stabilnosti sočasne integracije teh dveh plazmidov nadomestiti s 1323 bp veliko kaseto za kanamicinsko rezistenco. Konstruiran vektor pSok804 ermE*+*ccr1*, smo nato potrdili s postopkom sekvenciranja in s pomočjo konjugacije prenesli iz bakterije *E. coli* ET12567/pUZ8002 v sev *S. tsukubaensis* Δ ecmOp in Δ allR.

Takšen konstrukt smo potrebovali za namen potrditve pravilnega delovanja umetnega operona allR_ecmOp' (Poglavje 4.4.3.2). V sev Δ ecmOp, kjer smo hkrati vnesli pSok804 ermE*+ccr1 in pSet152 ermE* +allR_ecmOp' konstrukt, bi moral izražat celotno funkcionalno ECM pot in ponovno pridobit sposobnost rasti na acetatu.

4.4.3.4 Vpliv pripravljenih konstruktov na rast na acetatu

Starševski sev Δ ecmOp je bil pripravljen z vgraditvijo genske kasete za rezistenco proti tiostreptonu v gen *ccr1*, ki je prvi gen ecm operona. Takšna prekinitev je povzročila inaktivacijo gena *ccr1* in prekinitev transkripcije vseh genov, ki v tem operonu sledijo *ccr1* (Kosec in sod., 2012). V ta sev smo nato vnesli več različnih konstruktov (Slika 40) s katerimi smo želeli proučiti, ali je pot etilmalonil-CoA ključna metabolna pot za asimilacijo acetata in možnost komplementacije delovanja encima Ccr z njegovim homologom iz sekundarnega metabolizma AllR.

Vse pripravljene seve smo nacepili na sporulacijsko gojišče ISP4, kjer se je po 7 dnevih pojavila enakomerna sporulacija, med sevi ni bili mogoče opaziti pomembnejših morfoloških razlik. Seve smo nato precepili še na minimalno gojišče NMMB, ki kot edini vir ogljika vsebuje acetat. Na izbranem gojišču so lahko uspešno rastli le tisti sevi, ki so imeli povrnjeno sposobnost asimilacije acetata oziroma funkcionalno pot etilmalonil-CoA (ECM) (Slika 41).



Slika 41: Rast različnih mutant *S. tsukubaensis* na minimalnem gojišču, kjer je acetat edini vir ogljika. Sevi **w.t**. - *S. tsukubaensis* NRRL 18488; 1: ΔecmOp (K); 2: ΔecmOp + ermE* ecmOp; 3: ΔecmOp + ermE* allR_ecmOp'; 4: ΔecmOp + ermE* allR_ecmOp' + ermE* ccr1; 5: ΔecmOp + ermE* ccr1

Figure 41: Growth of various mutants of *S. tsukubaensis* on the minimal medium in which the acetate is a sole carbon source. Strains w.t. - *S. tsukubaensis* NRRL 18488; 1: \triangle ecmOp (K); 2: \triangle ecmOp + ermE* ecmOp; 3: \triangle ecmOp + ermE* allR_ecmOp'; 4: \triangle ecmOp + ermE* allR_ecmOp' + ermE* ccr1; 5: \triangle ecmOp + ermE* ccr1

4.4.4 Vpliv ECM poti na produkcijo FK506 in FK520

Za namen študije vloge ECM poti pri biosintezi FK506 in FK520 smo uporabili sev *S. tsukubaensis* s prekinjenim genom *allR* (prekinitev brez zamika bralnega okvirja oz. »in frame«), ki je bil pred kratkim pripravljen s strani naše raziskovalne skupine (Kosec in sod., 2012). Gen *allR* (2-pentenoil-ACP karboksilaza/reduktaza) je pri bakteriji *S. tsukubaensis* NRRL 18488 del genske skupine za oskrbo z gradbeno enoto alilmalonil-CoA, potrebno za biosintezo FK506. Gen je del večjega operona, ki vključuje še gene *allA*, *allK* in *allD* (Goranovič in sod., 2010) (Poglavje 2.4.4). Prekinitev gena *allR*, povzroči prekinitev sinteze alilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA, gradbenih enot potrebnih za sintezo FK506 oz. FK520. Sev Δ allR smo izbrali, ker je bil primeren za proučevanje možnosti delne komplementacije proteina AllR z njegovim homologom Ccr pri sintezi etilmalonil-CoA.

4.4.4.1 Prekinitev gena *allR*

Gen *allR* je bil v sevu Δ allR prekinjen brez zamika bralnega okvirja (»in-frame«) s pomočjo konstrukta pKC1139- Δ *allR*. Takšna prekinitev gena *allR* omogoča transkripcijo in translacijo preostalega dela operona in s tem izražanje produkta gena *allD*, ki se nahaja za *allR*. Rezultat takšne prekinitve je, da sev Δ *allR* ne proizvaja FK506 ali FK520. V primeru dohranjevanja s sintetičnim analogom alilmalonil-SNAC, pa se produkcija FK506 povrne, prav tako je uspešno dohranjevanje z etilmalonil-SNAC, ki omogoči povrnitev sinteze FK520 (Kosec in sod., 2012).

4.4.4.2 Prekomerno izražanje gena *allR*

Za namen prekomernega izražanja gena allR smo z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma allR-F (5'-ACATATGACCCACGTTCGCGACGCCG-3') z restrikcijskim (5'-AAAATCTAGATCACCGGGGGCTGCCCCTTCCG mestom NdeI) in Ccr2-R GAACA-3' z restrikcijskim mestom XbaI) pomnožili 1335 bp velik fragment. PCR pomnožek smo identificirali s pomočjo gelske elektroforeze, ga očistili in s T4polinukleotidno kinazo fosforilirali 5' konce DNA. Fragment smo nato ligirali v vektor pVM1, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskim encimon SmaI ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. Pravilnost kloniranega PCR pomnožka smo pred nadaljnjim delom preverili s sekvenciranjem. Iz pridobljenega plazmida pVM1+allR smo nato s pomočjo parcialne restrikcije (Poglavje 3.5.8.1) z encimoma NdeI in XbaI izrezali gen allR. Fragment smo po gelski elektroforezi očistili iz gela in ga ligirali v vektor pSET152+ermE*, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma NdeI in XbaI. Tako konstruiran vektor pSET152+ermE*+allR, smo s postopkom konjugacije prenesli iz bakterije E. coli ET12567/pUZ8002 v S. tsukubaensis AallR.

4.4.4.3 Prekomerno izražanje gena ccr1

Za namen prekomernega izražanja gena *ccr1* smo z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma ccr1F (5'-AACATATGAAGGAAATCCTGGACGCGATCTC-3' z restrikcijskim mestom *NdeI*) in ccr1R (5'-TTTCTAGATTGCGCCGGTACAGCTCGTTC-3' z restrikcijskim mestom *XbaI*) pomnožili 1473 bp velik fragment z genom *ccr1*. PCR pomnožek smo identificirali s pomočjo gelske elektroforeze, ga očistili iz gela in rezali z restrikcijskima encimoma *NdeI* in *XbaI*. Dobljeni fragment smo ligirali v vektor pSET152+ermE*, ki smo ga predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma NdeI in XbaI. Tako konstruiran vektor pSET152+ermE*+*ccr1*, smo potrdili s postopkom sekvenciranja in nato s pomočjo konjugacije prenesli iz bakterije *E. coli* ET12567/pUZ8002 v *S. tsukubaensis* Δ allR.

4.4.4.4 Rezultati produkcije FK506 in FK520

Za primerjavo biosinteze FK506 in FK520 različnih sevov *S. tsukubaensis*, ki smo jih pripravili (Poglavje 4.4.3 in 4.4.4), smo vse mutante po inokulaciji najprej 24 ur gojili v tekočem VG3 gojišču z dodanim apramicinom (50 µg/ml) oziroma drugim ustreznim antibiotikom pri 28 °C ter 220 rpm. Po 24 urah smo 10 % inokuluma prenesli v 5 mL produkcijskega gojišča PG3, kjer smo izvedli 6-dnevno kultivacijo pri 28 °C ter 220 rpm

(Poglavje 3.4.4). Iz produkcijske brozge smo nato ekstrahirali FK506 in FK520 in s pomočjo HPLC metode (Poglavje 3.6.2) določili njuno koncentracijo (Slika 42). Opravili smo tri neodvisne bioprocese, kjer smo kolonije inokulirali v paralelki. Za mutante s prekomernim zražanjem genov pa smo za preverjanje produkcije dodatno izbrali vsaj pet različne neodvisne kolonije, ki smo jih prav tako inokulirali v paralelkah. Na sliki 43 so izražene povprečne vrednosti donosov, na stolpcih pa so z vertikalno črto prikazane standardne napake. Podatke smo analizirali s programsko premo SAS/STAT.



Slika 42: Primerjava donosov FK506 in FK520 (mg/L) različnih sevov *S. tsukubaensis*. Polja pravokotnikov zajemajo 95 % podatkov iste populacije. Horizontalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ekstremne vrednosti (min, max). Zvezdice označujejo statistično pomembne razlike med eksperimentalno skupino v primerjavi s kontrolnimi sevi. WT: *S. tsukubaensis* NRRL 18488; A: WT+pSet152 (kontrolni sev z plazmidom); B: $\Delta allR$ +pSet152 (sev z prekinjenim genom *allR*); C: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* *allR* (komplementacija prekinitve z *allR* genom pod kontrolo promotorja ermE*); D: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* *ccr1* (prekomerno izražanje gena *ccr1*); E: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* ecmOp (prekomerno izražanje operona za pot etilmalonil-CoA); F: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* allR_ccmOp' (komplementacija *allR* z umetno konstruiranim operonom z geni *allR*, *ecm*, *mcl*, *mch in mcd*); G: Δ ecmOp (prekinitev operona za pot etilmalonil-CoA)

Figure 42: A comparison of FK506 and FK520 yields (mg/L) in different strains of *S. tsukubaensis*. Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal line representing the median values, and perpendicular lines indicating extreme values (min, max). Asterisks where representing statistically significant differences between different samples compared to control wild type samples (WT). WT: *S. tsukubaensis* NRRL 18488; A: WT+pSet152 (control strain with plasmid pSet152); B: $\Delta allR$ +pSet152 (inactivated *allR* gene); C: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* *allR* (complementation of *allR* gene under the control of ermE* promoter); D: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* *ccr1* (over-expressed *ccr1* gene); E: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* ecmOp (over-expressed operon for ethylmalonyl-CoA pathway); F: $\Delta allR$ +pSet152+ermE* allR_ecmOp' (complementation of *allR* with constructed operon (*allR*, *ecm*, *mcl*, *mch in mcd*); G: Δ ecmOp (inactivated operon for ethylmalonyl-CoA pathway)

Rezultati produkcije FK506 pri sevih Δ allR, Δ allR+ccr1 in Δ allR+ecmOp in produkcije FK520 pri sevu Δ allR so bili pod mejo detekcije uporabljene HPLC metode (1 mg/L), zato njihovih vrednosti nismo mogli zanesljivo določiti. Takšne rezultate koncentracije FK506

in FK520 smo pri statistični obdelavi obravnavali kot vrednost 0. Pri kultivacijah smo kot kontrolo uporabili dva seva: sev wt in sev s plazmidom pSet152 ermE*. V kontrolnem sevu s plazmidom, brez dodatnega inserta, se je nahajal zapis za rezistenco proti apramicinu. Izražanje rezistence lahko v nekaterih primerih fiziološko obremeni mikroorganizem in s tem upočasni hitrost rasti ter vpliva na produktivnost, zato je takšna kontrola primernejša za primerjavo z ostalimi sevi. Vendar v našem primeru takšna kontrola ni kazala statistično signifikantne razlike v primerjavi z wt (p-vrednost= 0,1583).

Rezultati biološke kultivacije in meritev produkcije FK506/FK520 so potrdili, da je produkt gena *allR* eden ključnih encimov pri sintezi alilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA (Kosec in sod., 2012). To so potrdili tako rezultati prekinitve gena *allR* kot tudi komplementacije prekinjenega gena s pomočjo prekomernega izražanja. Rezultati prekinitve celotnega operona za pot etilmalonil-CoA (ecmOp), pa so pokazali da med sevom Δ ecmOp in wt ni statistično signifikantne razlike pri produkciji FK506 (p-vrednost = 0,4162) in produkcija FK520 (p-vrednost = 0,536). Iz tega lahko sklepamo, da pri naših pogojih rasti in kemijski sestavi produkcijskega gojišča pot etilmalonil-CoA nima ključnega doprinosa pri biosintezi FK506 in FK520, oziroma ne predstavlja ozkega grla. So pa rezultati prekomernega konstitutivnega izražanja celotnega operona ecmOp oz. samo gena *ccr1* pokazali, da lahko pot etilmalonil-CoA oz. encim Ccr omogoči sintezo etilmalonil-CoA in tako povrne produkcijo FK520 v sevih Δ allR.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V farmacevtski industriji ima biotehnološka proizvodnja različnih industrijsko in medicinsko pomembnih metabolitov velik pomen. Zaradi ekonomskih zahtev po povečanem donosu in strogih zakonodajnih zahtev glede kakovosti produktov in prisotnosti nečistoč, se proizvodne bioprocese in seve nenehno izboljšuje. Predvidevamo, da bodo rezultati opravljenih raziskav poglobili razumevanje biosinteze FK506 in strukturno sorodnih metabolitov, nova spoznanja pa bodo uporabna za izboljšavo sevov in bioprocesov v industrijskem okolju.

5.1.1 Predstavitev problema

FK506 (takrolimus) in njegovi strukturni analogi, kot sta FK520 in rapamicin, so medicinsko izjemno pomembne spojine. FK506 je trenutno registriran za uporabo kot imunosupresiv po transplantacijah organov in za zdravljenje kožnih vnetnih obolenj ter ekcemov Poleg tega FK506, FK520 in nekateri drugi derivati kažejo obetaven potencial za zdravljenje nevroloških obolenj (Husain in Singh, 2002; Stuetz in sod., 2006). Rapamicin, in njegovi polsintezni in biosintezni analogi pa so že v klinični uporabi oziroma kažejo velik potencial za zdravljenje različnih oblik raka in nevroloških bolezni (Graziani, 2009).

Takrolimus so prvič odkrili v ekstraktu bakterije *Streptomyces tsukubaensis* leta 1984 na Japonskem (Kino in sod., 1987a; Kino in sod., 1987b), že deset let pozneje, leta 1994, pa je farmacevtsko podjetje Fujisawa Pharmaceutical (danes del Astellas Pharma) s strani FDA pridobilo dovoljenje za uporabo spojine FK506 kot imunosupresiva, ki preprečuje zavrnitev organov po transplantaciji. Takrolimus v primerjavi s ciklosporinom, drugim pogosto uporabljenim imunosupresivom, deluje do 100 krat močneje in se zato uporablja v manjših količinah ter povzroča manj stranskih učinkov (Meier-Kriesche in sod., 2006; Patel in Kobashigawa, 2004).

Kot zdravilo je takrolimus registriran že v več kot 70 državah in je v letu 2011 presegel prodajo v skupni vrednosti 1,9 miljarde ameriških dolarjev, kar predstavlja 27,6 % celotne letne prodaje vseh registriranih imunosupresivnih zdravil na trgu. Od sprostitve patenta leta 2009 je FDA podelil dovoljenje za prodajo še šestim generičnim proizvajalcem takrolimusa (Sandoz, Watson Labs, Dr Reddys Labs, Mylan, Panacea Biotec in Accord Healthcare), kar je povzročilo tudi povečano znanstveno zanimanje za razumevanje mehanizmov biosinteze, pri tem vpletenih metabolnih poti ter sekvenciranje ključnih genskih skupin oz. celotnih genomov organizmov, ki proizvajajo spojino FK506 (Martinez-Castro in sod., 2013). Medicinski pomen in komercialni uspeh tega zdravila pa

sta razloga, da se je več farmacevtskih podjetij odločilo za intenzivne programe iskanja novih organizmov, ki proizvajajo FK506 (Kim in Park, 2008; Konya in sod., 2008). V patentni in drugi literaturi je opisanih skupaj kar 17 takih bakterijskih sevov, ki pa so taksonomsko večinoma slabo proučeni in opredeljeni (Martinez-Castro in sod., 2011; Muramatsu in sod., 2005).

Čeprav je takrolimus že široko uporabljen imunosupresiv za preprečevanje zavrnitvene reakcije po presaditvi organov, je njegova uporaba zaradi ozkega terapevtskega okna ter toksičnosti za ledvice, centralni živčni sistem in trebušno slinavko otežena. Največji problem predstavlja velika variabilnost v biorazpoložljivosti in farmakokinetiki zdravila med pacienti (Ware in MacPhee, 2010; Yano, 2008). Za natančno uravnavanje koncentracij takrolimusa v krvi je zato potrebno pogosto določanje koncentracije v plazmi s pomočjo različnih analitskih tehnik (Korecka in Shaw, 2009). Velik medicinski in ekonomski potencial teh spojin na eni strani in omejitve trenutnih zdravil v kliniki na drugi strani jasno kažejo potrebo po razvoju novih spojin, podobnih FK506, ki bi bile manj toksične in bolj odporne na metabolno razgradnjo, hkrati pa bi imele bolj ponovljivo biorazpoložljivost. Objavljenih je bilo več študij, ki poročajo o uspešnih modifikacijah in biosintezi analogov FK506 ter o spremembah v biološki aktivnosti. Raziskovalcem je tako že uspelo sintetizirati FK506 analoge s spremenjeno začetno gradbeno enoto (DHCHC) (Ban in sod., 2013; Kim in sod., 2013; Moss in sod., 2013) oziroma vnesti spremembe v strukturo zaradi modifikacije nekaterih post-PKS procesov (Chen in sod., 2013). Še posebej zanimivo mesto za modifikacijo spojine FK506 je ravno pozicija C-21, kjer je zaradi promiskuitetnosti modula 4 uspelo raziskovalcem vgraditi številne alternativne sintezne gradbene enote kot so izobutirilmalonil-CoA, metilmalonil-CoA, propilmalonil-CoA (Lechner in sod., 2013) in propargilmalonil-SNAC (Kosec in sod., 2010).

Biosintezo spojine FK506, po strukturi 23-členskega makrolidnega laktona, je prvič opisala raziskovalna skupina Merck Research Laboratories, ki je tudi prva objavila delno nukleotidno sekvenco skupine genov za biosintezo FK506 iz *Streptomyces* sp. MA6548 (Motamedi in sod., 1997; Motamedi in Shafiee, 1998; Motamedi in sod., 1996). Pred kratkim so objavili nukleotidna zaporedja celotnih genskih skupin za sintezo FK506 tudi pri drugih producentih, to je sevu *S. tsukubaensis* NRRL18488 (Barreiro in sod., 2012; Goranovič in sod., 2010) in *Streptomyces tacrolimicus* ATCC 55098, *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP ter *Streptomyces kanamyceticus* KCTC 9225 (Mo in sod., 2011). Pri tem so ugotovili, da celotna genska skupina FK506 vsebuje še dodatne gene, katerih produkti sodelujejo pri nastanku FK506 gradbenih enot metoksimalonil-ACP (geni *fkbGHIJK*) in alilmalonil-CoA (geni *allAKRD* oz. *tcsABCD*) ter regulatorna gena (*fkbR* in *fkbN*), odgovorna za regulacijo biosinteze FK506 (Goranovič in sod., 2012; Mo in sod., 2012). Omenjene študije so tako omogočile podrobno razumevanje organizacije celotne genske skupine ter prvič pripomogle k prenosu celotne 84 kbp velike genske skupine in uspešni heterologni produkciji FK506 v bakteriji *Streptomyces coelicolor* (Jones in sod., 2013).

Vgradnja nenavadne gradbene enote alilmalonil-CoA na mestu C-21 ločuje biosintezo spojine FK506 od FK520, kjer se na istem mestu vključuje etilmalonil-CoA (Wu in sod., 2000). Za vključevanje stranske skupine na tem mestu je odgovoren PKS modul 4, ki se nahaja na encimu FkbB. Pri organizmih, ki sintetizirajo FK506, je AT domena modula 4 (AT4) do določene mere nespecifična in lahko sprejema različne substrate. Če modul 4 vgradi podaljševalno enoto alilmalonil-CoA, pride do sinteze FK506, če pa se na tem mestu vgradi podaljševalna enota etilmalonil-CoA, se sinteza zaključi z nastankom FK520. Pri produkciji FK506 je pri vseh opisanih sevih znano, da sočasno proizvajajo tudi FK520, ki lahko presega tudi več kot 20 % vsebnosti FK506. Dodatno se ob FK520 lahko v manjšem deležu pojavlja še 37,38-dihidro-FK506 (FK506D), ki pa na mestu C-21 vsebuje propilno stransko skupino (Chen in sod., 2012; Kosec in sod., 2012) in v sledovih še prolil-FK506, 9-dekarbonil-9-hidroksil-FK506, 9-deoksi-FK506, desmetil-FK520, prolil-FK520 in 9-deoksi-FK520 (Park in sod., 2009). V industrijskih procesih proizvodnje FK506 se zato FK520 in drugi analogi pojavljalo kot nečistoče, ki bistveno otežujejo postopke izolacije produkta in znatno povečajo stroške zaključnih procesov saj njihovo odstranjevanje običajno zahteva večkratno ekstrakcijo z uporabo organskih topil, uporabo kromatografskih metod kot je HPLC ter kombinacije omenjenih tehnik z vezavo produkta FK506 na inertne nabite nosilce (Cabri in sod., 2006; Cvak in sod., 2007; Keri in sod., 2006).

Ključna razlika biosinteznih poti med organizmi, ki proizvajajo izključno FK520, kot je *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 14891 (Wu in sod., 2000) in številnimi organizmi, ki proizvajajo pretežno FK506, FK520 pa le kot stranski produkt, je tudi v prisotnosti dodatnih genov vpletenih v oskrbo potrebnih podaljševalnih enot. V primeru izključne biosinteze FK520 so prisotni dodatni geni za oskrbo podaljševalne enote etilmalonil-CoA, medtem ko je pri organizmih, ki večinoma proizvajajo FK506, prisotna genska skupina za oskrbo gradbene enote alilmalonil-CoA, etilmalonil-CoA pa pri teh organizmih nastaja v majhnih količinah s pomočjo drugih slabše poznanih metabolnih poti, ki so verjetno del primarnega metabolizma. Prav tako je zanimivo, da do sedaj ni nobenih poročil o sodelovanju podaljševalne enote alilmalonil-CoA pri drugih metabolnih procesih, kar naredi biosintezo FK506 še posebej zanimivo.

5.1.2 Cilji naloge

Glavni cilji tega doktorskega dela so bili:

 s pomočjo standardnih bioinformacijskih orodij identificirati ključne metabolne poti primarnega metabolizma, ki direktno ali pa indirektno vplivajo na preskrbo ključnih gradbenih enot za biosintezo FK506

- s pomočjo bioinformacijskih orodij identificirati verjetne ključne gene (genske homologe), ki lahko potencialno direktno ali indirektno vplivajo na biosintezo FK506.
- s pomočjo bioinformacijskih analiz v sekvencah genoma poiskati in identificirati ostale potencialne (konkurenčne biosintezne poti FK506) sekundarne metabolite, s posebnim poudarkom na genskih skupinah z osnovo PKS in/ali NRPS
- manipulacija izbranih genskih homologov z uporabo metod genske inaktivacije oziroma prekomernega izražanja in proučevanja vpliva na biosintezo FK506 in izbranih ključnih stranskih produktov.

5.1.3 Bioinformacijska analiza nukleotidnega zaporedja genoma S. tsukubaensis

Primerjava sekvenc celotnega genoma še pred kratkim ni bila splošno dostopna zaradi visokih stroškov sekvenciranja. To se je v zadnjem času drastično spremenilo z uporabo novih tehnologij sekvenciranja. Takšen način raziskav je omogočil hitro in celostno zajemanje podatkov sekvenc genoma in je zato skoraj v celoti nadomestil zdaj že zastarel pristop zamudne in delovno zahtevne izdelave genomskih knjižnic. Občutno skrajšanje časa in zmanjšanje potrebnih stroškov za sekvenciranje celotnega genoma je povzročilo drastično povečanje števila sekvenciranih genomov bakterij (Bull in sod., 2000; Winter in sod., 2011).

Pridobljeno nukleotidno zaporedje celotnega de novo sekvenciranega genoma S. tsukubaensis NRRL 18488 z metodo pirosekvenciranja je za bioinformacijsko analizo predstavlja velik izziv. Genom v velikosti 7,62 Mbp spada med večje bakterijske genome, prav tako je za streptomicete značilna visoka vsebnost nukleotidov G in C, ki pri S. tsukubaensis dosega 71,5 % in kar je še dodatno otežilo natančno bioinformacijsko analizo. Najprej smo za avtomatsko sestavljanje kratkih odčitkov sekvenciranja v neprekinjene soseske (angl. contigs) uporabili programski algoritem Newbler Assembler (Miller in sod., 2010). Ta metoda je omogočila sestavljanje kratkih odčitkov v 240 večjih sosesk, vendar je pregled sosesk pokazal, da se genska skupina za biosintezo FK506, nahaja na kar petih ločenih soseskah. Zaradi razdrobljenosti genske skupine za biosintezo FK506, smo se zato odločili za uporabo alternativnega algoritma MIRA 3 (Chevreux in sod., 2004). Z uporabo navedenega algoritma smo celoten genom sestavili v 912 večjih sosesk. Kljub večji razdrobljenosti sestavljenega genoma pa smo celotno skupino genov za FK506 uspeli združiti v eno sosesko velikosti 115 kb. Tako sestavljeno nukleotidno zaporedje genov za biosintezo FK506 smo shranili v podatkovno bazo Genbank z dodeljeno oznako JX081655.

Avtomatsko anotacijo celotnega genoma oz. sestavljenih sosesk genoma smo izvedli s pomočjo javnega spletnega strežnika RAST (Aziz in sod., 2008). To storitev smo izbrali, ker nam je poleg osnovne anotacije genov, ki jo sicer izvede tudi pogosto uporabljena spletna storitev PGAAP (NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline) (Angiuoli in sod., 2008), omogočala tudi dodatno analizo in rekonstrukcijo prisotnih metabolnih poti. Takšno analizo omogoča uporaba obširne zbirke proteinskih družin (FIGfams) in njihovo natančno povezovanje v funkcionalne podskupine, ki jih ročno urejajo priznani strokovnjaki iz tega področja. Analiza genoma s pomočjo RAST nam je zato omogočila dober pregled prisotnih metabolnih poti primarnega metabolizma. Anotacija za streptomicete specifičnega sekundarnega metabolizma pa je ostala precej splošna in nedefinirana, hkrati pa ni omogočala identifikacije novih sekundarnih metabolitov. Analizo sekundarnega metabolizma s poudarkom na PKS in NRPS sistemih smo zato izvedli s pomočjo specializiranega programa ClustScan, kot je opisano v nadaljevanju (Starcevic in sod., 2008).

5.1.4 »In silico« analiza prisotnosti metabolnih poti gradbenih enot za sintezo FK506 in FK520

Po splošni bioinformacijski analizi primarnega metabolizma *S. tsukubaensis* NRRL 18488 smo se podrobneje osredotočili na analizo tistih metabolnih poti, ki sodelujejo oziroma zagotavljajo sintezo gradbenih enot potrebnih za nastanek FK506 in FK520. Tako smo podrobno proučili verjetne metabolne poti ter identificirali njihove ključne proteinske homologe, ki sodelujejo pri nastanku gradbenih enot: malonil-CoA, metilmalonil-CoA, metoksimalonil-ACP, etilmalonil-CoA (FK520), začetne (4,5-dihidroksicikloheks-1-enkarboksilna kislina) in zaključne (L-pipekolna kislina) gradbene enote. Analiza metabolnih poti in mehanizma nastanka gradbene enote alilmalonil-CoA, potrebne za sintezo FK506, je pri *S. tsukubaensis* NRRL 18488 pred kratkim že bila objavljena s strani naše raziskovalne skupine (Goranovič in sod., 2010).

Bioinformacijska analiza sinteznih poti za malonil-CoA je potrdila prisotnost homologa encima acetil-CoA karboksilaze, sestavljenega iz dveh podenot α in β . Na α -podenoti se nahajata dve domeni; to sta biotin karboksilaza (BC) in biotin karboksil prenašalni protein (BCCP). Na β -podenoti pa se nahaja karboksiltransferazna domena (CT), ki določa specifičnost encima do acil-CoA substratov. V genomu smo uspeli identificirati tri različne β -podenote, ki se glede na podatke iz literature, razlikujejo v specifičnosti vezave širšega spektra acil-CoA substratov (Diacovich in sod., 2002; Tong, 2005). Glede na primerjavo njihovega aminokislinskega zaporedja z že karakteriziranimi proteinskimi homologi, smo predvideli njihovo specifičnost. Tako smo za β -podenoto (protein ACCB) predvideli večjo afiniteto do substrata acetil-CoA in nastanek malonil-CoA ter za β -podenoto (protein PCCB) afiniteto do substrata propionil-CoA, kar vodi v nastanek metilmalonil-CoA. Analiza metabolnih poti za sintezo metoksimalonil-ACP je pokazala, da je poleg že poznane metoksimalonilne skupine genov (*fkb*G, H, I, J in K), ki se nahaja znotraj genske skupine za biosintezo FK506 (Goranovič in sod., 2010), prisotna tudi druga skupina homolognih genov. Novo homologno skupino genov smo po primerjavi aminokislinskega zaporedja anotirali in označili z *orf*G2, *orf*H2, *orf*I2, *orf*J2 in *orf*K2, nahaja pa se znotraj genske skupine za biosintezo sekundarni metabolita - poliketida *St*-PKS2 (Poglavje 4.2.3). Tudi ti novo identificirani geni so predvidoma odgovorni za biosintezo podaljševalne enote metoksimalonil-ACP. Celotno nukleotidno zaporedje soseske, v kateri smo identificirali gene *orf*G2, *orf*H2, *orf*J2 in orfK2 (newbler-contig00001), smo shranili v podatkovni bazi GenBank pod oznako JX081656.

V genomu S. *tsukubaensis* NRRL 18488 smo pri analizi metabolnih poti za podaljševalno enoto etilmalonil-CoA, identificirali tudi operon, ki nosi zapis za encime pred kratkim odkrite metabolne poti etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007) (operon smo označili kot ecmOp). V genomu smo identificirali tudi gen za metilmalonil-CoA/etilmalonil-CoA epimerazo, ki prav tako sodeluje v poti etilmalonil-CoA, vendar se ne nahaja v omenjenem operonu.

5.1.5 Novo odkrite genske skupine za sintezo sekundarnih metabolitov

Modularna organizacija PKS in NRPS, predstavlja velik izziv za nove generacije metod sekvenciranja, še posebej tistih metod, ki generirajo večje število krajših odčitkov. Uporaba takšnih metod za de novo sekvenciranje genoma otežuje združevanje sekvenc v neprekinjene soseske v delih, kjer se nahajajo modularni PKS in NRPS. Takšne genske skupine za biosintezo poliketidnih sekundarnih metabolitov so namreč lahko velike tudi več kot 100 kbp in so zato po sestavljanju sekvenc pogosto razdeljene na več kot eno sosesko. Pravilno sestavljanje v soseske pa še zlasti otežuje modularna organizacija PKS in NRPS biosinteznih genov. Moduli znotraj posameznega gena med seboj pogosto izkazujejo visoko stopnjo identičnosti v nukleotidnem zaporedju, kar lahko predstavlja veliko težavo za računalniške algoritme, ki odčitke združujejo v soseske. Pogoste napake, ki se pojavljajo pri avtomatskem sestavljanju modularnih PKS genov, so inverzije oz. zamenjave orientacije in delecije celotnih modulov. Zaradi naštetih razlogov smo se odločili za dodatno natančno analizo s pomočjo programskega orodja ClustScan, tistih zloženih sekvenc, kjer smo identificirali encimske domene, specifične za PKS in NRPS . S programom smo identificirali in analizirali 4 predvidene PKS (FK506 in St-PKS2 do St-PKS4) in 6 predvidenih NRPS (St-NRPS1 do St-NRPS6) genskih skupin ter napovedali njihovo modularno organizacijo. Filogenetska analiza novo odkritih KS domen je pokazala podobnost predvidenih genskih skupin z nekaterimi že opisanimi sekundarnimi metaboliti. Tako na primer genska skupina St-PKS2 po svoji organizaciji kaže veliko podobnost z gensko skupino za sintezo makrolida konkanamicina pri bakteriji Streptomyces neyagawaensis (Haydock in sod., 2005).

5.1.6 Podrobna analiza genske skupine *St*-PKS4

Po sestavljanju odčitkov genoma v soseske s programskim orodjem MIRA 3 smo dele genske skupine za St-PKS4 našli na treh ločenih soseskah (c43, c213 in c288). Nukleotidno zaporedje omenjenih sosesk smo podrobno analizirali s programskim paketom ClustScan. Z analizo smo uspeli predvideti vrstni red in orientacijo sosesk ter identificirati štiri potencialna mesta v sekvenci, kjer bi lahko prišlo do napak med postopkom sekvenciranja genoma. Identificirane napake sekvenciranega nukleotidnega zaporedja so povzročile zamike bralnega okvirja, kar smo zaznali kot prekinitve predvidenih PKS genov. Identificirane napake v nukleotidnem zaporedju so bile večinoma posledica visoke vsebnosti GC v DNA sekvenci in lokalnih zaporedij več istih baznih ostankov (homopolimeri DNA). Uporabljena metoda sekvenciranja celotnega genoma, lahko v nekaterih primerih znotraj takšnih sekvenc napačno določi število istih baz, ki se ponovijo, in s tem povzroči navidezen zamik bralnega okvirja ter napačno anotacijo predvidenih proteinov. Predvidene napake v prvotnem nukleotidnem zaporedju in pravilnost povezovanja sosesk c43, c213 in c288, smo poskušali potrditi s pomočjo pomnožitve izbranih odsekov genoma z verižno reakcijo s polimerazo in dodatnim sekvenciranjem z dideoksinukleotidno metodo.

Začetni poskusi pomnoževanja DNA z uporabo PCR pripravljeno z prvotnimi oligonukleotidnimi začetniki in uporabo splošne termostabilne DNA-polimeraze Phusion (Finnzymes), zaradi visoke vsebnosti GC (Mamedov in sod., 2008) niso bili uspešni. Za povečanje uspešnosti PCR smo zato uporabili DNA-polimerazo, prilagojeno za pomnoževanje DNA z visoko vsebnostjo GC baznih parov AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (Invitrogen) in nove oligonukleotidne začetnike, konstruirane tako, da so se med postopkom PCR na DNA matriko prilegali pri višjih temperaturah. S pomočjo nove DNA-polimeraze in prilagojenih pogojev za PCR, smo uspeli pomnožiti izbrane segmente DNA. V obeh primerih je bilo potrebno za uspeh uporabiti prilagojene reagente in pogoje. Po uspešnem kloniranju PCR produktov v komercialne plazmide, smo konstruktom uspeli določit nukleotidno zaporedje šele z uporabo prilagojenega postopka za težavno sekvenciranje, ki smo ga izvedli pri podjetju Macrogen (Republika Koreja).

Ta rezultat nakazuje, da povezovanje sosesk poleg modularne organizacije PKS, otežujejo tudi stabilne sekundarne strukture, ki pri standarnih pogojih pomnoževanja DNA s PCR in tudi standarnih pogojih pirosekvenciranja onemogočajo branje nukleotidnega zaporedja. Povezano nukleotidno zaporedje v skupni velikosti 108,2 kb s popravljenimi napakami iz prvotnega sekvenciranja genoma, smo shranili v podatkovno bazo Genbank z dodeljeno oznako (GI:389478798).

5.1.7 Analiza izražanja genske skupine St-PKS2

Po prvotni identifikaciji in bioinformacijski analizi genskih skupin za nove sekundarne metabolite smo se odločili, da pokažemo tudi izražanje oz. aktivnost te genske skupine. Poznani so številni primeri genskih skupin sekundarnih metabolitov, za katere velja, da so v standardnih pogojih kultivacije lahko neaktivni (speči ali utišani) (Chiang in sod., 2011; Scherlach in Hertweck, 2009). Prav tako bi se v velikih genomih streptomicet lahko nahajali ostanki nefunkcionalnih genskih skupin, ki so tekom evolucije izgubili svojo vlogo. Zato smo se odločili, da izražanje PKS genov genske skupine *St*-PKS2 v standardnih pogojih kultivacije za produkcijo FK506, potrdimo na nivoju transkripcije.

Analizo z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) smo izvedli na vzorcih mRNA izoliranih iz produkcijskega gojišča PG3 po 62 h kultivacije. Iz že objavljenih podatkov je znano, da je v tem času že mogoče zaznati transkripcijo FK506 genske skupine (Goranovič in sod., 2012). Zato smo predvidevali, da v tej fazi kultivacije že prihaja do aktivacije sekundarnega metabolizma in se bodo v tem času pričele izražali tudi genske skupine za druge sekundarne metabolite.

Za namen RT-PCR analize smo najprej konstruirali specifične oligonukleotidne začetnike. Ta korak je bi ključen, saj so si nukleotidna zaporedja modularno organiziranih genov za PKS pogosto zelo podobna, kar lahko povzroči nespecifično pomnoževanje fragmentov DNA. Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov smo pred RT-PCR preizkusili še s pomočjo PCR na izolirani genomski DNA. Identiteto pomnoženih nukleotidnih zaporedij pa smo po RT-PCR analizi še dodatno potrdili s pomočjo sekvenciranja.

Rezultati RT-PCR analize so v izbranih pogojih potrdili izražanje dveh (*pks*2 in *pks*4) od treh analiziranih genov genske skupine *St*-PKS2. Translacije gena za PKS1 z uporabljenim parom oligonukleotidnih začetnikov nismo uspeli potrditi. Razlog za neuspešno zaznavanje transkripcije gena PKS1 je lahko nepravilna anotacija gena *pks*1 in s tem povezana uporaba neprimernih oligonukleotidnih začetnikov (Slika 34). Alternativna anotacija gena *pks*1 ki predvideva drugi začetni kodon, gen skrajšaza 126 bp, kar bi povzročilo prileganje uporabljenega oligonukleotidnega začetnika (Concanlike1-Fw) zunaj dejanskega RNA transkripta in tako pojasnilo neuspešno zaznavanje transkripcije tega gena.

Na podlagi predvidene kemijske strukture poliketida, ki nastane kot produkt genske skupine *St*-PKS2, smo poskusili identificirati novo spojino s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti v kombinaciji z masno spektrometrijo (LC-MS). Iztočnica za iskanje predvidenega produkta genske skupine *St*-PKS2 je bila strukturna podobnost z bafilomicinom A1 in konkanamicinom A. Vendar se je kmalu pokazalo, da je nezmožnost natančne določitve molekulske mase nove spojine ključna težava pri teh eksperimentih. Težavo smo sicer poskušali rešiti z iskanjem fragmentov razpada nove spojine, za katere smo predpostavili, da so skupni vsem strukturno podobnim spojinam. Tisti del molekule,

ki je med bafilomicinom A1 in konkanamicinom A ter novo spojino identičen, verjetno v masnem detektorju razpade na enake fragmente in tako olajšal identifikacijo nove spojine. Po več neuspešnih meritvah smo spoznali, da je predvidena struktura nove spojine preveč nezanesljiva, da bi jo lahko enostavno detektirali. V nekaterih delih osnovnega poliketidnega skeleta namreč strukture ni bilo mogoče natančno napovedati, še dodatno variabilnost v strukturo spojine pa bi lahko vnesli potencialno prisotni post-PKS procesi.

Rezultati izražanja genov iz genske skupine *St*-PKS2, kažejo na možnost aktivne biosinteze novega sekundarnega metabolita. Sinteza takšnega z vidika porabe gradbenih enot konkurenčnega poliketida bi v divjem bakterijskem sevu *S. tsukubaensis*, lahko zmanjševala donos metabolita FK506. Vendar lahko zaradi aktivnosti genske skupine *St*-PKS2 obstaja tudi možnost pozitivnega vpliva na donos FK506. V tej genski skupini se namreč nahajajo tudi geni (*orf*G2-*orf*K2) za encime, ki predvidoma omogočajo sintezo nenavadne gradbene enote metoksimalonil-ACP (Poglavje 4.2.3), potrebne tudi za biosintezo FK506. Pri povečanju izražanja genov za sintezo metoksimalonil-ACP iz FK506 genske skupine (*fkbGHIJK*) raziskovalci namreč poročajo o pozitivnem vplivu na produkcijo FK506 (Chen in sod., 2012).

5.1.8 Vpliv primarnega metabolizma na produkcijo FK506 in FK520

Preusmerjanje toka primarnega metabolizma proti biosintezi sekundarnih metabolitov je pogosto uspešna strategija metabolnega inženiringa za optimizacijo produktivnosti industrijskih mikroorganizmov. Vendar pa je takšen takšen način izboljšave produkcije lahko nepredvidljiv, predvsem zaradi regulatorne povratne zank, ki vzdržujejo konstantne koncentracije različnih intermediatov znotraj celice. Prekinitev ali prekomerno izražanje posameznega gena iz katere od predvidenih metabolnih poti zato ne prinese vedno želenih rezultatov (Thykaer in sod., 2010). V takšnih primerih je potrebno proučiti in razumeti vpliv celotne metabolne poti in ne samo posameznih genov ter upoštevati njeno prepletenost s preostalim metabolizmom (Huang in sod., 2013a).

V primerjavi s študijami nekaterih strukturno enostavnejših spojin iz primarnega metabolizma, so študije biosinteze kompleksnih sekundarnih metabolitov, kot je FK506, veliko bolj zahtevna naloga, saj vključujejo razumevanje kompleksnih in večslojnih povezav primarnega in sekundarnega metabolizma, številnih multiencimskih kompleksov, ki so vključeni v biosintezo strukturno kompleksnih sekundarnih metabolitov, ter zapletene poti delovanja globalnih in specifičnih regulatorjev.

Proučevanje biosinteze FK506, kot medicinsko in ekonomsko pomembnega metabolita, je v zadnjih letih prineslo pomemben preboj na področju razumevanja mehanizmov njegove biosinteze, povečevanja produkcije in zmanjševanja prisotnosti nečistoč. Na področju povečevanja donosa FK506 so se izkazale uspešne strategije dohranjevanja z nekaterimi

prekurzurji za sintezo gradbenih enot, kot so metiloleat (sinteza metilmalonil-CoA) (Mo in sod., 2009), različni viri maščobnih kislin kot je sojino olje (sinteza različnih acil-CoA enot) (Mishra in Verma, 2012), pipekolno in pikolinsko kislino (sinteza zaključne enote) (Turlo in sod., 2012), L-lizina (sinteza zaključne enote) in nekaterih drugih aminokislin (Martinez-Castro in sod., 2013; Singh in Behera, 2009; Xia in sod., 2013). Veliko povečanja donosa FK506 so pokazali tudi rezultati optimizacije vodenja bioprocesa dohranjevanja (Xia in sod., 2013) ter postopne adaptacije rezistence produkcijskega seva na visoko koncentracijo produkta FK506 (Jung in sod., 2009), kjer so uspeli doseči končni donos 972 mg/L.

Povečanje donosa in spremembe v razmerju nečistoč so raziskovalci uspešno dosegli tudi s pomočjo genskega inženiringa številnih metabolnih poti. Tako so Mo in sod. (2009) uspeli za ~50 % povečati produkcijo FK506 s heterolognim izražanjem metilmalonil-CoA mutaze. Chen in sod. (2012) poročajo o hkratnim povečanju ekspresije genov za sintezo metoksimalonil-ACP (geni *fkbGHIJK*) in sintezo alilmalonil-CoA (geni *tcsABCD*), kar je povečalo produkcijo FK506 za ~150 %. Raziskovalci poročajo tudi o pozitivnih učinkih heterologne ekspresije propionil-CoA karboksilaze (PCC) (gena *accAI* in *pccB*) na produkcijo FK506, ki se je v tem primeru povečala za ~75% (Mo in sod., 2013). Prav tako so s istočasnim prekomernim izražanjem genov *fkbO* (sinteza začetne enote DHCHC), *fkbL* (sinteza pipekolata) ter *fkbM* in *fkbD* (post-PKS modifikacije) uspeli povečati produkcijo FK506 za 146 % (Huang in sod., 2013b). Navedeni primeri kažejo na to, da je dostopnost gradbenih enot lahko pomemben omejitveni faktor pri sintezi FK506.

Pred kratkim so bili pojasnjeni mehanizmi nastanka nenavadne gradbene enote alilmalonil-CoA (Goranovič in sod., 2010; Mo in sod., 2011), medtem ko so vpletene metabolne poti za nastanek gradbene enote etilmalonil-CoA ostale nejasne. Rezultati raziskav, ki so jo opravili Kosec in sod. (2012) so pokazali, da prekinitev gena ccr1 ni bistveno vplivala na biosintezo FK520 in FK506, med tem ko je prekinitev njegovega homologa gena allR, popolnoma ustavila produkcijo FK506 in FK520. Rezultati so bili delno v nasprotju z ugotovitvami, ki so jih predstavili Mo in sod. (2011), kjer je prekinitev gena tcsC (homolog allR) v organizmu Streptomyces sp. KCTC11604BP sicer povzročila prekinitev produkcije FK506, ni pa prišlo do zmanjšanja produkcije FK520. Zaradi omenjenih razhajanj v predstavljenih rezultatih in zaradi nejasne vloge poti etilmalonil-CoA pri sintezi FK520 smo se odločili, da to podrobneje raziščemo. Namen našega dela je bil proučiti vpliv primarne metabolne poti etilmalonil-CoA na produkcijo sekundarnih metabolitov FK506 in FK520 v sevu S. tsukubaensis NRRL18488. Ta metabolna pot je pri mnogih bakterijah odgovorna za asimilacijo acetata (Erb in sod., 2009b). Eden osrednjih intermediatov te metabolne pot je (2S)-etilmalonil-CoA, ki se uporablja tudi kot podaljševalna enota pri sintezi FK520.

V ta namen smo v sevih z prekinjenim genom *allR*, ki so bili predhodno narejeni v raziskavi Kosec in sod. (2012), prekomerno izrazili gen *ccr1* (za encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza), celotnen operon ključnih genov poti etilmalonil-CoA (ecmOp) ter konstruiran umetni operon (allR_ecmOp*) v katerem smo gen *ccr1* zamenjali z genom *allR* in obdržali preostale gene operona EcmOp (*ecm, mml, mch* in *msd*). Dobljeni rezultati so pokazali, da *trans* komplementacija gena *allR* v sevu *S. tsukubaensis* z predhodno inaktiviranim genom *allR* povrne sposobnost biosinteze FK506 in FK520, vendar so koncentracije nastalih produktov nekoliko nižje (FK506: 23,6 ± 4,9 mg/L in FK520: 3,4 ± 0,7 mg/L), kot jih proizvaja kontrolni sev divjega tipa (FK506 32,6 ± 4,3 mg/L in FK520: 5,0 ± 1,4 mg/L). Pri sevu *S. tsukubaensis* z inaktiviranim genom *allR*, kjer smo čezmerno izrazili gen *ccr1*, se je produkcija FK520 relativno učinkovito povrnila (FK520: 2,3 ± 0,8 mg/L), medtem ko produkcije FK506 z uporabljeno HPLC metodo nismo zaznali. Glede na to lahko sklepamo, da encim Ccr1 kaže relativno dobro specifičnost za substrat krotonil-CoA, iz katerega tvori etilmalonil-CoA, encim AllR pa je sposoben katalizirati reakcijo redukcije/karboksilacije tako na substratih s 4 kot na substratih s 5 ogljikovimi atomi.

Prav tako smo uspeli eksperimentalno dokazati ključen pomen poti etilmalonil-CoA v bakteriji *S. tsukubaensis* NRRL 18488 kot edine primarne metabolne poti, ki omogoča rast na gojiščih z acetatom kot edinem viru ogljika. Sev z inaktiviranim operonom za pot etilmalonil-CoA je namreč izgubil sposobnosti rasti na acetatu, komplementacija z prekomerno izraženim operonom pa je sposobnost rasti na acetatu povrnila. Za potrditev možnosti komplementacije encima Ccr1 z AllR in s tem povrnitev rasti na acetatu smo konstruirali umetni operon (allR_ecmOp*) v katerem smo gen *ccr1* zamenjali z genom *allR* in obdržali preostale gene operona EcmOp (*ecm, mml, mch* in *msd*). Vendar so rezultati rasti na acetatu pokazali, da encim AllR ne more uspešno nadomestiti delovanja encima Ccr1 in omogočitifunkcionalnega delovanja poti etilmalonila-CoA.

Za vsa prekomerna izražanja oziroma komplementacije genov smo uporabili mesto specifičen integrativen plazmid pSET152, ki se v genom streptomicet stabilno vgradi na mestu *attP* s pomočjo na plazmidu prisotnega gena za integrazo iz bakteriofaga ϕ C31 (Bierman in sod., 1992; Kuhstoss in Rao, 1991). Za prekomerno izražanje smo uporabili integracijski plazmid pSET152+ermE*. Tako vneseni geni so bili pod kontrolo močnega konstitutivnega promotorja ermE*, ki v organizmu *S. tsukubaensis* NRRL 18488 dobro deluje (Goranovič in sod., 2012; Magdevska in sod., 2010).

5.2 SKLEPI

Izhajajoč iz zastavljenih delovnih hipotez doktorske disertacije smo prišli do naslednjih sklepov:

- S pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 smo identificirali ključne metabolne poti za biosintezo gradbenih enot za FK506 in FK520, ki vključujejo: derivat šikimata kot začetno enoto, s CoA aktivirane karboksilne kisline za izgradnjo poliketidne verige (malonil-CoA, metilmalonil-CoA, metoksimalonil-ACP, alilmalonil-CoA) ter pipekolat, derivat aminokisline L-lizin.
- S pomočjo bioinformacijskih analiz smo uspeli v sekvenci genoma *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 poiskati in identificirati genske skupine za sintezo potencialnih sekundarnih metabolitov (konkurenčne biosintezni FK506) in sicer tri genske skupine, ki vsebujejo modularne gene PKS in šest genskih skupin, ki vsebujejo gene NRPS.
- Z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) smo uspeli na nivoju transkripcije potrdili izražanje genske skupine *St*-PKS2, ki predvidoma omogoča sintezo bafilomicinu podobnega sekundarnega metabolita.
- S pomočjo bioinformacijskih analiz genoma *S. tsukubaensis* smo uspeli predvideti sosledje prekinjenih sosesk (angl. contigs), na katere je bila razdeljena genska skupina *St*-PKS4 ter določiti mesta v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do napak v prvotnem sekvenciranju genoma.
- Predvideno sosledje sosesk, ki sestavljajo gensko skupino *St*-PKS4 smo nato eksperimentalno potrdili s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo in tudi dopolnili manjkajoče nukleotidno zaporedje vmesnih regij genske skupine *St*-PKS4.
- Združeno nukleotidno zaporedje za gensko skupino *St*-PKS4 v skupni velikosti 108,2 kb s popravljenimi napakami iz prvotnega sekvenciranja genoma smo shranili v podatkovno bazo Genbank z dodeljeno oznako (GI:389478798).
- Glede na rezultate rasti *Streptomyces tsukubaensis* seva wt in $\Delta ecmOp$ lahko sklepamo, da ima delujoča pot etilmalonil-CoA odločilno vlogo pri rasti na acetatu.
- Glede na rezultate rasti pripravljenih mutant *S. tsukubaensis* lahko sklepamo, da prekomerno izražanje gena *allR* iz genske skupine za biosintezo FK506 ne more nadomestiti Ccr, homolognega encima iz metabolne poti etilmalonil-CoA, in povrniti funkcionalnega delovanja poti etilmalonil-CoA.
- Glede na rezultate produkcije FK506 in FK520 lahko sklepamo, da lahko prekomerno izražen encim metabolne poti etilmalonil-CoA Ccr nadomesti delovanje encima AllR pri sintezi etilmalonil-CoA oziroma FK520, ne pa pri sintezi alilmalonil-CoA oziroma FK506.

5.3 POTRDITEV HIPOTEZ

Glede na postavljene hipoteze nam je uspelo:

- S pomočjo bioinformacijske analize genoma *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 smo uspeli identificirati verjetne biosintezne gene in metabolne poti vpletene v preskrbo gradbenih enot za biosintezo FK506, FK520 in drugih potencialnih poliketidnih sekundarnih metabolitov.
- S pomočjo bioinformacijskih analiz smo v sekvencah genoma *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 poleg genske skupine za biosintezo FK506 uspeli poiskati in identificirati še več genskih skupin, ki verjetno sodelujejo pri sintezi novih sekundarnih metabolitov in sicer tri genske skupine, ki vsebujejo gene PKS in šest genskih skupin, ki vsebujejo gene NRPS.
- S pomočjo bioinformacijskih analiz smo uspeli identificirati gene primarne metabolne poti etilmalonil-CoA, nato pa smo tudi potrdili vlogo teh genov v procesih primarnega metabolizma. Z metodo prekomernega izražanja gena *ccr1*, ki kodira enega ključnih encimov te metabolne poti, smo uspeli dokazati, da lahko ta gen delno prevzame vlogo svojega homologa AllR iz sekundarnega metabolizma. Encim Ccr namreč omogoča biosintezo etilmalonil-CoA, ta gradbena enota sodeluje pri biosintezi spojine FK520.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

FK506 (takrolimus) in njegovi strukturno in biogenetsko podobni analogi FK520, meridamicin ter rapamicin so sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo bakterije rodu *Streptomyces spp*. Glede na kemijsko strukturo te spojine spadajo v skupino poliketidnih makrolaktonskih antibiotikov in so registrirane za klinično uporabo kot imunosupresivi po transplantacijah organov, za zdravljenje rakastih obolenj ter za zdravljenje vnetnih bolezni kože in ekcemov. V zadnjem času klinične študije kažejo, da imajo te učinkovine velik potencial tudi za zdravljenje bolezni srca in ožilja, avtoimunskih ter nevrodegenerativnih bolezni (Allison, 2000; Demain, 2006; Easton in Houghton, 2004).

Glede na biosintezni izvor rapamicin, meridamicin, FK506 in FK520 uvrščamo med poliketide, ki jih sintetizirajo encimski kompleksi, v katerih sodelujejo poliketid-sintaze (PKS) in neribosomske peptid sintetaze (NRPS). Mehanizmi biosinteze teh strukturno podobnih spojin in razumevanje sinteze njihovih gradnikov so bili v zadnjem času predmet številnih raziskav. V primerjavi s študijami nekaterih strukturno enostavnejših spojin iz primarnega metabolizma so študije biosinteze kompleksnih sekundarnih metabolitov, kot je FK506, veliko bolj zahtevna naloga, saj vključujejo razumevanje kompleksnih in večslojnih povezav primarnega in sekundarnega metabolizma, številnih multiencimskih kompleksov, ki so vključeni v biosintezo strukturno kompleksnih sekundarnih metabolitov ter zapletene poti delovanja globalnih in pot-specifičnih regulatorjev. Kompleksna regulacija metabolnih poti pri biosintezi FK506 in njemu podobnih metabolitov, je rezultat prepletanja različnih metabolnih procesov. Te procese lahko razdelimo na več skupin (i) poti primarnega metabolizma, ki neposredno ali posredno vplivajo na oskrbo s substrati za biosintezo FK506, (ii) poti povezane z oskrbo z gradbenimi enotami (nekateri ključni geni so locirani znotraj FK506 genske skupine), (iii) regulatorni procesi, ki uravnavajo biosintezo sekundarnih metabolitov; in (iv) konkurenčne biosintezne poti, npr. delovanje PKS, ki kodirajo biosintezo drugih sekundarnih metabolitov v istem mikroorganizmu. Rezultati številnih projektov sekvenciranja genomov streptomicet in drugih aktinomicet so pokazali, da posamezni sev vsebuje genski zapis za številne sekundarne metabolite (Bentley in sod., 2002; Ikeda in sod., 2003; Oliynyk in sod., 2007), ki med seboj pogosto tekmujejo za iste substrate.

Velikost streptomicetnih genomov in visoka vsebnost baznih parov GC v primerjavi z ostalimi bakterijami otežuje postopek sekvenciranja in združevanje nukleotidnih zaporedij v večje soseske. Slaba kvaliteta pridobljenih sekvenc pa posledično oteži tudi sestavljanje nukleotidnih zaporedij genskih skupin, ki vsebujejo gene PKS oziroma NRPSin ki so zato razdeljene na večje število ločenih sosesk, Poleg tega lahko napake v nukleotidnem zaporedju povzročijo zamike bralnega okvirja znotraj zelo velikih PKS proteinov. Pri

našem raziskovalnem delu smo v genomu *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 iskali potencialne genske skupine, ki vsebujejo modularne gene PKS in NRPS . Za združevanje nepovezanih sosesk, ki so pripadale isti genski skupini, smo uporabili filogenetski pristop. V genomu *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 smo identificirali skupaj štiri PKS ter šest NRPS genskih skupin. Zbrana nukleotidna zaporedja na novo identificiranih genskih skupin smo podrobneje analizirali s pomočjo programa ClustScan. S programom smo predvideli sosledje in usmerjenost prekinjenih sosesk ter določiti potencialna mesta, kjer je zaradi napake v sekvenciranju prišlo do zamika bralnega okvirja. Na podlagi teh podatkov smo izvedli več PCR reakcij, s katerimi smo eksperimentalno potrdili predlagan vrstni red sosesk in določili novo, pravilno nukleotidno zaporedje genske skupine *St*-PKS4. Povezano nukleotidno zaporedje v skupni velikosti 108,2 kb s popravljenimi napakami iz prvotnega sekvenciranja genoma, smo shranili v podatkovno bazo Genbank z dodeljeno oznako (GI:389478798). Z RT-PCR analizo transkripcije smo dokazali, da *S. tsukubaensis* NRRL18488 aktivno izraža tudi gensko skupino *St*-PKS2, ki predvidoma omogoča sintezo bafilomicinu podobnega sekundarnega metabolita.

S pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *S. tsukubaensis* NRRL 18488 smo identificirali ključne metabolne poti za sintezo gradbenih enot spojin FK506 in FK520, ki vključujejo derivat šikimata kot začetno enoto, s CoA aktivirane karboksilne kisline za izgradnjo poliketidne verige (malonil-CoA, metilmalonil-CoA, metoksimalonil-ACP, alilmalonil-CoA) ter derivat aminokisline L-lizin, pipekolat. Prav tako smo uspeli identificirat ter proučit vlogo poti etilmalonil-CoA v primarnem metabolizmu, kjer je ključna pri rasti na acetatu kot edinem viru ogljika. S pomočjo prekomernega izražanja gena *ccr1*, ki kodira enega ključnih encimov pot etilmalonil-CoA, smo uspeli dokazati, da lahko ta gen delno prevzame vlogo svojega homologa AllR iz sekundarnega metabolizma. Encim Ccr namreč omogoča biosintezo etilmalonil-CoA, ne pa tudi alilmalonil-CoA, zato pride do izključne biosinteze spojine FK520.

S to doktorsko nalogo smo prispevali k boljšem poznavanju biosinteznih poti, ki posredno ali pa neposredno vplivajo na končni donos FK506 in njemu sorodnih metabolitov. Pridobljeno znanje bo doprineslo k povečanju končnega donosa ali zmanjšanju količine neželenih intermediatov in stranskih produktov v okviru programov za izboljševanje streptomicetnih sevov, ki potekajo v različnih raziskovalnih skupinah. Prav tako smo pokazali, da je sekvenciranje genomov streptomicet in natančna bioinformacijska analiza pravi način in močno orodje za prihodnje iskanje novih sekundarnih metabolitov, med katerimi bodo lahko tudi številne potencialno medicinsko pomembne spojine.

6.2 SUMMARY

FK506 (tacrolimus) and its structural analogs, FK520 and rapamycin are secondary metabolites belonging to a class of polyketide / macrolactone antibiotic compounds produced by bacteria of the genus *Streptomyces spp*. Based on chemical structure these compounds belong to the group of antibiotics poliketidnih macrolactone, which are currently registered for use as immunosuppressants after organ transplantation as well as for treatment of various forms of cancer, inflammatory skin diseases and eczema. In recent clinical studies, these compounds also show great promise for treatment of cardiovascular diseases, as well as for autoimmune and neurodegenerative diseases (Allison, 2000; Demain, 2006; Easton and Houghton, 2004).

Their complex chemical structures are mirrored in the complex biosynthetic machinery based on the megaenzymes of the polyketide synthase /non-ribosomal-peptide synthetase families (PKS/NRPS). Mechanisms of biosynthesis of these structurally similar compounds and their understanding of the synthesis building blocks have been recently the subject of numerous studies. Compared to the more simple primary metabolic product, the study of biosynthesis of a complex secondary metabolite such as FK506 is a much more demanding task, when considering complex and multilayer networks between primary and secondary metabolism, complex biosynthetic machineries carrying out biosynthesis of structurally complex secondary metabolites and intricate regulatory networks which govern the biosynthesis of such a complex structures. These can be divided into the following groups: (i) genes of primary metabolic pathways directly or indirectly influencing substrate supply for FK506 biosynthesis, (ii) genes involved in the supply of building blocks (some located within the FK506 gene cluster), (iii) regulatory genes governing the biosynthesis of a secondary metabolite and (iv) genes involved in competing pathways. It is now evident from whole genome sequencing projects that a single streptomycete often encodes numerous secondary metabolite gene clusters (Bentley et al., 2002; Ikeda et al., 2003; Oliynyk et al., 2007), which are likely competing for the common substrate supply.

The high GC content and large genome size make the sequencing and assembly of *Streptomyces* genomes more difficult than for other bacteria. Additional, the analysis of PKSs and NRPSs gene clusters is difficult if the genome sequence is not of the highest quality, because clusters can be distributed over several contigs, and sequencing errors can introduce apparent frameshifts into the large PKS and NRPS proteins. The genome sequence of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 was scanned for potential PKS and NRPS modular clusters. A phylogenetic approach was used to identify multiple contigs belonging to the same cluster. Four PKS clusters and six NRPS clusters were identified. Contigs containing cluster sequences were analyzed in detail by using the ClustScan program, which suggested the order and orientation of the contigs. The sequencing of the

appropriate PCR products confirmed the ordering and allowed the correction of apparent frameshifts resulting from sequencing errors. Nucleotide sequence in the total size of 108.2 kb with corrected errors from the original sequencing of the genome, was stored in the Genbank database with the assigned code (GI: 389478798). The analysis of PKS cluster *St*-PKS2 showed that it should produce a bafilomycin-like compound, and reverse transcription RT-PCR was used to show that the cluster was actively transcribed.

Whole genome sequencing of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of FK506, and annotation of the FK506 gene cluster, in the scope of this work allowed us to identify putative genes and biosynthetic pathways providing building blocks for FK506 and FK520 biosynthesis including shikimate-derived starter unit, simple CoA-activated carboxylic acids for the formation of polyketide backbone (malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA, allylmalonyl-CoA), methoxymalonyl-ACP (acyl carrier protein) and L-lysine-derived pipecolic acid. We have also identified the ethylmalonyl-CoA pathway and examined its role in primary metabolism. This pathway is essential for growth on acetate as the sole carbon source. With *ccr1* gene over-expression, encoding one of the key enzymes of the ethylmalonyl-CoA pathway, we have been able to demonstrate that the latter can partly replace the role of a protein homologue AllR. Ccr is involved in the synthesis of etilmalonil-CoA, but not alilmalonil-CoA, which results in the exclusive biosynthesis of FK520.

This thesis was focused on the understanding of biosynthetic pathways that affect the production of FK506 and related compounds. The knowledge obtained during these studies will help further the development of industrially important streptomycetes where a final high yield and a favourable impurity profile are highly desired. In this thesis we have also showed that genome sequencing and a careful bioinformatic analysis can aid the discovery of novel secondary metabolites which might be medically important or otherwise useful.

7 VIRI

- Akopiants K., Florova G., Li C., Reynolds K. A. 2006. Multiple pathways for acetate assimilation in *Streptomyces cinnamonensis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 2: 141-150
- Alber B. E. 2011. Biotechnological potential of the ethylmalonyl-CoA pathway. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 1: 17-25
- Alber B. E., Spanheimer R., Ebenau-Jehle C., Fuchs G. 2006. Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides*. Molecular Microbiology, 61, 2: 297-309
- Allison A. C. 2000. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology, 47, 2-3: 63-83
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 3: 403-410
- An J. H., Kim Y. S. 1998. A gene cluster encoding malonyl-CoA decarboxylase (MatA), malonyl-CoA synthetase (MatB) and a putative dicarboxylate carrier protein (MatC) in *Rhizobium trifolii*--cloning, sequencing, and expression of the enzymes in *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry, 257, 2: 395-402
- Anderson A. S., Wellington E. M. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 51, Pt 3: 797-814
- Andexer J. N., Kendrew S. G., Nur-e-Alam M., Lazos O., Foster T. A., Zimmermann A. S., Warneck T. D., Suthar D., Coates N. J., Koehn F. E., Skotnicki J. S., Carter G. T., Gregory M. A., Martin C. J., Moss S. J., Leadlay P. F., Wilkinson B. 2011. Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 12: 4776-4781
- Angiuoli S. V., Gussman A., Klimke W., Cochrane G., Field D., Garrity G., Kodira C. D., Kyrpides N., Madupu R., Markowitz V., Tatusova T., Thomson N., White O. 2008. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 12, 2: 137-141
- Arabolaza A., Shillito M. E., Lin T. W., Diacovich L., Melgar M., Pham H., Amick D., Gramajo H., Tsai S. C. 2010. Crystal structures and mutational analyses of acyl-CoA carboxylase beta subunit of *Streptomyces coelicolor*. Biochemistry, 49, 34: 7367-7376
- Arndt C., Cruz M. C., Cardenas M. E., Heitman J. 1999. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. Microbiology, 145, 8: 1989-2000
- Assmann T., Homey B., Ruzicka T. 2000. Applications of tacrolimus for the treatment of skin disorders. Immunopharmacology, 47, 2-3: 203-213
- Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. 2008. The

RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics, 9: 75, doi: 10.1186/1471-2164-9-75: 15 str.

- Ban Y. H., Lee J. H., Gu G. R., Lee B., Mo S., Kwon H. J., Yoon Y. J. 2013. Mutational biosynthesis of a FK506 analogue containing a non-natural starter unit. Molecular BioSystems, 9, 5: 944-947
- Baranasic D., Gacesa R., Starcevic A., Zucko J., Blažič M., Horvat M., Gjuračić K., Fujs Š., Hranueli D., Kosec G., Cullum J., Petković H. 2013. Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus strain* NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. Genome announcements, 1, 4: e00581-13, doi:10.1128/genomeA.00581-13: 2 str.
- Barreiro C., Prieto C., Sola-Landa A., Solera E., Martinez-Castro M., Perez-Redondo R., Garcia-Estrada C., Aparicio J. F., Fernandez-Martinez L. T., Santos-Aberturas J., Salehi-Najafabadi Z., Rodriguez-Garcia A., Tauch A., Martin J. F. 2012. Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). Journal of Bacteriology, 194, 14: 3756-3757
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 417, 6885: 141-147
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E. T., Rao R. N., Schoner B. E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene, 116, 1: 43-49
- Blažič M., Starcevic A., Lisfi M., Baranasic D., Goranović D., Fujs Š., Kuscer E., Kosec G., Petković H., Cullum J., Hranueli D., Zucko J. 2012. Annotation of the modular polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in the genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488. Applied and Environmental Microbiology, 78, 23: 8183-8190
- Borodina I., Scholler C., Eliasson A., Nielsen J. 2005. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active entner-doudoroff pathway. Applied and Environmental Microbiology, 71, 5: 2294-2302
- Breinbauer R., Vetter I. R., Waldmann H. 2002. From protein domains to drug candidatesnatural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. Angewandte Chemie, 41, 16: 2879-2890
- Bull A. T., Ward A. C., Goodfellow M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, 3: 573-606
- Buttner M. J., Chater K. F., Bibb M. J. 1990. Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology, 172, 6: 3367-3378

- Caboche S., Pupin M., Leclere V., Fontaine A., Jacques P., Kucherov G. 2008. NORINE: a database of nonribosomal peptides. Nucleic Acids Research, 36: D326-D331, doi: 10.1093/nar/gkm792: 6 str.
- Cabri W., Paissoni P., Roletto J., Morra L. 2006. Process for the purification of tacrolimus. World Intellectual Property Organization WO2006048145(A1): 14 str.
- Cerdeno A. M., Bibb M. J., Challis G. L. 2001. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. Chemistry and Biology, 8, 8: 817-829
- Challis G. L., Hopwood D. A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, Suppl. 2: 14555-14561
- Chan M., Sim T. S. 1998. Malate synthase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585: cloning, molecular characterization and its control by acetate. Microbiology, 144, 11: 3229-3237
- Chan Y. A., Podevels A. M., Kevany B. M., Thomas M. G. 2009. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. Natural Product Reports, 26, 1: 90-114
- Chan Y. A., Thomas M. G. 2009. Formation and characterization of acyl carrier proteinlinked polyketide synthase extender units. Methods in Enzymology, 459: 143-163
- Chater K. F. 2006. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 361, 1469: 761-768
- Chater K. F., Biro S., Lee K. J., Palmer T., Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiology Reviews, 34, 2: 171-198
- Chen D., Zhang L., Pang B., Chen J., Xu Z., Abe I., Liu W. 2013. FK506 maturation involves a cytochrome p450 protein-catalyzed four-electron C-9 oxidation in parallel with a C-31 O-methylation. Journal of Bacteriology, 195, 9: 1931-1939
- Chen D., Zhang Q., Zhang Q., Cen P., Xu Z., Liu W. 2012. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. Applied and Environmental Microbiology, 78, 15: 5093-5103
- Chevreux B., Pfisterer T., Drescher B., Driesel A. J., Muller W. E., Wetter T., Suhai S. 2004. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. Genome Research, 14, 6: 1147-1159
- Chiang Y. M., Chang S. L., Oakley B. R., Wang C. C. 2011. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. Current Opinion in Chemical Biology, 15, 1: 137-143
- Choi-Rhee E., Cronan J. E. 2003. The biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. Journal of Biological Chemistry, 278, 33: 30806-30812
- Cronan J. E., Jr., Waldrop G. L. 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. Progress in Lipid Research, 41, 5: 407-435
- Cvak L., Buchta M., Jegorov A., Blatny P., Keri V., Csorvasi A., Simon A., Mako G. 2007. Purifying tacrolimus. World Intellectual Property Organization WO2007106587(A2): 29 str.

- Dairi T., Kuzuyama T., Nishiyama M., Fujii I. 2011. Convergent strategies in biosynthesis. Natural Product Reports, 28, 6: 1054-1086
- Day L. E., Chamberlin J. W., Gordee E. Z., Chen S., Gorman M., Hamill R. L., Ness T., Weeks R. E., Stroshane R. 1973. Biosynthesis of monensin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4, 4: 410-414
- Demain A. L. 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 7: 486-495
- Demain A. L., Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. Journal of Antibiotics, 62, 1: 5-16
- Demirev A. V., Khanal A., Sedai B. R., Lim S. K., Na M. K., Nam D. H. 2010. The role of acyl-coenzyme A carboxylase complex in lipstatin biosynthesis of *Streptomyces toxytricini*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 3: 1129-1139
- Diacovich L., Mitchell D. L., Pham H., Gago G., Melgar M. M., Khosla C., Gramajo H., Tsai S. C. 2004. Crystal structure of the beta-subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity. Biochemistry, 43, 44: 14027-14036
- Diacovich L., Peiru S., Kurth D., Rodriguez E., Podesta F., Khosla C., Gramajo H. 2002. Kinetic and structural analysis of a new group of Acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Biological Chemistry, 277, 34: 31228-31236
- Dierick H., Stul M., De Kelver W., Marynen P., Cassiman J. J. 1993. Incorporation of dITP or 7-deaza dGTP during PCR improves sequencing of the product. Nucleic Acids Research, 21, 18: 4427-4428
- Donadio S., Sosio M., Lancini G. 2002. Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 4: 377-380
- Donadio S., Staver M. J., Katz L. 1996. Erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. Molecular Microbiology, 19, 5: 977-984
- Dunn M. F., Ramirez-Trujillo J. A., Hernandez-Lucas I. 2009. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. Microbiology, 155, Pt 10: 3166-3175
- Dyson P. 2011. *Streptomyces*: molecular biology and biotechnology. Norfolk, Caister Academic Press: 257 str.
- Easton J. B., Houghton P. J. 2004. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 8, 6: 551-564
- Enriquez L. L., Mendes M. V., Anton N., Tunca S., Guerra S. M., Martin J. F., Aparicio J. F. 2006. An efficient gene transfer system for the pimaricin producer *Streptomyces natalensis*. FEMS Microbiology Letters, 257, 2: 312-318
- Ensign S. A. 2006. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. Molecular Microbiology, 61, 2: 274-276
- Erb T. J., Berg I. A., Brecht V., Muller M., Fuchs G., Alber B. E. 2007. Synthesis of C5dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 25: 10631-10636
- Erb T. J., Brecht V., Fuchs G., Muller M., Alber B. E. 2009a. Carboxylation mechanism and stereochemistry of crotonyl-CoA carboxylase/reductase, a carboxylating enoyl-

thioester reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 22: 8871-8876

- Erb T. J., Fuchs G., Alber B. E. 2009b. (2S)-Methylsuccinyl-CoA dehydrogenase closes the ethylmalonyl-CoA pathway for acetyl-CoA assimilation. Molecular Microbiology, 73, 6: 992-1008
- Erb T. J., Retey J., Fuchs G., Alber B. E. 2008. Ethylmalonyl-CoA mutase from *Rhodobacter sphaeroides* defines a new subclade of coenzyme B12-dependent acyl-CoA mutases. Journal of Biological Chemistry, 283, 47: 32283-32293
- Fehr T., Sanglier J. J., Schuler W., Gschwind L., Ponelle M., Schilling W., Wioland C. 1996. Antascomicins A, B, C, D and E. Novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. Journal of Antibiotics, 49, 3: 230-233
- Fischbach M. A., Walsh C. T. 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. Chemical Reviews, 106, 8: 3468-3496
- Flardh K., Buttner M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology, 7, 1: 36-49
- Flett F., Mersinias V., Smith C. P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiology Letters, 155, 2: 223-229
- Friedman S. M., Kaneda T., Corcoran J. W. 1964. Antibiotic glycosides. V. A comparison of 2-methylmalonate and propionate as percursors of the C21 branched chain lactone in erythromycin. Journal of Biological Chemistry, 239: 2386-2391
- Gago G., Kurth D., Diacovich L., Tsai S. C., Gramajo H. 2006. Biochemical and structural characterization of an essential acyl coenzyme A carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 188, 2: 477-486
- Gandecha A. R., Large S. L., Cundliffe E. 1997. Analysis of four tylosin biosynthetic genes from the tylLM region of the *Streptomyces fradiae* genome. Gene, 184, 2: 197-203
- Garrity G. M., Lilburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéby J., Tindall B. J. 2007. Part 10 The Bacteria: Phylum "Actinobacteria": Class Actinobacteria. Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7: 399-539 http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/187/219 (oktober 2013)
- Gatto G. J., Jr., Boyne M. T., 2nd, Kelleher N. L., Walsh C. T. 2006. Biosynthesis of pipecolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster. Journal of the American Chemical Society, 128, 11: 3838-3847
- Gatto G. J., Jr., McLoughlin S. M., Kelleher N. L., Walsh C. T. 2005. Elucidating the substrate specificity and condensation domain activity of FkbP, the FK520 pipecolate-incorporating enzyme. Biochemistry, 44, 16: 5993-6002
- Gokhale R. S., Saxena P., Chopra T., Mohanty D. 2007. Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. Natural Product Reports, 24, 2: 267-277
- Goranovič D., Blažič M., Magdevska V., Horvat J., Kuščer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martinez-Castro M., Barreiro C., Mrak P., Kopitar G., Kosec G., Fujs Š., Martin J. F., Petković H. 2012. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. BMC Microbiology, 12: 238, doi:10.1186/1471-2180-12-238: 15 str.

- Goranovič D., Kosec G., Mrak P., Fujs Š., Horvat J., Kuščer E., Kopitar G., Petković H. 2010. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 285, 19: 14292-14300
- Graziani E. I. 2009. Recent advances in the chemistry, biosynthesis and pharmacology of rapamycin analogs. Natural Product Reports, 26, 5: 602-609
- Gregory M. A., Gaisser S., Lill R. E., Hong H., Sheridan R. M., Wilkinson B., Petković H., Weston A. J., Carletti I., Lee H. L., Staunton J., Leadlay P. F. 2004. Isolation and characterization of pre-rapamycin, the first macrocyclic intermediate in the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin by *S. hygroscopicus*. Angewandte Chemie, 43, 19: 2551-2553
- Gregory M. A., Petković H., Lill R. E., Moss S. J., Wilkinson B., Gaisser S., Leadlay P. F., Sheridan R. M. 2005. Mutasynthesis of rapamycin analogues through the manipulation of a gene governing starter unit biosynthesis. Angewandte Chemie, 44, 30: 4757-4760
- Han L., Reynolds K. A. 1997. A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in streptomycetes. Journal of Bacteriology, 179, 16: 5157-5164
- Haydock S. F., Appleyard A. N., Mironenko T., Lester J., Scott N., Leadlay P. F. 2005. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. Microbiology, 151, Pt 10: 3161-3169
- Haydock S. F., Mironenko T., Ghoorahoo H. I., Leadlay P. F. 2004. The putative elaiophylin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin. Journal of Biotechnology, 113, 1-3: 55-68
- He M., Haltli B., Summers M., Feng X., Hucul J. 2006. Isolation and characterization of meridamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NRRL 30748. Gene, 377: 109-118
- Henikoff S., Henikoff J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89, 22: 10915-10919
- Henry C. S., DeJongh M., Best A. A., Frybarger P. M., Linsay B., Stevens R. L. 2010. High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. Nature Biotechnology, 28, 9: 977-982
- Hodgson D. A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. Advances in Microbial Physiology, 42: 47-238
- Hopwood D. A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. Chemical Reviews, 97, 7: 2465-2498
- Hopwood D. A. 2007. *Streptomyces* in nature and medicine : the antibiotic makers. Oxford, Oxford University Press: 250 str.
- Horswill A. R., Escalante-Semerena J. C. 1999. *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. Journal of Bacteriology, 181, 18: 5615-5623
- Huang D., Li S., Xia M., Wen J., Jia X. 2013a. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement. Microbial Cell Factories, 12, 1: 52, doi: 10.1186/1475-2859-12-52: 18 str.
- Huang D., Xia M., Li S., Wen J., Jia X. 2013b. Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of *Streptomyces tsukubaensis* and exogenous

feeding strategies. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 40, 9: 1023-1037

- Hughes A. J., Keatinge-Clay A. 2011. Enzymatic extender unit generation for *in vitro* polyketide synthase reactions: structural and functional showcasing of *Streptomyces coelicolor* MatB. Chemistry and Biology, 18, 2: 165-176
- Hunaiti A. R., Kolattukudy P. E. 1982. Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 216, 1: 362-371
- Husain S., Singh N. 2002. The impact of novel immunosuppressive agents on infections in organ transplant recipients and the interactions of these agents with antimicrobials. Clinical Infectious Diseases, 35, 1: 53-61
- Huttner S., Mecke D., Frohlich K. U. 1997. Gene cloning and sequencing, and enzyme purification of the malate synthase of *Streptomyces arenae*. Gene, 188, 2: 239-246
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnology, 21, 5: 526-531
- Inoue A., Deguchi T., Yoshida M., Shirahata K. 1983. Biosynthesis and the metabolic fate of carbon-14 labeled spiramycin I. Journal of Antibiotics, 36, 4: 442-444
- Ishikawa J., Hotta K. 1999. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. FEMS Microbiology Letters, 174, 2: 251-253
- Jenke-Kodama H., Borner T., Dittmann E. 2006. Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. PLoS Computational Biology, 2, 10: e132, doi:10.1371/journal.pcbi.0020132: 9 str.
- Jiang H., Haltli B., Feng X., Cai P., Summers M., Lotvin J., He M. 2011. Investigation of the biosynthesis of the pipecolate moiety of neuroprotective polyketide meridamycin. Journal of Antibiotics, 64, 8: 533-538
- Jones A. C., Gust B., Kulik A., Heide L., Buttner M. J., Bibb M. J. 2013. Phage p1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster. PloS One, 8, 7: e69319, doi:10.1371/journal.pone.0069319: 9 str.
- Jung S., Moon S., Lee K., Park Y. J., Yoon S., Yoo Y. J. 2009. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36, 12: 1467-1471
- Jung W. S., Yoo Y. J., Park J. W., Park S. R., Han A. R., Ban Y. H., Kim E. J., Kim E., Yoon Y. J. 2011. A combined approach of classical mutagenesis and rational metabolic engineering improves rapamycin biosynthesis and provides insights into methylmalonyl-CoA precursor supply pathway in *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 5: 1389-1397
- Kakavas S. J., Katz L., Stassi D. 1997. Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. Journal of Bacteriology, 179, 23: 7515-7522
- Kämpfer P. 2006. The family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. V: The prokaryotes. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (ed.). Singapore, Springer: 538-604

- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Research, 28, 1: 27-30
- Kang C. B., Hong Y., Dhe-Paganon S., Yoon H. S. 2008. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. Neuro-Signals, 16, 4: 318-325
- Karray F., Darbon E., Oestreicher N., Dominguez H., Tuphile K., Gagnat J., Blondelet-Rouault M. H., Gerbaud C., Pernodet J. L. 2007. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. Microbiology, 153, Pt 12: 4111-4122
- Keatinge-Clay A. T. 2012. The structures of type I polyketide synthases. Natural Product Reports, 29, 10: 1050-1073
- Keri V., Csorvasi A., Melczer I., Simon A. 2006. Method of purifying tacrolimus. United States Patent US 20060142565(A1): 7 str.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, John Innes Foundation: 613 str.
- Kim D. H., Ryu J. H., Lee K. S., Lee B. M., Lee M. O., Lim S. K., Maeng P. J. 2013. Mutational biosynthesis of tacrolimus analogues by fkbO deletion mutant of *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 13: 5881-5892
- Kim H. J., Kim T. H., Kim Y., Lee H. S. 2004. Identification and characterization of glxR, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium* glutamicum. Journal of Bacteriology, 186, 11: 3453-3460
- Kim H. S., Park Y. I. 2008. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105, 4: 418-421
- Kim S. B., Lonsdale J., Seong C. N., Goodfellow M. 2003. Streptacidiphilus gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997. Antonie van Leeuwenhoek, 83, 2: 107-116
- Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., Nishiyama M., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. 1987a. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. Journal of Antibiotics, 40, 9: 1249-1255
- Kino T., Hatanaka H., Miyata S., Inamura N., Nishiyama M., Yajima T., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., et al. 1987b. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. Journal of Antibiotics, 40, 9: 1256-1265
- Konig A., Schwecke T., Molnar I., Bohm G. A., Lowden P. A., Staunton J., Leadlay P. F. 1997. The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin--nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. European Journal of Biochemistry, 247, 2: 526-534
- Konya A., Szabo Z., Lang I., Barta I., Salat J. 2008. Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. Microbiological Research, 163, 6: 624-632
- Korecka M., Shaw L. M. 2009. Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice. Annals of Transplantation, 14, 2: 61-72

- Kornberg H. L., Madsen N. B. 1958. The metabolism of C2 compounds in microorganisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle. Biochemical Journal, 68, 3: 549-557
- Kosec G., Goranovic D., Horvat J., Fujs S., Jenko B., Petkovic H. 2010. Novel polyketide compounds and methods of making same. World Intellectual Property Organization WO2012089349 (A2): 78 str.
- Kosec G., Goranovič D., Mrak P., Fujs Š., Kuščer E., Horvat J., Kopitar G., Petković H. 2012. Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506. Metabolic Engineering, 14, 1: 39-46
- Kuhstoss S., Rao R. N. 1991. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi C31. Journal of Molecular Biology, 222, 4: 897-908
- Kuščer E., Raspor P., Petković H. 2005. Rational design of polyketide natural products. Food Technology and Biotechnology, 43, 4: 403-410
- LaPorte D. C., Thorsness P. E., Koshland D. E., Jr. 1985. Compensatory phosphorylation of isocitrate dehydrogenase. A mechanism for adaptation to the intracellular environment. Journal of Biological Chemistry, 260, 19: 10563-10568
- Lechner A., Wilson M. C., Ban Y. H., Hwang J. Y., Yoon Y. J., Moore B. S. 2013. Designed biosynthesis of 36-methyl-FK506 by polyketide precursor pathway engineering. ACS Synthetic Biology, 2, 7: 379-383
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. 2004. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W.H. Freeman: 1100 str.
- Li C., Roege K. E., Kelly W. L. 2009. Analysis of the indanomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167. Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology, 10, 6: 1064-1072
- Li J. W., Vederas J. C. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? Science, 325, 5937: 161-165
- Ligon J., Hill S., Beck J., Zirkle R., Molnar I., Zawodny J., Money S., Schupp T. 2002. Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. Gene, 285, 1-2: 257-267
- Liu H., Jiang H., Haltli B., Kulowski K., Muszynska E., Feng X., Summers M., Young M., Graziani E., Koehn F., Carter G. T., He M. 2009. Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli*-streptomyces artificial chromosome vector, pSBAC. Journal of Natural Products, 72, 3: 389-395
- Liu J., Farmer J. D., Jr., Lane W. S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell, 66, 4: 807-815
- Lombo F., Pfeifer B., Leaf T., Ou S., Kim Y. S., Cane D. E., Licari P., Khosla C. 2001. Enhancing the atom economy of polyketide biosynthetic processes through metabolic engineering. Biotechnology Progress, 17, 4: 612-617
- Lowden P. A., Wilkinson B., Bohm G. A., Handa S., Floss H. G., Leadlay P. F., Staunton J. 2001. Origin and true nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. Angewandte Chemie, 40, 4: 777-779
- MacNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H., MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene, 111, 1: 61-68

- Magdevska V., Gaber R., Goranovič D., Kuščer E., Boakes S., Duran Alonso M. B., Santamaria R. I., Raspor P., Leadlay P. F., Fujs Š., Petković H. 2010. Robust reporter system based on chalcone synthase rppA gene from *Saccharopolyspora erythraea*. Journal of Microbiological Methods, 83, 2: 111-119
- Malpartida F., Hopwood D. A. 1986. Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Molecular and General Genetics, 205, 1: 66-73
- Mamedov T. G., Pienaar E., Whitney S. E., TerMaat J. R., Carvill G., Goliath R., Subramanian A., Viljoen H. J. 2008. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. Computational Biology and Chemistry, 32, 6: 452-457
- Maplestone R. A., Stone M. J., Williams D. H. 1992. The evolutionary role of secondary metabolites--a review. Gene, 115, 1-2: 151-157
- Marahiel M. A., Stachelhaus T., Mootz H. D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chemical Reviews, 97, 7: 2651-2674
- Martinez-Castro M., Barreiro C., Romero F., Fernandez-Chimeno R. I., Martin J. F. 2011. Streptomyces tacrolimicus sp. nov., a low producer of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, Pt 5: 1084-1088
- Martinez-Castro M., Salehi-Najafabadi Z., Romero F., Perez-Sanchiz R., Fernandez-Chimeno R. I., Martin J. F., Barreiro C. 2013. Taxonomy and chemically semidefined media for the analysis of the tacrolimus producer '*Streptomyces tsukubaensis*'. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 5: 2139-2152
- McCoy A. J., Adams N. E., Hudson A. O., Gilvarg C., Leustek T., Maurelli A. T. 2006. L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 47: 17909-17914
- McDaniel R., Welch M., Hutchinson C. R. 2005. Genetic approaches to polyketide antibiotics. Chemical Reviews, 105, 2: 543-558
- Meier-Kriesche H. U., Li S., Gruessner R. W., Fung J. J., Bustami R. T., Barr M. L., Leichtman A. B. 2006. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. American Journal of Transplantation, 6, 5 Pt 2: 1111-1131
- Meingassner J. G., Stutz A. 1992. Immunosuppressive macrolides of the type FK 506: a novel class of topical agents for treatment of skin diseases? Journal of Investigative Dermatology, 98, 6: 851-855
- Meister M., Saum S., Alber B. E., Fuchs G. 2005. L-malyl-coenzyme A/beta-methylmalylcoenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyasenegative bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Bacteriology, 187, 4: 1415-1425
- Miller J. R., Koren S., Sutton G. 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. Genomics, 95, 6: 315-327
- Mishra A., Verma S. 2012. Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology. Journal of Biochemical Technology, 3, 4: 419-425
- Mo S., Ban Y. H., Park J. W., Yoo Y. J., Yoon Y. J. 2009. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-

CoA precursor. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36, 12: 1473-1482

- Mo S., Kim D. H., Lee J. H., Park J. W., Basnet D. B., Ban Y. H., Yoo Y. J., Chen S. W., Park S. R., Choi E. A., Kim E., Jin Y. Y., Lee S. K., Park J. Y., Liu Y., Lee M. O., Lee K. S., Kim S. J., Kim D., Park B. C., Lee S. G., Kwon H. J., Suh J. W., Moore B. S., Lim S. K., Yoon Y. J. 2011. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues. Journal of the American Chemical Society, 133, 4: 976-985
- Mo S., Lee S. K., Jin Y. Y., Oh C. H., Suh J. W. 2013. Application of a combined approach involving classical random mutagenesis and metabolic engineering to enhance FK506 production in *Streptomyces* sp. RM7011. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 7: 3053-3062
- Mo S., Yoo Y. J., Ban Y. H., Lee S. K., Kim E., Suh J. W., Yoon Y. J. 2012. Roles of fkbN in positive regulation and tcs7 in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP. Applied and Environmental Microbiology, 78, 7: 2249-2255
- Molnar I., Aparicio J. F., Haydock S. F., Khaw L. E., Schwecke T., Konig A., Staunton J., Leadlay P. F. 1996. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. Gene, 169, 1: 1-7
- Moss S. J., Stanley-Smith A. E., Schell U., Coates N. J., Foster T. A., Gaisser S., Gregory M. A., Martin C. J., Nur-e-Alam M., Piraee M., Radzom M., Suthar D., Thexton D. G., Warneck T. D., Zhang M. Q., Wilkinson B. 2013. Novel FK506 and FK520 analogues via mutasynthesis: mutasynthon scope and product characteristics. MedChemComm, 4, 2: 324, doi:10.1039/c2md20266b: 7 str.
- Motamedi H., Cai S. J., Shafiee A., Elliston K. O. 1997. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. European Journal of Biochemistry, 244, 1: 74-80
- Motamedi H., Shafiee A. 1998. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. European Journal of Biochemistry, 256, 3: 528-534
- Motamedi H., Shafiee A., Cai S. J., Streicher S. L., Arison B. H., Miller R. R. 1996. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. Journal of Bacteriology, 178, 17: 5243-5248
- Muramatsu H., Mokhtar S. I., Katsuoka M., Ezaki M. 2005. Phylogenetic analysis of immunosuppressant FK506-producing *Streptomycete* strains. Actinomycetologica, 19, 2: 33-39
- Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. 1997. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. Nucleic Acids Research, 25, 1: 244-245
- NCBI. 2012. Taxonomy browser: *Streptomyces*. Bethesda, NCBI The National Center for Biotechnology Information: 44 str. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1883 (september

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1883 (september 2013)

- Nikolouli K., Mossialos D. 2012. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genomemining and metagenomics. Biotechnology Letters, 34, 8: 1393-1403
- Northrop D. B. 1969. Transcarboxylase. VI. Kinetic analysis of the reaction mechanism. Journal of Biological Chemistry, 244, 21: 5808-5819
- Nybo S. E., Shepherd M. D., Bosserman M. A., Rohr J. 2010. Genetic manipulation of *Streptomyces* species. Current protocols in microbiology, 10: 10E.13.11-10E.13.26, doi: 10.1002/9780471729259.mc10e03s19: 26 str.
- Oliynyk M., Samborskyy M., Lester J. B., Mironenko T., Scott N., Dickens S., Haydock S. F., Leadlay P. F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium Saccharopolyspora erythraea NRRL23338. Nature Biotechnology, 25, 4: 447-453
- Omura S., Takeshima H., Nakagawa A., Miyazawa J., Piriou F., Lukacs G. 1977. Studies on the biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry, 16, 13: 2860-2866
- Paiva N. L., Demain A. L., Roberts M. F. 1991. Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Natural Products, 54, 1: 167-177
- Park J. W., Mo S. J., Park S. R., Ban Y. H., Yoo Y. J., Yoon Y. J. 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP. Analytical Biochemistry, 393, 1: 1-7
- Park S. R., Ahn M. S., Han A. R., Park J. W., Yoon Y. J. 2011. Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 11: 1143-1146
- Park S. R., Han A. R., Ban Y. H., Yoo Y. J., Kim E. J., Yoon Y. J. 2010. Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, and future prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 5: 1227-1239
- Patel J. K., Kobashigawa J. A. 2004. Cardiac transplant experience with cyclosporine. Transplantation Proceedings, 36, 2 Suppl: 323S-330S
- Procopio R. E., Silva I. R., Martins M. K., Azevedo J. L., Araujo J. M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16, 5: 466-471
- Ranade N., Vining L. C. 1993. Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. Canadian Journal of Microbiology, 39, 4: 377-383
- Reeves A. R., Brikun I. A., Cernota W. H., Leach B. I., Gonzalez M. C., Weber J. M. 2006. Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production carbohydrate-based and oil-based fermentations in of erythraea. Saccharopolyspora Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 7: 600-609
- Reeves C. D., Chung L. M., Liu Y., Xue Q., Carney J. R., Revill W. P., Katz L. 2002. A new substrate specificity for acyl transferase domains of the ascomycin polyketide synthase in Streptomyces hygroscopicus. Journal of Biological Chemistry, 277, 11: 9155-9159
- Rodriguez E., Banchio C., Diacovich L., Bibb M. J., Gramajo H. 2001. Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of
Streptomyces coelicolor A3(2). Applied and Environmental Microbiology, 67, 9: 4166-4176

- Roege K. E., Kelly W. L. 2009. Biosynthetic origins of the ionophore antibiotic indanomycin. Organic Letters, 11, 2: 297-300
- Ryu Y. G., Butler M. J., Chater K. F., Lee K. J. 2006. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 11: 7132-7139
- Salituro G. M., Zink D. L., Dahl A., Nielsen J., Wu E., Huang L., Kastner C., Dumont F. J. 1995. Meridamycin: A novel nonimmunosuppressive FKBP12 ligand from *Streptomyces hygroscopicus*. Tetrahedron Letters, 36, 7: 997-1000
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. 4th ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 258 str.
- Scherlach K., Hertweck C. 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. Organic & Biomolecular Chemistry, 7, 9: 1753-1760
- Schroder J., Raiber S., Berger T., Schmidt A., Schmidt J., Soares-Sello A. M., Bardshiri E., Strack D., Simpson T. J., Veit M., Schroder G. 1998. Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. Biochemistry, 37, 23: 8417-8425
- Schwarzer D., Finking R., Marahiel M. A. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. Natural Product Reports, 20, 3: 275-287
- Schwarzer D., Marahiel M. A. 2001. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. Naturwissenschaften, 88, 3: 93-101
- Schwecke T., Aparicio J. F., Molnar I., Konig A., Khaw L. E., Haydock S. F., Oliynyk M., Caffrey P., Cortes J., Lester J. B., Bohm G. A., Staunton J., Leadlay P. F. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 17: 7839-7843
- Sherman D. H., Smith J. L. 2006. Clearing the skies over modular polyketide synthases. ACS Chemical Biology, 1, 8: 505-509
- Sierra-Paredes G., Sierra-Marcuno G. 2008. Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants. CNS Neuroscience & Therapeutics, 14, 1: 36-46
- Singh B. P., Behera B. K. 2009. Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids. Letters in Applied Microbiology, 49, 2: 254-259
- Soh B. S., Loke P., Sim T. S. 2001. Cloning, heterologous expression and purification of an isocitrate lyase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. Biochimica et Biophysica Acta, 1522, 2: 112-117
- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. 2012. Biologically active secondary metabolites from *Actinomycetes*. Central European Journal of Biology, 7, 3: 373-390
- Song L., Barona-Gomez F., Corre C., Xiang L., Udwary D. W., Austin M. B., Noel J. P., Moore B. S., Challis G. L. 2006. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. Journal of the American Chemical Society, 128, 46: 14754-14755

- Starcevic A., Zucko J., Simunkovic J., Long P. F., Cullum J., Hranueli D. 2008. ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and *in silico* prediction of novel chemical structures. Nucleic Acids Research, 36, 21: 6882-6892
- Staunton J., Weissman K. J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Natural Product Reports, 18, 4: 380-416
- Stuetz A., Baumann K., Grassberger M., Wolff K., Meingassner J. G. 2006. Discovery of topical calcineurin inhibitors and pharmacological profile of pimecrolimus. International Archives of Allergy and Immunology, 141, 3: 199-212
- Sun Y., Hong H., Samborskyy M., Mironenko T., Leadlay P. F., Haydock S. F. 2006. Organization of the biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM 4137 for the novel neuroprotectant polyketide meridamycin. Microbiology, 152, Pt 12: 3507-3515
- Thykaer J., Nielsen J., Wohlleben W., Weber T., Gutknecht M., Lantz A. E., Stegmann E. 2010. Increased glycopeptide production after overexpression of shikimate pathway genes being part of the balhimycin biosynthetic gene cluster. Metabolic Engineering, 12, 5: 455-461
- Tong L. 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 16: 1784-1803
- Turlo J., Gajzlerska W., Klimaszewska M., Krol M., Dawidowski M., Gutkowska B. 2012. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. Enzyme and Microbial Technology, 51, 6-7: 388-395
- Van der Geize R., Yam K., Heuser T., Wilbrink M. H., Hara H., Anderton M. C., Sim E., Dijkhuizen L., Davies J. E., Mohn W. W., Eltis L. D. 2007. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 6: 1947-1952
- Vrijbloed J. W., Zerbe-Burkhardt K., Ratnatilleke A., Grubelnik-Leiser A., Robinson J. A. 1999. Insertional inactivation of methylmalonyl coenzyme A (CoA) mutase and isobutyryl-CoA mutase genes in *Streptomyces cinnamonensis*: influence on polyketide antibiotic biosynthesis. Journal of Bacteriology, 181, 18: 5600-5605
- Wallemacq P. E., Reding R. 1993. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. Clinical Chemistry, 39, 11 Pt 1: 2219-2228
- Walton L. J., Corre C., Challis G. L. 2006. Mechanisms for incorporation of glycerolderived precursors into polyketide metabolites. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 2: 105-120
- Ware N., MacPhee I. A. 2010. Current progress in pharmacogenetics and individualized immunosuppressive drug dosing in organ transplantation. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 12, 3: 270-283
- Watve M. G., Tickoo R., Jog M. M., Bhole B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Archives of Microbiology, 176, 5: 386-390
- Werner G., Hagenmaier H., Drautz H., Baumgartner A., Zahner H. 1984. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. Journal of Antibiotics, 37, 2: 110-117

- Weston C. R., Davis R. J. 2007. The JNK signal transduction pathway. Current Opinion in Cell Biology, 19, 2: 142-149
- Wilkinson B., Bachmann B. O. 2006. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. Current Opinion in Chemical Biology, 10, 2: 169-176
- Winter J. M., Behnken S., Hertweck C. 2011. Genomics-inspired discovery of natural products. Current Opinion in Chemical Biology, 15, 1: 22-31
- Wu K., Chung L., Revill W. P., Katz L., Reeves C. D. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. Gene, 251, 1: 81-90
- Wu X., Wang L., Han Y., Regan N., Li P. K., Villalona M. A., Hu X., Briesewitz R., Pei D. 2011. Creating diverse target-binding surfaces on FKBP12: synthesis and evaluation of a rapamycin analogue library. ACS Combinatorial Science, 13, 5: 486-495
- Xia M., Huang D., Li S., Wen J., Jia X., Chen Y. 2013. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. Biotechnology and Bioengineering, 110, 10: 2717-2730
- Yang C. C., Huang C. H., Li C. Y., Tsay Y. G., Lee S. C., Chen C. W. 2002. The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. Molecular Microbiology, 43, 2: 297-305
- Yano I. 2008. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 23, 3: 150-157
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 13: 134, doi:10.1186/1471-2105-13-134: 11 str.
- Zarubin T., Han J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research, 15, 1: 11-18
- Zhang Z., Wang Y., Ruan J. 1997. A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). International Journal of Systematic Bacterology, 47, 4: 1048-1054
- Zhao C., Ju J., Christenson S. D., Smith W. C., Song D., Zhou X., Shen B., Deng Z. 2006. Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning the oxazolomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* JA3453. Journal of Bacteriology, 188, 11: 4142-4147
- Zhou H., Luo Y., Huang S. 2010. Updates of mTOR inhibitors. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 10, 7: 571-581
- Zucko J., Long P. F., Hranueli D., Cullum J. 2012. Horizontal gene transfer and gene conversion drive evolution of modular polyketide synthases. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39, 10: 1541-1547

ZAHVALA

V prvi vrsti se za vodenje pri delu iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Hrvoju Petkoviću.

Zahvaljujem se predstojniku Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil prof. dr. Peter Raspor, vsem zdajšnjim in bivšim sodelavcem na Biotehniški fakulteti, ki so mi bili hkrati v veliko pomoč in veselje. Še posebej hvala tudi celotni ekipi iz podjetja Acies Bio – Vasilki, Katarini, Marinki, Tadeji, Blažu, Dušanu, Gregorju, Jaki, Štefanu in Eneju.

Hvala staršem za potrpežljivost in podporo in hvala moji družinici, Klemnu in Nataši za razumevanje in ljubezen.

Delo je nastalo s pomočjo finančne podpore Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do biosinteze začetne enote (dihidroksicikloheksan karboksilne kisline) za biosintezo FK506.

Annex A: Nucleotide sequences of genes involved in metabolic pathways for provision of the starting unit (dihydroxycyclohexane carboxylic acid) for the biosynthesis of FK506.

>2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase DAHP aroH S.tsukubaensis ATGACCGTGAACGCTAAGACCACCACTTCCGGTGGCAACACCTGGCGAGACCTGCCCGCGGCG CAGCAGCCCGAGTACCCGGATGCCGAGGCTCTGCGCGATGTGATCGCCGAGCTCGAAAGCTAT CCGCCGCTCGTCTTCGCGGGCGAGTGCGACCAGCTCAGGGCGCGCATGGGCGCCGTCGCCAGG GGCGAGGCGTTCCTCCTCCAGGGCGGTGACTGCGCCGAGGCGTTCGACGCCGTCTCCGCGGACC ACATCCGGGCCAAGCTGAAGACGCTGCTCCAGATGAGCGCCGTGCTGACGTACGCCGCGTCCGT CCCGGTCGTCAAGGTCGGCCGGATCGCCGGCCAGTACTCCAAGCCGCGCTCCAAGCCCACCGA GACCCGCGACGGCGTCACGCTGCCGACCTACCGCGGCGACTCCGTCAACGGCTTCGCGTTCACC GAGGCCGAGCGGATCCCGGACCCCGAGCGGCTGAAGCGGATGTACCACGCGTCCGCCTCGACG CTGAACCTGGTCCGCGCCTTCACCACCGGCGGCTACGCCGATCTCCGGCAGGTCCACGCCTGGA ACCAGGACTTCGTGAAGTCGTCCCCCTCCGGCCAGCGCTACGAGCAGCTCGCCCGGGAGATCGA CAACGCGCTGAACTTCATGAAGGCGTGCGGGACCGACCCGGCCGAGTTCCGTGCGGTGGAGTT CTTCGCCTCCCACGAGGCGCTGCTCCTCGACTACGAGGGCGCCCTGACCCGTACCGACTCCCGG ACCGGGCACCTCTACGACACCTCCGGCCACATGGTGTGGATCGGTGAGCGCACCCGCCAGCTCG ACGGGGCGCACATCGAGTTCGCCTCCCGGATCCGCAACCCGATCGGCATCAAGCTGGGCCCGA CGACCACGGTCGACGAGGCGCTGACCTACATCGACCGGCTGGACCCGGACCGCGAGCCCGGCC GGCTGACCTTCATCGTCCGGATGGGCGCCGACAAGGTCCGCGACAAGCTCCCCGAGCTGGTCGA GAGGCGGCCTCCGGCCACAAGACCCGCCGCTTCGACGACGTGCTCGACGAGGTCAAGGGCTTC TTCGAGGTCCACAAGGGGCTCGGTACGCACCCCGGCGGCATCCACGTCGAGCTGACCGGCGAC GATGTCACCGAGTGCGTGGGCGGCGGCGACGAGATCTTCGTCGACGACCTCCACCAGCGCTAC GAGACGGCCTGTGACCCGCGGCTCAACCGCAGCCAGTCCCTCGACCTGGCGTTCCTGGTGGCGG AGATGTACCGCGACCAGTGACTCTAG

>3-dehydroquinate synthase aroB S.tsukubasensis

ATGACCGAGCAGGCAGTGACCCGGATCCGGGTCGGCGGCACCGAGGGCACCGCCCCGTACGAC GCCGTGCTCCACCCGGAGGCGCTCGAAGGCACCGGCGATGCGATCGCGGAAGACCTCAAGGCC CAGGGGTACGAGGTCGTCGCCGTCCAGGTGCCCAACGCGGAAGAGGCCAAGACCGCAGAGGTC GCCGCCTACTGCTGGAAGGCGCTCGGACAGTCCGGCTTCACCCGCACCGATGTGATCGTCGGAG TCGGCGGCGCGCCACCACCGACCTCGCCGGCTTCGTCGCCGCCACCTGGCTGCGCGGGGTCCG CTGGATCGCCGTGCCGACGACGGTCCTCGGCATGGTCGACGCCGCCGTCGGCGGCAAGACCGG CATCAACACCGCCGAAGGCAAGAACCTCGTGGGCGCCTTCCACCCGCCGCGGGCGTGCTCTGC GACCTCGCCGCACTGGAATCCCTGCCCGTCCACGACTACGTCAGCGGCCTCGCCGAGATCATCA AGGCGGGCTTCATCGCGGATCCGGCGATCCTCGAACTGATCGAGTCCGACCCGGAGGCCGCGC GGACCCCTGCCGGACCGCACACCGCCGAGCTGATCGAACGGTCCATCCGGGTCAAGGCCGACG TCGTCTCCGGCGACCTCAAGGAATCCGGCCGCCGCGAGATCCTCAACTACGGCCACACCCTCGC GGTGTTCGCCGCCGAACTGGGCCGGCCCGCCGGACGGCTCGACGACGCCACGGCCGACCGGCA CGCGGCCGTCCTCCAGTCCGTCGGCCTGCCCCTCACCTACCGCGGCGACCAGTGGCCCCGGCTG CTGGAGACCATGAAGGTCGACAAGAAGTCCCGCGGCAACCTGCTCCGGTTCATCGTCCTCGACG GACTCGGCAAGCCGAACGTCCTGGAAGGACCCGACCCGGCACTGCTGCTCGCCGCCTACGGGG AAGTGTCGTCATGA

>chorismate synthase aroC *S.tsukubaensis*

ATGAGGAGCACCGTTGAGCAGGTTGCGTTGGCTGACCGCGGGGGGAATCGCACGGACCCGCACT GGTGGCGACGCTGGAGGGACTTCCCGGCCGGTGTCCCGGTCACCACGGAGCTGGTCGCCGACCA CACCTTCATCGGCGGGGGCCCGGGCACGGGCTCACCCTCGGCTCCCCGGTCGCGATCATGGTCGGC AACAGCGAGTGGCCCAAATGGGAGAAGGTCATGGCGGCCGACCCGTCGACCCCGACGAGCTG GCCGCGCTCGCCCGTAACGCACCCCTGACCCGCCCCGGCCCGGCCACGCCGACCTCGCGGGAA TGCAGAAGTACGGCCTCGAAGAGGCCCGGCCGATCCTGGAGCGCGCCAGCGCCGCGAGACCG CCGCCCGCGTCGCCCTCGGCGCCGTCGCCCGCTCCTACCTCAAGGAGACCGCGGGCATCGAGAT CGTCTCCCACGTCGTCGAATTCGGCGCCGCCAAGGCCCCCAAGGGCGTCTACCCGACCCCGCC GACGTCGAGCGGCTCGACGCCGACCCGGTGCGCTGCCTGGACGCCGACGCCAGCAAGGCGATG GTCGCCGAGATCGACCAGGCCCACAAGGACGGCGACACCCTCGGCGGAGTCGTCGAGGTGCTC GCGTACGACGTCCCCGTCGGACTCGGCTCCCACGTCCACTGGGACCGCCGCCTCGACGCCCGGC TCGCCGCCGCGCTCATGGGCATCCAGGCCATCAAGGGCGTCGAACTCGGAGACGGCTTCGACCT CGCCCGGGTCCCCGGCTCCCAGGCCCACGACGAGATCGTCGCCACCGCCGACGGACTGCGCCG CACCTCCGGCCGCTCCGGCGGCACCGAAGGCGGCATGTCCACCGGCGAGCTGCTCCGGGTGCG CGCCGCGATGAAGCCCATCGCGACCGTCCCCAAGGCCCTCGCCACCGTCGACATCACCACCGGC GAGGCCGCCTCCGCGCACCACCAGCGCTCCGACGTCGCCGCCGCCGCCGCGGGATCGTCG CCGAAGCCATGGTCGCCTGGTGCTCGCCGACGCGGTCGCCGAGAAGTTCGGCGGCGACAACG TCGCCGAGACCCGCCGCAACGTCCGCTCCTACCTCGACAACCTGCACATCCGGTGA

>aminodeoxychorismate lyase S.tsukubaensis

ATGACTGAGTATGGCCGGGGCCCCGGCTCCGAACCGTGGCACCCCGACGACCCGCTCTACGGC GACCAGGGGCAGGGACCGCAGTCCGTTTCCGGCCATGATCCCTACGCCGGCGGTCAGCAGCAG TACCAGCAGCACCCGGGCGGGCCGCAGCAGGCCTACGGAGTCCAGGACCCGTACCAGCAGCAG GCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGCACGACCCGTACCAGCAGCAGTACCCGCAGCAACCC GGCGGGCAGTACTACCACCCCGGTGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTACGACGGCGGGCAG CTCCCAGCAGCAGCCGCAGGACCCGCAGTACCCGCACCAGGGCCACGGGGGCACCCGCACCA GGCAGGCGCCGCATCCGGCCGACCCCGGGATCGCCTACGGAGCCGCACCCGGCGACAGATACG CCGCCAACCCCGCCGACACCTACAGCGGGCCCGTCCCCGGCTACCAGGACCACGCCGAGGCCG CGAGGCCCGGGAAGGGGCCTGGGACGCCGAGGCCCCCGAGGAGGAGAAGCACCCCTTCTTCAC CGGTGACGGCGAAGACCGCGACGACAGTGCCGCGGACGACGACGACCGCCGCCCCCCGGAC AGAGCCGCAACGGCTGCGCCTGCCTGGTGGTCTCCGCGGTACTGCTCAGCGGCCTCGGCGGCGT CTCGTACTTCGGCTACCAGTTCTGGCAGGGCCAGTTCGGCTCCGCCCCGACTACAGCGGCGCC GGCAGCGGCTCCGTCGTCGACGAGATCCCCCAGGGCGCCGGACTGGCGGAGATCGGCCGCATC CTGAAGCAGCAGGGCGTCGTCAAGAGCTCCGGGGGCCTTCGTCTCCGCCGCCAACAGCAATCAG CGTGCCAAGGGCATCCAGGCCGGTGTCTACACCCTCGCCAAGGAGATGTCCGGCGCCAACGCG GTCAAGGCGATGCTCGACCCGCGCAGCAGCAGCAACATGATCATCCCCCGAGGGCAAGCGGAAC GCCGAGATCTACGCCCTGATCGACAAACGCCTCAGCCTCAAGGCGGGCACCACCGCCACAACG GCCAAGGAGCAGTCCGGCAAGCTCGGACTGCCCGCCTGGGCCAAGGGCGGACCCGATATCCAG GATCCGCTGGAAGGCTTCCTCTTCCCGGCCTCCTACCCCGCCGAAGGGCATGAAGCCCGAGG CCGTCCTCAAGAAGATGGTCGCCCGCGCCAACGAGGAGTACACCAAGGCCGACGTGGTCGGGA AGGCCGCCGGACTCGGTCTGAAGAACCCCCTCCAGCTCGTCACCGTCGCCAGCCTGGTGCAGGC CGAGGGCAAGTACAAGGAGGACTTCGACAAGGTCGCCCGGGTCGTCTACAACCGGCTCAAGCC GGACAACACCGAGACCAACGGCCTGCTCGACTTCGACTCCACCGTCAACTACGCCCGGGGCGA GAGCAAGCTCGCCATCGGCAGCGTCAACAAGGTCCGGAAGTTCAAGCACCCGTACAACACCTA CAGCATCACGGGGCTGCCGCCCGGACCGATCGGCAACCCGGGCACGGCCGCCATCAACTCCAC GTTGAACCCGGCGGAAGGCGACTGGTACTACTTCGTCTCGGTGACCGAGGACGAGACGGTGTTC TCGGTGACCCACGAGGACCACGAACGGGCCCGCCAGCGGTATCTGGCGGAGCTGAAGAAGAAC CAGGAGTGACCGGCTTGA

>shikimate kinase aroK S.tsukubaensis

GTGAGCGCCCGGCTGATCGTCCTGGTCGGGCCCATGGGCTCCGGCAAGTCCACGGTGGGGGAG GTACTGGCCCGGCGCCTCGGCGTCCCCTACCGCGACACCGACGCGGACATCGTCACCGCCGAGG GCCGGGAGATCTCCGACATCTTCATCGAGGACGGCGAACCGCACTTCCGCGAACTGGAGCGGG

>3-dehydroquinate dehydratase S.tsukubaensis

ATGAGCCGCCGGGTACTCGTCCTCAACGGCCCCAACCTCGGCCGCCTCGGCTCCCGGGAGCCCG ACGTCTACGGCGCCACGTCCTACGCGGGACTGGTGGACACCTGCCGCACCCTCGGCGAGCAGCT CGGTCTCGACGTCGACGTCCGCGAGACCAACGACGAAGCCGAACTGATCCGCTGGCTCCACGA GGCGGCGGACGGGGGGGCGATTCCGGTGGTGCTGAACCCCGGCGCGTCACGCACTACTCGTACGCC ATGAGGGACGCGGCGGCACAGAAGACGGCACCCCTGATCGAAGTCCACATCTCCAACCCGTAC GCACGGGAGGCGTTCCGGCACACCTCGGTCGTCGCCGCCGCGCGCACACGACCGCGGCG TCGGCCTCGGGTCCTACCGGCTGCGCGCGCGCGGCGGAGGAACTGGCCCCCTAG

>shikimate 5-dehydrogenase aroE S.tsukubaensis

Priloga B: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do biosinteze metilmalonil-CoA za biosintezo FK506.

Annex B: Nucleotide sequences of genes involved in metabolic pathways for provision of methylmalonyl-CoA for the biosynthesis of FK506.

>succinyl-CoA synthetase S.tsukubaensis

>succinyl-diaminopimelate desuccinylase S.tsukubaensis

ATGCGCCCCACCACGCTCGACCTCCGCCTCGACGGCCCCGCCCTCACCGCCGCCCTCGTCGACT TGCCGCACCTCTCCGTCGACCGGTACGGCAACAACGTCGTCGCCCGTACCCACCTCGGCCGGGC CTCGACTCCGACGGCGTCCTGTGGGGCTGCGGAACCAGCGATATGAAGTCCGGGGTCGCCGTCC AGCTGCGGATCGCCGCCACCGTCCCCGACCCCAACCGCGATCTCACCTTCGTCTTCTACGACAA CGAAGAGGTCGCCGCCCATCTCAACGGCCTCGGCCTGATCGCGGACGCCCACCCCGAATGGCTG GCGGGCGACTTCGCCGTACTGCTCGAACCCTCCGACGGCGAGGTCGAGGGCGGCTGCCAGGGC ACGCTCCGGGTCCTCCGTACCAGCGGTGAACGCGCCCACTCCGCCGCAGCTGGATGGGGT CCAACGCCATCCACGCCGCCGCCCCGATCCTCGCCCGCCTCGCCGCTTACGAGCCGCCGGCC GGTCGTCGAGGGGCTGGAGTACCGGGGAGGGGCTCAACGCGGTCCGTATCGACGGCGGAGTCGC GGGCAATGTGATCCCCGACGAGTGCACCGTCGTCGTCGACTACGCCCCCGACCTGGAC GAGGAGCGGGGCGCTGGCCCATGTCCGGGACGTCTTTGCCGGCTGCGGGGTCACCGAGTTCACCG TCGACGACCACAGCGGCGCGGCCCGGCCCCGGCCTCACCCATCCCGCCGCCGTCGCGTTCATGAA GGCCGTCGGCGGCACTGCCCGGCCCAAGTTCGGCTGGACCGATGTCGCCCGCTTCAGCGCGCTG GGCGTACCGGCGGTGAACTACGGGCCCGGCAATCCGCTCCTCGCCCACAAGCGCGACGAGCAC GTGGCCGTGGAGCGGATCTCCCACTGCGAGGAGAAGCTCCGCCAGTGGCTGACGTCCTGA

>methylmalonyl-CoA mutase meaA S.tsukubaensis

GCCCTCCAGGGCACCACCAGAACGACATCGTGAAGGAGTACCTGTCGCGCGGGACGCACGTC TTCCCGCCCGGCCCTTCGCTGCGGCTGACGACCGACATGATCGCGTACACGGTCGGCCGGATGC CCAAGTGGAATCCGATCAACATCTGCAGCTACCACCTCCAGGAGGCCGGTGCCACCCCGGTCCA GGAGATCAGCTACGCGATGTCGACGGCGGTCGCCGTACTGGACGCGGTCTTCGCCTCCGGACAG GTGCCCGACGACCGCAGGGGCGAGGTGGTGGGCCGGATCTCCTTCTTCGTGAACGCGGGCGTCC GGTTCATCGAGGAGATGTGCAAGATGCGGGCCTTCGGCCGGATCTGGGACCGGATCACCCGGG AGCGGTACGGAATCGAGGACCCCCGGCAGCGCCGGTTCCGCTACGGCGTCCAGGTCAACTCGC TGGGGCTGACCGAGGCACAGCCGGAGAACAACGTCCAGCGGATCGTGCTGGAGATGCTGGCGG TGACGCTCTCCAAGGACGCCCGGGCCCGGGCCGTACAGCTTCCGGCGTGGAACGAGGCGCTCG GGCTGCCCGGCCGTGGGACCAGCAGTGGTCGCTCCGTATCCAGCAGGTCCTGGCGCACGAGTC GGATCTGCTGGAGTACGACGATATCTTCGCGGGGCTCCCGGGGTGATCGAGGCCGAGGTCGCCGCG GTGGAGTCGGGCTATCTGAAGGCGCAGCTGGTCTCCTCGCACGCCGAGCGGGCGCGGGCCCGGATC GAGGCCGGCGAGGAGAAGATCGTCGGGGGTCAACGTCTTCCAAAGCACCGAGGAGAATCCGCTG ACCGCCGATCTGGACGGCGGGCGATCATGACGGTCGATCCGGCGAACGAGGCCCGGGTGGTCGCC GCCCTGCACTCCTGGCGCGAGGATCGGAACGAACCCCGCGCCACCGAGGCGCTGACCGCGCTG AAGAAGGCGGCGGCGGGTACGGACAATCTGATGACCACCACGCTGGAGTGCGCCCGCGCGGGC GTCACCACCGGCGATGA

>B12-dependent-methylmalonyl-CoA mutase S.tsukubaensis

GTGAAGCCGCTGTACACGGAGGCCGATCTGGCCCCGGTGGACTTCCTGGGCACCTATCCGGGGA TCGCGCCGTATCTGCGCGGCCCGTACCCGACGATGTACGTCAACCAGCCGTGGACGATCCGGCA GTACGCGGGGTTCTCCACCGCCGAGGAGTCCAACGCCTTCTACCGGCGGAATCTGGCGGCCGGT CAGAAGGGCCTGTCGGTCGCCTTCGACCTGCCGACGCACCGGGGGGTACGACTCCGATCATCCCC GGGTCACCGGTGATGTCGGCATGGCCGGGGTGGCGATCGACTCCATCTACGACATGCGGCAGCT CTTCGCCGGTATTCCGCTGGACCGGATGAGCGTGTCGATGACCATGAACGGCGCGGTGCTGCCG ACCATCCAGAACGACATCCTCAAGGAGTTCATGGTCCGCAACACGTACATCTATCCGCCGAAGC CGTCGATGCGGATCATCTCCGACATCTTCGCCTTCACCTCGCGGCGGATGCCCCGCTACAACTCC ACGCTGGCGGACGGCATGGAGTATCTGCGGGCCGGTATCGGCACCGGTCTCGACGTGGACGCG TTCGCGCCGCGGCTGTCGTTCTTCGGGCGATCGGCATGAACTTCTTCATGGAGGTCGCCAAGCT GCGGGCCGGCCGGCTGCGGGGGGGAGCCGGGGCGCACCTTCGAGCCGAAGAACGCGAAGTC GCTGTCGCTGCGCACCCATTCCCAGACCTCGGGCTGGTCGCTGACGGCGCAGGACGTGTTCAAC AATGTGACGCGGACCTGTGTGGAGGCGATGGCCGCCACCCAGGGGCACACCCAGTCGCTGCAC ACCAACGCGCTGGACGAGGCGCTGGCGCTGCCGACGGACTTCTCGGCGCGGATCGCCCGCAAC ACCCAGATCCTGCTCCAGCAGGAGTCGGGGGACGACCCGGGCGATCGACCCCTGGGGCGGCAGT GCGTACGTGGAGCGGCTGACGTACGACCTGGCGCGCGGGCCTGGCAGCACATCGAGGAGGTC GAGGCCGCGGGCGCATGGCGCAGGCCATCGACGCGGGCATCCCCAAGCTGCGGGTGGAGGAG GCGGCGGCCCGGACCCAGGCCCGGATCGACTCGGGCCGGCAGCCGGTGATCGGCGTGAACAAG TACCGGGTCGAATCCGACGAGCAGATCGACGTGCTGAAGGTCGACAACTCGGCGGTGCGGGCG GCTGCGGGCGCTGACCGCGGCCGCGGGGCTCGGCGCCCGGGCCCCGGTCTTGAGGGCAATCTGCTG GCGCTGGCGGTGGACGCGGCGCGCGCGAAGGCGACCGTGGGTGAGATCTCGGACGCCCTGGAG GCCGTGTACGGGCGGCATTCGGGGCCAGATCCGTACGATCTCCGGTGTGTACCGAGGTGAGGCA GGACAGTCCCCGTCCGTGGCGCGGACCCGGACGCTGGTCGAGCAGTTCGAGGAGGCGGAGGGC CGCCGGCCGCGGATCCTGGTGGCGAAGATGGGCCAGGACGGGCACGACCGCGGCCAGAAGGTG ATCGCCACGGCCTTCGCGGACCTGGGCTTCGACGTGGACGTGGGCCCGCTGTTCCAGACGCCCG AGGAGGTGGCGCGGCAGGCGGTGGAGGCCGATGTGCATATCGTCGGGGTGTCGTCGCCGG CGGGGGCATCTGACGCTGGTGCCCGCGCTGCGGGAGGAACTGGCGGCGCAGGACCGGGAGGACA TCATGATCGTGGTGGCGGGGGGGGGGGATTCCGCCGCAGGACGTGGCGACGCTCCGCGAGTCGGGTG CGGCGGCCGTGTTCCCGCCCGGGACGGTGATCCCCGGACGCGGCGTACGACCTGGTCACGACGTT GTCCGCGGCGCTGGGCCACACCTCGTGA

>propionyl-CoA carboxylase accC S.tsukubaensis

ATGTTCGACACCGTCCTCGTGGCCAACCGGGGCGAGATCGCGGTCCGTGTCATCCGGACCCTGC GGGCCCTCGGCATCCGCTCGGTCGCCGTGTTCAGCGACGCCGACGCCGGAGCCCGGCATGTACG GGAGGCGGACACCGCGGTCCGGATCGGTCCCGCGCCGCCGCGAGAGCTATCTCTCCGTCCCC GCGGAGAACGCCGCTTTCGCCCGCGCCTGCGCGGACGCCGGACTGGTCTTCATCGGCCCCCGC CGGACGCGATCGCCCTGATGGGCGACAAGATCCGGGCCAAGGAGACGGTCCGGGCCGCCGGGG TGCCGGTGGTCCCGGGCTCCTCCGGATCGGGGCTGACCGACGCCGAACTGGCCGCGGCGGCCC TGACCCGGCTGGAGTCCGCCCTCTTCGACGAGATCGCGGCGGCCCGCCGGGAGGCCCGTGCCTC CTTCGGCGACGACACCCTGCTGGTGGAGCGGTGGATCGACCGGCCCCGCCATATCGAGATCCAG GCCACCAGAAGATCATCGAGGAGGCGCCGTCCGTCCTCCGACGAGGAGACCCCGGGCGGCCA TGGGCGAGGCGGCCGTCCAGGCGGCCCGCTCCTGCGGCTACACCGGCGCCGGGACGGTCGAGT TCATCGTCCCCGGCAGCAACCCTTCCGACTACTCCTTCATGGAGATGAACACCCGTCTCCAGGT CGAGCATCCCGTCACGGAACTGGTCACCGGCCTCGACCTGGTCGAGTGGCAGGTACGGATCGC GGCGGGCGAGCCCCTGCCGTACGAACAGCGGGACATCGCGCTCACCGGCCATGCGGTCGAGGC CCGGATCTGCGCCGAGGACCCCTCGCGCGCGGTTTCCTCCCCTCCGGCGGTACGGTCCTCGCCCTG AGCGAACCGGACGGCGCCGGGGTGCGCACCGACTCCGGGCTGAGCCCCGGCACCGAGATCTCC AGCCTCTACGACCCGATGCTCTCCAAGGTGATCGCGTACGGCCCCGACCGGCCCACCGCCCTGC GCCGGCTGCGGGCCGCCCTCGCTGAGACGGTCACCCTCGGCGTCCCCACCAACGCCGGTTTCCT GCGCAGGCTGCTGGCCCATCCCGCGGTCGTCGCGGGCGATCTGGACACGGGTCTGGTGGAGCG GGAGGCGGACGGGCTGCTGCCGGACTCCGTCCCCGCCGAGGTGTACGCGGCGGCCGCGGCGGT GACGGCTGGCGGCTCGGCGGCCCCCGGCGCAACTGGCGTTCCCCCTGCGAGTGACGGGACGT GAACCCGTCGTACAGGAAGCCCCCGCGACGGCGGTGGTCACCGCCGACACGGTCACCGTCACT GGCACGTCAGGGACCACGACCCGGTCGCCGCCTCCCTCTCGGCCGCGGGCACGCGGGGGGCCG ACACCCTCGCGGCGCCCATGCCCGGCACGGTGACGGTGGTCAAGGTCGCCGTCGGCGACGAGG TCACAGCCGGTCAGAGCCTGCTGGTCGTGGAGGCGATGAAGATGGAACACGTCATCTCCGCCCC GCACGCGGGGACCGTCACCGAACTGGACGTGACCCCCGGGGGCCACCGTCGCCATGGACCAGGT CTTGGCCGTGGTCACACCGGCGGAAACGGGAACGGAAGGGGCCGGACGGTGA

Priloga C: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka malonil-CoA za biosintezo FK506.

Annex C: Nucleotide sequences of genes involved in metabolic pathways for provision of malonyl-CoA for the biosynthesis of FK506.

>acetyl-CoA carboxylase *S.tsukubaensis*

ATGTTCGACACCGTCCTCGTGGCCAACCGGGGCGAGATCGCGGTCCGTGTCATCCGGACCCTGC GGGCCCTCGGCATCCGCTCGGTCGCCGTGTTCAGCGACGCCGACGCCGGAGCCCGGCATGTACG GGAGGCGGACACCGCGGTCCGGATCGGTCCCGCGCCGCCGCGAGAGCTATCTCTCCGTCCCC CGGCTGCTGGAGGCCGCGGCCAGGACCGGCGCCGGGGCGGTCCACCCGGGCTACGGCTTCCTC GCGGAGAACGCCGCTTTCGCCCGCGCCTGCGCGGACGCCGGACTGGTCTTCATCGGCCCCCGC CGGACGCGATCGCCCTGATGGGCGACAAGATCCGGGCCAAGGAGACGGTCCGGGCCGCCGGGG TGCCGGTGGTCCCGGGCTCCTCCGGATCGGGGCTGACCGACGCCGAACTGGCCGCGGCGGCCC TGACCCGGCTGGAGTCCGCCCTCTTCGACGAGATCGCGGCGGCCCGCCGGGAGGCCCGTGCCTC CTTCGGCGACGACACCCTGCTGGTGGAGCGGTGGATCGACCGGCCCCGCCATATCGAGATCCAG GCCACCAGAAGATCATCGAGGAGGCGCCGTCCGTCCTCCGACGAGGAGACCCCGGGCGGCCA TGGGCGAGGCGGCCGTCCAGGCGGCCCGCTCCTGCGGCTACACCGGCGCCGGGACGGTCGAGT TCATCGTCCCCGGCAGCAACCCTTCCGACTACTCCTTCATGGAGATGAACACCCGTCTCCAGGT CGAGCATCCCGTCACGGAACTGGTCACCGGCCTCGACCTGGTCGAGTGGCAGGTACGGATCGC GGCGGGCGAGCCCCTGCCGTACGAACAGCGGGACATCGCGCTCACCGGCCATGCGGTCGAGGC CCGGATCTGCGCCGAGGACCCCTCGCGCGCGGTTCCTCCCCCCCGGCGGTACGGTCCTCGCCCTG AGCGAACCGGACGGCGCCGGGGTGCGCACCGACTCCGGGCTGAGCCCCGGCACCGAGATCTCC AGCCTCTACGACCCGATGCTCTCCAAGGTGATCGCGTACGGCCCCGACCGGCCCACCGCCCTGC GCCGGCTGCGGGCCGCCCTCGCTGAGACGGTCACCCTCGGCGTCCCCACCAACGCCGGTTTCCT GCGCAGGCTGCTGGCCCATCCCGCGGGCGGCGGCGATCTGGACACGGGTCTGGTGGAGCG GGAGGCGGACGGGCTGCTGCCGGACTCCGTCCCGCCGAGGTGTACGCGGCGGCCGCGGCGGT GACGGCTGGCGGCTCGGCGGCCCCCGGCGCAACTGGCGTTCCCCCTGCGAGTGACGGGACGT GAACCCGTCGTACAGGAAGCCCCCGCGACGGCGGTGGTCACCGCCGACACGGTCACCGTCACT GGCACGTCAGGGACCACGACCCGGTCGCCGCCTCCCTCTCGGCCGCGGGCACGCGGGGGCCG ACACCCTCGCGGCGCCCATGCCCGGCACGGTGACGGTGGTCAAGGTCGCCGTCGGCGACGAGG TCACAGCCGGTCAGAGCCTGCTGGTCGTGGAGGCGATGAAGATGGAACACGTCATCTCCGCCCC GCACGCGGGGACCGTCACCGAACTGGACGTGACCCCCGGGGGCCACCGTCGCCATGGACCAGGT CTTGGCCGTGGTCACACCGGCGGAAACGGGAACGGAAGGGGCCGGACGGTGA

Priloga D: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka metoksimalonil-ACP za biosintezo FK506.

Annex D: Nucleotide sequences of genes involved in metabolic pathways for provision of methoxymalonyl-ACP for the biosynthesis of FK506.

>haloacid dehalogenase-like hydrolase (metoxymalonyl-ACP biosynthesis) fkbH S.tsukubaensis

ATGACCACCACGACCATCGTCAAATGCCTGGTCTGGGATCTGGACAACACCTTGTGGCGCGGCA CCGTGCTGGAAGACGCCGACGTGGTACTCACCGACGCGGTCCGCGACGTCGTCCGCGCACTCGA CGGCCGCGGCATTCTCCAGGCGGTCGCCAGCAAGAACGACCACGACCTCGCCTGGAAGCACCT CGAACGGCTCGGCATGGCCGAGTACTTCGTTCTGCCGCACATCGGATGGGGGGCCGAAATCGCA ATCCGTCCGGGCCATCGCCGAAAGGCTGAACTTCGCCCCGTCGACGCTCGCCTTCGTCGACGAC CAGCCCGCCGAGCGCCGAGGTCGCGTTCCATCTCCCCGAAGTGCGCTGCTACGCAGCCGAGC AGGTGACCGCGCTCCCCACCCTGCCCGAGTTCAGCCCCCCGGAATCCACGGTCGACTCACGCCG GACGACGACTTCCTGCGCTCCCTGGACCTGAGAATGACGATCGCGCCCGCGGGCCCCGAGGAG ATCACCCGCGTCGAGGAGCTGACGCTGCGGACCAGTCAGATGAACGCGACCGGCGTGCACTAC TCCGACGCGGCACTGCGGGGCGCTGCTCGCAGACCCCGGCCACGAGGTCCTCGTCGTCACCATGG GCGACCGCTTCGGCCCGCACGGCGCCGTCGGCATCGTCCTGCTCGCGACGCAACCGCAGGTGTG GCACCTGAAGCTGCTCGCGACGTCCTGCCGGGTGGTGGTGTCGTTCGGTGCCGGTGCGGTGATCCTC GACTGGCTCACGGACCGGGCCGCCCGGGCCGGCGTCCATCTGATGGCCGACTTCCGGCGCACG GAACGCAACCGTCTGATGGAGGTCGCCTACCGGTTCGCCGGGTTCATGGAGAGCGGCTGCGCCT GCGCGTCGCCGCTGGGGGGGGGCCGGCCGGTGGTGTGGAACGGCTGCATCTGGAGCCCTCGCCGC GACCCGGGCCGAGGACCCTGACACTGACCGCCGCGGGCAGTATCCCGTTCACCGCTTCCGCAAC AAGGTGA

>3-hydroxyacil-CoA dehydrogenase fkbK S.tsukubaensis

>acyl-CoA dehydrogenase fkbI S.tsukubaensis

>O-methyltransferase fkbG *S.tsukubaensis*

Priloga E: Nukleotidna zaporedja genov vključenih v metabolne poti, ki vodijo do nastanka L-pipekolne kisline za biosintezo FK506.

Annex E: Nucleotide sequences of genes involved in metabolic pathways for provision of L-pipecolic acid for the biosynthesis of FK506.

>aspartate kinase *S.tsukubaensis*

GTGGGCCTTGTCGTGCAGAAGTACGGAGGCTCCTCCGTTGCCGATGCCGAAGGCATCAAGCGCG TCGCCAAGCGGATCGTGGATGCCAAGAAGGACGGCCACCAAGTGGTCGTCGTGGTCTCCGCGA TGGGCGACACGACGGACGAGCTGATCGACCTCGCGGAGCAGGTGTCGCCGATCCCTGCGGGCC CAAAAACCTGGGCCACGAGGCCCAGTCCTTCACCGGCAGCCAGGCCGGCGTCATCACCGACTC GGTCCACAACAAAGCGCGCATCATTGATGTCACGCCGGGCCGGATCCGTACCGCGCTGGACGA GGGCAATATCGCCATCGTCGCCGGGTTCCAGGGTGTGTCCCAGGACAAGAAGGACATCACCAC TGCGAGATCTACACGGACGTCGACGGCGTCTTCACCGCCGACCCCCGGGTCGTCCCCAAGGCCA GGAAGATCGACTGGATCTCCTTCGAGGACATGCTGGAGCTGGCCTCCTCCGGCTCCAAGGTGCT GCTCCACCGCTGTGTCGAGTACGCCCGCCGCTACAACATTCCGATCCACGTCCGCTCGTCCTTCT CCGGGCTGCGCGCACCTGGGTGAGCAACGAACCGCAGGGAGACCAGCAGATGGAGCACGCC ATCATCTCCGGAGTCGCCCATGACGTCTCCGAGGCCAAGATCACGGTCGTCGGGGTGCCCGACA AGCCGGGCGAGGCGGCGGCCATCTTCCGTGCGATCGCGGACGCCGACATCAATCTGGACATGA TCGTCCAGAATGTGTCCGCGGCCACCACCGCTCTGACCGACATCTCCTTCACGCTGCCCAAGAC GGACGGCGCCCGGGCGATCGAAGAGCTGGAGAGGGCCAAGGACCGGATCGGCTTCGAATCGCT GCGCTACGACCAGATCGGCAAGATCTCCCTGGTCGGCGCCGGTATGAAGACCAACCCGGG GGTTACGGCCTCCTTCTTCGAGGCGCTCACGGACGCCGGGGTCAACATCGAGCTGATCTCGACC TCCGAGATTCGTATCTCGGTCGTCACCCGTGCCGACGACGTCACCGAGGCGGTGCGCGCGTGC ACAGCCGCTTCGGTCTGGACAGCGACGACCGACGAGGCCGTGGTCTACGGAGGCACCGGCCGAT GA

>aspartate-semialdehyde dehydrogenase S.tsukubaensis

GTGCACAGCCGCTTCGGTCTGGACAGCGACACCGACGAGGCCGTGGTCTACGGAGGCACCGGC CGATGATCCGCAAGCCGGCGCTCGCGGTCGTCGGAGCGACCGGAGCCGTCGGTGCGGTGATGC TGGAGCTGCTCCCCGCAACGAGGACGTCTGGGGCGCGATCCGCCTCGTCGCCTCCCCGCGCTC GCTCGGCGGGATCGACGTGGCGATGTTCCTGGTGCCCGCGGAGGTGTCCGCGCAGTGGGCGCC GGTCGCCGCCGAAGGGCGCGGTCGTCGTGGACGCGTCCGCGGCGTTCCGGCTCGACCCGGA CGTGCCGCTGGTCGTCCCCGAAATCAATCCCCACGCGATACGGGTACGGCCGCGGGGGCATCGTC GCCGGACCCCATGACACCACCCTCGCCATGCTCCCGGCGGTGGGCGCCCTGCATGCCGAGTTCG GGCTGCGGCAGCTGGTCGTCGCCTCGTACCAGGCCGTCAGCGGCGGGGCCGGGACGCCGTCG CCGTACTGCGGGCGCAGACCGCGCTGGTCGCGGGGGACCGGACTGGGCGAGACGCCCGGGGACG GTGCGGGGTTCGGAGGTTCCGGCGCGCGGGCTTCGGAGCGCCGGGCTCCGGTACGGGCCACAGTG CTTCGGGTACGGGCTCCGGTGCCGCGGCCACCGGCTTCGGGCCCTTCCCCGCGCCCGTCGCCCT CAACGTCGTGCCCTGGACCGGCGAACCCGCCGAGGACGGCTGGTCCTCCGAGGAACTGGGGCT GCGGGCGGAGGTCCGCAAAGTCCTCGACCTGCCGGGGCTGCACGTCTCGGCAACCTGCGTCAG GGTCCCCGTACTGACCACGCACTCCCTCGCCGTGCACGCCCGCTTCGAAACGGAGGTGACGGTC GCCCGGGCCCACGAGATCCTCGCGACCTCGCCCGGTGTGGTCCTCTTCGACGATCCGGCGGCCG GGTCGCCGGACGACCCCTGCGCCCTGGAGCTCTTCGTCTGCGGGGGACAACCTCCGCAAGGGCGC CGCGCTGAACACCGCTCAGATCGCCGAGTCCGTCGCACAGTCGCTGA

>dihydrodipicolinate synthase *S.tsukubaensis*

>dihydrodipicolinate reductase S.tsukubaensis

>2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase S.tsukubaensis CCGACGGGACCGTTCTCGACACCTGGTTCCCCGCCCCGAACTCACCTCGGAGCCCGGCCCCGC CGGGACCGAGCGGCTGGACGCGGACCGTGCCGTGCAGCTTCTGGGGGGCCGGTGCCGCCAAGGC GACGACAAGCCGCTCGACGCCCATGACGCGTATCTGCGGCTGCACCTGCTCTCGCACCGGCTGG TCCGGCCGCACGGCCAGAACCTCGACGGCCTGTTCGGCCTGCTGGCCAATGTGGCGTGGACGTC GCTGGGGCCCGTCGCCGTCGACGATATCGAGAAGGTACGGCTCAACGCCCGGGCCGAGGGCCT GCACCTCCAGGTGGTCGGTGTCGATAAGTTCCCGCGGATGACGGACTACGTGGTCCCCAAGGGC GTCCGGATCGCCGACCGGCCCGGGTCCGGCTCGGTGCCCACCTGGCCGAAGGCACCACCGTG ATGCACGAGGGCTTCGTCAACTTCAACGCGGGCACCCTCGGCACCTCCATGGTCGAGGGCCGGA TCTCGGCCGGTGTCGTCGGCAACGGCTCCGACATCGGCGGCGCGCCTCCACCATGGGCAC GGCGTCGGGATCGCGCTGGGCGACGAGTGCGTCGTCGAGGCCGGTCTCTACGTCACCGCCGGG ACCCGGATCACCATGCCCGACGGCGAGATCGTCAAGGCCCGTGAGCTGTCCGGCGCGAGCAAC ATCCTCTTCCGCCGCAACTCGGTGACGGGCGCGGTCGAGGCCCGGCCGAACAACGCGGTCTGG GGCGGGCTGAACGAGATCCTGCACGCCCACAACTGA

>N-succinyldiaminopimelate aminotransferase S.tsukubaensis

>succinyl-diaminopimelate desuccinylase S.tsukubaensis ATGCGCCCCACCACGCTCGACCTCCGCCTCGACGGCCCCGCCCTCACCGCCGCCCTCGTCGACT TGCCGCACCTCTCCGTCGACCGGTACGGCAACAACGTCGTCGCCCGTACCCACCTCGGCCGGGC CTCGACTCCGACGGCGTCCTGTGGGGGCTGCGGAACCAGCGATATGAAGTCCGGGGTCGCCGTCC AGCTGCGGATCGCCGCCACCGTCCCCGACCCCAACCGCGATCTCACCTTCGTCTTCTACGACAA CGAAGAGGTCGCCGCCCATCTCAACGGCCTCGGCCTGATCGCGGACGCCCACCCCGAATGGCTG GCGGGCGACTTCGCCGTACTGCTCGAACCCTCCGACGGCGAGGTCGAGGGCGGCTGCCAGGGC ACGCTCCGGGTCCTCCGTACCAGCGGTGAACGCGCCCACTCCGCCGCAGCTGGATGGGGT CCAACGCCATCCACGCCGCCGCCCCGATCCTCGCCCGCCTCGCCGCTTACGAGCCGCGCCGGCC GGTCGTCGAGGGGCTGGAGTACCGGGGAGGGGCTCAACGCGGTCCGTATCGACGGCGGAGTCGC GGGCAATGTGATCCCCGACGAGTGCACCGTCGTCGTCGACCTACGCCCCCGACCTGGAC GAGGAGCGGGGCGCTGGCCCATGTCCGGGACGTCTTTGCCGGCTGCGGGGTCACCGAGTTCACCG TCGACGACCACAGCGGCGCGGCCCGGCCCCGGCCTCACCCATCCCGCCGCCGTCGCGTTCATGAA GGCCGTCGGCGGCACTGCCCGGCCCAAGTTCGGCTGGACCGATGTCGCCCGCTTCAGCGCGCTG GGCGTACCGGCGGTGAACTACGGGCCCGGCAATCCGCTCCTCGCCCACAAGCGCGACGAGCAC GTGGCCGTGGAGCGGATCTCCCACTGCGAGGAGAAGCTCCGCCAGTGGCTGACGTCCTGA

>diaminopimelate decarboxylase S.tsukubaensis

ATGAGCCGTTCCGCACATCCCGCCGGGCCCCGCCACGCCGACGTCCTGCCCGAGGGGCACTACG CCGCCCGGCCGACCTCAACGCCCTCGACGGCAGGATCTGGTCCCGGACCGTGACCCGGGC GGCGGACGGGACCGTCGCCGTCGGCGGAATCCCGGTGACCCGGCTGGCCGAGGAGTTCGGCAC CCCCGCGTACTTCCTCGACGAGGAGGACTTCCGGGCCCGCTGCCGCGCCTGGGCCGAGGCCTTC GGGCCCGGGGCCGACGTCTTCTACGCCGGGAAGGCCTTCCTCAGCCGCGCCGTCGTCCGCTGGC TGTACGAGGAGGGGCTCAACCTCGACGTCTGCTCCGGCGGCGAGCTGCGTACCGCACTGGACG CGGGCATGCCCGCCGAGCGCATCGCCTTCCACGGCAACAACAAGTCCGCCGAGGAGATCGAAC GGGCCGTCGAGGCCGGTGTCGGGCCGGATCGTGCTCGACTCCTTCCAGGAGATCGTCAAGGTCGC GCACACCGCCCAGCGGCTCGGCCGGCGGCAGAAGGTCCTGATCCGCGTCACCGTCGGGGTCGA GGCCCACACCCACGAGTTCATCGCCACCGCGCACGAGGACCAGAAGTTCGGCATCCCGCTCGCC GGGGACCAGGCCGCGAGGCGGTCCGCAGGGCCCTCGCCCTCGACGGTCTCGAACTGGTCGGC ATCCACTCCCACATCGGCTCGCAGATCTTCGACACCTCCGGCTTCGAGGTCGCCGCCCACCGGG TCGTCGGCCTCCTCAAGCGGGTCCGCGACGAGCACGGCGTCGAACTGCCCGAGATCGACCTCGG CGGCGGGCTCGGCATCGCGTACGTCCCCGGCGACGACCCGCGTGAACCGCATCACATCGCCAA GGCCCTCCACGAGATCGTCGGCCGCGAGTGCGAGGCCGCCGGACTGCGCAGCCCCCGGATCTC GGTCGAGCCCGGCCGGGCCATCGTCGGCCCGACGGCGTTCACGCTGTACGAGGTCGGCACCGTC AAGCCGCTGGAAGGCCTGCGGACGTACGTCAGTGTCGACGGCGGCATGTCGGACAACATCCGG ACCGCGCTGTACGACGCCGAGTACAGCGTCGTCCTGGTCTCCCGCACCTCCGACGCCGCCCCGA TGCTCAGCCGGGTCGTCGGCAAGCACTGCGAGAGCGGTGACATCGTGGTGAAGGACGCCTTCCT CCCGGCCGACCTCGCCCCGGCGATCTGATCGCGGTGCCCGCCACCGGCGCCTACTGCCGCTCG CGAGTGATCGTCCGGCGCGAGACGGAGGAAGATCTGTTGCGTCTCGATGTCGGTTAA

ATGCAGACCAAGATCCTGCGTCAGCGCGATATCAAGCAGATCCTCTCCGTGGTCGGCCGCGACA CGATAATGGACCGGCTGATCCAAGAGCTGTACGACGGCTTCGCCGCGCTCGGCCGGGGGAGAGC TCGCCGAGGCGCCGCCACGCAGTGGCTTCGCCCGGAGCGGCGAGATCCCCGGCGTCATCGAGTT CATGCCGTACCGGGTGCCCGGTGTTGCCGTGACCATGAAGACCGTTTCGTACAGTCCGCACAAC TATCAGCGATTCCGGCTGCCGACGGTCGTCGGCACGGTGTCGCGCCTCGACGACGACAGCGGCA GTCTGATCGCGCTCGCCGACGCGGGTGTGATCACCGCGATGCGCACGGGCGCGGGCTCTCGGCCGT CGCGAGCCGGCTGCTGGCCAGACCCGACAGCTCCACCCTCGCGCTGATCGGAGCCGGCGCACA GGCGGTGACCCAGGCACGCACTCAGCAGGGTCCTGCCCGTCGAGCGGATCCTGGTCAGCGA TATCGACCCGGCGCACGCGGCGTCCTTCGCGGGCCGGATCGCCTTCCTCGGGCTCCCCGTCGAA ATCACCGGCCCTGCCGAAGCGGTCGCCGCCGCCGACGTCCTGAGCACCGTCACATCGGTGCCCG CGGGACAGGGCCCGGTGCTCCCCGCCGAGCCGCGCCTGGCACACCTCCACGTCAACGCGACCG GTGCCGACGAGCCGGGCAAGACCGAGCTGCCGAAGGCCCTGCTCGACGATGCGTTCATCTGCG GACCGTCGCTGGCGAGCCTCTGCGCGGCGCCCCGCACCGCCGCTGCGTACATCGGCAGCCTGAG CGTCCTCGACTCGACCGGCAGCGCCTTCGCCGACCACATCGCGTTCGACGTACTGCTCGGCTTC GCCGATGAACTCGGTCTCGGCCGCAAAGCCGCGATCGGGGCGACACCGGACGACGTCCTCGAC CCCTACTCGCTGCCGTGGTGACTCTAGA

Priloga F: Nukleotidna zaporedja sekvenciranih PCR produktov za povezovanje sosesk genske skupine St-PKS4

Annex F: Nucleotide sequences of the PCR products sequenced to connect contigs of St-PKS4 gen cluster

>DNA zaporedja PCR pomnožka za povezovanje soseske c43 in c213 CCGGGCCCGGCACCGTGCCCCGGGCCGGGGGGGGGCAGCGCATCCCAGTCCAGCCGGTAGAGCCCG TCCCCGGCTCCGAGGCGCCGAGCGCACGCGCGAGCCCGGGGCCCGGGAGACCGTACGGACG CTCAACTCCTCGGCATACAGCACCGGGGGCGCCGGAGGTGTCCGTGAGCCAGAGCGACACCGAA TCGTCGTCACGCGGAATGCACTGCACCCGTAGCTCGGTGACACCGGTGGCGAAGAACTGCACGT TCTTCCAGGCGAACGGGATCCGGATCAGCTCCGGGTCCGGGTCCGGGACCGCTGAGCGGGAGGA TGGGGTGTTGTTGGGTGTGGGCGTAGAGGGTGCCGTTGGGGTGTTGGTGGGCTTGGGTGAGTCC GTGGATGGTGAGGGTGCGGTGGCCTTGGGGGGGTTGGGGGGGTGTGAGGTGTGCTTGGAGGTGGGT ACGGGATGGAGGGGTGCTCCGGCACCACCCCCTCCAGCAGGTGCAGCAGCTCGTCGCGGATCC CGTCGACATGAGGTGAGTGGGACGCGTAGTCCACCGGAATGGTGCGCGCCCGGATCCGGTCCG CCTTGCACGCCTCCACGAAGTCCGCGACGGCCCCGGCATCCCGGATACCACGGTGGAGACCGG GCTGTTCGTAGCCGCGACGGACAGGGCGGACCCGTACGGGAGCAGCCGCTCGGCCACCTCTTC GGCCGGGAGAGGTACGGACGCCATCCCTCCCGTACCCGCAAGC

>DNA zaporedja PCR pomnožka za povezovanje soseske c213 in c288: GAAGTACGCGAACAGGGCCACCACGCCCGGATCATCAACGTCGGCTACGCATCCCACACCCCG TCCATCCCCTTCTACTCCACCCTCACCGGAACCCTCCTCACCCCCACACCCCTCTCAACCCCAC CTACTGGTACGACAACCTCCGCCACCCGTCCACTTCCACCAAGCCCTCACCACCTCACCACC CACCACCCGAGCCAACCCTCCACACCATCGAAATCAGCCCCCACCCCATCCTCACCCCGCCA TCCACGACACCCACCACAACCATCACCACCACACCCTCCACCGCAAACACCCCAACCACAC CACCTACCTCACCAACCTCGCCCACACCTGGACCCACGGCACCCCACCACCTGGCACCCCACC CACACCAACACAGGCACCGCCACCGGCACCGGCACCCGGCACCCCGACACCCCACACA CCCCTCCCACCTACCCCTTCCAACACCACACCTACTGGCTCACCCCCACACCACCACCACCCC GACCACCACCTCTACACCGGAACCATCACCCCCCACACCCCCTGGACCACCACCACCACCA TCCTCAACACCCCTCCTCCCCGGCACCACCCACCTCGAACTCGCCCACCACATCGGCACCCA CACACCCACCTCCAAGCACCTCACACCCCCCAACCCCCAAGACCACCGCACCCTCACCATCC ACACCACCAACCCCCACACCACCCCCTGGACCCACCACGCCACCGCCACCCTCACCCCAC GACTCACCCAAGCCCAACACCCCCAACGGCACCCTCTACGCCCACACCCAACAACACCCCAC CTCCCGCTTCTCCACAGCGACCGGGCACGTCTGCCGTTCTCCTGGAGCGGAGTGACGATCTACC AGGAGGGCGTCACCGAGCTGCGGGTACGGATCAGCACGACCGGCCCCGAAACGGTCCGGGTGG

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko BLAŽIČ

METABOLNE POTI GRADBENIH ENOT ZA BIOSINTEZO FK506 IN STRUKTURNO-PODOBNIH SEKUNDARNIH METABOLITOV PRI BAKTERIJAH RODU Streptomyces

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014