

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina KARNIČAR

**PROTEOMSKI PRISTOP ZA ŠTUDIJ BIOSINTEZE
ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI
*Saccharopolyspora erythraea***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina KARNIČAR

**PROTEOMSKI PRISTOP ZA ŠTUDIJ BIOSINTEZE
ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI *Saccharopolyspora
erythraea***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**PROTEOMIC APPROACH TO STUDY ERYTHROMYCIN
BIOSYNTHESIS IN ACTINOBACTERIA *Saccharopolyspora erythraea***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21.9.2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorico je bil imenovana izr. prof. dr. Polona Jamnik.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno v podjetju Acies Bio d.o.o. V okviru širšega raziskovalnega projekta kompetenčnega centra BRIN, pri katerem je sodelovalo več inštitucij, so bile izvedene genomske in proteomske analize. Dobljene rezultate analiz smo uporabili tudi v tej doktorski disertaciji, kar je v tekstu tudi navedeno.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Hrvoje Petković

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Marko Fonovič

Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka Katarina Karničar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	606:61:604.4:615.33:577.18(043.3)
KG	aktinobakterije/ <i>Saccharopolyspora erythraea</i> /eritromicin/biosinteza/proteomske metode/bioinformatske metode/metabolni inžinering
AV	KARNIČAR, Katarina, univ. dipl. mikrobiol.
SA	JAMNIK, Polona (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
LI	2016
IN	PROTEOMSKI PRISTOP ZA ŠTUDIJ BIOSINTEZE ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	XX, 158 str., 13 pregl., 58 sl., 10 pril., 260 vir.
IJ	si
JI	sl/en
AI	Aktinobakterija <i>S. erythraea</i> sintetizira široko-spektralni antibiotik eritromicin A. Biosinteza eritromicina je kompleksen proces, ki poteka z multiencimskimi kompleksi, t.i. poliketid sintazami. Kljub številnim raziskavam mehanizmi biosinteze eritromicina ter metabolne poti, ki vplivajo na donos eritromicina (oskrba s substrati), še vedno niso dobro poznani. Da bi podrobnejše raziskali te metabolne poti, smo se lotili primerjalne proteomske študije med naravnim in visoko-donosnim industrijskim sevom <i>S. erythraea</i> . Razvili smo bioprocес за produkcijo eritromicina, ki je posnemal pogoje realnega industrijskega bioprocesa. Za primerjalno proteomsko analizo smo uporabili metodologijo 2-DE/MS. Identificirali smo 44 diferencialno izraženih proteinov, večinoma proteine vključene v primarni metabolizem. Nekatere proteine smo identificirali na več lokacijah 2-D gela, kar nakazuje na post-translacijske modifikacije ali izooblike. Dodatno so bili v sklopu širše primerjalne transkriptomske analize in proteomske analize spektralnega štetja identificirani geni oz. proteini, ki se v obeh sevih različno izražajo. Na podlagi rezultatov pridobljenih z različnimi omskimi pristopi smo izbrali gene (<i>ilvB1</i> , operon <i>bkd</i> , operon <i>mms</i>), ki kodirajo ključne encime za alternativno pot produkcije eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvezanih aminokislín. Izbrane gene smo najprej analizirali z bioinformatskimi orodji. Nato smo s čezmernim izražanjem teh genov pridobili različne transformante in ovrednotili njihov vpliv na produkcijo eritromicina. Največji vpliv na produkcijo eritromicina so imele transformante z dodatno kopijo operona <i>mmsOp1</i> . Ugotovili smo kar 150 % izboljšano produkcijo eritromicina glede na naravni sev. Izboljšan donos eritromicina smo pokazali tudi pri transformantah z dodatno kopijo gena <i>ilvB1</i> (52 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom) in operona <i>bkd</i> (70 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom).

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dd
DC 606:61:604.4:615.33:577.18(043.3)
CX actinobacteria/*Saccharopolyspora erythraea*/erythromycin/biosynthesis/proteomic methods/bioinformatic methods/metabolic engineering
AU KARNIČAR, Katarina
AA JAMNIK, Polona (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary doctoral programme in Biosciences, field Biotechnology
PY 2016
TI PROTEOMIC APPROACH TO STUDY ERYTHROMYCIN BIOSYNTHESIS IN ACTINOBACTERIA *Saccharopolyspora erythraea*
DT Doctoral Dissertation
NO XX, 158 p., 13 tab., 58 fig., 10 ann., 260 ref.
LA si
AL sl/en
AB Actinobacterium *S. erythraea* produces wide-spectrum antibiotic erythromycin A. Erythromycin biosynthesis is a complex process that is catalysed by multienzyme complexes, polyketide synthases. Despite many studies of erythromycin biosynthesis and metabolic pathways that contribute to erythromycin yield (precursor supply), the mechanisms are not fully understood. For these reason we conducted a comparative proteomic study. We compared the wild-type and high-producing industrial strain of *S. erythraea*. Initially, a bioprocess for erythromycin production that simulated conditions of real industrial bioprocess was set up. For comparative proteomic analysis we used the methodology of 2-DE/MS and identified 44 differentially expressed proteins, mostly proteins involved in primary metabolism. Multiple spots were identified on 2-D gels for some of the proteins, suggesting that post-translational modifications or isoforms may play an important role. Additionally, in the context of complex transcriptomic and spectral counting proteomic study, differentially expressed genes or proteins have been identified. Different omic approaches gave results that enabled us to select genes (*ilvB1*, *bkd* operon, *mms* operon) encoding key enzymes in alternative feeder pathway via branched-chain amino acid metabolism. Firstly, we performed bioinformatic analysis of these genes. Next, with overexpression of key genes we obtained different transformants and then observed the effect on erythromycin production. Transformants constitutively overexpressing *mmsOp1* construct showed highest erythromycin yield increase (approximately 150% higher yield compared to wild-type). In addition, transformants overexpressing the *ilvB1* gene and *bkd* operon also showed significantly increased erythromycin yield, reaching 52 % and 70 % of wild-type yield.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO SLIK	XII
KAZALO PRILOG	XVII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XVIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DOKTORSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 AKTINOMICETE	4
2.1.1 Aktinomiceta <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	5
2.2 BIOSINTEZA POLIKETIDOV	6
2.2.1 Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo poliketidov	7
2.2.2 Biosinteza poliketidne verige	11
2.3 ERITROMICIN A	13
2.3.1 Genska skupina za bisintezo eritromicina	14
2.3.2 Biosinteza eritromicina	15
2.3.2.1 Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo eritromicina.....	16
2.3.2.2 Biosinteza eritromicinske poliketidne verige.....	18
2.3.2.3 Post-PKS reakcije	19
2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE POLIKETIDOV	20
2.5 PRISTOPI ZA POVEČANJE DONOSA ANTIBIOTIKOV	23
2.5.1 Klasični pristopi	23
2.5.2 Metabolni inženiring.....	24
2.5.2.1 Deregulacija specifičnih metabolnih poti (prekomerno izražanje pot-specifičnih regulatorjev, inaktivacija represorjev)	25
2.5.2.2 Metabolni inženiring na nivoju manipulacije oskrbe s substrati.....	25
2.5.2.3 Povečanje rezistence ali indukcija rezistence na antibiotike	26
2.5.2.4 Prekomerno izražanje strukturnih genov, ki kodirajo encime za biosintezo metabolita.....	27

2.5.4	Uporaba omskih tehnologij	28
2.5.4.1	Proteomske metode/pristopi.....	30
2.5.4.2	Proteomske študije biosinteze antibiotikov pri streptomicetah.....	31
2.5.4.3	Genomske in transkriptomske študije biosinteze eritromicina pri <i>S. erythraea</i> .	33
3	MATERIALI IN METODE.....	35
3.1	GOJIŠČA IN RAZTOPINE.....	36
3.1.1	Gojišča.....	36
3.1.1.1	Gojišča za kultivacijo <i>S. erythraea</i>	36
3.1.1.2	Gojišče za izvedbo biološkega testa - ABA.....	36
3.1.1.3	Gojišča za kultivacijo <i>E. coli</i> in <i>B. subtilis</i>	37
3.1.2	Raztopine	37
3.1.2.1	Raztopine za agarozno elektroforezo	37
3.1.2.2	Raztopine za izvezdbo 2-D elektroforeze	37
3.1.2.3	Raztopine za prenos Western	39
3.1.2.4	Raztopine za merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze	40
3.1.3	Antibiotiki	41
3.1.4	Bakterijski sevi, encimi in plazmidi	41
3.1.5	Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili za izvedbo HPLC	46
3.2	NAPRAVE IN OPREMA	46
3.3	METODE	47
3.3.1	Shranjevanje sevov <i>E. coli</i> in <i>S. erythraea</i>	47
3.3.2	Mikrobiološke metode kultivacije sevov <i>E. coli</i>	47
3.3.3	Mikrobiološke metode kultivacije sevov <i>S. erythraea</i>	47
3.3.3.1	Kultivacija v 50 ml centrifugirkah	47
3.3.3.2	Kultivacija v 250 ml erlenmajericah	47
3.3.3.3	Kultivacija v 5 L bioreaktorju.....	48
3.3.3.4	Rastna krivulja <i>S. erythraea</i> in določitev kontrolnih točk	48
3.3.4	Analitske metode	48
3.3.4.1	Ekstrakcija eritromicina iz fermentacijske brozge.....	48
3.3.4.2	Določanje vsebnosti eritromicina pri sevu NRRL2338 – mikrobiološki test	49
3.3.4.3	Določanje vsebnosti eritromicina pri visoko-donosnem sevu ABE1441 – HPLC	49
3.3.5	Proteomske metode	50

3.3.5.1	Priprava celičnih ekstraktov iz <i>S. erythraea</i>	50
3.3.5.2	Čiščenje celičnega ekstrakta iz <i>S. erythraea</i>	50
3.3.5.3	Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu po metodi Bradford	50
3.3.5.4	2-D elektroforeza	50
3.3.5.5	Računalniška analiza proteinskih profilov s programom 2-D Dymension	52
3.3.5.6	Identifikacija diferencialno izraženih proteinov z masno spektrometrijo.....	52
3.3.5.7	Metoda spektralnega štetja (ang. Spectral counting)	53
3.3.5.8	Prenos Western	54
3.3.6	Bioinformatska analiza genov oz. proteinov	55
3.3.6.1	Bioinformatska orodja	55
3.3.6.2	Bioinformatske analize	56
3.3.7	Molekularno-biološke metode.....	57
3.3.7.1	Testiranje delovanja promotorjev (merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze)	57
3.3.7.2	Genske manipulacije v naravnem sevu NRRL2338 (vnos dodatnih kopij in prekinitve genov)	58
3.3.8	Statistična obdelava podatkov	61
4	REZULTATI	62
4.1	OPTIMIZACIJA GOJIŠČ IN POGOJEV GOJENJA <i>S. erythraea</i> ZA OPTIMALNO PRODUKCIJO ERITROMICINA	62
4.2	POTEK FERMENTACIJE IN DOLOČITEV KONTROLNIH TOČK	65
4.3	OPTIMIZACIJA METODE ZA EKSTRAKCIJO PROTEINOV IZ MIKROBNE BIOMASE	67
4.3.1	Testiranje različnih hitrosti centrifugiranja pri začetnem centrifugiranju	68
4.3.2	Testiranje različnih raztopin za izpiranje biomase	70
4.3.3	Testiranje različnih inhibitorjev proteaz v ekstrakcijski raztopini	70
4.3.4	Testiranje različnih načinov razbijanja celic	71
4.3.5	Obarjanje proteinov s komercialnim kompletom - 2-D Clean-Up (GE Healthcare)	72
4.4	RAČUNALNIŠKA ANALIZA PROTEINSKIH PROFILOV S PROGRAMOM 2-D DYMENSION IN IDENTIFIKACIJA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	72
4.4.1	Slike 2-D gelov	72
4.4.2	Primerjave 2-D proteinskih profilov	74
4.4.3	Analiza diferencialno izraženih proteinov z metodo spektralnega štetja	84

4.5	BIOINFORMATSKE ANALIZE	85
4.5.1	Analiza gena <i>ilvB1</i>	88
4.5.2	Analiza operona <i>bkd</i>	89
4.5.3	Analiza operona <i>mms</i>.....	92
4.6	TESTIRANJE DELOVANJA PROMOTORJEV V NARAVNEM SEVU	97
4.7	ČEZMERNO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV IN PREVERJANJE VPLIVA NA PRODUKCIJO ERITROMICINA V NARAVNEM SEVU	99
4.7.1	Vnos dodatne kopije gena <i>ilvB1</i>	100
4.7.1.1	Potrditev izražanja proteina IlvB1 s prenosom Western.....	101
4.7.1.2	Vpliv dodatne kopije gena <i>ilvB1</i> na produkcijo eritromicina	102
4.7.2	Vnos dodatne kopije operona <i>mms</i>	102
4.7.2.1	Potrditev izražanja proteina metilmalonat sintaze s prenosom Western	104
4.7.2.2	Vpliv dodatne kopije operona <i>mms</i> na produkcijo eritromicina	104
4.7.3	Vnos dodatne kopije operona <i>bkd</i>	105
4.7.3.1	Potrditev izražanja dodatne kopije dehidrogenaze razvejanih keto kislin s prenosom Western	106
4.7.3.2	Vpliv dodatne kopije operona <i>bkd</i> na produkcijo eritromicina.....	106
4.7.4	Vnos gena <i>vdh</i> iz <i>S. cinnamonensis</i>	107
4.7.4.1	Potrditev izražanja proteina Vdh s prenosom Western	108
4.7.4.2	Dodajanje valina v produksijsko gojišče	109
4.7.5	Vnos kombinacij gena <i>ilvB1</i> in operona <i>mms</i>	110
4.7.5.1	Potrditev izražanja proteinov acetolaktat sintaze in metilmalonat sintaze s prenosom Western v transformantah s konstrukti <i>ilvB1+mmsOp1</i> oz. <i>mmsOp1+ilvB1</i>	113
4.7.5.2	Vpliv dodatne kopije operona <i>mmsOp1</i> in gena <i>ilvB1</i> na produkcijo eritromicina	114
4.7.6	Prekinitev operona <i>mcm</i>	114
4.7.6.1	Vpliv prekinitve operona <i>mcm</i> na produkcijo eritromicina	116
4.7.7	Vpliv različnih mutacij na produkcijo eritromicina v sevu NRRL2338....	116
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	118
5.1	OPTIMIZACIJA GOJIŠČA, KI OMOGOČA POVIŠAN DONOS ERITROMICINA IN HKRATI USPEŠNO EKSTRAKCIJO PROTEINOV IZ CELIC <i>S. erythraea</i> TER OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA PROTOKOLA	118
5.2	RAZVOJ BIOPROCESA PRODUKCIJE ERITROMICINA, KI POSNEMA REALNE INDUSTRIJSKE POGOJE	121

5.3	UPORABA OMSKIH TEHNOLOGIJ KOT IZHODIŠČE ZA IZBOLJŠEVANJE DONOSA ERITROMICINA	122
5.3.1	Uporaba proteomskega orodja za preučevanje biosinteze eritromicina.....	123
5.3.2	Primernost proteomskega pristopa za študij biosinteze antibiotikov	125
5.3.3	Rezultati primerjalne transkriptomsko-proteomske analize ter uporaba bioinformatskih orodij za preučevanje biosinteze eritromicina.....	125
5.4	UPORABA METABOLNEGA INŽINERINGA ZA VREDNOTENJE VPLIVA RAZLIČNIH TRANSFORMANT NA PRODUKCIJO ERITROMICINA....	127
5.4.1	Izbor promotorja za učinkovito izražanje vnešenih genov	127
5.4.2	Potrditev hipoteze o alternativni poti za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev	128
5.5	SKLEPI	130
6	POVZETEK (SUMMARY)	132
6.1	POVZETEK	132
6.2	SUMMARY	134
7	VIRI	137
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Receptura za pripravo raztopin za ločevalni in zbiralni gel za elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE).....	39
Pregl. 2: Sestava pufra za katehol test.....	40
Pregl. 3: Antibiotiki, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu; navedene so založne koncentracije in končne koncentracije v posameznih gojiščih (vsi so od proizvajalca Sigma).....	41
Pregl. 4: Plazmidi, ki smo jih pripravili v okviru doktorske naloge (navedeni so ime plazmida, vstavljeni oz. prekinjeni gen/operon, velikost plazmida, rezistenca ter organizem, v katerega smo plazmid vnesli).....	44
Pregl. 5: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri prekomernem izražanju oz. prekinivti genov (navedeni so ime oligonukleotidnega začetnika, katero restirksko mesto je vgrajeno in zaporedje).....	45
Pregl. 6: Reakcijska mešanica za rezanje z restrikskimi encimi.....	60
Pregl. 7: Producija eritromicina seva ABE1441 v gojiščih SCM 1, SCM 2, SCM 3 in ABPM8. Oznake vzorcev 1-5, črka a pomeni brez dodatka standarda, črka b pomeni z dodatkom standarda (koncentracije 0,5 g/l).....	64
Pregl. 8: Določanje koncentracije proteinov v izpirkih; vzorec A in B sta tehnični ponovitvi fermentacijske brozge, gojišče je neinokulirano gojišče, A595 je izmerjena absorbanca, c je koncentracija proteinov (v g/l).....	70
Pregl. 9: Določitev koncentracije proteinov, ekstrahiranih na različne načine (z raličnimi načini sonikacije).....	71
Pregl. 10: Rezultati identifikacije proteinov z MS; navedeni so oznaka 2-D lise, ime proteina, pristopna številka v podatkovni bazi NCBI, odstotek v pokritosti AK sekvence ujemanih peptidov v identificiranem peptidu, število identificiranih peptidov najvišjega zadetka in rezultat MASCOT za najvišji oz. najbolj značilen zadetek.....	76
Pregl. 11: Diferencialno izraženi proteini v točkah KT1 in KT2, določeni na podlagi primerjave med sevoma NRRL2338 in ABE1441; navedene so oznaka 2-D lise (v ABE1441 in v NRRL2338), ime proteina, številka SACE, razvrstitev glede na celične procese v skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway in zvišana/znižana (+/-) raven izražanja proteinov glede na kontrolo (številka pa pove razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension).....	80

Pregl. 12: Diferencialno izraženi proteini v točkah KT1 in KT2, prisotni le pri sevu ABE1441 oz. le pri sevu NRRL2338; navedene so oznaka 2-D lise (v ABE1441 in v NRRL2338), ime proteina, številka SACE, razvrstitev glede na celične procese v skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway in kontrolna točka, v kateri je bil protein identificiran.....	81
Pregl. 13: Rezultati primerjalne transkriptomske analize (pridobljeni v okviru KC Brin) za ključne gene predlagane alternativne poti za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev; navedeni so ime gena, št. SACE, ime encima in nivo izražanja gena v sevu ABE1441 v primerjavi z izražanjem gena v sevu NRRL2338 v štirih kontrolnih točkah.....	86

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel aktinomicet (Angert, 2005: 222)	4
Slika 2: Rast divjega tipa (levo) in visoko-donosnega seva <i>S. erythraea</i> (desno) na trdnem gojišču (osebni viri).....	5
Slika 3: Primer različne morfologije <i>S. erythraea</i> : a) prosti micelij, b) skupek, c) pelet (Ghojavand in sod., 2011: 568).....	6
Slika 4: Prikaz metabolnih poti, ki omogočajo nastanek (2S)-metilmalonil-CoA in (2S)-etilmalonil-CoA; ti dve podaljševalni enoti sta obkroženi s polno črto, začetni metaboliti, iz katerih nastaneta so obkroženi s črtkano črto (okrajšave: ICM = izobutiril-CoA mu mutaza, BCC = butiril-CoA karboksilaza, PCC = propionil-CoA karboksilaza, CCR = krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza, PHB = polihidroksibutirat, MCR = metilmalonil-CoA racemaza (epimeraza), MCM = metilmalonil-CoA mutaza, MM-CoA TC = metilmalonil-CoA transkarboksilaza) (Chan in sod., 2009: 35).....	9
Slika 5: Strukture in mehanizmi bakterijskih PKS: (a) PKS tipa I sestavljajo neiterativne domene, primer je DEBS za biosintezo eritromicina; (b) PKS tipa II sestavljajo iterativne domene, primer je TomKLM za biosintezo tetracenomicina; (c) PKS tipa III sestavlja ena iterativna domena, primer je RppA za biosintezo flavolina (Shen, 2003: 286).	13
Slika 6: Kemijska struktura eritromcina A (Weissman in Leadley, 2005: 926).....	14
Slika 7: Shematski prikaz genske skupine za biosintezo eritromicina (Staunton in Weissman, 2001: 387).....	15
Slika 8: Sinteza TDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoze (White-Phillip in sod., 2009: 16, 18) ...	17
Slika 9: Organizacija domen eritromicinske PKS (Staunton in Weissman, 2001: 389)	18
Slika 10: Pozne stopnje biosinteze eritromicina A (EA = eritromycin A, EC = eritromycin C, EB = eritromycin B, ED = eritromycin D) (Carerras in sod., 2002: 218).....	20
Slika 11: Shema prikazuje različne pristope za povečanje donosa sekundarnih metabolitov z metabolnim inžineringom (Olano in sod., 2008: 284)	25
Slika 12: Shema poteka dela.....	35
Slika 13: Vektor pUC19; vsebuje gen <i>lacZ</i> (kodira β-galaktozidazo), v katerem se nahaja mesto za kloniranje (MCS, ang. multiple cloning site) in gen <i>bla</i> za rezistenco proti ampicilinu (Invitrogen)	42
Slika 14: Vektor za izražanje tarčnih genov pSet152; vsebuje laktozni operon in ima zapis za α-podenoto gena <i>lacZ</i> , gen <i>aac(3)IV</i> za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicin, multiplo mesto za koniranje in mesto začetka podvojevanja (<i>oriT</i>) (Kieser in sod., 2000: 530).....	42
Slika 15: Vektor za prekinitev genov pKC1132; vsebuje zapis za α-podenoto gena <i>lacZ</i> , gen <i>aac(3)IV</i> za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicin, multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka podvojevanja (<i>oriT</i>) (Kieser in sod., 2000: 566).....	43

Slika 16: Shematski prikaz poteka bioinformatskih analiz	57
Slika 17: Producija eritromicina seva ABE1441 v gojišču ABPM8 v centrifugirkah in v erlenmajericah. Polja pravokotnikov obsegajo 95 % vzorčne populacije, horizontalne črte predstavljajo vrednost mediane, vertikalne črte predstavljajo ekstreme (min, max), n = 14.	63
Slika 18: Potek bioprosesa pri visoko-donosnem sevu <i>S. erythraea</i> ABE1441; s črnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z metodo HPLC, z vijoličnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z biološkim testom, z zelenimi kvadratki je označena poraba glukoze, z rjavimi zvezdicami je označena koncentracija amonijevega sulfata, modri stolpci pa predstavljajo PMV. Označene so tudi kontrolne točke (KT1-KT4).	66
Slika 19: Potek bioprosesa pri naravnem sevu <i>S. erythraea</i> NRRL2338; z vijoličnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z biološkim testom, z zelenimi kvadratki je označena poraba glukoze, z rjavimi zvezdicami je označena koncentracija amonijevega sulfata, modri stolpci pa predstavljajo PMV. Označene so tudi kontrolne točke (KT1-KT4).....	67
Slika 20: Mikroskopski preparat sedimenta fermentacijske brozge (osebni vir)	69
Slika 21: Testiranje komercialnih koktejlov z inhibitorji proteaz; na sliki levo je prikaz 2-D gela, kjer smo dodali v ekstrakcijsko raztopino 1 tabletko Complete Mini (Roche), na sliki desno pa je prikazan 2-D gel, kjer smo v ekstrakcijsko raztopino dodali 2 tabletki Complete Mini (Roche)	71
Slika 22: Prikaz 2-D gela pred in poobarjanju proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean Up«	72
Slika 23: Prikaz 2-D gelov pri sevu NRRL2338 v različnih časovnih točkah	73
Slika 24: Prikaz 2-D gelov pri sevu ABE1441 v različnih časovnih točkah.....	74
Slika 25: Razvrstitev diferencialno izraženih proteinov v točkah KT1 (TP1) in KT2 (TP2) glede na celične procese s skladu s hierarhijo metabolizma »KEGG Pathway« (zelena barva pomeni znižano raven izražanja, rdeča barva pomeni zvišano raven izražanja	82
Slika 26: Primerjava 2-D gelov med sevoma ABE1441 in NRRL2338 v točki KT1 (številke označujejo identificirane proteine, ki so navedeni v preglednici 9).....	83
Slika 27: Primerjava 2-D gelov med sevoma ABE1441 in NRRL2338 v točki KT2 (številke označujejo identificirane proteine, ki so navedeni v preglednici 10).....	84
Slika 28: Predlagana alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin	87
Slika 29: Poravnava aminokislinskega zaporedja acetolaktat sinzate iz <i>S. erythraea</i> (SACE_4565) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TTP-vezavnih mest)	88
Slika 30: Organizacija genov v operonu <i>bkd</i> ; SACE_3952 kodira alfa podenoto dehidrogenaze E1, SACE_3953 kodira beta podenoto dehidrogenaze E1, SACE_3954 kodira (domnevno) dihidrolipoamid aciltransferazo, komponento E2.	89

Slika 31: Poravnava aminokislinskega zaporedja SACE_3952 z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TTP-vezavnih mest)	90
Slika 32: Poravnava aminokislinskega zaporedja beta podenote SACE_3953 z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TTP-vezavnih mest).....	91
Slika 33: Organizacija genov v operonu <i>mms; mmsA2</i> kodira metilmalonat-semialdehid dehidrogenazo; SACE_1457 kodira acil-CoA dehidrogenazo, <i>echA9</i> kodira enoil-CoA hidratazo, <i>mmsB</i> kodira 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenazo (Carata in sod., 2009: 9).	93
Slika 34: Poravnava aminokislinskega zaporedja metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza iz <i>S. erythraea</i> (SACE_1456) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki katalitičnih mest).....	94
Slika 35: Poravnava aminokislinskega zaporedja metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza iz <i>S. erythraea</i> (SACE_1456) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki NAD vezavnih mest)	94
Slika 36: Poravnava aminokislinskega zaporedja acil-CoA dehidrogenaze iz <i>S. erythraea</i> (SACE_1457) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki FAD vezavnih mest)	95
Slika 37: Poravnava aminokislinskega zaporedja enoil-CoA hidrataze iz <i>S. erythraea</i> (SACE_1458) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki vezavnih mest za substrat)	96
Slika 38: Plazmid pSet152 + <i>PermE*/xylE</i> za testiranje delovanja promotorjev; vsebuje gen <i>acc(3)IV</i> za rezistenco bakterije proti apramicinu, mesto <i>oriT</i> za začetka podvojevanja, att (phiC31) mesto za integracijo, gen <i>int</i> za integrazo, mesto za začetek podvajanja iz pUC18, multiplo mesto za kloniranje, promotor (na sliki <i>PermE*</i>) in poročevelski gen <i>xylE</i>	98
Slika 39: Vpliv različnih promotorjev (<i>PermE*</i> brez mesta za vezavo ribosoma, <i>PermE</i> , <i>PmerR</i> , <i>PeryAI</i>) na izražanje poročevelskega gena <i>xylE</i> v <i>S. erythraea</i> NRRL2338; negativna kontrola je bil sev s plazmidom brez promotorja in gena <i>xylE</i> . Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti izmerjene absorbance ±SD, n = 15.	99
Slika 40: Shema konstrukcije plazmidov pABE (na sliki je prikazana konstrukcija plazmida pABE61, je pa princip enak za vse pABE plazmide)	100
Slika 41: Plazmid z dodatno kopijo gena <i>ilvB1</i> brez in s HA-epitopom na karboksiterminalu; A) pABE61 (<i>ilvB1</i> brez HA-epitopa), B) pABE62 (<i>ilvB1</i> z HA-epitopom)	101
Slika 42: Potrditev izražanja dodatne kopije gena <i>ilvB1-HA</i> s prenosom western, 556 AK; 1-7: neodvisne konjugante <i>S. erythraea</i> NRRL2338 s plazmidom pABE62 (opazne so lise z molekulsko maso 58 kDa); 8: pozitivna kontrola, Vdh; M: molekulska masa označevalcev.	102

Slika 43: Plazmid z dodatno kopijo operona <i>mmsOp1</i> brez in s HA-epitopom na karboksiterminalu; A) pABE60 (<i>mmsOp1</i> brez HA-epitopa), B) pABE87 (<i>mmsOp1</i> s HA-epitopom)	103
Slika 44: Plazmid z dodatno kopijo operona <i>mmsOp2</i> , pABE95	103
Slika 45: Analiza prenosa western in genomske kontekst operona <i>mms</i> . A) Potrditev izražanja dodatne kopije SACE_1459-HA-tag, 295 AK (1-8), M: molekulska masa označevalcev (njihova pozicija je označena na levi strani membrane), 9: pozitivna kontrola, Vdh. Opazne so lise z molekulsko maso 30 kDa pri 8 neodvisnih transformantah seva <i>S. erythraea</i> NRRL2338 z dodatno kopijo gena SACE_1459. B) Organizacija genov operona <i>mms</i> (<i>mmsOp1</i> - SACE_1456-59), zadnji gen v operonu (SACE_1459) je označen s HA epitopom.	104
Slika 46: Plazmid pABE56 z dodatno kopijo operona <i>bkd</i> s HA-epitopom na karboksiterminalu.....	105
Slika 47: Restriktijska analiza plazmida pABE56. A) pABE56 rezan z <i>NdeI</i> in <i>XbaI</i> (vrstica N-X), vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike), lisa 3590 bp se ujema s fragmentom operona <i>bkd</i> , lisa velikosti 6,2 kb se ujema s preostankom plazmida pABE56. B) pABE56 rezan z <i>BamHI</i> (vrstica B), <i>PstI</i> (vrstica P) in z <i>XhoI</i> (vrstica X), vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike), lise 6687 bp, 2128 bp, 763 bp in 255 bp ustrezajo fragmentom, ki nastanejo pri restrikciji z <i>BamHI</i> (vrstica B), lise 3294 bp, 3172 bp, 2565 bp in 802 bp ustrezajo fragmentom, ki nastanejo pri restrikciji s <i>PstI</i> (vrstica P), lisi 5396 bp in 4437 bp ustrezata fragmentoma, ki nastaneta pri restrikciji z <i>XhoI</i> (vrstica X).	106
Slika 48: Plazmid pABE96 z genom <i>vdh</i> s HA epitopom iz <i>S. cinnamomensis</i>	107
Slika 49: Restriktijska analiza plazmida pABE96, rezanega z <i>NdeI</i> in <i>XbaI</i> (vrstice 1-4). Velikost DNA fragmentov (bp) označevalcev (vrstica L) in njihova pozicija je prikazana shematsko na levi strani slike. Lise z velikostjo 1109 bp (vrstice 1, 3, 4) se ujemajo s fragmenti gena <i>vdh</i> , lise z velikostjo 7,3 kb se ujemanje s preostanki plazmida pABE96.	108
Slika 50: Potrditev izražanja vnosa gena <i>vdh</i> s prenosom western, 358 AK; 1: molekulska masa označevalcev, 1-8: neodvisne konjugante <i>S. erythraea</i> NRRL2338 s konstruktom pSet152+ <i>PermE*</i> + <i>vdh</i> -HA (opazne so lise z molekulsko maso cca. 48 kDa).....	109
Slika 51: Producija eritromicina pri transformantah z genom <i>vdh</i> in vpliv dodajanja valina v producijsko gojišče.....	110
Slika 52: Shematski prikaz priprave plazmidov, ki vsebujejo različne kombinacije genov (<i>ilvB1</i> in operon <i>mms</i>)	111
Slika 53: Restriktijska analiza plazmidov pABE88 in pABE89 z restriktijskim encimom <i>NdeI</i> . A) pABE88 (3 neodvisni kloni: lisa velikosti 5101 bp se ujema s fragmentom operona <i>mmsOp1</i> , lisa velikosti 7943 bp se ujema s preostalim fragmentom z <i>NdeI</i> rezanega plazmida pABE88) in pABE89 (3 neodvisni kloni: lisa velikosti 1742 bp se ujema s fragmentom gena <i>ilvB1</i> -HA, lisa velikosti 11302 bp se ujema s preostalim	

fragmentom z *NdeI* rezanega plazmida pABE89); vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike). B) kontrole: 1 – pABE87 (lisa velikosti 11309 bp ustreza velikosti nerezanega plazmida pABE87), 2 – insert *ilvB1-HA* (lisa 1742 bp se ujema s fragmentom gena *ilvB1-HA*), 3 – pABE62 (lisa velikosti 7983 bp ustreza velikosti nerezanega plazmida pABE62), 4 – insert *mmsOp1-HA* (lisa 5101 bp se ujema s fragmentom operona *mmsOp1-HA*); vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na desni strani slike). 112

Slika 54: Restriktijska analiza plazmidov pABE88 in pABE89 z restriktijskima encimoma *KpnI* in *PstI*. A) vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike); pABE88: 1, 3, 5 – 3 neodvisni kloni rezani s *KpnI* (lise velikosti 1672 bp, 1800 bp, 9572 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE88 rezanega s *KpnI*); 2, 4, 6 – 3 neodvisni kloni rezani s *PstI* (lise velikosti 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 3084 bp, 4663 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE88 rezanega s *PstI*). B) vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike); pABE89: 1, 3, 5 – 3 neodvisni kloni rezani s *KpnI* (lise velikosti 1672 bp, 3371 bp, 8001 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE89 rezanega s *KpnI*); 2, 4, 6 – 3 neodvisni kloni rezani s *PstI* (lise velikosti 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 2921 bp, 4826 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE89 rezanega s *PstI*)..... 113

Slika 55: Potrditev izražanja dodatne kopije operona *mms* (295 AK) in gena *ilvB1* (556 AK) s prenosom western; 1-3: NRRL2338+pABE89, 4: NRRL2338+pABE88, M: proteinski standard velikosti; 5: NRRL2338+pABE88; 6: negativna kontrola sev NRRL2338; 8: NRRL2338+pABE87, 9: NRRL2338+pABE14412 (opazne so lise z molekulsko maso 30 in 58 kDa). 114

Slika 56: Organizacija genov v *mcm* operonu; *mutA* kodira manjšo podenoto MCM, *mutB* kodira večjo podenoto MCM, *meaB* kodira MCM pomožni protein, *mutR* pa je regulatorni gen iz družine *gntR* (Reeves in sod., 2007: 296) 115

Slika 57: Plazmid pABE58; vsebuje gen *aac(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicin in prekinjen operon *mcm* 116

Slika 58: Vpliv različnih mutacij na produkcijo eritromicina v primerjavi s produkcijo eritromicina pri naravnem sevu NRRL2338. Producija eritromicina različnih transformant NRRL2338, določena z biološkim testom; WT: kontrola 1, NRRL2338, A: kontrola 2, NRRL2338 + pSet152, B: NRRL2338 + $\Delta mcmOp$ (pABE58), C: NRRL2338 + *mmsOp1* (pABE60), D: NRRL2338 + *mmsOp1-HA* (pABE87), E: NRRL2338 + *ilvB1* (pABE61), F: NRRL2338 + *ilvB1-HA* (pABE62), G: NRRL2338 + *mmsOp1-HA* + *ilvB1-HA* (pABE89), H: NRRL2338 + *ilvB1-HA* + *mmsOp1-HA* (pABE88), I: NRRL2338 + *bkdOp* (pABE56), J: NRRL2338 + *mmsOp2* (pABE95). Okvirji označujejo prvi in tretji kvartil vzorčne populacije. Horizontalne črte označujejo mediano, ročaji označujejo ekstremne vrednosti vzorčne populacije. Zvezdice označujejo statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med vzorci in kontrolama 1 in 2 (podatki s produkcijo eritromicina pri različnih mutantah so navedeni v preglednici v prilogi J). 117

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu po metodi Bradford
- Pril. B: Poravnava aminokislinskih zaporedij acetolaktat sintaz (SACE_1456)
- Pril. C: Poravnava aminokislinskih zaporedij alfa podenote piruvat dehidrogenaze E1 (SACE_3952)
- Pril. D: Poravnava aminokislinskih zaporedij beta podenote piruvat dehidrogenaze E1 (SACE_3953)
- Pril. E: Poravnava aminokislinskih zaporedij dihidrolipoamid aciltransferaze, komponenta E2 (SACE_3954)
- Pril. F: Poravnava aminokislinskih zaporedij metilmalonat semialdehid dehidrogenaze (SACE_1456)
- Pril. G: Poravnava aminokislinskih zaporedij acil-CoA dehidrogenaze (SACE_1457)
- Pril. H: Poravnava aminokislinskih zaporedij enoil-CoA hidrataze (SACE_1458)
- Pril. I: Poravnava aminokislinskih zaporedij 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaze (SACE_1459)
- Pril. J: Preglednica produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- 2-D – dvodimenzionalna
2-DE – dvodimenzionalna elektroforeza
6-dEB – 6-deoksieritronolid B
ACC – acetil-CoA karboksilaza
ACP – acil prenašalni protein
AK - aminokislina
Apr – apramicin
APS – amon persulfat
AT – aciltransferaza
ATP – adenozin trifosfat
BC – biotin karboksilaza
BCCP – biotin karboksil prenašalni protein
BLAST - osnovno programsko orodje za iskanje in poravnavo zaporedij (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp – bazni par
BRENDA – encimska baza podatkov Braunschweig (ang. Braunschweig Enzyme Database)
C – citozin
CCR – krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza
Cm – kloramfenikol
CoA – koencim A
CSL – koruzna namakalna vodica (ang. corn steep liquor)
CT – karboksil transferaza
DAB - diaminobenzimid
DEBS – deoksieritronolid B sintaza
DH – dehidrataza
 dH_2O (ddH_2O) – destilirana voda (bidestilirana voda)
DMSO – dimetilsulfoksid
DNA – deoksiribonukleinska kislina
dNTP – dioksinukleotid trifosfat
DTT – ditiotritol
EC – numerična klasifikacijska številka za encime (ang. enzyme commision number)

EDTA - etilendiaminetetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EMS – etil metansulfonat
ER – enoil reduktaza
G – gvanin
GTP – gvanozin trifosfat
G-3-P – gliceraldehid-3-fosfat
HA – hidroksilamin
HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography)
IEF – izoelektrično fokusiranje
IPG – imobiliziran pH gradient
kb – kilobaza
KEGG - Kyoto enciklopedija genov in genomov (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
Kn – kanamicin
KR – ketoreduktaza
KS – ketosintaza
LAL – veliki ATP-vezavni regulatorni proteini iz družine LuxR (ang. Large ATP-binding regulators of the LuxR family)
LC – tekočinska kromatografija
LTTR – transkripcijski regulatorji tipa LysR (ang. LysR-type transcriptional regulators)
MALDI-TOF - ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem časa preleta ionov (ang. matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight)
MCM – metilmalonil-CoA mutaza
MMS – metil metansulfonat
MS – masna spektrometrija
NAD(P)H – nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
Nal – nalidinska kislina
NCBI – nacionalni center za biotehnološke informacije (ang. National Center for Biotechnology Information)
NMR – jedrna magnetna resonanca (ang. nuclear magnetic resonance)
NTG – nitrozogvanidin
PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCC – propionil-CoA karboksilaza

PCR – verižna reakcija s polimerazo
PMV – ang. packed mycelium volume
PKS – poliketid sintaza
PTM – post-translacijske modifikacije
RNA – ribonukleinska kislina
SAM – S-adenozil-L-metionin
SARP – družina regulatornih proteinov značilnih za streptomicete (ang. *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins)
SDS – natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulphate)
TCA – cikel trikarboksilnih kislin (ang. tricarboxylic acid cycle)
TDP – timidin difosfat
TE – tioesteraza
TEMED - tetrametiletilendiamin
TF – sprožitveni faktor (ang. trigger factor)
TMP – timidin monofosfat
TPP – tiamin pirofosfat
TPP – timidin trifosfat
UTP – uridin trifosfat
UV – ultravijolična svetloba

1 UVOD

Poliketidi so zelo raznolika skupina sekundarnih metabolitov s širokim spektrom bioloških aktivnosti. Najbolj znani primeri medicinsko pomembnih poliketidov so antibiotiki (eritromicin, rifampicin), protirakaste spojine (doksorubicin, epotilon), fungicidi (amfotericin B), insekticidi (spinozin A) in imunosupresivi (rapamicin) (Shen, 2003; Weissman in Leadley, 2005). Biosinteza poliketidov poteka s pomočjo multiencimskih kompleksov, t.i. poliketid sintaz (PKS). PKS katalizirajo kaskado dekarboksilacijskih kondenzacij med derivati tioesterificiranih malonatov in acil tioestrov (Rawlings, 2001).

Aktinobakterija *Saccharopolyspora erythraea* je po Gramu pozitivna bakterija, ki proizvaja široko-spektralni makrolidni antibiotik eritromicin. Biosinteza eritromicina lahko razdelimo v dve fazi. V prvi fazi se z zaporednimi kondenzacijami ene enote propionil-CoA in šestih enot metilmalonil-CoA sintetizira makrolaktonski prekurzor (6-dEB). V drugi fazi pa potem sledijo modifikacije 6-dEB (hidroksilacija, dva koraka glikozilacije in O-metilacija), ki omogočajo nastanek aktivne oblike eritromicina (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991; Staunton in Wilkinson, 1997).

Kljub temu, da se v industriji že desetletja trudijo izboljšati industrijski sev *S. erythraea*, so donosi eritromicina v primerjavi z nekaterimi drugimi antibiotiki razmeroma nizki (8-9 g/l), npr. donosi penicilina so 5 do 10-krat višji (Brunker in sod., 1998). Industrijski sevi *S. erythraea* so bili pridobljeni s klasičnimi postopki izboljšave, t.j. s postopki naključne mutageneze in selekcije mutiranih sevov. Klasični pristopi izboljšave sekundarnih metabolitov so dolgotrajni, poleg tega pa ne dajo nobenih informacij o mutacijah in mehanizmih, ki omogočajo višje donose. Omejeno število usmerjenih raziskav posameznih genov, ki vplivajo na donos eritromicina (Donadio in sod., 1996; Reeves in sod., 2006), ne zadošča za celostni vpogled v ozka grla biosinteze, poleg tega tudi ne omogoča nadaljnjega izboljševanja industrijskih sevov. Ključne metabolne, biosintezne in regulatorne poti, ki imajo bistveno vlogo za dvig donosa eritromicina, še vedno niso identificirane ali dobro poznane.

Za razliko od številnih drugih makrolidnih antibiotikov, katerih biosinteza je specifično regulirana (Cundliffe, 2006), pri eritromicinu ni poznan pot-specifični regulatorni gen za njegovo biosintezo. Chng in sod. so odkrili globalni transkripcijski regulator *bldD*, ki pozitivno vpliva na gensko skupino za biosintezo eritromicina in morfološko diferenciacijo (Chng in sod., 2008). Pred kratkim so identificirali še dva nova pozitivna globalna regulatorja pri *S. erythraea*: SACE_5599, ki vpliva na donos eritromicina in morfološko diferenciacijo (Kirm in sod., 2013) in SACE_7301, ki omogoča povečano transkripcijo biosinteznega gena *eryAI* in gena za rezistenco *ermE* ter posledično dvig produkcije eritromicina (Wu in sod., 2014).

Objava celotnega genoma naravnega seva *S. erythraea* (Oliynyk in sod., 2007) je odprla nove možnosti sistemskega preučevanja genoma omenjene aktinobakterije. Objavljene so

bile tudi že prve primerjalne genomske in transkriptomske študije različnih sevov *S. erythraea* (Peano in sod., 2007; Marcellin in sod., 2013; Li in sod., 2013), proteom te bakterije pa je zaenkrat še slabo raziskan. Izražanje genov ni vedno v korelaciiji z vsebnostjo proteinov, zato lahko s preučevanjem bioloških procesov na nivoju proteoma dobimo veliko dodatnih informacij (Thongboonkerd, 2007). Proteomika namreč preučuje proteine, ki so nosilci funkcij (Lubec in sod., 2003). Poleg informacije o izražanju proteinov lahko z uporabo različnih proteomskeih orodij dobimo tudi informacije o njihovih post-translacijskih modifikacijah in proteinskih interakcijah, kar daje še boljši vpogled v dogajanje v celici oz. tkivu (Wetmore in Merrick, 2004). Iz literature je razvidno, da so proteomski pristop že uporabljali za preučevanje biosinteze antibiotikov tudi pri streptomicetah (Hesketh in sod., 2002; Kim in sod., 2005; Lu in sod., 2007; Orsaria in sod., 1998; Vohradsky in sod., 2000).

V naši raziskovalni nalogi smo se lotili preučevanja biosinteze eritromicina v aktinobakteriji *S. erythraea* s proteomskeimi in bioinformatskimi orodji. S pomočjo teh orodij smo identificirali gene, ki imajo pomembno vlogo pri produkciji eritromicina. Z metabolnim inžineringom izbranih genov (prekomerno izražanje ali prekinitve genov) smo nato pridobili rekombinantne seve *S. erythraea* in ugotavljali vpliv genskih sprememb na produkcijo eritromicina.

1.1 NAMEN DOKTORSKE NALOGE

Namen doktorske naloge je, da bi z metodološkim pristopom kombinacije proteomskeih orodij in bioinformatike dobili boljši vpogled v relevantne razlike med izražanjem proteinov naravnega in visoko-donosnega seva. S tem bi lahko bolje razumeli ključne metabolne poti in regulatorne mehanizme biosinteze eritromicina, ki vplivajo na povečan donos eritromicina. S celovito analizo izražanja odgovornih proteinov, poznavanjem celotnega genoma in gojenjem sevov v industrijskih pogojih bomo lahko razvili nove pristope h genski manipulaciji biosinteznih poti z namenom racionalnega izboljšanja novih sevov oz. pri nadaljnjih izboljšavah obstoječih industrijskih sevov, pri katerih klasičen pristop ne omogoča več napredka ali pa je preveč zamuden.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na dosedanje raziskave na področju biosinteze eritromicina lahko postavimo sledeče hipoteze:

- a) Da bomo uspeli razviti oziroma optimizirati gojišče, ki v veliki meri omogoča povišan donos eritromicina in ob enem omogoča uspešno ekstrakcijo proteinov iz celic *S. erythraea* za proteomsko analizo.
- b) Da bomo s primerjalno proteomsko analizo lahko opazili razlike v proteomskem profilu med naravnim sevom *S. erythraea* in visoko-donosnim industrijskim sevom.

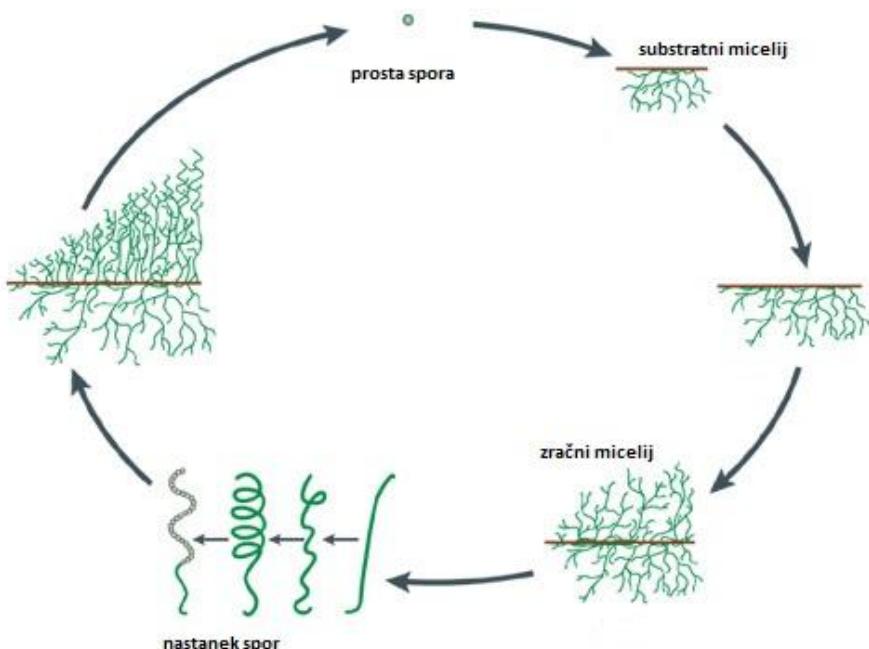
- c) Da bomo na osnovi komparativne proteomske analize in s pomočjo bioinformatskih orodij določili proteine oz. gene, ki potencialno lahko vplivajo na donos eritromicina.
- d) Da bomo s pomočjo prekomernega izražanja nekaterih izbranih genov preverili vpliv teh genskih homologov na donos eritromicina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AKTINOMICETE

Aktinomicete so aerobne po Gramu pozitivne nitaste bakterije, ki so klasificirane v red *Actinomycetales* (Lechevalier in Lechevalier, 1981). Njihove značilnosti so visoka vsebnost nukleotidov G in C v genomu (60-70 %), tvorba substratnega in zračnega micelija, tvorba spor, rast v obliki hif in značilen vonj po zemlji (Lechevalier in Lechevalier, 1981; Sprusansky in sod., 2005). Aktinomicete so pomembni producenti številnih bioaktivnih sekundarnih metabolitov kot so antibiotiki, protitumorske spojine, imunosupresivi in encimi. Izmed številnih rodov aktinomicet so glavni producenti komercialno pomembnih biomolekul rodovi *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* in *Actinoplanes* (Solanki in sod., 2008).

Življenjski cikel aktinomicet obsega fazo substratnega micelija, fazo zračnega micelija in fazo sporulacije (slika 1). Iz posamezne spore se razvijejo substratne hife, ki z razraščanjem po površini in v samo podlago tvorijo substratni micelij. Pri razraščanju substratnega micelija se tvorijo razvezani filamenti, ki se občasno septirajo in nastanejo podolgovate celice, ki vsebujejo nukleoide. Ko v okolju pride do pomanjkanja hrani, pride do razvoja zračnih hif in tvori se zračni micelij. Ko se hife nehajo podaljševati, pride do septacije in zračni micelij se transformira v verigo spor (Klieneberger-Nobel, 1947; Morris, 1951; Dahl, 2004; Angert, 2005).



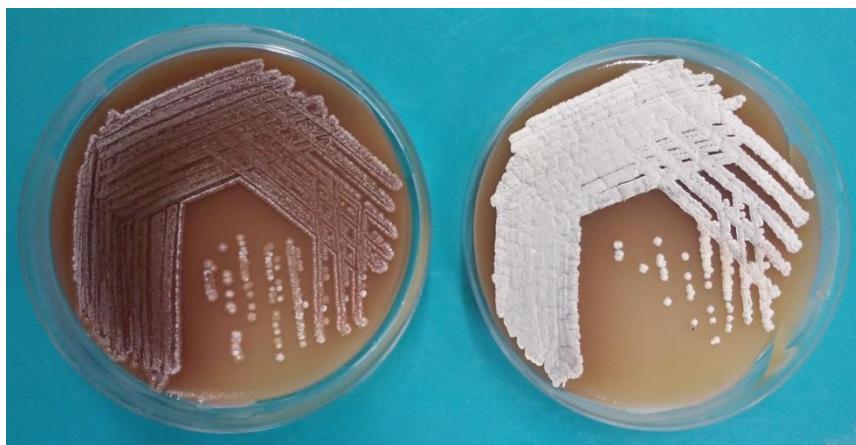
Slika 1: Življenjski cikel aktinomicet (Angert, 2005: 222)
Figure 1: Actinomycete life cycle (Angert, 2005: 222)

Celična stena aktinomicet je rigidna struktura, ki vzdržuje obliko celice in preprečuje lizo celice zaradi visokega osmotskega tlaka (Manuselis in Mahon, 2007; Goodfellow in sod., 1998). Celično steno sestavlja peptidoglikan, teihoična in teihuronska kislina ter polisaharidi. Peptidoglikan sestavlja verige alternirajočih polisaharidov N-acetyl-d-glukozamina, N-acetyl-d-muramične kisline in diaminopimelične kisline, kar je posebnost v celičnih stenah prokariontov (Manuselis in Mahon, 2007; Davenport in sod., 2000).

2.1.1 Aktinomiceta *Saccharopolyspora erythraea*

Saccharopolyspora erythraea je po Gramu pozitivna nitasta bakterija, ki je bila sprva identificirana kot *Streptomyces erythraeus*, leta 1987 pa so jo na podlagi kemotaksonomske lastnosti uvrstili v rod *Saccharopolyspora* (Labeda, 1987). Kljub reklassifikaciji je biologija *S. erythraea* zelo podobna mikroorganizmom iz rodu *Streptomyces* (morfologija, življenjski cikel). Po drugi strani je analiza genoma *S. erythraea* leta 2007 razkrila pomembne razlike med njimi, tako v organizaciji genov kot tudi v njihovih funkcijah. Genomi bakterij iz rodu *Streptomyces* so na primer linearni, medtem ko ima *S. erythraea* krožni genom, podobno kot večina drugih aktinobakterij (Oliynyk in sod., 2007).

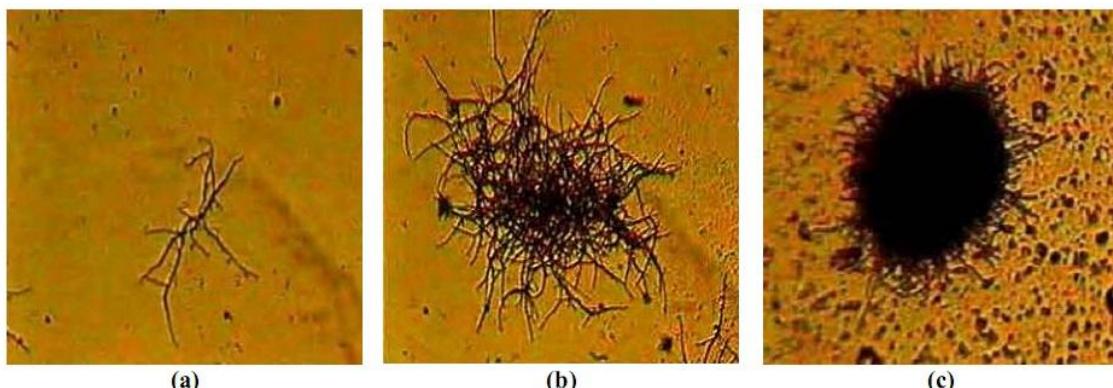
S. erythraea sintetizira široko-spektralni makrolidni antibiotik eritromicin A, ki se uporablja zlasti za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo po Gramu pozitivne bakterije (Staunton in Weissman, 2001). Spore *S. erythraea* se nahajajo v kratkih verigah, ki so običajno rahlo spiralne oblike. Substratni micelij je obarvan svetlo rumenooranžno ali redečerjavo, odvisno od gojišča. Zračni micelij je prav tako lahko v različnih barvnih odtenkih, od svetlo roza do rjavosivega, lahko tudi bel, spet odvisno od gojišča (slika 2). V večini gojišč nastaja roza-oranžno-rjav pigment. Melanin ne nastaja (Labeda, 1987).



Slika 2: Rast divjega tipa (levo) in visoko-donosnega seva *S. erythraea* (desno) na trdnem gojišču (osebni viri)

Figure 2: Mycelium growth of wild type (left) and high-producing strain (right) of *S. erythraea* on solid medium (personal sources)

V tekočem gojišču micelij lahko vidimo v treh oblikah: prosti micelij, skupki ali peleti (slika 3). Katera oblika bo prevladovala, je odvisno od različnih dejavnikov (sestava gojišča, strižne sile, ki nastanejo zaradi mešanja, delež inokuluma) (Stocks in Thomas, 2001; Ghojavand in sod., 2011).



Slika 3: Primer različne morfologije *S. erythraea*: a) prosti micelij, b) skupek, c) pelet (Ghojavand in sod., 2011: 568)

Figure 3: Example of different *S. erythraea* morphology: a) free dispersed mycelium, b) clump, c) pellet (Ghojavand et al., 2011: 568)

Genom naravnega seva *S. erythraea* NRRL 23338 je krožen, velik je 8.212.805 bp, povprečna vsebnost GC parov pa je 71,1 %. Genom vsebuje vsaj 25 genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov. Razporeditev teh genskih skupin po kromosому ni enotna; le 4 (vključno z gensko skupino za biosintezo eritromicina) se nahajajo v osrednji regiji, ki vsebuje večino esencialnih genov, ostale genske skupine pa so zunaj osrednje regije (Oliynyk in sod., 2007).

2.2 BIOSINTEZA POLIKETIDOV

Poliketidi so zelo raznolika skupina medicinsko pomembnih bioaktivnih spojin, ki jih proizvajajo bakterije, glive in rastline. Večino znanih poliketidov proizvajajo aktinomicete. Mednje uvrščamo antibiotike (eritromicin A, rifampicin S), protirakaste spojine (doksorubicin, epotilon), fungicide (amfotericin B), insekticide (spinozin A) in imunosupresive (rapamicin) (Shen, 2003; Weissman in Leadley, 2005). Poliketidi niso nujno potrebni za rast, ampak mikroorganizmu omogočajo selektivno prednost (Firn in Jones, 2003).

Glavni koraki biosinteze poliketidov so:

- oskrba z gradniki,
- biosinteza poliketidne verige,
- post-PKS reakcije.

2.2.1 Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo poliketidov

Izjemna struktturna raznolikost poliketidov je rezultat uporabe različnih začetnih in podaljševalnih enot, variacij in števila podaljševalnih enot, ki se vgradijo v poliketidno verigo, različnega oksidacijskega stanja nastalih β -keto skupin in načina sprostiteve verige (ciklizacija, hidroliza) (Moore in Hertweck, 2002; Austin in Noel, 2003; Grunewald in Marahiel, 2006). Najbolj pogoste gradbene enote pri bakterijskih PKS so na CoA-vezane gradbene enote, in sicer: malonil-CoA, acetil-CoA, propionil-CoA, (2S)-metilmalonil-CoA, (2S)-etilmalonil-CoA in kloroetilmalonil-CoA. Koencim A (CoA) ima pri biosintezi poliketidov vlogo prenašalca karboksilnih kislin (Chan in sod., 2009).

Malonil-CoA

Malonil-CoA je pri številnih organizmih prva stopnja v biosintezi maščobnih kislin. Procesa biosinteze maščobnih kislin in biosinteze poliketidov sta evolucijsko sorodna, zato ni presenetljivo, da je malonil-CoA tudi najbolj pogosta podaljševalna enota pri biosintezi poliketidov, značilna je pri vseh treh tipih PKS. Malonil-CoA lahko nastane preko dveh različnih metabolnih poti. Bolj običajna je pot nastanka preko karboksilacije acetil-CoA z acetil-CoA karbosilazami (ACC), druga pot pa vključuje direktno pretvorbo malonata v malonil-CoA s pomočjo malonil-CoA sintaze (Chan in sod., 2009).

Delovanje acetil-CoA karboksilaz je odvisno od prisotnosti biotina in ATP (Tong, 2005). Ti encimi imajo tri komponente: biotin karboksilazo (BC), biotin karboksil prenašalni protein (BCCP) in karboksiltransferazo (CT). BC katalizira ATP-odvisno aktivacijo bikarbonata in posledično karboksilacijo N1 atoma prostetične skupine biotina. Ko pride do nastanka karboksil-BCCP intermediata, CT aktivira metilno skupino acetil-CoA za nukleofilni napad aktivirane karboksilne skupine, ki je vezana na BCCP. Posledično pride do prenosa karboksilne skupine na acetil-CoA in nastane malonil-CoA (Chan in sod., 2009).

Drugi mehanizem za nastanek malonil-CoA je direktna kondenzacija malonata in CoA s pomočjo malonil-CoA sintetaze. Ta metabolna pot ni dominantna pot pri nastajanju malonil-CoA in je prisotna le pri nekaterih bakterijah (Kim, 2002). Predvidevajo, da malonat, ki je potreben za to reakcijo, nastaja pri razgradnji pirimidinov (An in Kim, 1998; An in sod., 1999).

Propionil-CoA

Propionil-CoA lahko nastane z β -oksidacijo lihih in razvejanih maščobnih kislin, z razgradnjo aminokislin izolevcina, metionina ali valina ozziroma z razgradnjo holesterola (Gottschalk, 1986). Poleg tega lahko propionil-CoA nastane tudi z vgradnjo propionata iz okolja, ki ji sledi tioesterifikacija s CoA s pomočjo acil-CoA ligaze (Horswill in Escalante-Semerena, 1999). V industrijska gojišča za produkcijo eritromicina se kot prekurzor

propionil-CoA pogosto dodajata n-propanol ali propionat (Marini in Teatini, 1973; Sanchez in sod., 1984; Potvin in Peringer, 1993).

Propionil-CoA lahko vstopi v celični metabolizem preko različnih poti, ena od takih je karboksilacija propionil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA. To reakcijo katalizira propionil-CoA karboksilaza (PCC), ki je od ATP in biotina odvisen encimski kompleks. PCC je po mehanizmu delovanja podoben encimu ACC (pri *S. coelicolor* je α podenota encima PCC enaka α podenoti encima ACC) (Diacovich in sod., 2004).

Drug mehanizem za karboksilacijo propionil-CoA pa vključuje metilmalonil-CoA transkarboksilazo (Northrop, 1969). Ta encim karboksilacijo propionil-CoA katalizira z uporabo oksalacetata kot karboksilnega donorja, pri tem pa nastaneta (2S)-metilmalonil-CoA in piruvat (Chan in sod., 2009).

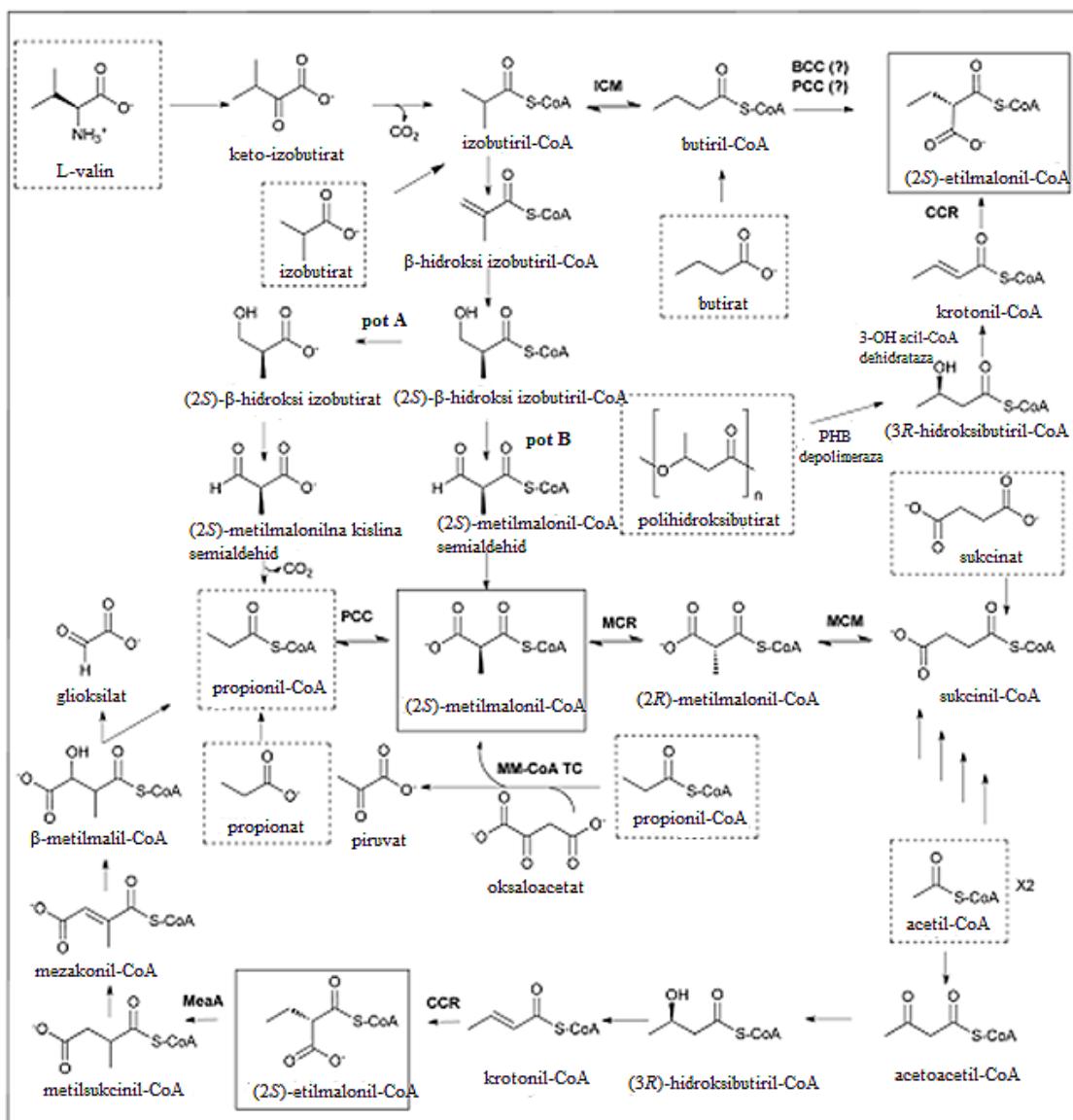
(2S)-Metilmalonil-CoA

(2S)-Metilmalonil-CoA je druga najbolj pogosta podaljševalna enota pri biosintezi poliketidov. (2S)-Metilmalonil-CoA je sicer zelo pogost primarni metabolit, a kot podaljševalna enota pri biosintezi poliketidov je značilen le pri PKS tipa I (Chan in sod., 2009).

Poznane so štiri biosintezne poti (2S)-metilmalonil-CoA (slika 4) (Chan in sod., 2009; Erb in sod., 2007):

- karboksilacija propionil-CoA,
- prerazporeditev in epimerizacija sukcinil-CoA,
- razgradnja valina in
- večstopenjska pretvorba acetoacil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA preko metabolne poti etilmalonil-CoA.

Metabolne sposobnosti seva in vir ogljika, na katerem mikroorganizem raste, določijo katera pot nastanka (2S)-metilmalonil-CoA bo prevladujoča (Chan in sod., 2009; Du in Chen, 2007).



Slika 4: Prikaz metabolnih poti, ki omogočajo nastanek (2S)-metilmalonil-CoA in (2S)-ethylmalonil-CoA; ti dve podaljševalni enoti sta obkroženi s polno črto, začetni metaboliti, iz katerih nastaneta so obkroženi s črtkano črto (okrajšave: ICM = izobutiril-CoA mu mutaza, BCC = butiril-CoA karboksilaza, PCC = propionil-CoA karboksilaza, CCR = krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza, PHB = polihidroksibutirat, MCR = metilmalonil-CoA racemaza (epimeraza), MCM = metilmalonil-CoA mutaza, MM-CoA TC = metilmalonil-CoA transkarboksilaza) (Chan in sod., 2009: 35)

Figure 4: Metabolic pathways leading to the formation of (2S)-methylmalonyl-CoA and (2S)-ethylmalonyl-CoA; these two extender units are in solid boxes, starting metabolites that can lead to these extender units are in dashed boxes (abbreviations: ICM = isobutyryl-CoA mutase, BCC = butyryl-CoA carboxylase, PCC = propionyl-CoA carboxylase, CCR = crotonyl-CoA carboxylase/reductase, PHB = polyhydroxybutyrate, MCR = methylmalonyl-CoA racemase (epimerase), MCM = methylmalonyl-CoA mutase, MM-CoA TC = methylmalonyl-CoA transcarboxylase) (Chan et al., 2009: 35)

Propionil-CoA je zelo pogost metabolni prekurzor za nastanek (2S)-metilmalonil-CoA (podrobnej opis metabolnih poti preko katerih iz propionil-CoA nastane (2S)-metilmalonil-CoA je na straneh 7 in 8).

Sukcinil-CoA je drugi prekurzor, iz katerega lahko nastane (2S)-metilmalonil-CoA. Eden najpogosteješih virov za sukcinil-CoA je cikel trikarboksilnih kislin (TCA). Pretvorba sukcinil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA je dvostopenjski proces. Najprej metilmalonil-CoA mutaza prerazporedi sukcinil-CoA v (2R)-metilmalonil-CoA. Ta ima nepravilno stereokemijo za vgradnjo v poliketide, zato sledi pretvorba v (2S)-metilmalonil-CoA, ki jo katalizira metilmalonil-CoA epimeraza (Hunaiti in Kolattukudy, 1984; Chan in sod., 2009).

Ali bo mikroorganizem uporabil propionil-CoA ali sukcinil-CoA kot prekurzor za (2S)-metilmalonil-CoA je odvisno od rastnih pogojev mikroorganizma. Ugotovili so, da lahko mikroorganizem, npr. *S. erythraea*, uporabi tako propionat kot sukcinat. Ko so prekinili gen za propionil-CoA karboksilazo ali metilmalonil-CoA mutazo (vsakega posebej), je *S. erythraea* vseeno sintetizirala eritromicin (Donadio in sod, 1996; Reeves in sod., 2006). Reeves in sod. (2006) so ugotovili, da se je produkcija eritromicina povečala za 126 %, če je imel sev *S. erythraea* prekinjen gen za metilmalonil-CoA mutazo in je kot vir ogljika uporabljal ogljikove hidrate. Nasprotno pa, če so isto mutanto gojili na gojišču, ker je glavni vir ogljika olje, se je produkcija eritromicina zmanjšala za 66 %. Ti rezultati nakazujejo variabilnost v uporabi metabolnih prekurzorjev v odvisnosti od rastnih pogojev.

Pri nastanku (2S)-metilmalonil-CoA preko razgradnje valina se L-valin lahko razgradi preko dveh različnih metabolnih poti (slika 9). Prva pot (A) poteka preko razgradnje L-valina do izobutiril-CoA, ta pa se naprej pretvorí v propionil-CoA. Sledi karboksilacija propionil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA (reakcijo katalizira PCC). Tudi pri drugi poti (B) se najprej L-valin razgradi do izobutiril-CoA, temu pa sledi pretvorba v (2S)-metilmalonil-CoA preko intermediata metilmalonil-CoA semialdehid. Študije so pokazale, da je pri aktinomicetah značilna druga pot razgradnje valina (Pospisil in sod., 1983; Reynolds in sod., 1988; Sherman in sod., 1986; Vrijbloed in sod., 1999). Carata in sod. so s selekcijo na rifampicinu pridobili mutante (rif mutante), ki so imele zvišan nivo regulacije poti razgradnje valina, ki pri biosintezi eritromicina zagotavlja oskrbo s propionil-CoA. Posledično so imele rif mutante 4-krat višjo produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolnim sevom (Carata in sod., 2009).

Pri *S. cinnamonensis*, ki producira monenzin A in B, so odkrili še dodaten vir za nastanek (2S)-metilmalonil-CoA. Gre za metabolno pot, pri kateri ima ključno vlogo krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (CCR) (Liu in Reynolds, 1999; Liu in Reynolds, 2001; Li in sod., 2004). Pri tej poti, ki je kasneje dobila ime »pot etilmalonil-CoA«, se dve enoti acetil-CoA kondenzirata v acetoacetil-CoA, sledi dvostopenjska konverzija v krotonil-CoA. CCR katalizira pretvorbo krotonil-CoA v etilmalonil-CoA. Sledi reakcija prerazporeditve in nastanek metilsukcinil-CoA, v naslednjem koraku redukcija do mezakonil-CoA in potem hidratacija ter nastanek β -metilmalil-CoA. β -metilmalil-CoA/L-malil-CoA ligaza nato generira glioksilat in propionil-CoA, ki se preko karboksilacije propionil-CoA (PCC) pretvorí v (2S)-metilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007).

(2S)-Etilmalonil-CoA

Številni poliketidi, ki jih sintetizirajo PKS tipa I, pri biosintezi uporabljajo podaljševalno enoto (2S)-etilmalonil-CoA. Primeri so tilozin (Omura in sod., 1977), monenzin A (Day in sod., 1973), spiramicin (Inoue in sod., 1983). Dolgo je veljalo, da je butiril-CoA edini direktni prekurzor za sintezo (2S)-etilmalonil-CoA. Kot je omenjeno zgoraj, so pred kratkim potrdili obstoj alternativne metabolne poti etilmalonil-CoA, pri kateri ima encim krotonil-CoA reduktaza (CCR) ključno vlogo pri nastanku (2S)-etilmalonil-CoA. V tej metabolni poti se krotonil-CoA direktno pretvori v (2S)-etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2009). V metabolni poti, v kateri je prekurzor butiril-CoA, lahko le-ta izvira iz razgradnje L-valina ali iz β -oksidacije maščobnih kislin (Chan in sod., 2009).

2.2.2 Biosinteza poliketidne verige

Biosinteza poliketidne verige poteka na multiencimskih kompleksih, t.i. poliketid sintazah (PKS). PKS katalizirajo zaporedne reakcije dekaboksilacijskih kondenzacij med derivati tioesterificiranih malonatov in acil tioestrov (Chan in sod., 2009). Različne PKS omogočajo biosintezo poliketidov z veliko strukturno raznolikostjo. PKS kontrolirajo število ter tip podaljševalne enote, pa tudi obseg in stereokemijo redukcije v vsakem ciklu. Poleg tega so produkti PKS podvrženi nadaljnjam t.i. post-PKS encimom, kot so glikozilaze, metiltransferaze in oksidaze, ki prispevajo k še večji strukturni raznolikosti končnih spojin (Weissman in sod., 1998). Ključne encimske domene PKS so aciltransferaza (AT), ketosintaza (KS) in acil prenašalni protein ACP. Domena AT prepozna ustrezno podaljševalno enoto in jo veže na ACP. Domena ACP deluje kot fleksibilna roka in prenaša rastočo verigo po encimskem kompleksu. Domena KS katalizira reakcijo dekarboksilacijske kondenzacije med podaljševalno enoto in rastočo verigo. Poleg esencialnih domen imajo PKS lahko še dodatne reduktivne domene, to so ketoreduktaza (KR), dehydrataza (DH) in enoil reduktaza (ER), ki omogočajo različno stopnjo redukcije pri kondenzaciji nastalih β -keto skupin (Staunton in Weissman, 2001; Katz in McDaniel, 1999).

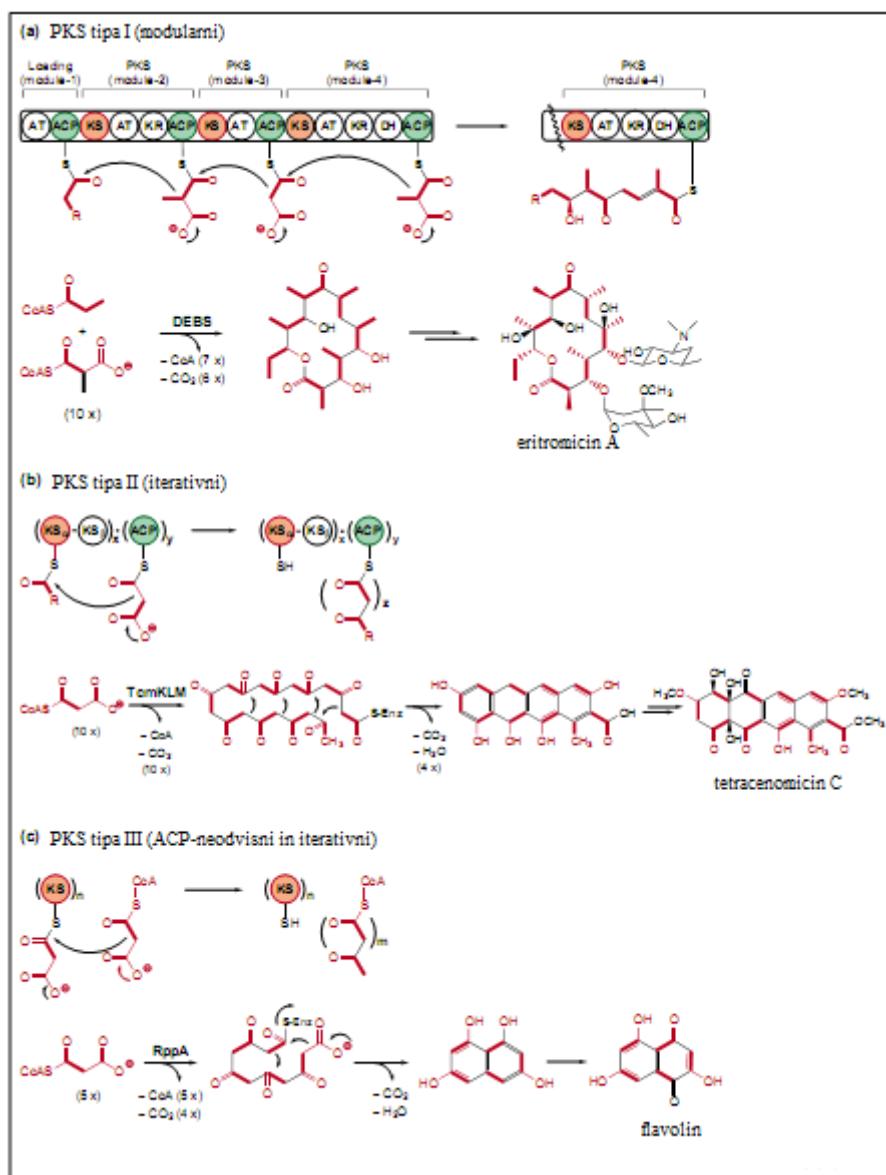
V grobem ločimo 3 tipe bakterijskih PKS: PKS tipa I, PKS tipa II in PKS tipa III (slika 5).

PKS tipa I so veliki večdomenski modularni proteini, ki vsebujejo več kot 30 encimskih aktivnosti. Encimske domene PKS so prisotne na eni polipeptidni verigi in so organizirane v t.i. module (Katz in Ashley, 2005). PKS tipa I ponovno lahko razdelimo v dve skupini: modularne, pri katerih se posamezni modul uporabi le za en korak podaljševanja poliketidne verige in iterativne, pri katerih se isti modul uporabi v več podaljševalnih ciklih (Staunton in Weissman, 2001). Najbolje poznani poliketidi, ki imajo modularne PKS so eritromicin A, rapamicin, monensin A, amfotericin B, avermektin (Weissman in Leadley, 2005). Iterativni PKS so značilni za glive, primer tega sistema so PKS, ki sodelujejo pri biosintezi lovastatina (Chan in sod., 2009).

PKS tipa II so sestavljeni iz več mono- ali bifunkcionalnih encimov, ki se uporabijo v več podaljševalnih ciklih (iterativni PKS) (Seow in sod., 1997). Pri biosintezi PKS tipa II v prvi fazi med začetnimi in podaljševalnimi enotami potekajo zaporedne reakcije kondenzacij, ki omogočajo nastanek linearnega poliketonskega intermediata. Temu sledita specifična redukcija in ciklizacija, ki omogočata nastanek ciklične aromatske strukture. Te se potem še nadalje modificirajo z različnimi encimi, da nastanejo biološko aktivne oblike (Shen, 2000). Ti poliketidi so razširjeni med bakterijami, glivami in rastlinami. Številni med njimi imajo medicinsko pomembne biološke aktivnosti, najbolj znani so tetraciklinski antibiotiki (Shen, 2000; Seow in sod., 1997; Javidpour in sod., 2011).

V primerjavi s PKS tipa I in II so encimi PKS tipa III majhni in enostavni, vseeno pa vse imajo vse katalitične funkcije potrebne za podaljševanje in ciklizacijo poliketidne verige. So homodimerni encimi, eno samo aktivno mesto vsakega monomera katalizira nalaganje gradnikov, podaljševanje in ciklizacijo. PKS tipa III so razširjeni med rastlinami, bakterijami in glivami. Sintetizirajo številne spojine kot so kalkoni, pironi, stilbeni in floroglukinoli. Bakterijske PKS tipa III so razdeljene v pet skupin, številne so bile identificirane pri bakterijah rodu *Streptomyces* (Yu in sod., 2012).

PKS tipa I in II uporablja acil prenašalni protein za aktivacijo acil-CoA substratov in za prenašanje rastoče poliketidne verige, PKS tipa III pa nimajo ACP in delujejo direktno na substrate acil-CoA (slika 5) (Shen, 2003).

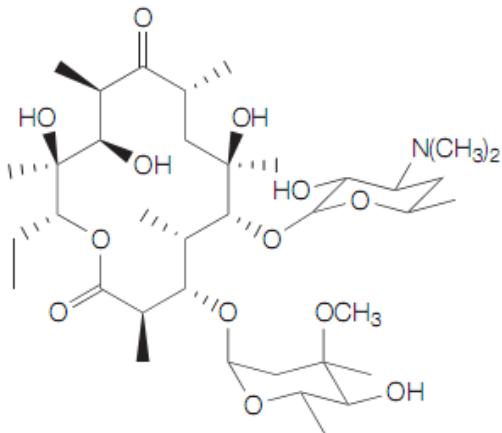


Slika 5: Strukture in mehanizmi bakterijskih PKS: (a) PKS tipa I sestavljajo neiterativne domene, primer je DEBS za biosintezo eritromicina; (b) PKS tipa II sestavljajo iterativne domene, primer je TomKLM za biosintezo tetracenomicina; (c) PKS tipa III sestavlja eno iterativna domena, primer je RppA za biosintezo flavolina (Shen, 2003: 286).

Figure 5: Stuctures and mechanisms of bacterial PKSs: (a) type I PKS consisting of non-iteratively acting domains as exemplified by DEBS for erythromycin; (b) type II PKS consisting of iteratively acting subunits as exemplified by TomKLM for tetracenomycin; (c) type III PKS consisting of an iteratively acting single subunit as exemplified by RppA for flavolin (Shen, 2003: 286).

2.3 ERITROMICIN A

Eritromicin A je poliketidni antibiotik makrolidnega tipa. Značilnost makrolidnih antibiotikov je laktonski obroč, ki je sestavljen iz 12, 14 ali 16 atomov. Eritromicin ima 14-členski obroč, na katerega sta pripeta 2 deoksisladkorja, kladinoza (3-O-metilmikaroza) in desozamin (slika 6) (Rawlings, 2001; Staunton in Wilkinson, 1997).



Slika 6: Kemijska struktura eritromicina A (Weissman in Leadley, 2005: 926)

Figure 6: Chemical structure of erythromycin A (Weissman and Leadley, 2005: 926)

Eritromicin A so prvič izolirali leta 1952 iz aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea* (McGuire in sod., 1952). Poleg *S. erythraea* eritromicin proizvaja tudi aktinomiceta *Aeromicrobium erythreum*. *A. erythreum* je enocelični organizem, ki v primerjavi z *S. erythraea* raste hitreje, je bolj enostaven za gojenje in ga je lažje transformirati. Za komercialno produkcijo eritromicina se sicer uporablja le *S. erythraea* (Miller in sod., 1991; Brikun in sod., 2004).

Eritromicin A se v medicini uporablja proti okužbam, ki jih povzročajo po Gramu pozitivne bakterije. Uporablja se tudi kot alternativa za paciente, ki so alergični proti penicilinu (Staunton in Wilkinson, 1997). Deluje tako, da se veže na bakterijski ribosom in posledično prepreči sintezo proteinov. Visoka afiniteta za bakterijske ribosome in visoko ohranjena struktura med različnimi bakterijskimi družinami omogoča makrolidom širokospikalno aktivnost (Katz in Ashley, 2005).

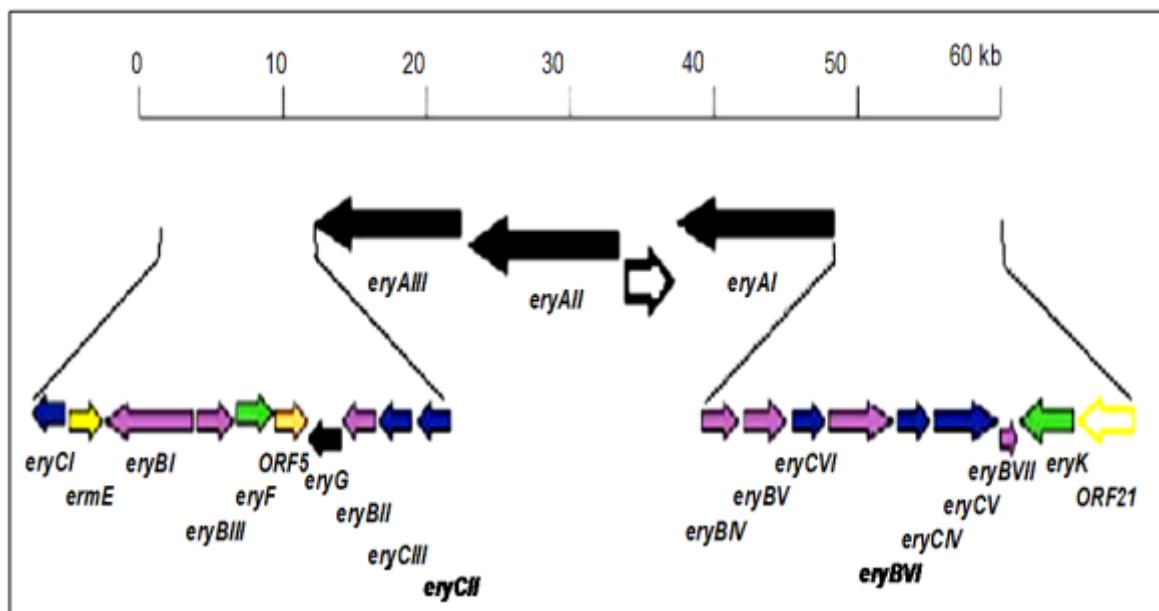
2.3.1 Genska skupina za biosintezo eritromicina

Genska skupina za biosintezo eritromicina v genomu *S. erythraea* vsebuje 20 genov (slika 7). Geni *eryA* so odgovorni za biosintezo poliketidne verige (*eryAI*, *eryAII*, *eryAIII*), geni *eryB* za biosintezo in pritrdirtev mikaroze na makrolidni obroč (*eryBII-eryBVII*), geni *eryC* pa za biosintezo in pritrdirtev desosamina na makrolidni obroč (*eryCI-eryCVI*). Geni *eryF*, *eryG* in *eryK* kodirajo encime za pozne stopnje biosinteze eritromicina. V genski skupini se nahaja še gen *ermE*, ki kodira rRNA metilazo (za eritromicinsko rezistenco v gostiteljskem organizmu). Poleg tega sta v genski skupini še dva odprta bralna okvirja: *orf5*, ki kodira domnevno tioesterazo tipa II in *orf21* (Reeves in sod., 1999; Gaisser in sod., 1997; Haydock in sod., 1991).

V osrednjem delu genske skupine za biosintezo eritromicina se nahajajo geni *eryAI*, *eryAII* in *eryAIII*, ki kodirajo PKS tipa I (Caffrey in sod., 1992; Donadio in sod., 1991). Levo od

osrednje regije se nahajata dva gena *eryB* (*eryBII* in *eryBIII*), trije geni *eryC* (*eryCI*, *eryCII*, *eryCIII*), dva gena za pozne stopnje biosinteze eritromicina, *eryF* (kodira C-6 hidroksilazo) in *eryG* (kodira O-metiltransferazo) ter geni *ermE*, *eryBI* (kodira β-glukozidazo) in *orf5* (kodira domnevno tioesterazo tipa II). Desno od osrednje regije se nahajajo štirje geni *eryB* (*eryBIV*-*eryBVII*), trije geni *eryC* (*eryCIV*-*eryCVI*) in *eryK*, ki kodira C-12 hidroksilazo (Stassi in sod., 1993; Reeves in sod., 1999).

Genska skupina za biosintezo eritromicina se prepisuje v obliki štirih policistronskih mRNA: *eryAI*-*eryG*, *eryBIV*-*eryBVII*, *eryBVI*-*eryBVII* in *eryBIII*-*eryF*. Identificirali so tudi dve večji promotorski regiji, ki omogočata prepisovanje genov za biosintezo deokslisladkorjev desno od osrednje regije. Ti promotorski regiji omogočata sintezo prekrivajočih prepisov; prvi se začne navzgor od *eryBIV* in se razteza do *eryBVII* (približno 8 kb), drugi pa se začne pri *eryBVI* in se razteza do *eryBVII* (približno 4,8 kb) (Reeves in sod., 1999).



Slika 7: Shematski prikaz genske skupine za biosintezo eritromicina (Staunton in Weissman, 2001: 387)
Figure 7: Organization of the gene cluster for erythromycin biosynthesis (Staunton and Weissman, 2001: 387)

2.3.2 Biosinteza eritromicina

Biosinteza eritromicina poteka s pomočjo poliketid sintaz tipa I (poglavlje 2.2.2). Biosintezo eritromicina lahko razdelimo v dve fazi. V prvi fazi PKS tipa I katalizira zaporedne kondenzacije ene enote propionil-CoA in šestih enot metilmalonil-CoA. Nastane makrolidni intermedijat 6-deoksieritronolid B (6-dEB). V drugi fazi (post-PKS reakcije) pride do serije modifikacij 6-dEB, ki jih katalizirajo encimi hidroksilaze, glikozil transferaze in metil transferaze in nastane eritromicina A (Staunton in Wilkinson, 1997).

Biosinteza eritromicina lahko poteče, če so na voljo ustrezne izhodne spojine (začetna enota propionil-CoA, podaljševalne enote metilmalonil-CoA, glukoza), donorji funkcionalnih skupin (*S*-adenozil-L-metionin), NADPH in kofaktorji (dvovalentni kovinski ioni). Te molekule v celicah nastajajo v reakcijah primarnega metabolizma (Weissman in sod., 1995; Fontecave in sod., 2004; Takanashi in sod., 2006).

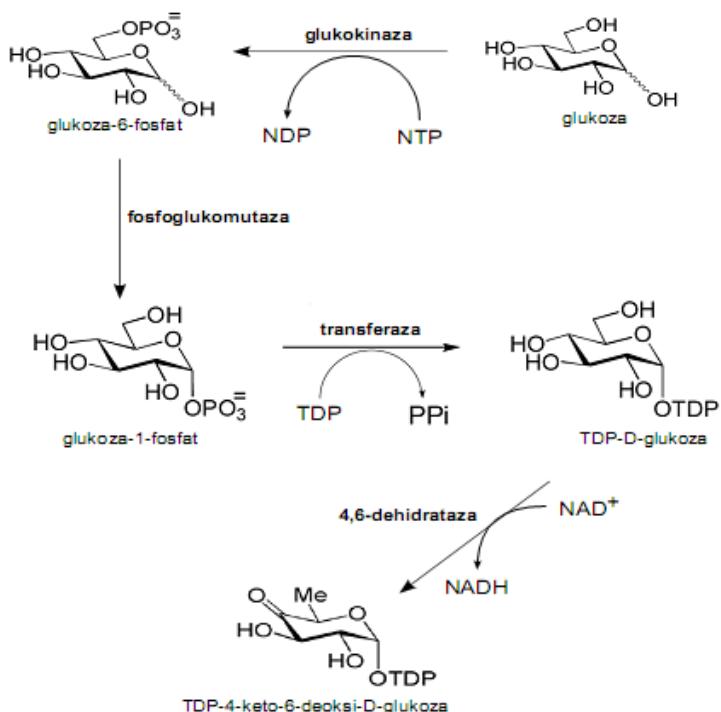
2.3.2.1 Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo eritromicina

Za nastanek intermediata 6-dEB pri biosintezi eritromicina sta ključni začetna enota propionil-CoA in podaljševalna enota (2S)-metilmalonil-CoA. Propionil-CoA skupaj s šestimi molekulami (2S)-metilmalonil-CoA omogoča nastanek aglikona 6-dEB. Pogosto je propionil-CoA tudi metabolni prekurzor za (2S)-metilmalonil-CoA (podrobni opis nastanka propionil-CoA in (2S)-metilmalonil-CoA je v poglavju 2.2.1).

Poleg teh sta za biosintezo eritromicina nujno potrebni še spojini TDP-4-keto-6-deoxsiglukoza (za biosintezo deoksisladkorjev) in *S*-adenozil-L-metionin, ki pri različnih reakcijah sodeluje kot donor metilne skupine (Takahashi in sod., 2006; Fontecave in sod., 2004).

TDP-4-keto-6-deoxsiglukoza

Timidin difosfat-4-keto-6-deoxsiglukoza (TDP-4-keto-6-deoxsiglukoza) je izhodna spojina za sintezo obeh deoksisladkorjev, ki sodelujeta pri biosintezi eritromicina (L-mikaroza, D-desozamin). Nastane iz TDP-D-glukoze, ta pa nastane iz glukoze-1-fosfata in timidin trifosfata (TTP) (Takahashi in sod., 2006). Glukoza-1-fosfat se pri bakterijah sintetizira iz glukoze-6-fosfat, reakcijo katalizira encim fosfoglukomutaza (slika 8) (Joshi in Handler, 1964; Adhya in Schwartz, 1971; Rimmele in Boos, 1994; Boos in Shuman, 1998; Andersson in Rådström, 2002; White-Phillip in sod., 2009). Glukoza-6-fosfat se sintetizira iz glukoze z encimom glukokinaza, ki za delovanje potrebuje donor fosfatne skupine (ATP, GTP ali UTP) in dvovalentni kovinski ion. Bakterijske glukokinaze imajo zelo ozko specifičnost do substrata, izražanje encima pa se inducira le z glukozo. Glukoza-6-fosfat se lahko sintetizira tudi preko drugih metabolnih poti, npr. z razgradnjo nekaterih drugih sladkorjev (Goward in sod., 1986; Buckley in Hamilton, 1994; Rimmele in Boos, 1994; Meyer in sod., 1997; Hansen in sod., 2002; Zheng in sod., 2012).



Slika 8: Sinteza TDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoze (White-Phillip in sod., 2009: 16, 18)
 Figure 8: Synthesis of TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose (White-Phillip et al., 2009: 16, 18)

Z encimom glukoza-1-fosfat timidilil transferaza se potem glukoza-1-fosfat pretvori v TDP-D-glukozo. Na aktivno mesto glukoze-1-fosfat timidilil transferaze se najprej veže TPP, nato pa še glukoza-1-fosfat. Ob prisotnosti Mg²⁺ nastaneta TDP-D-glukoza in pirofosfat (Ma in sod., 1997; Sivaraman in sod., 2002; Han in sod., 2006). Sledi pretvorba TDP-D-glukoze v TDP-4-keto-6-deoksiglukozo z reakcijo, ki jo katalizira encim TDP-D-4,6-dehidrataza (Lombo in sod., 1997; Doumith in sod., 2000). Pretvorba poteče v dveh fazah. V prvi fazi pride do oksidacije hidroksilne skupine na ogljikovem atomu sladkorja v keto skupino, pri tem se odcepljeni vodikov ion reducira iz NAD⁺ v NADH. V drugi fazi se odcepi hidroksilna skupina iz šesetga ogljikobega atoma in po vezavi vodikovega atoma z NADH nastane metilna skupina in s tem končni produkt (Vara in Hutchinson, 1988; Allard in sod., 2004). Aktivnost encima TDP-D-4,6-dehidrataze je regulirana s fosforiliranimi timidin nukleotidi (TTP, TDP in TMP), pri čemer jo najmočneje inhibira TDP (Wang in Gabriel, 1969; Zarkowsky in sod., 1970; Thompson in sod., 1992).

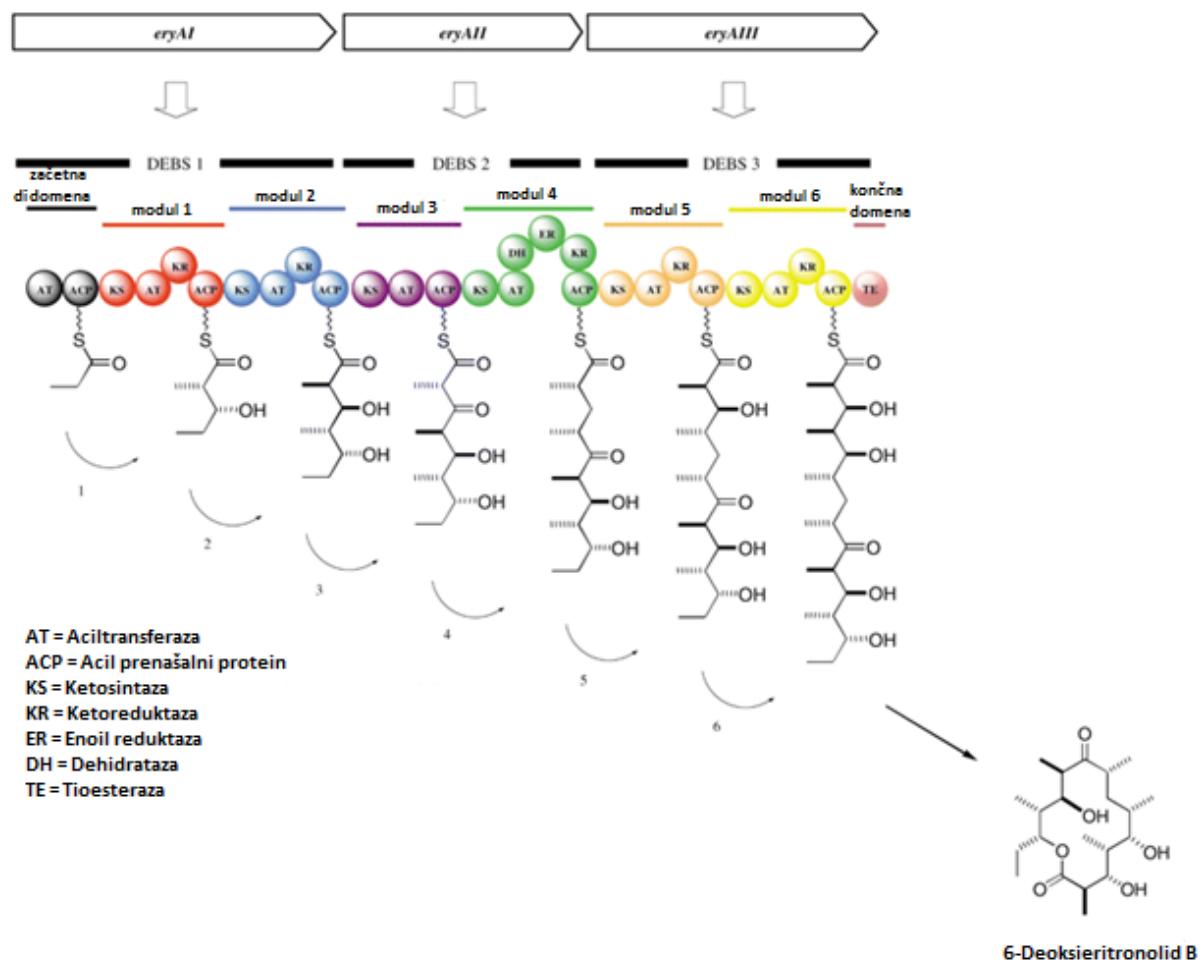
S-adenozil-L-metionin

S-adenozil-L-metionin (SAM) je izredno pomemben donor metilne skupine pri t.i. post-PKS reakcijah biosinteze eritromicina, ki jih katalizirajo metiltransferaze EryBIII, EryCVI, EryF in EryG (Fontecave in sod., 2004). SAM se sintetizira iz L-metionina in ATP, reakcijo katalizira encim metionin adenosil-transferaza. Adenosilna skupina se iz ATP prenese na L-metionin in nastane sulfonijev ion, ki je visokoenergijski reagent in lahko prenese metilno skupino na substrat. Poleg SAM v reakciji nastanejo še pirofosfat (PP_i) in anorganski fosfat (P_i). Za sam potek reakcije encim metionin adenosil-transferaza

potrebuje še Mg^{2+} in K^+ ione (Cantoni, 1953; Lombardini in sod., 1973; Chiang in Cantoni, 1977; Mato in sod., 1997; González in sod., 2000; Lu, 2000).

2.3.2.2 Biosinteza eritromicinske poliketidne verige

Strukturni PKS geni za biosintezo prvega makrolidnega intermediata (6-dEB) so trije veliki odprtih bralni okvirji; *eryA1*, *eryAII* in *eryAIII* (slika 9) (Cortes in sod., 1990; Bevitt in sod., 1992). Kodirajo tri ogromne multiencimske polipeptide DEBS 1, DEBS 2 in DEBS 3. Vsak od proteinov DEBS ima več funkcionalnih enot oz. t.i. modulov, vsak od modulov pa več domen. Vsaka domena ima svojo katalitično funkcijo. Povezovalne regije med domenami vzdržujejo pravilno topologijo aktivnosti za kooperativnost v biosintetskih procesih. Povezovalne regije so dolge do 100 aminokislinskih ostankov, bogate so z alaninom, prolinom in nabitimi aminokislinskimi ostanki (Bevitt in sod., 1992).

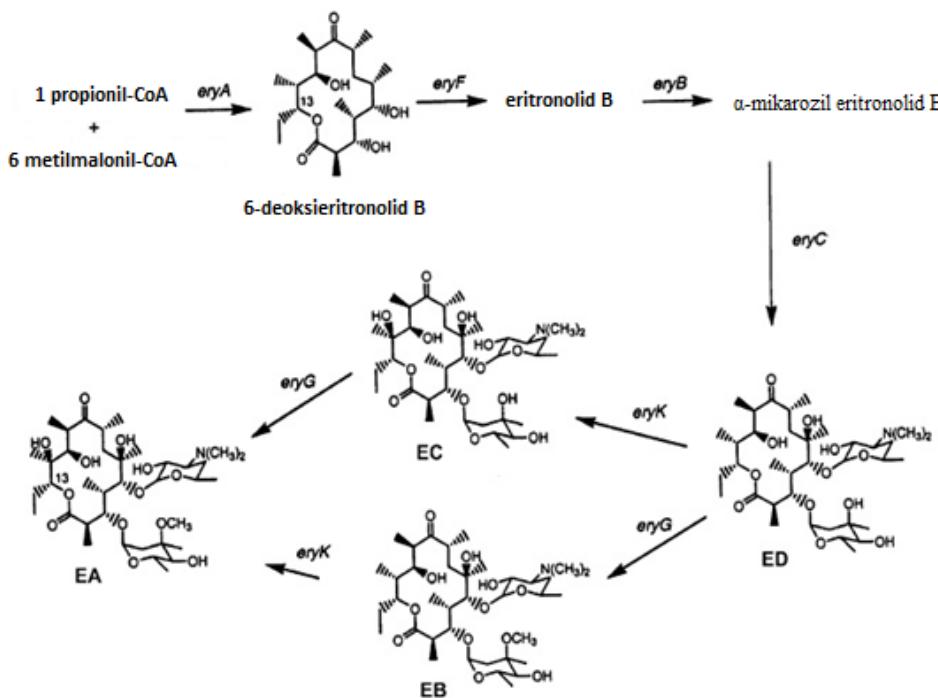


Slika 9: Organizacija domen eritromicinske PKS (Staunton in Weissman, 2001: 389)
 Figure 9: Domain organization of the erythromycin PKS (Staunton and Weissman, 2001: 389)

Biosinteza 6-dEB se prične na začetnem oz. nanašalnem modulu, ki vsebuje domeni AT in ACP. Domena AT prepozna in veže začetno enoto propionil-CoA na ACP. Nato AT prvega podaljševalnega modula prepozna in veže podaljševalno enoto metilmalonil-CoA na ACP modula 1. Med propionil-CoA (na nanašalnem modulu) in metilmalonil-CoA (na podaljševalnem modulu 1) pride do nastanka C-C vezi z dekarboksilativno kondenzacijo, ki jo katalizira domena KS. Sledi redukcija nastale β -karbonilne skupine, ki jo katalizira domena KR, v β -hidroksilno skupino. Na modulu 2 se enako zaporedje reakcij ponovi, le da se veriga prenese z ACP modula 1. Na modulu 3 ni reduktivne domene, zato je končni produkt β -karbonilna skupina. Modul 4 ima vse tri reduktivne domene KR, DH in ER, tako da se najprej ponovijo reakcije do nastanka β -hidroksilne skupine, sledi redukcija z DH, ki katalizira nastanek dvojne vezi z dehidracijo in redukcija z ER, ki reducira dvojno vez do nastanka enojne C-C vezi. Modula 5 in 6 imata samo eno reduktivno domeno KR, tako da v obeh primerih pride do redukcije do β -hidroksilne skupine. V zadnji reakciji na modulu 6 se nastala veriga prenese z ACP na domeno TE, ki omogoča sprostitev verige in ciklizacijo v makrolakton 6-dEB (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991; Caffrey in sod., 1992; Donadio in Katz, 1992; Aparicio, 1994; Pereda in sod., 1998; Staunton, 1998; Tang in sod., 2006; Tang in sod., 2007; Cane, 2010).

2.3.2.3 Post-PKS reakcije

Post-PKS reakcije so pozne stopnje biosinteze eritromicina, v katerih se biološko neaktivna molekula 6-dEB pretvori v molekulo z antibiotično aktivnostjo (eritromicin A). S pomočjo encima citokrom P450 hidroksilaza (EryF) najprej poteče hidroksilacija na mestu C-6 in nastane eritronolid B. Sledi pripenjanje sladkorja, L-mikaroze, na C-3 hidroksilno skupino, ki ga katalizira encim TDP-mikaroza glikoziltransferaza (EryBV). V naslednjem koraku se na C-5 hidroksilno skupino pripne D-desozamin s pomočjo encima TDP-desozamin glikoziltransferaze (EryCIII), pri čemer nastane eritromicin D. Iz eritromicina D lahko nato nastane eritromicin C ali eritromicin B, odvisno od tega ali najprej poteče hidroksilacija (citokrom P450 hidroksilaza EryK) na mestu C-12, ki vodi v nastanek eritromicina C ali pa O-metilacija (O-metil transferaza EryG) na mestu C-3 hidroksilne skupine sladkorja mikaroze, kar vodi v nastanek eritromicina B. V obeh primerih v zadnji stopnji nastane eritromicin A, bodisi s hidroksilacijo eritromicina B ali z O-metilacijo eritromicina C (slika 10) (Staunton in Wilkinson, 1997). 1200-1900-kratna preferenca encima EryK za eritromicin C kaže, da je pot preko eritromicina C dominantna.



Slika 10: Pozne stopnje biosinteze eritromicina A (EA = eritromicin A, EC = eritromicin C, EB = eritromicin B, ED = eritromicin D) (Carerras in sod., 2002: 218)

Figure 10: Post PKS biosynthesis of erythromycin A (EA = erythromycin A, EC = erythromycin C, EB = erythromycin B, ED = erythromycin D) (Carerras et al., 2002: 218)

2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE POLIKETIDOV

Biosinteza antibiotikov in drugih sekundarnih metabolitov je regulirana preko interakcij globalnih in pot-specifičnih regulatorjev, ki aktivirajo ali inhibirajo izražanje odgovornih genov (Santos-Benedit in sod., 2009). Globalni regulatorji delujejo glede na fazo rasti in razmere v okolju, na podlagi tega potem regulirajo en ali več fizioloških procesov v celici. Pot-specifični regulatorji pa regulirajo eno specifično funkcijo (Chater in Horinouchi, 2003; Bibb, 2005).

Začetek produkcije sekundarnih metabolitov pri aktinomicetah na trdnih gojiščih je običajno usklajen s tvorbo zračnega micelija. Pri gojenju v tekočih gojiščih pa se produkcija začne v stacionarni fazi, običajno takrat ko zmanjka hranil (Bibb, 2005). Geni, ki nosijo zapis za biosintezo sekundarnih metabolitov, se v večini primerov nahajajo v genskih skupinah (Bentley in sod., 2002; Ikeda in sod., 2003; Schwecke in sod., 1995). Večina teh genskih skupin vsebuje tudi gene za rezistenco na antibiotik in pot-specifične regulatorne gene, ki regulirajo prepisovanje genov iz skupine, v kateri se nahajajo (Yang in sod., 1995; Cundliffe, 2006). Nekateri od teh genov so odgovorni tudi za tvorbo zračnega micelija in spor (Chater in Horinouchi, 2003; Elliot in Talbot, 2004).

Začetek biosinteze antibiotikov je lahko tudi odziv na okoljske dejavnike kot so fosfatni ioni, koncentracija kisika, viri ogljika in dušika, pa tudi različne spremembe v temperaturi in pH (Sanchez in sod., 2010).

2.4.1 Globalna (pleiotropna) regulacija biosinteze poliketidov

Globalna regulacija vpliva na številne celične procese, tako v primarnem kot tudi v sekundarnem metabolizmu. Deluje torej na višji ravni regulacije. Regulacija lahko poteka preko regulatornih proteinov (BldD) ali preko signalnih molekul (γ -butirolaktoni).

BldD pri *S. coelicolor* je pleiotropni regulator, ki vpliva na produkcijo antibiotikov in morfološko diferenciacijo. Posledica mutacije ali delecije *bldD* je nezmožnost tvorbe zračnega micelija in zmanjšana produkcija antibiotika (Elliot in sod., 2003). BldD je DNA vezavni protein, ki se lahko veže na svoj promotor/operator ali na promotor/operator drugih ključnih genov, kot so specifični sigma faktorji (Elliot in sod., 2001; Chater in sod., 1989; Bibb in sod., 2000). Chng in sod. (2008) so izolirali transkripcijski regulator, ortolog *bldD*, ki pozitivno regulira gene v genski skupini za biosintezo eritromicina. Mutante v *bldD* producirajo 7-krat manj eritromicina v primerjavi z divjim tipom, poleg tega mutacije vplivajo tudi na morfološko diferenciacijo na trdem gojišču (mutante ne tvorijo zračnega micelija in ne sporulirajo). Ugotovili so tudi, da se v visoko-donosnem industrijskem sevu *S. erythraea* izraža več BldD v primerjavi z divjim tipom.

Kirm in sod. (2013) so pri *S. erythraea* s pristopoma primerjalne proteomike in transkriptomike identificirali nov regulatorni gen SACE_5599, ki vpliva na sporulacijo in donos eritromicina v divjem tipu in visoko-donosnem sevu. Ugotovili so, da sta biosinteza eritromicina in končni donos močno povezana z regulatornimi mrežami, ki sodelujejo pri morfološki diferenciaciji. Poleg tega so pokazali, da prekomerno izražanje genov SACE_5599 in *bldD* zviša donos eritromicina v divjem tipu *S. erythraea*.

Wu in sod. so pri *S. erythraea* identificirali transkripcijski regulator iz družine TetR, SACE_7301. SACE_7301 pozitivno regulira biosintezo eritromicina tako, da omogoča povečano transkripcijo biosintetskega gena *eryAI* in gena za rezistenco *ermE*. S konstrukcijo sevov s prekomernim izražanjem regulatorja (vstavili so dodatne kopije gena SACE_7301) so izboljšali produkcijo eritromicina v naravnem in visoko-donosnem sevu za cca. 30 % (Wu in sod., 2014).

Številne vrste *Streptomyces* in tudi nekatere druge aktinobakterije producirajo majhne signalne molekule, t.i. γ -butirolaktone, ki regulirajo produkcijo antibiotikov in morfološko diferenciacijo. Identificirali so 14 različnih γ -butirolaktonov iz 7 vrst *Streptomyces*, ki se razlikujejo v dolžini, razvejanju in stereokemiji verig maščobnih kislin. Vežejo se na citoplazemske receptorje in inhibirajo njihovo vezavo na specifične DNA tarče. Večinama ti receptorski proteini delujejo kot represorji in vsak receptorski protein je visoko specifičen za določen γ -butirolakton. Najbolj znani primeri so A-faktor iz *S. griseus*

(vpliva na produkcijo streptomicina in sporulacijo *S. griseus*), *virginiae* butanolid iz. *S. virginiae* (vpliva na produkcijo virginiamicina), butanolidi iz *S. coelicolor*, t.i. SCB (vplivajo na produkcijo aktinorhodina in undecilprodigiozina) (Ohnishi in sod., 2005; Horinouchi, 2002; Nihira, 2002; Yamada, 1999).

2.4.2 Pot-specifična regulacija biosinteze poliketidov

Pri pot-specifični regulaciji pa gre za nižjo raven regulacije. Ti geni se nahajajo znotraj genskih skupin za biosintezo antibiotikov in običajno kodirajo transkripcijske regulatorje biosinteznih genov v isti skupini. Poznane so različne družine regulatornih proteinov: SARP, LAL in LTTR.

Družina SARP (ang. *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins)

V družino SARP uvrščamo transkripcijske aktivatorje, ki na svojem N-terminalnem koncu vsebujejo HTH (helix-turn-helix) DNA vezavno regijo (Wietzorek in Bibb, 1997). Nekateri med njimi prepoznajo heptamerne ponovitve v promotorski regiji genov, ki jih kodirajo (Wietzorek in Bibb, 1997; Widdick in sod., 2003; Lombo in sod., 1999; Sheldon in sod., 2002). Našli so jih samo pri aktinomicetah, večino pri streptomicetah (Bibb, 2005). V nekaterih primerih regulatorji iz družine SARP delujejo kot pleiotropni regulatorji, ki regulirajo produkcijo različnih sekundarnih metabolitov in morfološko diferenciacijo. Primer je gen *afsR* iz. *S. coelicolor*, ki lahko s prekomernim izražanjem v *S. lividans* povlači donos aktinorhodina in undecilprodigiozina (Horinouchi in sod., 1983).

Družina LAL (ang. Large ATP-binding regulators of the LuxR family)

Ti proteini so transkripcijski regulatorji in imajo na N-terminalnem koncu vezavno mesto za nukleotid trifosfat (NTP), na C-terminalnem koncu pa HTH DNA vezavno regijo, ki je značilna za družino LuxR. Našli so jih samo pri aktinomicetah (Bibb., 2005). LAL homologe so našli pri *S. venezuelae* (Wilson in sod., 2001), *S. noursei* (Sekurova in sod., 2004) ter v genskih skupinah za amfotericin (Carmody in sod., 2004), kandicidin (Campelo in Gil, 2002) in geldanamicin (Rascher in sod., 2003).

Družina LTTR (ang. LysR-type transcriptional regulators)

Družina LTTR je najbolj razširjena družina transkripcijskih regulatorjev pri bakterijah. Proteini družine LTTR imajo na N-terminalnem koncu HTH DNA vezavno domeno, na C-terminalnem koncu pa imajo domeno za vezavo ko-induktorjev. Ko-induktorji so signalne molekule, pomembne za regulatorno aktivacijo oz. respresijo (Maddocks in Oyston, 2008). Homologe LTTR so našli v genskih skupinah za biosintezo klavulanske kisline - regulator *claR* (Paradkar in sod., 1998; Perez-Redondo in sod., 1998), FK506 – regulator *fkbR* (Goranovič in sod., 2012) in tienamicina – regulator *thnI* (Rodríguez in sod., 2008).

2.5 PRISTOPI ZA POVEČANJE DONOSA ANTIBIOTIKOV

Pristopi za povišanje produktivnosti industrijskih mikroorganizmov obsegajo (Adrio in Demain, 2006; Nielsen, 1998; Bro in Nielsen, 2004):

- klasične pristope naključne mutageneze in selekcije v povezavi z optimizacijo industrijskih bioprocесov,
- metabolni inženiring, kjer z uporabo rekombinantne DNA tehnologije preusmerimo metabolne pretoke, tako da izboljšamo produkcijo sekundarnih metabolitov,
- heterologna ekspresija celotnih genskih skupin,
- inženiring mikroorganizmov za dvig donosov naravnih produktov z uporabo modernih tehnologij, kot so DNA sekvenciranje, transkripcijsko profiliranje, genomika, proteomika, metabolomika – razvoj omik.

Klasični pristopi za dvig produkcije sekundarnih metabolitov so dolgotrajni, poleg tega pa s temi pristopi ne dobimo nobenih informacij o nastalih mutacijah in mehanizmih, ki omogočajo višje donose. Z objavo celotnega genoma *S. erythraea* (Oliynyk in sod., 2007) so se odprle nove možnosti sistemskega preučevanja. Razumevanje zapletenih mehanizmov biosinteze in regulacije bodo omogočili bolj racionalne pristope k nadaljnemu izboljševanju industrijskih sevov.

2.5.1 Klasični pristopi

Klasični pristopi za povečanje donosa sekundarnega metabolita so temeljili na naključni mutagenezi in selekciji ter optimizaciji gojišč.

Za pridobitev visoko produktivnih mutant, moramo v prvi fazi mikrobeno populacijo tretirati z mutagenim agensom. Najbolj pogosti mutageni agensi, ki se uporabljajo v ta namen, so nitrozogvanidin (NTG), metilmetan sulfonat (MMS), etilmelan sulfonat (EMS), hidroksilamin (HA) in ultravijolični žarki (UV) (Adrio in Demain, 2006). Optimalna umrljivost celic je 70-95 % (Simpson in Caten, 1979), nekateri industrijski pristopi uporabljajo še višje stopnje umrljivosti (tudi do 99,99 %). Preživele mutante nato selekcioniramo s presejalnimi testi (Adrio in Demain, 2006). S pristopom naključne mutageneze in selekcije so izboljšali produkcijo številnih industrijskih produktov, primeri so tetraciklin (Podojil in sod., 1984), tilozin (Chen in sod., 2003), salinomicin (Liu, 1982), penicilin in cefalosporin C (Elander, 2003). Seve s povečanim donosom sekundarnega metabolita lahko pridobimo tudi s selekcijo na trdnem gojišču, ki vsebuje določen antibiotik. Primer je 4-krat povečana produkcija eritromicina pri mutantah, rezistentnih na rifampicin (Carata in sod., 2009). V industrijski mikrobiologiji se je pogosto uporabljal tudi pristop selekcije z metabolnimi inhibitorji, gre za selekcijo mutant, odpornih na toksične analoge primarnih metabolitov ali na antibiotike (pri nekaterih bakterijah so

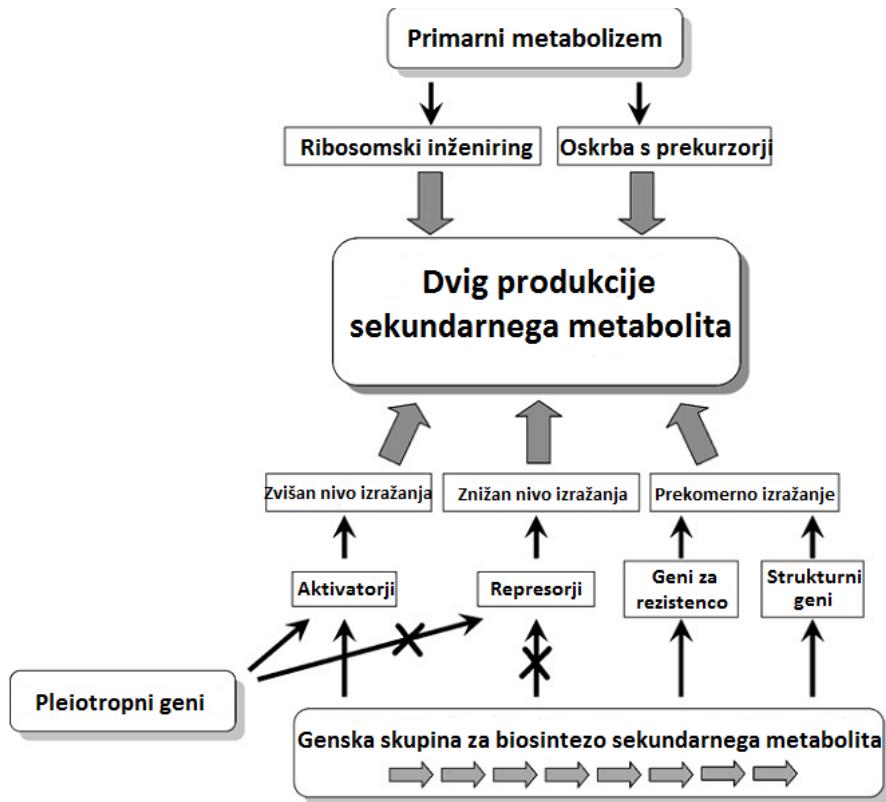
mutante rezistentne na streptomycin omogočile dvig produkcije antibiotikov) (Adrio in Demain, 2006; Hosoya in sod., 1998)

S pristopom naključne mutageneze in selekcije so v cca. 50 letih občutno dvignili produkcijo eritromicina (50-80-kratno povečanje). Najboljši produksijski sevi *S. erythraea* dosegajo donos 7-9 g/l eritromicina (divji tip *S. erythraea* NRRL2338 doseže cca. 100 mg/l). Ti maksimalni donosi se seveda dosegajo v optimalnih pogojih natančno vodenega industrijskega bioprosesa z dohranjevanjem ključnih hranil (Zou in sod., 2011; Tan in sod., 2013).

Dvig produkcije eritromicina so dosegli tudi z optimizacijo gojišč. Z dodajanjem različnih rastlinskih olj, ki imajo lahko vlogo protipenilcev (Anderson in sod., 1956), edinega vira ogljika (Park in sod., 1994), dodatnega vir ogljika (Davies in sod., 2000) ali zagotavljanje prekurzorjev (Choi in sod., 1996) so zvišali produkcijo eritromicina. Producijo so dvignili tudi z dodajanjem alginata v produksijsko gojišče. Alginat poviša viskoznost gojišča (Hamedi in sod., 2004). El-Enshasy in sod. (2008) so z dodajanjem melase (edini vir ogljika), amonijevega sulfata (vir dušika) in n-propanola (vir prekurzorjev) dvignili produkcijo eritromicina. Vpliv Co^{2+} na produkcijo eritromicina sta preučevala Du in Chen (2007); ugotovila sta pozitiven učinek, ki je posledica izboljšane specifične aktivnosti encimov metilmalonil-CoA mutaze in metilmalonil-CoA transkarboksilaze ter pospešen pretok glukoze v glikolizi.

2.5.2 Metabolni inženiring

Možnih je več pristopov metabolnega inženiringa (slika 11): sprememba metabolnih pretokov preko manipulacije prekurzorjev, deregulacija specifičnih metabolnih poti (prekomerno izražanje pot-specifičnih regulatorjev, inaktivacija represorjev), povečanje rezistence ali indukcija rezistence na antibiotike, prekomerno izražanje struktturnih genov, ki kodirajo encime za biosintezo metabolita, uporaba globalnih genetskih pristopov, kot je »genome shuffling« in ekspresija genskih skupin za biosintezo v heterolognem gostitelju ali industrijsko optimiziranem sevu (Olano in sod., 2008).



Slika 11: Shema prikazuje različne pristope za povečanje donosa sekundarnih metabolitov z metabolnim inžiniringom (Olano in sod., 2008: 284)

Figure 11: Scheme representing the different approaches used for improvement of secondary metabolite production with metabolic engineering (Olano et al., 2008: 284)

2.5.2.1 Deregulacija specifičnih metabolnih poti (prekomerno izražanje pot-specifičnih regulatorjev, inaktivacija represorjev)

Inaktivacija pot-specifičnih ali pleiotropnih represorjev lahko povzroči dvig produkcije sekundarnih metabolitov. Primer je inaktivacija pot-specifičnega represorja *cmmRII* iz *S. griseus* subsp. *griseus*, ki omogoča dvig produkcije kromomicina (Menéndez in sod., 2007). Dobro poznan pleiotropni represorski sistem, ki regulira produkcijo sekundarnih metabolitov na nivoju fosfata, je dvokomponentni sistem *phoR-phoP*. Prekinitev gena *phoR* ali simulatana delecija obeh genov (*phoR* in *phoP*) omogoča dvig produkcije pimaricina pri *S. natalensis* (Mendes in sod., 2007).

2.5.2.2 Metabolni inženiring na nivoju manipulacije oskrbe s substrati

Producija sekundarnih metabolitov je večinoma odvisna od razpoložljivosti biosintetskih prekurzorjev oziroma oskrbe s substrati. Primarni metabolizem je vir prekurzorjev, zato je identifikacija ključnih encimov, ki regulirajo pretok ogljika skozi mrežo reakcij

centralnega metabolizma, izrednega pomena (Olano in sod., 2008; Papagiani, 2012). Z gensko manipulacijo začetnih stopenj glikolize so dvignili produkcijo klavulanske kisline pri *S. clavuligerus*. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza pretvarja gliceraldehid-3-fosfat (G3P) v 1,3-difosfoglicerat. Prekurzorja za biosintezo klavulanske kisline sta G3P in L-arginin. S prekinitvijo gena, ki kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo, je prišlo do kopiranja G3P in posledično do zvišane produkcije klavulanske kisline (Li in Townsend, 2006).

Z inženiringom razpoložljivosti s koencimom A (CoA) aktiviranih prekurzorjev maščobnih kislin so dvignili produkcijo različnih poliketidov, kot so eritromicin (Reeves in sod., 2004, 2006, 2007), monensin B (Cropp in sod., 2001) in aktinorhodin (Ryu in sod., 2006). Reeves in sod. so z metabolnim inženiringom prekurzorjev povečali produkcijo eritromicina. Konstruirali so mutante v genu *mutB*, ki ima zapis za večjo podenoto metilmalonil-CoA mutaze (MCM). MCM katalizira reverzibilno izomerizacijo metilmalonil-CoA in sukcinil-CoA. S prekinitvijo gena *mutB* so dvignili produkcijo eritromicina za 126 % v gojiščih, ki kot glavni vir ogljika vsebujejo ogljikove hidrate. V gojiščih, ki kot glavni vir ogljika vsebujejo olja, se je s prekinitvijo gena *mutB* produkcija eritromicina zmanjšala za 66 %. Reakcija izomerizacije metilmalonil-CoA in sukcinil-CoA lahko poteka v obeh smereh (v smeri nastanka metilmalonil-CoA ali v smeri nastanka sukcinil-CoA). V fermentaciji, ki temelji na gojišču, ki kot glavni vir ogljika vsebuje ogljikove hidrate, reakcija MCM prazni rezervoar z metilmalonil-CoA. V fermentaciji, ki temelji na gojišču, ki kot glavni vir ogljika vsebuje olja, pa ta ista reakcija polni rezervoar z metilmalonil-CoA (Reeves in sod., 2006). Pri nadaljnjih eksperimentih so Reeves in sod. v gojišču z oljem kot glavnim virom ogljika z duplikacijo operona *mcm* dvignili produkcijo za 50 % (Reeves in sod., 2007).

V nekaterih primerih biosinteze sekundarnih metabolitov kofaktorji delujejo kot prekurzorji in so zato tarča pristopov metabolnega inženiringa. Primer je *S*-adenozil-L-metionin (SAM). S prekomernim izražanjem gena *metK* iz *S. spectabilis*, ki kodira *S*-adenozil-L-metionin sintetazo, so zvišali produkcijo aktinorhodina pri *S. lividans* in *S. coelicolor*. *S*-adenozil-L-metionin sintetaza katalizira biosintezo SAM iz ATP in L-metionina. Dvig produkcije aktinorhodina so opazili tudi, če so v producijsko gojišče dodali SAM (Kim in sod., 2003; Okamoto in sod., 2003).

2.5.2.3 Povečanje rezistence ali indukcija rezistence na antibiotike

Genske skupine za biosintezo antibiotikov običajno vsebujejo tudi enega ali več genov za rezistenco. To jim zagotavlja samozaščito pred toksičnimi učinki njihovih produktov. Sistemi za rezistenco vključujejo encime za spreminjanje tarčnega mesta za antibiotike, encime, ki inaktivirajo antibiotike in transportne sisteme, ki črpajo antibiotik ven iz celice (Cundliffe, 1989; Méndez in Salas, 2001). V nekaterih primerih so ti sistemi za rezistenco vpleteni tudi v biosintezo antibiotikov (Olano in sod., 1995; Menéndez in sod., 2007). Z

vnosom mutacije v *rpsL* gen, ki kodira ribosomalni protein S12, ki omogoča rezistenco za streptomycin, so pri *S. lividans* in *S. coelicolor* signifikantno dvignili produkcijo antibiotikov aktinorhodin in undecilprodigiozin (Shima in sod., 1996; Okamoto-Hosoya in sod., 2003). Gre za pristop t.i. ribosomskega inženiringa. S povečanjem lastne rezistence mikroorganizma, ki producira antibiotik, so uspeli povisiti donos kanamicina in neomicina (Crameri in Davies, 1986).

2.5.2.4 Prekomerno izražanje strukturnih genov, ki kodirajo encime za biosintezo metabolita

Pri manipulaciji strukturnih genov lahko pomnožimo gene za celotno biosintezno pot, npr. 2,3-kratno povečanje donosa cefamicina C (Chen in sod., 1988) ali pa pomnožimo samo gene za določen segment biosintezne poti; primeri so 7-kratno povečanje biosinteze daunorubicina (Otten in sod., 1990), 30 % povečanje biosinteze tetracenomicina C (Decker in sod., 1994) in 3-4-kratno povečanje biosinteze spinozina (Madduri in sod., 2001).

2.5.3 Heterologno izražanje genskih skupin

Nekateri producenti poliketidov imajo določene pomanjkljivosti, kot so slabe rastne lastnosti, zapleteni mehanizmi, zaradi katerih jih težko gensko manipuliramo ali nizek donos poliketidov. V zadnjih desetletjih se je močno povečalo število sekveniranih genomov in posledično smo pridobili ogromno znanja o genetskih informacijah, kar je omogočilo razvoj pristopa izražanja genskih skupin v heterolognih gostiteljih (Jung in sod., 2005). Lastnosti zaradi katerih so aktinomicete zanimive kot heterologni gostitelji so njihova sposobnost izločanja proteinov v okolje, dobro razvita genetska orodja, veliko je že poznanega o biosintetskih procesih, poleg tega pa ne izločajo nobenih eks- ali endotoksinov (Connell, 2001; Nakashima in sod., 2005). Za produkcijo poliketidov se najpogosteje kot heterologna gostitelja uporablja *S. coelicolor* (McDaniel in sod., 1995) in *S. lividans* (Ziermann in Betlach, 1999).

Heterologno izražanje genskih skupin za prekomerno izražanje željenih spojin v *E. coli* bi lahko skrajšala čas fermentacije in omogočila fermentacije na industrijskem nivoju, saj so za *E. coli* že dobro razvita genetska orodja pa tudi dobro poznani protokoli kultivacije. Pfeifer in sod. (2001) so v *E. coli* vnesli PKS za biosintezo eritromicina. Genetsko modificiran sev *E. coli* so konstruirali tako, da so pospešili post-translacijske modifikacije PKS (vnos fosfopanteinil transferaznega gena *sfb* iz *B. subtilis*) in zagotovili produkcijo metilmalonil-CoA, ki ga *E. coli* sicer ne sintetizira (z izražanjem genov *pccA* in *pccB* iz *S. coelicolor*). Tako konstruiran sev je lahko sintetiziral 6-dEB na nivoju industrijskega seva *S. erythraea*. Nadaljnji metabolni inženiring tega seva, ki je vključeval izražanje *metK* iz *S. spectabilis* (kodira SAM sintetazo), je omogočil 2-krat večjo produkcijo 6-dEB (Wang in sod., 2007). Peiru in sod. (2005) so uspeli razvit sev *E. coli*, ki je lahko sintetiziral

eritromicin C. V že pripravljeni sev *E. coli*, ki je sintetiziral 6-dEB, so vnesli še 17 heterolognih genov (gene, ki kodirajo potrebne encime za biosintezo deoksisladkorjev in gen za rezistenco na eritromicin). Zhang in sod. (2010) pa so s koordinirano ekspresijo 26 genov (>50 kb DNA) uspeli razvit sev *E. coli*, ki je sintetiziral eritromicin A.

Podobno so Mutka in sod. (2006) v *S. cerevisiae* vnesli gene za heterologno ekspresijo 6-dEB. Vnesli so gene za različne metabolne poti nastanka prekurzorja metilmalonil-CoA (propionil-CoA-odvisna pot in propionil-CoA- neodvisna pot). Z vnosom poti za nastanek metilmalonil-CoA so uspeli pridobiti sev *S. cerevisiae*, ki je sintetiziral poliketidni produkt, triketid lakton.

2.5.4 Uporaba omskih tehnologij

V zadnjih letih je postopek DNA sekvenciranja vedno hitrejši in cenejši, zato je na voljo vedno več sekvenciranih genomov iz različnih mikroorganizmov. Ker imamo na voljo kompletne genomske sekvence, se post-genomske analize (t.i. področje omik) vedno bolj razvijajo. Transkriptomika omogoča obsežne vzporedne analize ekspresijskih vzorcev mRNA. Proteomika omogoča analize nabora proteinov v celici v danem trenutku. Metabolomika omogoča kvantitativno profiliranje metabolitov in metabolnih intermedijatov. Fluksomika omogoča določanje metabolnih pretokov (Lee in sod., 2005).

S funkcionalno genomiko se s pridobivanjem informacij pomikamo po centralni dogmi molekularne biologije; DNA se prepiše v mRNA, mRNA se prevede v protein, protein pa s svojo specifično funkcijo vpliva na metabolizem. Z določanjem zaporedja DNA pridobimo informacije o vseh genih, ki so prisotni v organizmu, meritve mRNA pa nam povejo, kateri od teh genov se dejansko izražajo. Na nivoju meritev proteinov potem ugotovimo, katere mRNA so se prepisale in kakšna je količina specifičnih encimov. V končni fazi lahko z merjenjem metabolnih pretokov določimo prisotnost in količino specifičnih metabolitov (Oliver in sod., 2002).

Transkriptomika

Za izvedbo transkriptomskih analiz se uporablja cDNA mikromreže, pri čemer se cDNA uporablja kot sonde. Na eni mikromreži imamo lahko več kot 1000 različnih sond. Postopek je sledeč: iz vzorca izoliramo mRNA, ta potem služi kot matrica za pripravo tarčne cDNA (komplementarna DNA), ki jo potem označimo, po navadi s fluorescenčnimi barvili. Sledi hibridizacija s sondami na mikromreži in detekcija hibridiziranih molekul s fluorescenco. Možne aplikacije mikromrež so: analiza sprememb v izražanju genov tekom nekega procesa ali kot posledica nekega okoljskega stresa, identifikacija sprememb v aktivaciji genov, če primerjamo mutanto z divjim tipom, odkrivanje genov v metabolnih poteh in njihova regulacija (Oliver in sod., 2002). Primer je uporaba mikročipov za identifikacijo genov/regulatorjev/regulonov, ki so vpleteni v tranzicijo med primarnim in sekundarnim metabolizmom pri *S. coelicolor* (Huang in sod., 2001).

Tehnike, ki so v zadnjih letih praktično izpodrinile cDNA mikromreže, so tehnike t.i. sekvenciranja naslednjih generacij oz. nove tehnike določanja nukleotidnega zaporedja (ang. next-generation sequencing – NGS). Najpogosteje se uporablajo tehnike NGS, ki uporablajo ciklično mrežno sekvenciranje. Postopek vključuje naključno fragmentacijo DNA za pripravo knjižnice DNA, temu sledi ligacija skupnih DNA-adapterjev. V naslednjem koraku namnožijo posamezne fragmente DNA in pripravijo pomnožke oz. klone, ki so med seboj prostorsko ločeni in se uporablajo kot enote mrežnega sekvenciranja. Proces določanja nukleotidnega zaporedja pa sestavlja ponavljajoči se koraki encimsko kataliziranega vključevanja fluorescentno označenih nukleotidov. Določanje nukleotidnega zaporedja poteka s sintezo. Encim, ki sodeluje pri postopnem podaljševanju verige je lahko polimeraza ali ligaza. Podatki se pridobivajo z zajemanjem slike celotne mreže v vsakem koraku. Rezultat so kratka nukleotidna zaporedja oz. odčitki, ki jih s posebnimi računalniškimi algoritmi sestavijo v neprekinjeno zaporedje. V pomoč pri sestavi zaporedja je večkratna pokritost zaporedja s prekrivajočimi se kratkimi odčitki (Shendure in Ji, 2008).

Metabolomika in fluksomika

Metabolomiko jo Oliver Fiehn definiral kot kompleksno analizo, s katero določimo in kvantificiramo vse metabolite v organizmu (Fiehn, 2002). Metabolomika v strogem pomenu (kot jo je definiral Fiehn) je nemogoča naloga, saj je metabolom zaradi njegove kemijske raznolikosti in širokega dinamičnega območja izredno kompleksen. Bolj primerna definicija metabolomike bi bila karakterizacija metabolnega fenotipa (metaboloma) v specifičnih pogojih (npr. razvojne faze, okoljski pogoji, genetske modifikacije) in povezava teh fenotipov z njihovimi ustrezačimi genotipi (povezava z izražanjem genov in proteinskih vzorcev). Metabolni fenotip lahko okarakteriziramo z različnimi analitičnimi pristopi, pri čemer imajo tehnike profiliranja metabolitov izredno pomembno vlogo (Villas-Boas in sod., 2005).

Metabolni profil lahko empirično definiramo kot set vseh metabolitov ali derivatnih produktov (identificiranih ali neznanih), ki jih zaznamo z analizo vzorca z uporabo določene analitične tehnike, hkrati pa jih moramo tudi kvantificirati. Po navadi to vključuje učinkovite kromatografske separacije (Villas-Boas in sod., 2005).

V povezavi z analizami metabolnih profilov se delajo tudi analize metabolnih pretokov (fluksomika) in skupaj predstavljajo pomembno orodje za preučevanje celičnih procesov (Lee in sod., 2005). Primer pristopa kombinacije metabolnega profiliranja in profiliranja metabolnih pretokov za dvig produkcije antibiotikov je preučevanje pretoka ogljika skozi pot pentoze fosfata (PPP). Pri *S. rimosus* gena *zwf1* in *zwf2* kodirata izoencima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze oz. G6PDH, ki je prvi encim v PPP. Na podlagi rezultatov preučevanja pretokov ogljika skozi pot pentoze fosfata so z delecijo genov *zwf1* in *zwf2* povečali oskrbo z malonil-CoA (prekursor) in posledično izboljšali produkcijo oksitetraciklina (Liu in sod., 2008; Tang in sod., 2011). Pri *S. coelicolor* so ugotovili, da z

zmanjšanim tokom ogljika skozi PPP, omogočijo bolj učinkovito porabo glukoze v glikolizi, kar omogoča povečano oskrbo s prekurzorji in posledično povečano produkcijo aktinorhodina (Butler in sod., 2002; Ryu in sod., 2006).

Proteomika

Besedo proteom je prvi uporabil Marc Wilkins (Wilkins in sod., 1995) in jo definiral kot celokupni nabor proteinov v določeni celici, tkivu ali organizmu v določenem trenutku. Za en sam genom obstaja več proteomov. Proteomi so veliko bolj kompleksni kot genomi. Začetki proteomike segajo v pozna sedemdeseta leta prejšnjega stoletja (1970), ko so raziskovalci začeli preučevati proteinske sete celičnih linij ali organizmov z 2-dimenzionalno elektroforezo (2-DE). Nastali so obsežni katalogi proteinskih lis, pridobljenih iz 2-D gelov in posledično obsežne baze podatkov vseh izraženih proteinov. V 90ih letih je potem prišlo do razvoja masne spektrometrije, ki se je izkazala kot močna analitska metoda in je omogočila karakterizacijo izoliranih proteinov. Danes izraz proteomika obsega večino funkcionalne analize genskih produktov, vključno s študijami identifikacije in lokalizacije proteinov ter njihovih interakcij (Wilkins in sod., 1996; Anderson in Anderson, 1996; Pandey in Mann, 2000).

Z razvojem DNA sekvenciranja smo pridobili ogromne količine DNA zaporedij in zapisa teh informacij v baze podatkov. Vendar pa to ni dovolj za razumevanje bioloških funkcij. Proteomika je komplementarna genomiki, saj se osredotoča na produkte genov. Obstoj odprtrega bralnega okvirja v genomskeih podatkih ne pomeni nujno tudi funkcionalnega gena. S proteomiko lahko potrdimo določen genski produkt. Poleg tega se na proteinskem nivoju pojavljajo tudi različne oblike proteinov (izoforme) in post-translacijske modifikacije, ki pa jih lahko določimo le s proteomsko metodologijo (Pandey in Mann, 2000).

Z omskimi pristopi ne moremo direktno izboljševati industrijskih sevov oz. donos antibiotikov. Podatki, ki jih pridobimo s pomočjo omskih pristopov, so osnova za nadaljnje manipulacije. Pridobimo lahko informacije o biosintezi in regulaciji antibiotikov, nato pa na podlagi teh informacij z metabolnim inžineringom spreminjam industrijске seve in izboljšujemo donose različnih antibiotikov.

2.5.4.1 Proteomske metode/pristopi

Diferencialna proteomika za primerjavo proteomov uporablja različne pristope. Ločimo pristope, ki temeljijo na gelski elektroforezi (klasični pristopi) in pristope, ki ne temeljijo na gelski elektroforezi (novejši pristopi, ki temeljijo na masni spektrometriji oz. MS pristopi) (Rabilloud, 2002; Monteoliva in Albar, 2004).

Klasični pristop poteka v dveh korakih. V prvem koraku poteka ločevanje proteinov (običajno z dvodimenzionalno elektroforezo oz. 2-DE), sledi identifikacija proteinov, ki

ponavadi poteka z MS. Ločevanje z metodo 2-DE poteka v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji proteine z izoelektričnim fokusiranjem ločimo na podlagi njihove izoelektrične točke, v drugi dimenziji pa proteine z SDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS) ločimo na podlagi njihove molekulske mase (O'Farrell, 1975). Identifikacija proteinov z MS poteka z peptidnim mapiranjem (ang. peptide-mass fingerprinting), »de novo« sekveniranjem (tandemska MS oz. MS/MS), lahko pa po razgradnji s tripsinom peptide še dodatno očistimo s tekočinsko kromatografijo in neposredno sklopimo s tandemsko MS (ESI-MS/MS) (Monteoliva in Albar, 2004). Identifikacijo proteinov lahko izvedemo tudi z Edmanovo degradacijo. Edmanova degradacija je metoda sekveniranja aminokislin v peptidu. Metoda poteka tako, da v peptidu označimo amino-terminalni ostanek in ga odcepimo iz peptida ne da bi pri tem vplivali na peptidne vezi med ostalimi aminokislinskimi ostanki (Edman, 1950). Metoda je bila leta 1967 avtomatizirana (Edman in Begg, 1967).

Metoda 2-DE je relativno enostavna metoda, vendar ima nekaj pomanjkljivosti. Kljub številnim tehničnim izboljšavam (kot je npr. uporaba imobiliziranih pH gradientov), to ni avtomatizirana metoda, zato je težko zagotoviti ponovljivost. Poleg tega so pomanjkljivosti metode še nizka občutljivost detekcije, slaba topnost membranskih proteinov, omejena je kapaciteta nanašanja gradientnih pH trakov, nizko linearno območje vizualizacijskih postopkov (Rabilloud, 2002; Monteoliva in Albar, 2004). Nekatere od teh pomanjkljivosti so odpravili z razvojem t.i. diferencialne gelske elektroforeze v gelu oz. DIGE (ang. differential in-gel electrophoresis) (Amersham Biosciences). Pri metodi DIGE primerjane vzorce pred analizo označimo z različnimi fluorescentnimi barvili, jih združimo in analiziramo skupaj (Ünlü in sod., 1997).

Novejši pristopi pa zaradi številnih pomanjkljivosti 2-DE namesto le-te uporabljajo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ali kapilarno elektroforezo (Kislinger in Emili, 2005; Simpson in Smith, 2005). Pri tem pristopu proteine najprej razgradimo na peptide, v naslednji fazi pa peptide v enem samem eksperimentu ločimo s kromatografijo in jih identificiramo z MS (gre za t.i. »shotgun« proteomiko) (Fournier in sod., 2007). V vzorcih, ki vsebujejo izredno kompleksno mešanico proteinov, ločevanje s HPLC ne omogoča zadostne resolucije. V takih primerih najprej izvedemo frakcionacijo proteinov, nato pa vsako frakcijo posebej razgradimo in analiziramo s HPLC-MS. Proteinsko mešanico najprej ločimo z metodo SDS-PAGE, nato celotno vrstico razrežemo v enako velike trakove in potem s HPLC-MS analiziramo vsak trak posebej. Prednost te metode je, da je analiza razdeljena v več neodvisnih podanaliz, kar poveča zaupanje v identifikacijo in dinamično območje meritev (Lasonder in sod., 2002; Schirle in sod., 2003).

2.5.4.2 Proteomske študije biosinteze antibiotikov pri streptomicetah

Iz literature je razvidno, da so proteomska orodja uporabljali tudi za preučevanje biosinteze antibiotikov pri streptomicetah (Hesketh in sod., 2002; Kim in sod., 2005a, 2005b; Lu in

sod., 2007; Orsaria in sod., 1998; Vohradsky in sod., 2000; Bobek in sod., 2004; Novotna in sod., 2003).

Yin in sod. (2008) so razvili protokol za izolacijo proteinov iz celic *S. avermitilis*, pri čemer so streptomiceto gojili v kompleksnem industrijskem gojišču. Protokol je omogočal pridobitev proteinskih vzorcev, ki so bili primerni za analizo z 2-D elektroforezo (odstranili so soli, nukleotide, polisaharide, lipide in druge kontaminante). Merili so tudi proteazno aktivnost med procesom biosinteze avermektina. Proteazna aktivnost je bila relativno visoka tekom celotnega procesa. Kljub temu, da so pri izolaciji proteinov s proteaznim inhibitorjem skušali preprečiti razgradnjo proteinov, jim to ni v celoti uspelo. Predvsem v srednji in pozni fazi bioprosesa je prišlo do razgradnje proteinov, zato so se osredotočili na preučevanje proteoma *S. avermitilis* v začetnih fazah bioprosesa. Ista raziskovalna skupina je 2013 izdala še eno publikacijo o primerjavi proteinskih profilov med divjim tipom in industrijskim sevom v dveh različnih gojiščih (produkcijskem in neprodukcijskem). Rezultati so pokazali, da sta med biosintezo avermektina metabolizem maščobnih kislin in cikel trikarboksilnih kislin inhibirana. Dodatne analize vloge glikolize so pokazale, da je katabolizem glukoze ozko grlo v biosintezi avermektina. Potrdili so tudi vlogo aminokisline levcin kot možnega prekurzorja za biosintezo avermektina. Visoke koncentracije proteinov, ki se izražajo med stresom, nakazujejo pomembno vlogo globalnih regulatornih mehanizmov pri začetku biosinteze avermektina. Potrdili so tudi povezavo med morfologijo hif in produkcijo avermektina (Yin in sod., 2013).

Hesketh in sod. (2002) so preučevali proteom *S. coelicolor*. Sekveniran genom *S. coelicolor* kodira cca. 7825 teoretičnih proteinov. V tej študiji so mapirali približno 10 % teoretičnega proteoma. Identificirali so produkte 770 različnih genov. Zaznali so povprečno 1,2 proteina na gen, kar nakazuje obširno post-translacijsko regulacijo. Z masno spektrometrijo so dokazali modifikacije kot so N-acetilacija, adenilacija in proteolitsko procesiranje. Identificirali so tako proteine primarnih kot tudi proteine sekundarnih metabolnih poti. Wang in Yuan (2005) sta analizirala proteom *Streptomyces luteogriseus*. Sev *S. luteogriseus* 103 producira protivirusno spojino maituolaimizin, ki deluje proti virusu HIV in proti Coxsackie B6 virusu. Z mutagenezo so naredili mutanto *cnn1*, ki ne producira protimikrobnega sredstva. Z uporabo 2D-LC - MS/MS so analizirali proteine v obeh sevih in identificirali 726 (sev 103) oz. 809 (sev *cnn1*) proteinov. V obeh sevih so identificirali proteine, ki so povezane z biosintezo poliketidov, kar nakazuje, da se maituolaimizin sintetizira preko poliketidne poti.

Orsaria in sod. (1998) so z uporabo 2-DE analizirali spremembe v proteinskem profilu *S. coelicolor* v eksponentni ter pozni stacionarni fazi. Iz 2-D gelov so izolirali 6 proteinov, 3 so identificirali. Dva izmed njih so identificirali kot superoksid dismutazi, tretjega pa kot telurit rezistenten protein iz *Alcaligenes* sp.

Z uporabo proteomskega orodja so različne raziskovalne skupine raziskovale regulatorne mehanizme pri streptomicetah. Vohradsky in sod. (2000) so raziskovali regulatorne

mehanizme pri *S. coelicolor*, ki se inducirajo v različnih stresnih pogojih. Osredotočili so se na pet različnih induktorjev stresa (visoka/nizka temperatura, sol, etanol in antibiotiki) in preučevali sintezo proteinov. Pri drugih bakterijah različni stresi inducirajo izražanje podobnega seta proteinov, pri *S. coelicolor* pa induktorji, ki jih inducirajo visoka temperatura, sol in etanol povzročijo izražanje različnih med seboj neodvisnih proteinov. To pomeni, da ima *S. coelicolor* neodvisno kontrolo pri različnih stresnih signalih in posledično tudi neodvisne regulatorne sisteme. Kim in sod. (2005a) so s pomočjo proteomskega pristopa identificirali potencialne tarčne proteine AfsR2 (globalni regulatorni protein), ki so vpleteni v regulacijo biosinteze aktinorhodina. V proteomsko študijo so vključili divji tip in visoko produktivni sev *S. lividans*, ki ima integriran *asfR2*. 2-DE je razkrila razlike v proteinskih profilih med sevoma. Analiza MALDI-TOF je razkrila več različnih AfsR2 tarčnih proteinov (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, regulator transportnega sistema za fosfat, gvanozin pentafosfat sintetaza/poliribonukleotid nukleotidiltransferaza in superoksid dismutaza). To nakazuje, da je AfsR2 pleiotropni regulatorni protein, ki kontrolira diferencialno izražanje različnih vrst genov pri vrstah *Streptomyces*. Kim in sod. (2005b) so na podlagi študije ekstracelularnega proteoma *S. coelicolor* ugotovili, da mutacija v *bldA* (vpliva na proces produkcije antibiotikov in morfološko diferenciacijo v stacionarni fazi) inducira spremembe v ekstracelularnem proteomu; pokazal se je še večji pleiotropni učinek v fenotipu *bldA* kot je bilo prej znano. Lu in sod. (2007) so preučevali funkcije dvo-komponentnih regulatornih sistemov pri *S. coelicolor*. Konstruirali so več mutant s prekinjivo genov za dvo-komponentni sistem in nato preučevali spremembe fenotipov. V članku poročajo o karakterizaciji novega dvo-komponentnega sistema, t.i. RapA1/A2. Ugotovili so, da RapA1/A2 deluje kot pozitivni regulator za biosintezo aktinorhodina in nekarakteriziranega poliketida tipa I, vplivi RapA1/A2 pa so odvisni od pot-specifičnih regulatornih genov.

Bobek in sod. (2004) so pri *S. granaticolor* preučevali aktivacijo in izražanje proteinov med kalitvijo spor. V sporah so identificirali tri glavne šaperone: DnaK, TF (ang. trigger factor) in GroEL. S proteomskim pristopom so skušali pridobiti informacije o izražanju proteinov med germinacijo na dveh različnih gojiščih (razlikujeta se v sposobnosti produkcije antibiotika granaticina).

Novotna in sod. (2003) so se lotili kombinatornega pristopa proteomike in metabolomike pri analizi globalnih sprememb v izražanju genov med diaukično rastjo *S. coelicolor* v definiranem tekočem gojišču.

2.5.4.3 Genomske in transkriptomski študije biosinteze eritromicina pri *S. erythraea*

Z objavo celotnega genoma naravnega seva *S. erythraea* so leta 2007 Oliynyk in sod. odprli nove možnosti sistemskoga preučevanja genoma aktinobakterije. Kmalu po tem so bile objavljene prve primerjalne genomske in transkriptomski študije različnih sevov *S. erythraea* (Peano in sod., 2007, 2012; Marcellin in sod., 2013; Li in sod., 2013).

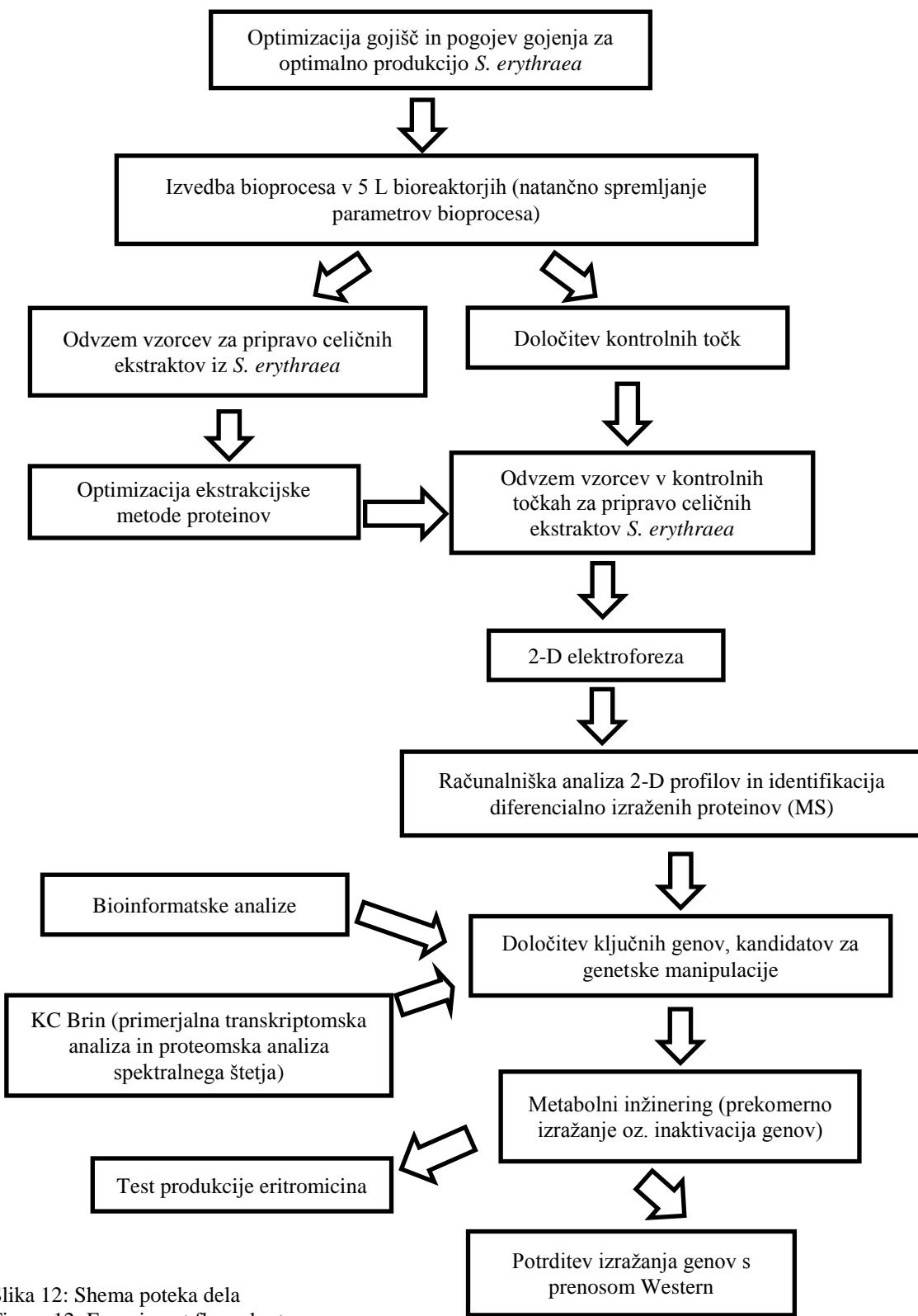
Peano in sod. (2007) so z uporabo DNA mikromrež preučevali profil izražanja genov seva *S. erythraea* NRRL2338 med rastjo v kompleksnem gojišču. Potrdili so zvišano izražanje genske skupine za biosintezo eritromicina v začetni fazni rasti, poleg tega pa tudi zvišano izražanje genskih skupin za biosintezo drugih sekundarnih metabolitov (*nrps3* in *nrps5*, ki verjetno sodeljujeta pri nastanku siderofora) v poznejših fazah rasti. Ista raziskovalna skupina je l. 2012 izdala še eno publikacijo (Peano in sod., 2012), v kateri so poročali o primerjalni genomski in transkriptomski analizi med naravnim in visokodonosnim sevom *S. erythraea*. Ugotovili so, da ima genom visokodonosnega seva kar nekaj mutacij v genih, ki kodirajo ključne encime osrednjega metabolizma ogljika in dušika (preusmeritev skupnih prekurzorjev v biosintezo eritromicina).

Marcellin in sod. (2013) so z RNA sekvenciranjem analizirali transkripcijske spremembe *S. erythraea* med rastjo v šaržnem bioprocesu. Identificirali so t.i. metabolni preklop, gre za globalne spremembe v izražanju genov, ki so vplivale na metabolni profil *S. erythraea*. Po metabolnem preklopu je prišlo do represije polovice genov, ki so regulirani s kompleksnimi transkripcijskimi mehanizmi.

Li in sod. (2013) so na transkriptomskem nivoju primerjali divji tip NRRL 23338 in visokodonosni sev *S. erythraea*. Potrdili so zvišan nivo regulacije genske skupine za biosintezo eritromicina in metabolnih poti za oskrbo s substrati. Niso pa zaznali pozitivne korelacije med regulatorjem BldD in izražanjem genske skupine za biosintezo eritromicina. Na podlagi rezultatov genomskeh in transkriptomskih analiz so predlagali nove potencialne regulatorje.

3 MATERIALI IN METODE

Na sliki 12 je prikazano kako je potekalo eksperimentalno delo.



Slika 12: Shema poteka dela
Figure 12: Experiment flow chart

3.1 GOJIŠČA IN RAZTOPINE

3.1.1 Gojišča

3.1.1.1 Gojišča za kultivacijo *S. erythraea*

ABVM1

30 g koruzne namakalne vodice - CSL (Cargill Foods) smo zamešali v 20 % končnega volumna vode in zavreli, nato dodali preostanek vode (do 1 L) in v ohlajeno mešanico dodali še 30 g saharoze (Sigma), 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) in 6 g CaCO_3 (Kalcit). pH smo uravnali na 5,5 in avtoklavirali 30 min pri 121 °C (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

ABPM8

36 g sojine moke (Cargill Foods) smo zamešali v 20 % končnega volumna vode, zavreli in kuhalili 30 min, nato dodali preostanek vode (do 1 L) in v ohlajeno mešanico dodali 36 g koruznega škroba (Cerestar) in 2,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) ter uravnali pH na 6,3. Nato smo dodali 7,2 g CaCO_3 (Kalcit) in na koncu še 5 g sojinega olja (tovarna olja GEA d.d.). Avtoklavirali smo 30 min pri 121 °C (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

Sporulacijsko gojišče ABSM4

11 g koruzne namakalne vodice - CSL (Cargill Foods) smo zamešali v 20 % končnega volumna vode in zavreli, nato dodali preostanek vode (do 1 L) in v ohlajeno mešanico dodali še 10 g koruznega škroba (Cerestar), 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) in 3 g NaCl (Carlo Erba). Uravnali smo pH na 7,2 in dodali še 3 g CaCO_3 (Kalcit) in na koncu še 20 g agarja (Biolife). Avtoklavirali smo 30 min pri 121 °C (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

CRM

V 1 L dH₂O smo zmešali 10 g glukoze (Kemika), 103 g saharoze (Sigma), 10 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 15 g TSB (Oxoid) in 5 g kvasnega ekstrakta (Biolife). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C (Pigac in Schrempf, 1995).

SM+10mM MgCl₂ (trdno gojišče za regeneracijo konjugant)

V 1 L dH₂O smo zmešali 20 g sojine moke (Cargill Foods), 20 g D-manitola (Carlo Erba) in 20 g bakteriološkega agarja (Biolife). Gojišče smo avtoklavirali 20 min pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo dodali MgCl_2 (Merck) in razlili plošče (Kieser in sod., 2000).

3.1.1.2 Gojišče za izvedbo biološkega testa - ABA

V 1 L dH₂O smo zmešali 25,5 g Antibiotic base agar A2 (Biolife), uravnali pH na 6,9 in kuhalili do 80 °C. Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C.

3.1.1.3 Gojišča za kultivacijo *E. coli* in *B. subtilis*

2TY (tekoče)

V 1 L dH₂O smo zmešali 16 g kazein peptona (Biolife), 10 g kvasnega ekstrakta (Biolife) in 5 g NaCl (Carlo Erba), uravnali pH na 7,0 in avtoklavirali 20 min pri 121 °C (Sambrook in Russell, 2001).

2TY (trdno)

V 1 L dH₂O smo zmešali 16 g kazein peptona (Biolife), 10 g kvasnega ekstrakta (Biolife) in 5 g NaCl (Carlo Erba), uravnali pH na 7,0. Dodali smo še 20 g bakteriološkega agarja (Biolife), dobro premešali in avtoklavirali 20 min pri 121 °C (Sambrook in Russell, 2001).

3.1.2 Raztopine

3.1.2.1 Raztopine za agarozno elektroforezo

0,5 M EDTA pH 8,0

V 1 L dH₂O smo raztopili 186,1 g Na₂EDTAx2H₂O (Calbiochem) in uravnali pH na 8,0 (Sambrook in Russell, 2001).

50x TAE

V 1 L dH₂O smo raztopili 242 g Tris baze (Calbiochem), nato dodali še 57,1 ml ocetne kisline (Sigma) in 100 ml 0,5 M EDTA (Kemika), pH 8,0 (Sambrook in Russell, 2001).

3.1.2.2 Raztopine za izvezdbo 2-D elektroforeze

Raztopina za pripravo celičnih ekstraktov *S. erythraea*

V 10 ml ddH₂O smo raztopili 4,2 g uree (Sigma), 1,52 g tiouree (Sigma), 0,4 g deteragenta CHAPS (Sigma), 0,048 g Tris baze (Sigma) in 0,1 g DTT (Sigma). Tik pred uporabo smo dodali še 2 tabletki proteznih inhibitorjev Complete Mini (Roche). Tabletke Complete Mini se uporabljajo za inhibicijo serinskih, cisteinskih in metaloproteaz.

Raztopina za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom

V 25 ml ddH₂O smo raztopili 10,5 g uree (Sigma), 3,8 g tiouree (Sigma) in 0,5 g deteragenta CHAPS (GE Healthcare). Nato smo dodali 500 µl IPG pufra (GE Healthcare) in 1 kristalček barvila bromofenol modro (Sigma).

Gel za 2-D elektroforezo (12 % zamreženost, debelina 1 mm)

Najprej smo zmešali 15,7 ml raztopine akrilamid/bisakrilamida (30 % / 0,8 %) (Sigma), 9,8 ml 1,5 M raztopine Tris-HCl pH 8,8, 0,4 ml 10 % SDS (Sigma) in 13 ml ddH₂O. To raztopino smo razplinili v ultrazvočni kopeli 10 min, nato pa dodali še 195 µl 10 % APS (Sigma) in 13 µl TEMED (Sigma).

Raztopina za uravnoteženje - osnovna

Najprej smo zatehtali 18 g uree in 1 g SDS (Sigma), nato smo dodali 2,5 ml 1,5 M raztopine Tris-HCl pH 8,8 in 15 ml glicerola (Sigma), premešali in dopolnili ddH₂O do 50 ml. Na koncu smo dodali še 1 kristalček barvila bromofenol modro (Sigma).

Raztopina za uravnoteženje - I.

0,2 g DTT (Sigma) smo zatehtali v centrifugirko in ovili s folijo. Nato smo dodali 20 ml raztopine za uravnoteženje - osnovne.

Raztopina za uravnoteženje - II.

0,96 g jodacetamida (Sigma) smo zatehtali v centrifugirko in ovili s folijo. Nato smo dodali 20 ml raztopine za uravnoteženje - osnovne.

5x SDS elektroforetski pufer

V 1 L ddH₂O smo raztopili 15 g Tris baze (Sigma), 72 g glicina (Merck) in 5 g SDS (Sigma).

Agarozna raztopina

Zatehtali smo 0,5 g agaroze (Sigma) in dodali 100 ml 1x SDS elektroforetskega pufra. Raztopino smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agarozna raztopila in dodali kristalček barvila bromofenol modro (Sigma). Raztopino smo alikvotirali po 11 ml in shranili na sobni temperaturi.

Fiksacijska raztopina

V merilni bučki smo zmešali 500 ml metanola (Merck) in 70 ml ocetne kisline (Merck), nato pa dodali ddH₂O do 1 litra.

Raztopina za spiranje

V merilni bučki smo zmešali 100 ml metanola (Merck) in 70 ml ocetne kisline (Merck), nato pa dodali ddH₂O do 1 litra.

3.1.2.3 Raztopine za prenos Western

Nanašalni pufer 6x LB (za SDS-PAGE)

V času smo zatehtali 1,8 g SDS (Sigma), 10 g glicerola (Sigma), 0,012 g barvila bromofenol modro (Sigma) in 1,85 g DTT (Sigma). Dodali smo 15 ml 0,5 M raztopine Tris-HCl, pH 6,8 in raztopili. Raztopino smo segreli na 37 °C, da se je SDS raztopil (po potrebi lahko segrejemo tudi na 65 °C). Raztopino smo prenesli v merilno bučko in dopolnili ddH₂O do 20 ml. Raztopino smo alikvotirali in shranili na -20 °C.

Poliakrialmidni gel (za SDS-PAGE)

Preglednica 1: Receptura za pripravo raztopin za ločevalni in zbiralni gel za elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Table 1: Recipes for preparing running and stacking gel solutions for SDS-PAGE

Sestavina	Ločevalni 12,5 %	Zbiralni 4 %
30% bis-akrilamid (Sigma)	2,35 ml	0,625 mL
1 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	1,88 ml	/
1 M raztopina Tris-HCl, pH 6,8	/	1,25 ml
10 % SDS (Sigma)	75 µl	50 µl
APS (Sigma)	22,5 µl	15 µl
TEMED (Sigma)	11,25 µl	7,5 µl
dH ₂ O	3,2 ml	3,075 ml
Končni volumen	7,5 ml	5,0 ml

Zmešali smo vse sestavine, razen APS in TEMED. APS in TEMED omogočita polimerizacijo, zato ju dodamo tik pred vlitjem gela. Najprej smo med stekelca vlili ločevalni gel, nanj pa nanesli dH₂O. Ko se je ločevalni gel strdil (cca. 20-30 min), smo vodo odlili in vlili zbiralni gel ter vstavili glavnicek. Ponovno smo počakali 20-30 min, da se gel strdi.

10x elektroforetski pufer za SDS-PAGE

V 1 L dH₂O smo raztopili 30 g Tris baze (Calbiochem), 144 g glicina (Sigma) in 10 g SDS (Sigma).

10x založna raztopina za prenašalni pufer

V 1 L dH₂O smo raztopili 30,3 g Tris baze (Calbiochem) in 144,1 g glicina (Sigma).

Prenašalni pufer

V merilni bučki smo zmešali 100 ml 10x založne raztopine za prenašalni pufer, 200 ml metanola in dodali dH₂O do 1 L ter dobro premešali.

Barvilo Panceau S

V 30 ml 1 % ocetne kisline (Sigma) smo raztopili 0,03 g barvila Panceau S (Sigma).

10x TBS

V 1 L dH₂O smo raztopili 12,1 g Tris baze (Calbiochem) in 87,8 g NaCl (Carlo Erba) ter uravnali pH na 7,5.

3.1.2.4 Raztopine za merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze

0,5 M založna raztopina za fosfatni pufer

Zatehtali smo 17,42 g K₂HPO₄ (Merck) in dodali dH₂O do 200 ml. Nato smo zatehtali še 13,61 g KH₂PO₄ (Riedel-de Haen) in dodali dH₂O do 200 ml. Raztopino KH₂PO₄ smo zamešali v raztopino K₂HPO₄ do pH 7,5.

Pufer za izpiranje (za merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze)

Iz založne raztopine za fosfatni pufer smo pripravili 20 mM raztopino kalijevega fosfata in uravnali pH na 7,5.

Pufer za katehol test

Preglednica 2: Sestava pufra za katehol test
Table 2: Composition of buffer for catechol test

Sestavina	Končna koncentracija	Volumen
0,5 M raztopina za fosfatni pufer, pH 7,5	20 mM	2 ml
0,5 M raztopina EDTA, pH 8,0	20 mM	0,4 ml
aceton	10 % (vol./vol.)	1 ml
dH ₂ O do 10 ml		

Pufer za merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze

Zmešali smo 100 mM raztopine kalijevega fosfata (pH 7,5) in 0,2 mM katehol. Katehol smo pripravili kot 20 mM založno raztopino (raztopili smo ga v 96 % etanolu) in ga shranili na -20 °C

3.1.3 Antibiotiki

Preglednica 3: Antibiotiki, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu; navedene so založne koncentracije in končne koncentracije v posameznih gojiščih (vsi so od proizvajalca Sigma)

Table 3: Antibiotics used in this study, their final concentrations as selection markers in selected media and stock concentration (manufacturer is Sigma)

Antibiotik	Selektivna koncentracija	Založna raztopina
Apramicin (Apr)	50 µg/ml	50 mg/ml v vodi
Kanamicin (Kn)	25 µg/ml	25 mg/ml v vodi
Kloramfenikol (Cm)	10 µg/ml	10 mg/ml v etanolu
Nalidinska kislina (Nal)	25 µg/ml	25 mg/ml v NaOH

Vse založne raztopine smo hranili na -20 °C.

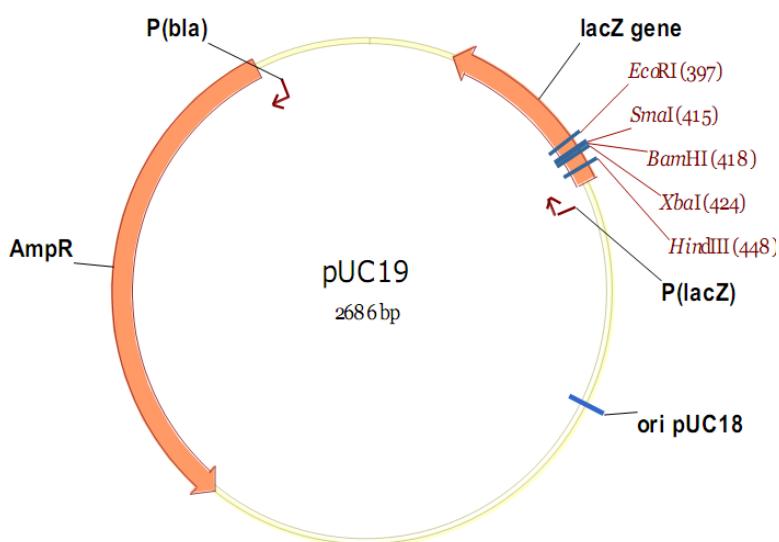
3.1.4 Bakterijski sevi, encimi in plazmidi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje seve:

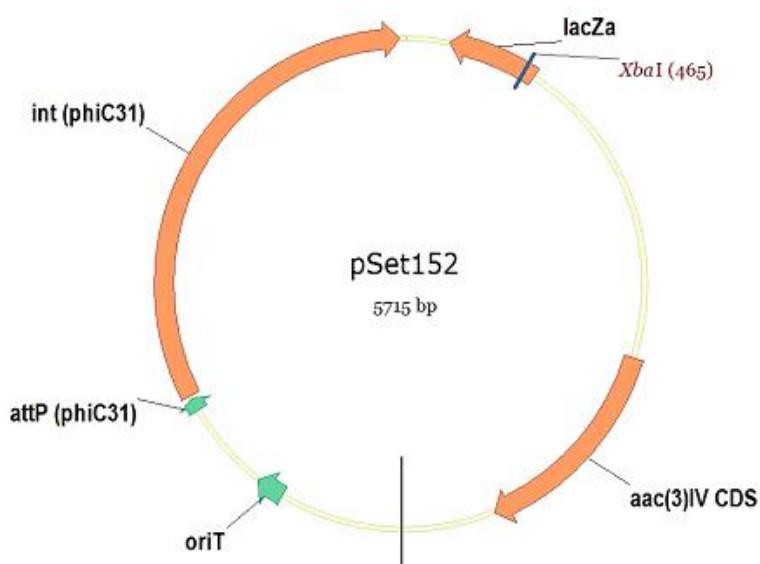
- *Saccharopolyspora erythraea* sev NRRL2338 divji tip.
- *Saccharopolyspora erythraea* sev ABE1441 industrijski – visoko-donosni (Acies Bio d.o.o.).
- *E. coli* sev DH10β z genotipom: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80lacZ ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU* *galKλ-* *rpsL* *nupG* (InvitrogenTM).
- *E. coli* sev ET12567 z genotipom: F⁻ *dam13::Tn9*, *dcm6*, *hsdM*, *hsdR*, *recF143::TnII*, *galK2*, *galT22*, *ara14*, *lacY1*, *xyl5*, *leuB6*, *thi1*, *tonA31*, *rpsL136*, *hisG4*, *tsx78*, *mtl1* *glnV44* (MacNeil in sod., 1992). Sev zaradi prekinitev *dam* in *dcm* metilaze ne metilira DNA. Takšna DNA je zaradi restrikcijsko-metilacijskih sistemov v streptomicetah primernejša za prenos.
- *E. coli* sev ET12567/pUZ8002. Sev ima enak genotip kot sev ET12567, dodatno pa vsebuje še konjugativni plazmid pUZ8002. Rezistenca proti kloramfenikolu je prisotna v genomu *E. coli* ET12567, rezistenco proti kanamicinu pa nosi plazmid pUZ8002.

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje encime: *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, *XbaI*, T4 DNA ligaza, Phusion polimeraza, FastAP (vsi od proizvajalca Thermo Scientific).

Za pripravo plazmidov z enim ali več genov smo uporabili standardni klonirni vektor pUC19 (Invitrogen) (slika 13). Za kloniranje in izražanje tarčnih genov smo uporabili plazmidni vektor pSet152 (slika 14) (Kieser in sod., 2000).



Slika 13: Vektor pUC19; vsebuje gen *lacZ* (kodira β-galaktozidazo), v katerem se nahaja mesto za kloniranje (MCS, ang. multiple cloning site) in gen *bla* za rezistenco proti ampicilinu (Invitrogen)
 Figure 13: Vector pUC19; contains *lacZ* gene (coding for β-galactosidase) with a multiple cloning site (MCS) located in its coding sequence and *bla* gene coding for β-lactamase that confers resistance to ampicillin (Invitrogen)

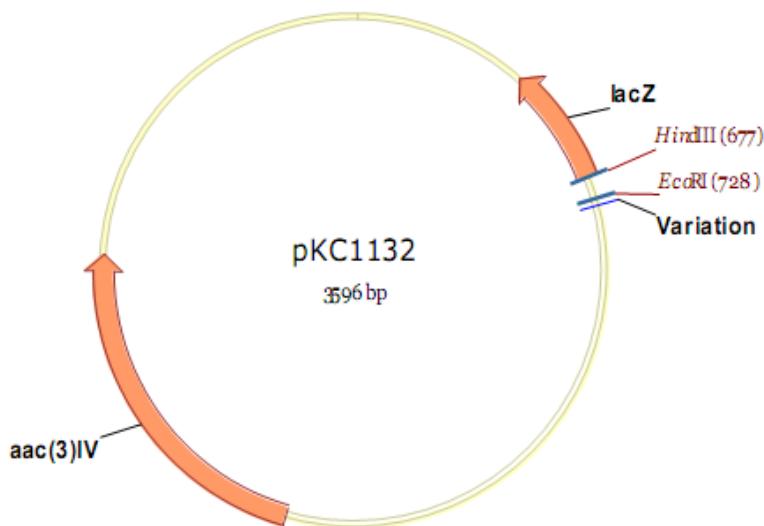


Slika 14: Vektor za izražanje tarčnih genov pSet152; vsebuje laktozni operon in ima zapis za α-podenoto gena *lacZ*, gen *aac(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicin, multiplo mesto za koniranje in mesto začetka podvojevanja (*oriT*) (Kieser in sod., 2000: 530)
 Figure 14: Expression vector pSet152; contains lactose operon and transcript for α-subunit of *lacZ* gene, *aac(3)IV* for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site and origin of transfer (*oriT*) (Kieser et al., 2000: 530)

Za prenos genov v genom *S. erythraea* smo uporabili konjugativni plazmid pSet152 z dodanim močnim konstitutivnim promotorjem *PermE**.

Za prekinitvev genov smo uporabili nereplikativni plazmidni vektor pKC1132 (slika 15) (Kieser in sod., 2000).

V preglednici 4 so navedeni plazmidi, ki smo jih pripravili v okviru doktorske naloge, v preglednici 5 pa oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za prekomerno izražanje oz. prekinitvev genov/operonov.



Slika 15: Vektor za prekinitvev genov pKC1132; vsebuje zapis za α -podenoto gena *lacZ*, gen *aac(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramycin, multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka podvojevanja (*oriT*) (Kieser in sod., 2000: 566)

Figure 15: Suicide vector pKC1132; contains transcript for α -subunit of *lacZ* gene, *acc(3)IV* for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site and origion of transfer (*oriT*) (Kieser et al., 2000: 566)

Preglednica 4: Plazmidi, ki smo jih pripravili v okviru doktorske naloge (navedeni so ime plazmida, vstavljeni oz. prekinjeni gen/operon, velikost plazmida, rezistenca ter organizem, v katerega smo plazmid vnesli)

Table 4: Plasmids prepared in this study (contains information on plasmid name, inserted/deactivated gene/operon; plasmid size, resistance and organism in which the plasmid was transferred)

Ime	Gen/operon	Velikost (bp)	Rezistenca	Organizem
pABE56	<i>bkdOP</i> -HA tag	9837	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE58	<i>mcm-del</i>	4694	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE60	<i>mmsOP1</i>	11282	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE61	<i>ilvB1</i>	7956	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE62	<i>ilvB1</i> -HA tag	7983	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE87	<i>mmsOP1</i> -HA tag	11309	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE88	<i>mmsOP1</i> -HA tag/ <i>ilvB1</i> -HA tag	13051	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE89	<i>ilvB1</i> -HA tag/ <i>mmsOP1</i> -HA tag	13051	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE95	SACE_4672_73 (<i>mmsOP2</i>)	9193	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>
pABE96	<i>vdh</i> -HA tag	7356	apramicin	<i>E. coli/S. erythraea</i>

Preglednica 5: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri prekomernem izražanju oz. prekiniti genov (navedeni so ime oligonukleotidnega začetnika, katero restirkijsko mesto je vgrajeno in zaporedje)
 Table 5: Primers used for overexpression or gene deactivation (contains information on primer name, which restriction site is integrated and sequence)

Ime	Restrikcijsko mesto	Zaporedje
PermE-F	<i>NdeI</i> -F	5'-ATG CGA GTG TCC GTT CGA GTG G-3'
PermE-R	<i>XbaI</i> -R	5'-CAT ATG AAT CCT CCA CTA GAT CCT ACC-3'
PeryAI-F	<i>NdeI</i> -F	5'-AAA AGA ATT CAG GCC GAC GTT GAC CCG CTC GGC TTC-3'
PeryAI-R	<i>XbaI</i> -R	5'-AAA AAA CAT ATG CGT CCC CCT ACT CGA CGA CCA CGC AAT G-3'
bkdOp-F	<i>NdeI</i> -F	5'-AAA ATC ATA TGT GTC CAG GAA AAC GGC GCT CA-3'
bkdOp-R	<i>XbaI</i> -R	5'-AAA TCT AGA ACT ACA ACT CGC CGA GCG CGG TGA TCG-3'
mmsOp-F	<i>NdeI</i> -F	5'-AAA ACA TAT GAC CAA CGA GCT TGG GCA CTT CAT CGG-3'
mmsOp-R	<i>XbaI</i> -R	5'-AAA TCT AGA TTC AGT GAC CGG AGT GCT CGC GGA CC-3'
mmsOp-HA	<i>XbaI</i> -R	5'-AAA TCT AGA TTC AGG CGT AGT CCG GGA CGT CGT ACG GGT AGT GAC CGG AGT GCT CGC GGA CC-3'
ilvB1-F	<i>NdeI</i> -F	5'-TTT TAA CAT ATG CCG GGC GCT GAC AAC GAC-3'
ilvB1-R	<i>XbaI</i> -R	5'-TTT TCT AGA TTC ACT TCG GCG ATG TCC TCT CGG TCG-3'
ilvB1-HA-R	<i>XbaI</i> -R	5'-TTT TCT AGA TTC AGG CGT AGT CCG GGA CGT CGT ACG GGT ACT TCG GCG ATG TCC TCT CGG TCG-3'
MCM-del-F1	<i>EcoRI</i> -F	5'-AAA GAA TTC CCC GAG CCC GCC CGG CAG CAG TG-3'
MCM-del-R1	<i>HindIII</i> -R	5'-AAA AAG CTT GTG CGC CAG TTC GTC GGT CAG CGT C-3'
SACE_4672-73-F	<i>NdeI</i> -F	5'- AAA AAA CAT ATG GTG GCT ACT ACA CAG GCC GAC GAG-3'
SACE_4672-73-R	<i>XbaI</i> -R	5'- AAA AAT CTA GAA TCA GAG GGC GGA CGT GGC TTC GA-3'
vdhHA-F	<i>NdeI</i> -F	5'-AAA AAC ATA TGA CCG AAG CAG ACA ACG GCG TCC TGC-3'
vdhHA-R	<i>XbaI</i> -R	5'-TTT CTA GAT TCA GGC GTA GTC CGG GAC GTC GTA CGG GTA GCG CGC GTC GGA CAT CCG CTG TTC G-3'

Oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje *PmerR* smo sintetizirali pri Eurofins MWG Operon (Nemčija).

3.1.5 Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili za izvedbo HPLC

Pri kromatografskih metodah smo uporabili vodo MiliQ (HPLC-grade), acetonitril (J.T.Baker, HPLC-grade, čistost 99 %), 25 % raztopino amonijaka (Kemika, HPLC-grade, čistost 98 %), amonijev acetat (Sigma, HPLC-grade, čistost 99 %) in natrijev klorid (Kemika, čistost 98 %). Vse kemikalije smo uporabili brez dodatnega čiščenja.

Mobilna faza pri gradientni ločbi je bila sestavljena iz komponente A (10 mM amonijev acetat smo nastavili na 9,8 z razredčeno amonijevim raztopinom) in komponente B (acetonitril). Eksterni standard za kvantifikacijo: eritromicin A od European Pharmacopoeia, čistost 98,4 %.

Uporabili smo kolono Thermo Hypersil Gold 10x4,6 mm, 5 µm in predkolono Phenomenex security guard KJ0-4282.

3.2 NAPRAVE IN OPREMA

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje aparature:

- PCR-aparatura »Professional Thermocycler« (Biometra),
- aparatura za agarozno gelsko elektroforezo (Bio-Rad),
- aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo »Mini Protean Tetra Cell« (Bio-Rad),
- aparatura za elektroprenos proteinov »Mini Trans-Blot Cell« (Bio-Rad),
- spektrofotometer »Infinite 200 Pro NanoQuant« (TECAN),
- ultrazvočni sonikator »Labsonic« (Sartorius),
- mala in velika centrifuga (Hettichlab),
- stresalnik Multitron HT (Infors),
- tehtnici PLJ 2100-2M in ALT 220-4NM (Kern & Sohn),
- elektroporator »MicroPulser« (Bio-Rad),
- pH-meter PHS 3D (Qingdao Flom Technology),
- grelec in magnetno mešalo Rotamix 500 (Tehnica),
- avtoklavi (Sutjeska in Medicinotehnika),
- avtomatske pipete (Gilson),
- brezprašna komora (Telstar),
- hladilnik (4 °C) (LTH),
- zamrzovalna omara (-20 °C) (LTH),
- zamrzovalna skrinja (-80°C) (Heto),
- inkubator za aktinomicete (28 °C) (Sutjeska),

- inkubator za *E. coli* (37 °C) (Sutjeska),
- digestorij (Med-Lab Rauh),
- vodna kopel (UniEquip),
- vrtinčnik (IKA),
- mikrovalovna pečica (Sanyo),
- kamera za slikanje gelov za elektroforezo (UV transiluminator) (Bio-Rad),
- hibridizacijska pečica (Biometra),
- bioreaktor 5 L (Sartorius)
- HPLC sistem Thermo Finnigan Surveyor+, ki ga sestavljajo črpalka z vakuumskim razplinjevalcem, avtomatski vzorčevalnik z 10 µl zanko (metanol se uporablja kot injektorsko topilo), PDA detektor in osebni računalnik s programom ChromQuest (verzija 4.2).

3.3 METODE

3.3.1 Shranjevanje sevov *E. coli* in *S. erythraea*

Vse bakterijske seve smo shranjevali v 20 % (v/v) glicerolu pri temperaturi -20 °C (za krajši čas) oz. -80 °C (za daljši čas).

3.3.2 Mikrobiološke metode kultivacije sevov *E. coli*

Za kultivacijo sevov *E. coli* smo uporabili tekoče gojišče 2TY z dodatkom ustreznih antibiotikov. Inkubacija je potekala preko noči na stresalniku pri 37 °C in 220 obr./min.

Za pomnoževanje sevov *E. coli* smo uporabili agarne plošče 2TY z ustreznim antibiotikom. Plošče smo inkubirali preko noči na 37 °C.

3.3.3 Mikrobiološke metode kultivacije sevov *S. erythraea*

3.3.3.1 Kultivacija v 50 ml centrifugirkah

Za pripravo spor *Sac. erythraea* smo uporabili gojišče ABSM4. Spore smo inokulirali na agarne plošče in jih inkubirali 14 dni pri 30 °C. Po 14 dneh smo izbrane kolonije inokulirali v 5 ml tekočega gojišča ABVM1 in jih 48 h inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min in 30 °C. Po 48 h smo namnoženo kulturo inokulirali v produkcijsko gojišče ABPM8 (10 % inokulum). Sledila je 7-dnevna kultivacija pri 220 obr./min in 30 °C.

3.3.3.2 Kultivacija v 250 ml erlenmajericah

Spore, pripravljene na agarnih ploščah ABSM4, smo po 14 dneh inkubacije inokulirali v 40 ml tekočega gojišča ABVM1 in jih 48 h inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min in 30

°C. Po 48 h smo namnoženo kulturo inokulirali v produkcijsko gojišče ABPM8 (10 % inokulum) in jih inkubirali 7 dni pri 220 obr./min in 30 °C.

3.3.3.3 Kultivacija v 5 L bioreaktorju

Za inokulacijo bioreaktorja smo pripravili dvostopenjski inokulum. V prvi fazi smo inokulirali 300 µl spor v erlenmajerico s 40 ml gojišča ABVM1 in inkubirali na stresalniku 72 h pri 33 °C in 220 obr./min. V drugi fazi smo inokulirali 8 ml namnožene kulture v 160 ml gojišča ABVM1 (5 % inokulum) in inkubirali na stresalniku 56 h pri 33 °C in 220 obr./min. Nato smo inokulirali produkcijsko gojišče ABPM8, in sicer 150 ml inokuluma v 3 L gojišča (5 % inokulum). Ob inokulaciji smo dodali 150 ml glukoze (5 % volumna brozge) in 25 ml n-propanola (0,83 % volumna brozge). Začetni pogoji bioreaktorja: 30 °C, 400-700 obr./min, GSF 0,5-1 vvm, pO₂ nad 30 %.

3.3.3.4 Rastna krivulja *S. erythraea* in določitev kontrolnih točk

Rastno krivuljo *S. erythraea* smo določili s pomočjo kultivacije sevov v bioreaktorju. Spremljali smo več parametrov: PMV (ang. packed mycelium volume), porabo glukoze, propanol, koncentracijo eritromicina. Na podlagi teh parametrov izrisali rastno krivuljo ter določili kontrolne točke.

Kontrolne točke:

- (a) pred začetkom produkcije eritromicina,
- (b) ob začetku produkcije eritromicina,
- (c) v fazi intenzivne produkcije eritromicina,
- (d) ob koncu produkcije eritromicina.

3.3.4 Analitske metode

3.3.4.1 Ekstrakcija eritromicina iz fermentacijske brozge

Ekstrakcija eritromicina z NaCl

Po končani fermentaciji smo vzorčili 5 ml fermentacijske brozge in z 1 M raztopino NaOH umerili pH na 9,5-10,0. Nato smo dodali 5 ml acetonitrila (razmerje 1:1) in stresali na stresalniku 40 min (220 obr./min, 30 °C). Po 40 min smo dodali 1 g NaCl (0,2 g/ml) in stresali še 20 min (220 obr./min, 30 °C). Vzorce smo nato centrifugirali pri 4500 obr./min 3 min. Zgornjo fazo smo prenesli v mikrocentrifugirko ter ponovno centrifugirali pri 14000 obr./min 10 min. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dali v analizo s HPLC.

Ekstrakcija eritromicina brez NaCl

Po končani fermentaciji smo vzorčili 5 ml fermentacijske brozge. Dodali smo 5 ml acetonitrila (razmerje 1:1) in stressali na stresalniku 60 min (220 obr./min, 30 °C). Vzorce smo nato centrifugirali pri 4500 obr./min 3 min. 2 ml supernatanta smo prenesli v mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali pri 14000 obr./min 10 min. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in naredili biološki test za določanje vsebnosti eritromicina.

3.3.4.2 Določanje vsebnosti eritromicina pri sevu NRRL2338 – mikrobiološki test

Za izvedbo mikrobiološkega testa smo kot testni organizem uporabili *B. subtilis*. Kolonije smo inokulirali na plošče 2TY + 0,001 g/L MnSO₄ in inkubirali pri 37 °C 7 dni. Nato smo kolonije pobrali v dH₂O, jih homogenizirali in segrevali 30 min na 70 °C. Potem smo kolonije centrifugirali pri 3000 obr./min 10 min, odstranili supernatant in jih resuspendirali v 20 % glicerolu. Tako pripravljeno kulturo smo alikvotirali in do uporabe shranili na -80 °C.

Kulturo *B. subtilis* smo inokulirali v 50 ml gojišča 2TY (100 µl spor/50 ml gojišča) in preko noči inkubirali na stresalniku pri 30 °C in 220 obr./min. Ko je kultura dosegla OD₅₄₀ = 1,30-1,35, smo ustavili rast in centrifugirali pri 3000 obr./min 10 min, odlili supernatant in resuspendirali v 25 ml 2TY. Sledila je inokulacija *B. subtilis* v ohlajeno gojišče ABA (5 ml/250 ml gojišča) in razlitje plošč (25 ml), ki smo jih inkubirali v hladilniku 2 h. Med inkubacijo smo si pripravili ustrezne redčitve ekstraktov (redčitve smo pripravili v acetonitrilu). Po 2 h inkubacije smo v ploščah naredili luknjice in nanesli standarde oz. vzorce (60 µl/luknjico). Plošče smo inkubirali v hladilniku 2 h, nato pa smo jih prenesli v inkubator na 37 °C in jih inkubirali preko noči (cca. 16-18 h). Naslednji dan smo izmerili cone inhibicije in na podlagi umeritvene krivulje določili koncentracije eritromicina.

3.3.4.3 Določanje vsebnosti eritromicina pri visoko-donosnem sevu ABE1441 – HPLC

Meritve je izvajal analitski oddelek podjetja Acies Bio d.o.o.

Sistem je deloval pri pretoku 0,8 mL/min, skupni čas merjenja je bil 5 min za en vzorec, temperatura kolone 40 °C in valovna dolžina detekcije je bila 206 nm. Volumen injektiranega vzorca je bil 1 µl.

3.3.5 Proteomske metode

3.3.5.1 Priprava celičnih ekstraktov iz *S. erythraea*

Za pripravo celičnih ekstraktov iz *S. erythraea* smo vzorčili 2 ml brozge. Vzorce smo najprej centrifugirali (3500 g, 1 min), jih 3x sprali s 50 mM raztopino Tris-HCl (pH 7,2), pri čemer je pomembno, da so bili vzorci ves čas na ledu. Pelet smo nato resuspendirali v 400 µl raztopine za pripravo celičnih ekstraktov in sonicirali 4 x 15 s (s 30 s premori na ledu). Sledilo je centrifugiranje na 20000 g 20 min pri 4 °C. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ga do nadaljnje uporabe shranili na -80 °C.

3.3.5.2 Čiščenje celičnega ekstrakta iz *S. erythraea*

V pripravo vzorca smo vključili še obarjanje proteinov, za kar smo uporabili komercialni komplet - »2-D Clean-Up Kit« (GE Healthcare). S tem smo odstranili prisotne kontaminante, kot so lipidi, nukleinske kisline, ionski detergenti, soli, ki lahko motijo ločevanje in vizualizacijo 2-D gela.

3.3.5.3 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu po metodi Bradford

Uspešnost priprave celičnih ekstraktov smo preverili z določanjem vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu po metodi Bradford (Bradford, 1976).

V mikrotitersko ploščico smo odpipetirali 4 µl celičnega ekstrakta in 196 µl 5x razredčenega Bradfordovega reagenta. Mikrotitersko ploščico smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in pomerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Na podlagi umeritvene krivulje smo določili koncentracijo celokupnih proteinov. V primeru, da izmerjene absorbance niso bile znotraj linearnega območja umeritvene krivulje, smo vzorce celičnih ekstraktov razredčili. Naredili smo tudi slepi vzorec (5x razredčen Bradfordov reagent). Od izmerjene absorbance vzorca smo odšteli absorbanco slepega vzorca in na podlagi umeritvene krivulje izračunali koncentracijo proteinov (priloga A).

3.3.5.4 2-D elektroforeza

Prva dimenzija (izoelektrično fokusiranje)

Prva dimenzija zajema dva koraka: rehidracijo trakov in IEF.

Za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom (IPG) dolžine 13 cm smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo najprej uravnali v ravnotežno pozicijo, nato pa v sredino reže odpipetirali 250 µl mešanice celičnega ekstrakta in raztopine za rehidracijo trakov. Trakove IPG smo položili z gelom navzdol v režo ter prekrili s 3 ml

mineralnega olja. To smo potem pokrili s plastičnim pokrovom in pustili čez noč. Po končani rehidraciji smo trakove sprali z bdestilirano vodo in jih posušili na filter papirju.

Za IEF smo uporabili elektroforetsko enoto Multiphor II. Na ploščo, ki omogoča konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo nanesli 4 ml mineralnega olja. Čez smo postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, tako da je bil anodni priključek nameščen na vrhu plošče. V podstavek smo nalili 10 ml mineralnega olja in vanj položili plastično ploščo z vdolbinami. V vdolbine smo položili trakove z gelom navzgor in s pozitivnim (+) koncem na zgornjem delu plošče. Nato smo odrezali dva enako dolga elektrodna trakova, ju namočili v bdestilirani vodi, osušili na filter papirju in ju položili pravokotno na oba konca trakov. Čez njiju smo namestili elektrodi. Trakove smo nato prelili s približno 150 ml mineralnega olja ter vse skupaj pokrili s pokrovom. Elektroforetsko enoto smo povezali z usmernikom in nastavili pogoje: 300 V, 5 mA, 5 W, 1 min; 3500 V, 5 mA, 5 W, 1 h 30 min; 3500 V, 5 mA, 5 W, 4 h.

Po končanem IEF smo trakove zavarili v plastične mape in jih shranili na -80 °C.

Druga dimenzija (SDS-PAGE)

- Vlivanje gelov za SDS-PAGE

Najprej smo sestavili kalup za vlivanje gelov, nato pa vlili ločilni gel (19 ml) in nanj vlili še ddH₂O (s tem smo preprečili dostop zraka, ki ovira samo polimerizacijo in zagotovili ravno površino gela). Gel smo inkubirali preko noči, da je polimeriziral. Naslednji dan smo vodo s površine gela odlili in preostanke posušili s sušilnikom.

- Uravnoteženje trakov

IPG trakove smo najprej 15 min inkubirali v raztopini za uravnoteženje I., nato pa še 15 min v raztopini za uravnoteženje II. Po končanem uravnoteženju smo trakove rahlo osušili na filter papirju.

- Elektroforeza

Na površino ločilnega gela smo vlili agarozno raztopino in nanesli IPG trakove. Ko se je agaroza strdila, smo kalup vpeli v zgornjo posodo z elektrodama ter vse skupaj prenesli v elektrodnou posodo, v katero smo predhodno nalili 4 L 1x SDS pufer. Nato smo še v zgornjo posodo nalili 1x SDS pufer (cca. 700 ml). Elektrode smo priklopili na usmernik in nastavili naslednje pogoje:

faza 1: 20 mA/gel, 15 min;

faza 2: 40 mA/gel, dokler barvilo bromofenol modro ne pripotuje ko konca gela.

Med potekom elektroforeze je bila aparatura povezana s termostatom, ki vzdržuje konstantno temperaturo 20 °C. Ko je barvilo bromofenol modro pripravovalo do konca gelov, smo elektroforezo ustavili, razstavili kalup in gele ustreznou označili.

- Fiksacija, barvanje in slikanje gelov

Gele smo prenesli v banjice s fiksacijsko raztopino in inkubirali na stresalniku 2-krat po 30 min. Fiksacijsko raztopino smo odlili in gele preko noči v temi inkubirali v fluorescentnem barvili SYPRO RUBY (banjice smo ovili v aluminijasto folijo). Vse nadaljnje postopke smo delali v temi, saj je barvilo občutljivo na svetlobo.

Naslednji dan smo barvilo odlili in gele spirali v raztopini za spiranje 2-krat po 30 min ter nato še v ddH₂O 3-krat po 5 min. Sledilo je slikanje gelov s sistemom za dokumentacijo gelov G-BOX:HR (Syngene). Barvilo Sypro Ruby ima eksitacijski maksimum pri dveh valovnih dolžinah: ~280 nm in ~450 nm ter emisijski maksimum blizu 610 nm. Uporabili smo eksitacijsko osvetlitev Transilluminator - medium wavw uv ter emisijski filter FiltUV. Pogoji, ki smo jih nastavili za slikanje, so bili naslednji: zaslonka 1,2; povečava 12,5; fokus 136; čas izpostavitve 200 ms.

3.3.5.5 Računalniška analiza proteinskih profilov s programom 2-D Dymension

Slike 2-D gelov smo analizirali z računalniškim programom Dymension 2-D analysis software (Syngene). Referenčni gel, na podlagi katerega smo delali vse primerjave, je bila slika 2-D profila divjega tipa NRRL2338 v določeni kontrolni točki. Vse primerjave so bile izvedene v dveh bioloških ponovitvah in treh tehničnih ponovitvah. Kot relevantne razlike oz. ujemanja smo upoštevali tiste, ki so se ponovile na vseh ponovitvah.

Primerjave smo naredili znotraj seva NRRL2338 oz. znotraj seva ABE1441 ter med sevoma NRRL2338 in ABE1441 v različnih kontrolnih točkah.

Program Dymension je avtomatsko zaznal in obkrožil lise ter jih kvantitativno ovrednotil. Program nam je podal rezultate v obliki preglednice, ki izpiše številke lis in normalizirane volumne (normaliziran volumen je razmerje med volumnom ene lise proti celokupnemu volumnu vseh lis na gelu). Uporabili smo privzete računalniške nastavitev merjenja ozadja in identifikacije lis glede na razmerje intenzitete in šuma. Kot diferencialno izražene proteine smo upoštevali samo tiste, kjer je bilo razmerje normaliziranih volumnov večje od 1,5 in statistično značilno ($p < 0,05$).

3.3.5.6 Identifikacija diferencialno izraženih proteinov z masno spektrometrijo

Identifikacija diferencialno izraženih proteinov je bila narejena z masno spektrometrijo (LC-MS/MS) na Inštitutu Jožef Stefan (Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo).

Izvedba analize LC-MS/MS je potekala z aparaturom EASY-nanoLCII HPLC (Thermo Scientific), ki je bila sklopljena z Orbitrap LTQ Velos masnim spektrometrom (Thermo Scientific). Peptidni vzorec je bil najprej naložen na predkolono (Proxeon EASY-ColumnTM, dolžina 2 cm, notranji premer 100 µm, 5 µm 120 Å, kromatografski nosilec

C18), sledilo je ločevanje z elucijo na 10 cm dolgi analitični koloni C18 PicoFrit™ AQUASIL (notranji premer 75 µm, 5 µm 100 Å, kromatografski nosilec C18) (New Objective)). Peptidi so bili eluirani s 30-minutnim linearnim gradientom 5-50 % mobilne faze B (0,1 % mravljična kislina v acetonitrilu) pri pretoku 300 nL/min. MS/MS spektri so bili pridobiljeni s fragmentacijo devetih najbolj intenzivnih prekurzorskih ionov iz celotnega masnega spektra. Dinamično izločanje prekurzorskih ionov je potekalo ob ponovljeni detekciji iona in je trajalo 120 sekund. Za preiskovanje baze proteinskih zaporedij je bil uporabljen algoritem Sequest, ki je vgrajen v Proteome Discoverer programskega paketa (verzija 1.3.0.339) (Thermo Scientific) in baza proteinskih zaporedij *S. erythraea*, ki je bila pridobljena iz spletnih strani "Saccharopolyspora erythraea Genome Project Web site" (<http://jblseqdat.bioc.cam.ac.uk/gnmweb/files.html>). Nastavitev pri iskanju so bile naslednje: tripsinska cepitev z največ dvema pogreškoma, variabilna oksidacija metioninov in stabilna karbamidometilacija cisteinov. Toleranca odstopanja mase prekurzorskih ionov je bila nastavljena na 10 ppm, toleranca odstopanja mase fragmentiranih ionov pa 0,8 Da. Statistična zanesljivost identificiranih peptidov je bila ovrednotena tudi z iskanjem po obratni bazi podatkov, pri katerem je bil delež napačno identificiranih peptidov nastavljen na 1 %.

Rezultate smo dobili v obliki preglednice identificiranih proteinov. Poleg identitetete proteina smo dobili naslednje podatke: rezultat MASCOT (najvišji oz. najbolj značilen zadetek), število identificiranih peptidov najvišjega zadetka, odstotek v pokritosti aminokislinske sekvence ujemanih peptidov v identificiranem proteinu in kodo NCBI.

Funkcijo proteinov smo poiskali v bazah NCBI in Uniprot. Diferencialno izražene proteine smo razvrstili v skupine glede na celične procese s skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway.

3.3.5.7 Metoda spektralnega štetja (ang. Spectral counting)

Alternativna metoda za določanje diferencialno izraženih proteinov, t. i. metoda spektralnega štetja, je bila izvedena na Inštitutu Jožef Stefan (Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo).

Pripravljene celične ekstrakte (poglavlje 3.3.5.1) smo najprej ločili z metodo SDS-PAGE, za ločevanje smo uporabili komercialni gel (12 % tris-glicin) (Lonza). Gel smo barvali z barvilom Commasie Brilliant Blue. Celo proteinsko vrstico smo razrezali na osem trakov, nato pa vsak trak razbarvali z raztopino 25 mM amonijevega bikarbonata in 50 % acetonitrila in ga pripravili za analizo MS. Razbarvane trakove gela smo najprej reducirali v prisotnosti 10 mM DTT in 25 mM amonijevega bikarbonata (45 min na 56 °C). Sledila je redukcija z acetilacijo cisteinov s 55 mM jodacetamidom in 25 mM amonijevim bikarbonatom (30 min na sobni temperaturi). Delčke gela smo nato sprali z 25 mM amonijevim bikarbonatom, jih posušili in razgradili s tripsinom (Promega) (preko noči pri

37 °C). Peptide smo nato ekstrahirali iz delčkov gela z ekstrakcijsko raztopino (50 % acetonitril, 5% mravljična kislina) in jih skoncentrirali na 15 µl. Sledila je analiza LC-MS/MS.

Analiza LC-MS/MS je potekala kot je že opisano v točki 3.3.5.6 z nekaj razlikami:

- peptidi so bili eluirani z 90-minutnim linearnim gradientom 5-50 % mobilne faze B;
- za preiskovanje baze proteinskih zaporedij in kvantifikacijo s spektralnim štetjem je bil uporabljen proteomski programski paket MaxQuant (Cox in Mann, 2008; Cox in sod., 2011);
- nastavitev pri iskanju v bazi podatkov: stabilna karbamidometilacija cisteinov, variabilna oksidacija metioninov in variabilna N-terminalna acetilacija;
- toleranca odstopanja mase prekurzorskih ionov je bila nastavljena na 6 in 20 ppm.

3.3.5.8 Prenos Western

Prenos Western smo uporabili za potrditev izražanja proteinov po vnosu dodatne kopije izbranega gena v sev NRRL2338.

Prenos Western poteka v večih korakih: izolacija proteinov (priprava proteinskih ekstraktov), ločevanje proteinov z SDS-PAGE, prenos proteinov na membrano, blokada, hibridizacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi, barvanje in detekcija z DAB.

Izolacija proteinov (priprava proteinskih ekstraktov)

3. dan fermentacije (po cca. 65 h) v produkcijskem gojišču smo vzorčili 2 ml biomase in jo centrifugirali 5 min pri 3000 xg in 4 °C. Odlili smo supernatant in pelet 4-krat sprali z 20 mM fosfatnim pufrom, pH 7.5. Nato smo pelet resuspendirali v 0,5 ml pufra, ki je vseboval 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.5), 20 mM EDTA (pH 8.0) in proteazni inhibitor (Roche) (2 tabletki/10 ml) in sonificirali 4 x15 s (s 30 s premori na ledu). Vzorce smo centrifugirali na 20000 xg 20 min pri 4 °C, supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali nanšalni pufer 6x LB ter segrevali 10 min na 95 °C.

Ločevanje proteinov z SDS-PAGE

Pripravili smo 12 % poliakriamidni gel. Elektroforezo smo izvedli z aparatujo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). V aparatu smo vili cca. 1 L 1x elektroforetskega pufra za SDS-PAGE, vstavili kalup z geli ter nanesli vzorce. Elektroforeza je potekala pri 20-25 mA/gel. Ko je barvilo bromofenol modro priprovalo do konca gelov, smo elektroforezo ustavili, razstavili kalup in gele ustreznno označili.

Prenos proteinov na membrano

Po končani elektroforezi smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano. Pri tem smo uporabili sistem Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). V kadičko smo nalili cca. 1 L

prenašalnega pufra. Prenos je potekal 75 min pri napetosti 70-80 V. Uspešnost prenosa smo preverili z barvanjem membrane z barvilo Ponceau S.

Blokada

Membrano smo nato inkubirali v 200 ml raztopine 1x TBS z dodatkom mleka v prahu (3 %) 40 minut na stresalniku.

Hibridizacija s primarnimi in sekundarnimi protitelesi

Za detekcijo proteinov smo uporabili:

- primarna protitelesa: podganja monoklonska Ab Anti-HA z visoko afiniteto (3F10) (Roche) (angl. Rat monoclonal Ab Anti-HA High Affinity) in
- sekundarna protitelesa: konjugant kozjih poliklonskih Ab Anti-podganjih IgG in peroksidaze (Calbiochem) (angl. Goat Anti-Rat IgG Peroxidase Conjugat).

Hibridizacija s primarnimi protitelesi je potekala na sobni temperaturi preko noči. Membrano smo inkubirali v 5 ml raztopine 1x TBS z dodatkom mleka v prahu (3 %) in primarnimi protitelesi v razmerju 1:500.

Membrano smo naslednji dan 3x sprali v raztopini 1x TBS (stresalnik, 10 min, sobna temperatura). Nato smo izvedli hibridizacijo s sekundarnimi protitelesi. Membrano smo inkubirali v raztopini 1x TBS z dodatkom mleka v prahu (3 %) in sekundarnimi protitelesi v razmerju 1:1000 na sobni temperaturi 75 minut.

Sledilo je 4x spiranje membrane po 10 minut v raztopini 1x TBS na sobni temperaturi.

Barvanje in detekcija z DAB

Za barvanje smo uporabili DAB Substrate Kit. Kit vsebuje 10x raztopino DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) in peroksidni pufer (Stable Peroxide Substrate Buffer). DAB je občutljiv kolorimetrični substrat, ki se skupaj s hrenovo peroksidazo uporablja za imunološko detekcijo. Hrenova peroksidaza katalizira oksidacijo vodikovega peroksida substrata DAB. Dobimo netopen rjavaobarvan produkt.

Zmešali smo 22,5 ml peroksidnega pufra in 2,5 ml DAB. V tako pripravljeni raztopini smo inkubirali membrano 10-15 min.

3.3.6 Bioinformatska analiza genov oz. proteinov

3.3.6.1 Bioinformatska orodja

Za bioinformacijske analize genov oz. proteinov smo uporabili javno dostopna bioinformatska orodja: BLAST, KEGG Pathway, BRENDA in Clustal Omega.

Algoritem BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool) je dostopen na spletni strani NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) in omogoča primerjavo nukleotidnih ali proteinskih zaporedij z drugimi zaporedji v javno dostopnih bazah, kot so nukleotidne baze GenBank, EMBL, DDBJ, PDB ter proteinske baze GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR in PRF. Rezultati primerjav so podani v obliki zadetkov, ki so razvrščeni glede na odstotek identičnosti in glede na E-vrednost. E-vrednost oz. pričakovana vrednost je parameter, ki pove koliko zadetkov lahko pričakujemo, če bi naključno iskali zaporedje enake velikosti. Nižja kot je E-vrednost, manjša je verjetnost, da je zadetek rezultat naključja (Altschul in sod., 1990).

KEGG (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genom) je baza podatkov za sistematično analizo funkcij genov in omogoča povezavo genomskeih informacij z višjim nivojem funkcionalnih informacij. Baza »GENES« vsebuje zbirko genov za vse v celoti sekvencirane genome in nekatere delno sekvencirane genome z anotacijami genskih funkcij. Baza »PATHWAY« vsebuje grafične predstavitev celičnih procesov, kot so metabolizem, membranski transport, signalna transdukcija in celični cikel. Referenčno metabolno pot lahko vidimo kot mrežo encimov ali mrežo EC števil (numerična klasifikacijska shema za encime, angl. Enzyme commission number). EC številke identificirajo encime v metabolnih poteh in omogočajo povezavo z genomskeim informacijami (Kaneisha in Goto, 2000).

BRENDA (ang. Braunschweig Enzyme Database) vsebuje prosto dostopne biokemijske in molekularne informacije o vseh klasificiranih encimih. Baza podatkov vsebuje informacije o klasifikaciji in nomenklaturi, o reakcijah in specifičnosti, o funkcionalnih parametrih, o pojavljanju, o encimski strukturi in stabilnosti, o mutantah in encimskem inženiringu, o pripravi in izolaciji, o uporabi encimov ter o podatkih o ligandih. Vsak vnos ima povezavo na referenco iz literature, izvorni organizem in če je na voljo tudi proteinsko zaporedje encima (Chang in sod., 2009).

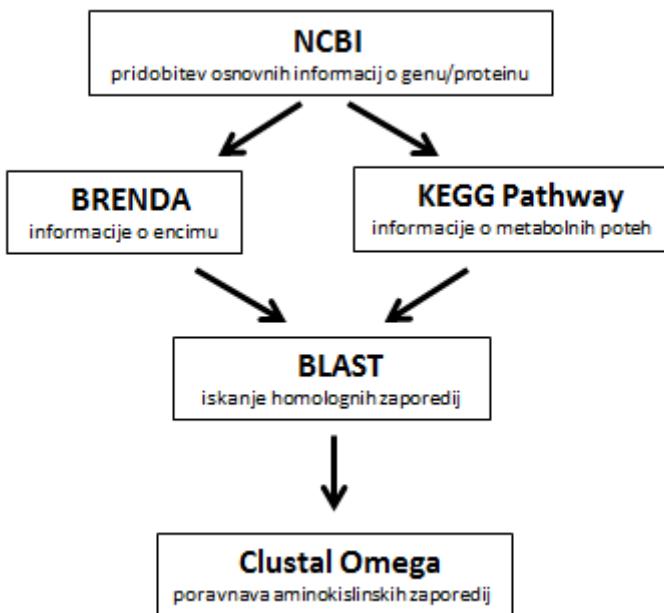
Clustal Omega (EMBL-EBI) je javno dostopen program za poravnavo aminokislinskih zaporedij (Sievers in sod., 2011). Rezultati poravnav so prikazani grafično in imajo različne oznake:

- z zvezdico so označeni povsem ohranjeni aminokislinski preostanki,
- z dvema pikama so označeni delno ohranjeni aminokislinski preostanki,
- z eno piko so označena mesta v zaporedju s sicer različnimi aminokislinsami, vendar podobnimi kemijskimi značilnostmi,
- najslabše ohranjena mesta v zaporedju pa nimajo oznake.

3.3.6.2 Bioinformatske analize

Za gene, ki smo jih na podlagi primerjalne transkriptomsko/proteomske analize identificirali kot potencialne kandidate, ki lahko bistveno vplivajo na povečan donos

eritromicina v produkcijskem sevu, smo najprej izvedli podrobno bioinformacijsko analizo. Bioinformacijske analize smo izvedli tako, da smo v bazi »Gene« na NCBI poiskali vnos za specifičen gen oz. protein. Tu smo pridobili informacije o lokaciji gena (kje v genomu se nahaja), velikosti gena, aminokislinskem zaporedju proteina in njegovi dolžini, funkciji proteina, EC številki. Nato smo s pomočjo baz BRENDA in KEGG Pathway poiskali metabolno pot, v katero je vključen protein oz. encim. Z algoritmom BLASTP smo poiskali potencialna homologna zaporedja v *S. erythraea*, potencialna homologna zaporedja v sorodnih mikroorganizmih (Actinobacteria) in najbližjega biokemijsko že karakteriziranega homologa v čim bolj sorodnem mikroorganizmu. Za poravnavo več aminokislinskih zaporedij smo uporabili program Clustal Omega. Pri poravnavi aminokislinskih zaporedij smo predpostavili, da predstavlja identiteta aminokislinskega zaporedja nad 40 % dovolj veliko verjetnost, da so encimske funkcije ohranjene (Tian in Skolnick, 2003; Edgar, 2010).



Slika 16: Shematski prikaz poteka bioinformatskih analiz
Figure 16: Schmatic reprezentation of bioinformatic analysis

3.3.7 Molekularno-biološke metode

3.3.7.1 Testiranje delovanja promotorjev (merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze)

Delovanje promotorjev smo testirali z merjenjem aktivnosti poročevalskega gena katehol 2,3-dioksigenaze. Katehol 2,3-dioksigenaza je produkt gena *xylE* TOL plazmida iz *Pseudomonas putida*, ki spreminja brezbarvni katehol v rumenoobarvan produkt 2-hidroksimukonski semialdehid (Zukowski in sod., 1983).

Seve smo inokulirali v 5 ml gojišča CRM z ustreznim antibiotikom in jih inkubirali na stresalniku pri 30 °C in 220 obr./min. Po 48 h smo kulturo precepili (10 % inokulum) v sveže gojišče CRM in ponovno inkubirali pri 30 °C 220 obr./min. Po 48 h smo vzorčili 1 ml kulture. Vzorce smo najprej centrifugirali pri 14000 obr./min 10 min. Odstranili smo supernatant in dodali pufer za izpiranje ter ponovno centrifugirali pri 14000 obr./min 10 min. Odstranili smo supernatant in dodali 0,5 ml pufra za katehol test. Vzorce smo nato sonificirali (amplituda 100%, cikel 1) 4x 15 sekund z vmesnimi 30 s intervali na ledu. Po sonifikaciji smo vzorcem dodali 5 µl 10 % Triton X-100 in inkubirali na ledu 15 min. Vzorce smo ponovno centrifugirali pri 14000 obr./min 10 min, nato pa v mikrotitersko ploščico odpipetirali 50 µl vzorca in dodali 150 µl pufra za merjenje, ki smo ga predhodno inkubirali na 37 °C. Mikrotitersko ploščico smo inkubirali 30 min pri 37 °C in potem pomerili absorbanco pri 375 nm in s tem določili vsebnost rumenoobarvanega produkta (2-hidroksimukonski semialdehid).

3.3.7.2 Genske manipulacije v naravnem sevu NRRL2338 (vnos dodatnih kopij in prekinitev genov)

Vnos plazmidne DNA v *E. coli*

- Priprava elektrokompetentnih celic sevov *E. coli*

Sev *E. coli* smo na agarne plošče 2TY nacepili do posameznih kolonij in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo v 7 ml tekočega gojišča 2TY inokulirali zrasle posamezne kolonije. Te smo potem inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C in 200 obr./min. S tako pripravljenim inokulumom (4 ml) smo inokulirali 2 L Erlenmajerjeve steklenice (400 ml gojišča 2TY) in jih gojili 2-3 h na stresalniku pri 37 °C in 220 obr./min. Ko je OD₆₀₀ doseгла vrednost 0,9, so bile celice pripravljene. Celice smo prenesli v kivete, jih postavili za 20 min na led, nato pa jih centrifugirali v ohlajeni centrifugi (4 °C) pri 4000 obr./min 10 min. Po centrifugiranju smo celice 2x sprali z 200 ml in 100 ml dH₂O z 1 mM HEPES pH 7,0 in enkrat z 97,5 ml 10 % glicerolom z 1 mM HEPES pH 7,0. Pri vsakem spiranju smo po resuspendirjanju celice centrifugirali pri 4000 obr./min 10 min na 4 °C. Po zadnjem centrifugiranju so bile celice resuspendirane v 2,5 ml 10 % glicerola/1 mM HEPES ph 7,0. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 40 µl in jih shranili pri -80 °C.

- Transformacija sevov *E. coli*

Plazmidno DNA smo dodali v 40 µl elektrokompetentnih celic seva *E. coli*, nežno premešali s pipeto in prenesli v sterilno elektroporacijsko kiveto. Uporabili smo aparaturo Micro Pulser Bio-Rad. Celice smo izpostavili električni napetosti 2,5 kV z električno kapaciteto 25 µF in upornostjo 200 Ω. Celotni volumen elektroporiranih celic smo prenesli v 0,9 ml gojišča 2TY in jih inkubirali 45 min pri 37 °C, nato pa jih razmazali na agarne plošče 2TY z ustreznim antibiotikom.

Konjugacija sevov *S. erythraea*

Najprej smo pripravili prekonočno kulturo *E. coli* ET12567/pUZ8002. V 10 ml gojišča 2TY z ustreznimi antibiotiki smo inokulirali 3-5 kolonij iz plošče in inkubirali preko noči pri 37 °C in 220 obr./min. Naslednji dan smo ustrezno namnoženo kulturo (1 ml) inokulirali v gojišče 2TY z ustreznimi antibiotiki (20 ml gojišča) in inkubirali pri 37 °C in 220 obr./min dokler kultura ni dosegla OD₆₀₀ 0,4.

Za konjugacijo smo pripravili celice tako, da smo kulturo celic *E. coli* ET12567/pUZ8002 najprej centrifugirali 10 min pri 4500 obr./min in jih nato 2x sprali z gojiščem 2TY (z vmesnimi centrifugiranjimi). Na koncu smo celice resuspendirali v 1 ml 2TY.

Medtem smo odtajali že prej pripravljene in homogenizirane spore bakterije *S. erythraea* NRRL2338 (1 ml). Spore smo 2x sprali z gojiščem 2TY (centrifugirali smo pri 5000 obr./min 5 min) in jih resuspendirali v 1 ml 2TY, nato pa smo jih inkubirali 10 min na 52 °C in jih takoj prenesli na led.

Potem smo spore in celice združili v volumskem razmerju 2:2,5 ter suspenzijo razmazali na agarne plošče SM z 10 mM MgCl₂ in jih inkubirali pri 30 °C. Po cca. 18-20 h smo plošče stehtali in jih prelili z nalidinsko kislino (končna koncentracija 25 µg/g gojišča), ki zavira rast *E. coli*. Po cca. 40 h smo plošče za seleksijski pritisk prelili še z apramicinom (končna koncentracija 50 µg/g gojišča). Konjugante smo inkubirali še nadaljnjih 10-14 dni pri 30 °C, da so zrasle posamezne kolonije.

Molekularne tehnike

- Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli*

Plazmidno DNA iz prekonočne kultrue *E. coli* smo izolirali s pomočjo kompleta GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma). 2 ml kulture smo centrifugirali 2 min pri 12000 obr./min. Supernatant smo zavrgli, celično usedlino pa uporabili za izolacijo plazmidne DNA po navodilih proizvajalca. V zadnjem koraku smo DNA eluirali v 100 µl dH₂O.

- Pomnoževanje DNA *in vitro* s PCR

Za pomnoževanje želenih DNA fragmentov smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Reakcijska mešanica je vsebovala 0,5-1 ng/µl matrične DNA (genomska DNA *S. erythraea* ABE1441), začetne oligonukleotide s koncentracijo 0,4 pmol/µl (vodilni, sledilni), mešanico dNTP (0,2 mM), DMSO (10 %), polimerazni pufer (1,5 mM MgCl₂) in Phusion polimerazo (0,02 U/µl). PCR reakcije smo izvedli v aparaturi Professional Thermocycler (Biometra). Program pomnoževanja je obsegal začetno denaturacijo DNA pri 98 °C, temu sledi 30 ciklov (denaturacija 15 s pri 98 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov 15 s pri 3 °C višji temperaturi od najnižje Tm in podaljševanje verige DNA 30 s/1 kb pri 72 °C). Sledilo je še končno podaljševanje, 10 min pri 72 °C.

- Rezanje DNA z restrikcijskimi plazmidi

Rezanje DNA z restrikcijskimi encimi smo izvedli pri preverjanju plazmidov (končni volumen 10 µl) ali pri pripravi PCR produkta za ligacijo (končni volumen 55 µl). Reakcije so potekale 1-2 h pri 37 °C. Inaktivacijo encimov smo izvedli z inkubacijo 30 min na pri 65 °C ali z nanosom vzorcev na gel.

Preglednica 6: Reakcijska mešanica za rezanje z restrikcijskimi encimi

Table 6: Restriction enzyme reaction mix

Sestavina	Mešanica za preverjanje plazmidov (µl)	Mešanica za pripravo PCR produkta za ligacijo (µl)
DNA	6	44
restrikcijski encim 1	0,5	3
restrikcijski encim 2	0,5	3
FD pufer	1	5,5
dH ₂ O	2	/
Končni volumen	10	55,5

- Ligacija fragmentov DNA

Ligacija fragmentov je običajno potekala v molekularnem razmerju 3:1 (insert:vektor). Običajno smo ligacijo izvajali v 15 µl ligacijske mešanice, v katero smo dodali PCR produkt, plazmidni vektor, T4 ligacijski pufer (Thermo Scientific) (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7,8 pri 25 °C), 1U T4 ligazo (Thermo Scientific) in dH₂O. Ligacijsko mešanico smo inkubirali 4 ure pri sobni temperaturi ali preko noči pri 16 °C.

- Defosforilacija linearnih DNA fragmentov

Defofsforilacijo linearnih DNA fragmentov smo uporabili, kadar smo žeeli preprečiti zlepjanje lineariziranih plazmidov. S 5'-koncev se odstrani fosfatna skupina. V ta namen smo uporabljali alkalno fosfatazo FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) po navodilih proizvajalca Thermo Scientific.

- Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za ločevanje in vizualizacijo fragmentov DNA. Uporabljali smo kadičke Mini-Sub Cel®I GT in Sub-Cell® GT (BioRad).

Pripravljali smo gele z 0,8 % zamreženostjo. Agarozne gele smo pripravili z 1x TAE raztopino. Za barvanje smo uporabili fluorescentno barvilo Sybr® Safe (1 µl/100 ml) (Invitrogen), barvilo smo dodali v gel pred izvedbo elektroforeze. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer (6x agarose gel loading buffer, Fermentas) in jih nanesli na gel. Za lestvico smo uporabili GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) ali MassRuler™ Express Forward DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) (100-10.000 bp).

- Izolacija DNA iz agaroznega gela

Fragmente DNA smo iz agaroznega gela izolirali s pomočjo kompleta "Wizard Promega kit". Izolacija je bila izvedena po navodilih proizvajalca.

- Priprava vzorcev za sekvenciranje

S pomočjo komercialnega kompleta GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma) smo izolirali vzorce za sekvenciranje in podjetju Macrogen (Seoul, Korea) poslali 10 µl plazmida v koncentraciji 70 ng/µl pri sobni temperaturi.

3.3.8 Statistična obdelava podatkov

Vse primerjave pri analizi 2-D gelov so bile izvedene na podlagi štirih (bioloških) ponovitev bioprocesov in treh tehničnih ponovitev. Kot diferencialno izražene proteine smo upoštevali samo tiste, kjer je bilo razmerje normaliziranih volumnov večje od 1,5 in statistično značilno ($p < 0,05$).

Pri preverjanju vpliva manipulacije genov na produkcijo eritromicina smo izvedli dve ločeni kultivaciji z najmanj 20 neodvisnimi kolonijami za vsako gensko mutacijo. Rezultate smo obdelali s programom SAS (SAS Software, version 8.01, 1999) za statistično obdelavo podatkov po postopku GLM (General Linear Models).

4 REZULTATI

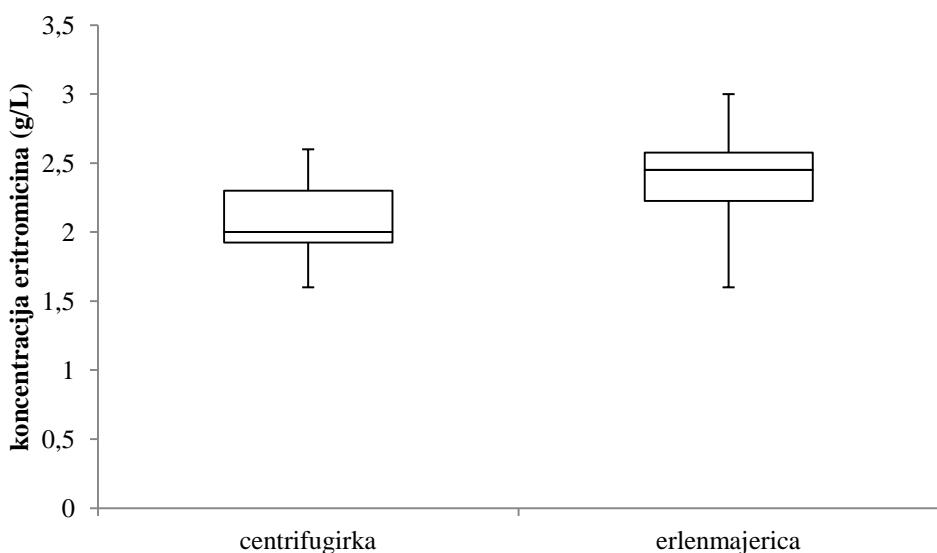
V okviru te doktorske naloge smo preučevali biosintezo eritromicina s proteomskimi in bioinformatskimi orodji. V začetnih korakih smo optimizirali gojišča in pogoje gojenja aktinomicete *S. erythraea* za optimalno produkcijo eritromicina ter prilagodili protemske metode za delo z industrijskimi gojišči. V nadaljevanju smo s pomočjo primerjalne proteomske analize naravnega in visokodonosnega seva *S. erythraea* identificirali gene, ki imajo pomembno vlogo pri produkciji eritromicina. V zaključnem delu eksperimentov pa smo z metabolnim inžineringom izbranih genov (prekomerno izražanje ali prekinitev genov) pripravili rekombinantne seve *S. erythraea* in ugotavliali vpliv genskih sprememb na produkcijo eritromicina.

4.1 OPTIMIZACIJA GOJIŠČ IN POGOJEV GOJENJA *S. erythraea* ZA OPTIMALNO PRODUKCIJO ERITROMICINA

V začetni fazi raziskovalnega dela smo želeli razviti oziroma optimizirati gojišče, ki v veliki meri omogoča povišan donos eritromicina in ob enem omogoča uspešno ekstrakcijo proteinov iz celic *S. erythraea* za proteomsko analizo. Naš cilj je bil tudi čim bolj posnemati industrijske pogoje, saj smo le tako dobili vpogled v relevantne razlike med naravnim sevom NRRL2338 in visoko-donosnim industrijskim sevom ABE1441.

Najprej smo testirali produkcijo eritromicina seva ABE1441 v prilagojenem industrijskem gojišču (ABPM8). Štirinajst neodvisnih kolonij seva ABE1441 smo vzporedno inokulirali v 50-ml centrifugirke in v 250-ml erlenmajerice z gojiščem ABVM1. Po 48 h smo namnoženo kulturo inokulirali v produksijsko gojišče (ABPM8) in po sedmih dneh kultivacije vzorce fermentacijske brozge ekstrahirali z acetonitrilom in pomerili koncentracije eritromicina z metodo HPLC.

Producijo eritromicina seva ABE1441 smo lahko natančno zmerili z metodo HPLC, medtem ko smo produkcijo eritromicina seva NRRL2338 lahko določili le z biološkim testom (koncentracije manjše od 0,5 g/l eritromicina z metodo HPLC nismo mogli natančno določiti).



Slika 17: Producija eritromicina seva ABE1441 v gojišču ABPM8 v centrifugirkah in v erlenmajericah. Polja pravokotnikov obsegajo 95 % vzorčne populacije, horizontalne črte predstavljajo vrednost mediane, vertikalne črte predstavljajo ekstreme (min, max), n = 14.

Figure 17: Erythromycin production of ABE1441 strain in ABPM8 fermentation medium in centrifugation tubes and erlenmeyer flasks. Bars encompass 95 % of sample population, horizontal lines represent median values and perpendicular lines represent extreme values (min, max), n = 14.

Donosi eritromicina v gojišču ABPM8 so bili v povprečju 2,1 g/l ($\pm 0,3$ g/l) v centrifugirkah in 2,4 ($\pm 0,4$ g/l) v erlenmajericah (slika 17).

Industrijska gojišča, ki se uporabljajo za kultivacijo aktinomicet, so gosta in kompleksna, v njih pa je veliko netopnih sestavin, kot sta sojina moka in škrob. Zaradi kompleksnosti sestave lahko industrijska gojišča otežijo izvedbo proteomske analiz. Problem lahko predstavljajo komponente gojišča, saj lahko vsaka kontaminacija z ionskimi detergenti, polisaharidi, lipidi ali nukleotidi vpliva na izoelektrično fokusiranje. Zato smo žeeli preveriti ali bi bilo mogoče uporabiti bolj enostavno produkcijsko gojišče, ki pa bi vseeno omogočalo dovolj visoko produkcijo eritromicina.

V ta namen smo testirali gojišče SCM (Davies in sod., 2000). Poleg osnovne variante gojišča SCM smo pripravili še 2 različici (SCM 2 in SCM 3), kjer smo namesto glukoze dodali kombinacijo glukoze in dekstrina.

SCM 1: 30 g/L glukoze, 6 g/L kvasnega ekstrakta, 4 g/L bakto-peptona, 2 g/L glicina, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,68 g/L KH₂PO₄.

SCM 2: 10 g/L glukoze, 20 g/L dekstrina, 6 g/L kvasnega ekstrakta, 4 g/L bakto-peptona, 2 g/L glicina, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,68 g/L KH₂PO₄.

SCM 3: 20 g/L glukoze, 50 g/L dekstrina, 6 g/L kvasnega ekstrakta, 4 g/L bakto-peptona, 2 g/L glicina, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,68 g/L KH₂PO₄.

Pet neodvisnih kolonij seva ABE1441 smo inokulirali v erlenmajerice z gojiščem ABVM1 in jih po 48 h prenesli v centrifugirke z variacijami gojišča SCM in v gojišče ABPM8 (kontrola). Po 7 dneh kultivacije smo vzorce fermentacijske brozge ekstrahirali z acetonitrilom in z metodo HPLC pomerili koncentracijo eritromicina. Pri vseh treh variantah nismo mogli določiti koncentracije eritromicina, zato smo poskus ponovili in v eno paralelko pred ekstrakcijo dodali 0,5 g/l standarda. Rezultati so navedeni v preglednici 7.

Preglednica 7: Producija eritromicina seva ABE1441 v gojiščih SCM 1, SCM 2, SCM 3 in ABPM8. Oznake vzorcev 1-5, črka a pomeni brez dodatka standarda, črka b pomeni z dodatkom standarda (koncentracije 0,5 g/l).

Table 7: Erythromycin production of ABE1441 strain in different fermentation media, SCM 1, SCM 2, SCM 3, ABPM8. Samples were marked 1-5, letter a meaning without added standard, letter b meaning with added standard (concentration 0,5 g/l).

Oznaka vzorca	Dodatek stand.	Konc. ER (g/l) v SCM 1	Konc. ER (g/l) v SCM 2	Konc. ER (g/l) v SCM 3	Konc. ER (g/l) v ABPM8
1a	0	0	0	0	1,5
1b	0,5	0,5	0,5	0,51	2,0
2a	0	0	0	0	1,8
2b	0,5	0,5	0,5	0,54	2,3
3a	0	0	0	0	1,9
3b	0,5	0,5	0,5	0,51	2,4
4a	0	0	0	0	2,2
4b	0,5	0,5	0,5	0,52	2,7
5a	0	0	0	0	2,0
5b	0,5	0,5	0,5	0,53	2,5

V variantah SCM 1 in SCM 2 še vedno nismo zaznali eritromicina, v varianti SCM 3 pa smo zaznali zelo nizke koncentracije, od 10 do 40 mg/l eritromicina. Za primerjavo smo hkrati iste kolonije inokulirali tudi v gojišče ABPM8, kjer smo pomerili v povprečju 1,9 g/l ($\pm 0,36$ g/l) eritromicina.

Glede na rezultate smo ugotovili, da nobena varianta gojišča SCM ni ustrezna za nadaljnje eksperimente. V variantah SCM 1 in SCM 2 je bila produkcija tako nizka, da je nismo zaznali oz. produkcije sploh ni bilo, v SCM 3 pa je bila produkcija prenizka. V nadalnjih eksperimentih smo delali z industrijskim gojiščem ABPM8.

4.2 POTEK FERMENTACIJE IN DOLOČITEV KONTROLNIH TOČK

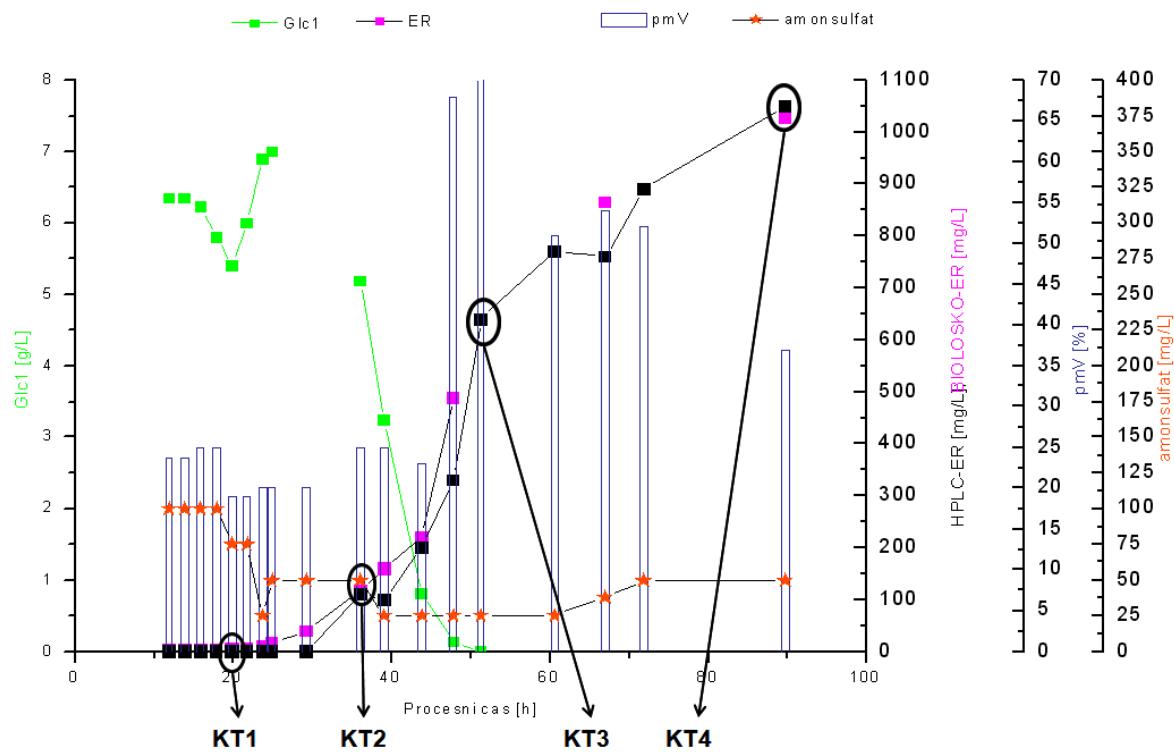
V centrifugirkah in erlenmajericah smo delali eksperimente samo v začetni fazni, ko smo testirali gojišča, v nadaljnjih eksperimentih pa smo fermentacije izvedli v 5-l bioreaktorjih, saj smo že zeleli čim bolj posnemati industrijske pogoje. Bioreaktor smo inokulirali preko dvostopenjskega inokuluma. Inokulum smo pripravili v gojišču ABVM1. Namnoženo kulturo smo nato inokulirali v produkcijsko gojišče ABPM8. Ob inokulaciji smo dodali še 5 % glukozo in 0,83 % n-propanola (podrobnejši opis postopka je v poglavju 3.3.3.3).

Bioprocес je potekal cca. 100 h, pri čemer smo ves čas fermentacije vzorčili fermentacijsko brozgo (na cca. 4-8 h). Spremljali smo pH, koncentracijo kisika v brozgi, koncentracijo glukoze, koncentracijo amonijevega sulfata, celično gostoto (z meritvami PMV, ang. packed mycelium volume) in produkcijsko eritromicina. Na podlagi teh parametrov smo določili točke vzorčenja oz. kontrolne točke (slike 18 in 19), in sicer:

1. pred začetkom produkcije eritromicina (KT1),
2. ob začetku produkcije eritromicina (KT2),
3. faza intenzivne produkcije eritromicina (KT3),
4. ob koncu produkcije eritromicina (KT4).

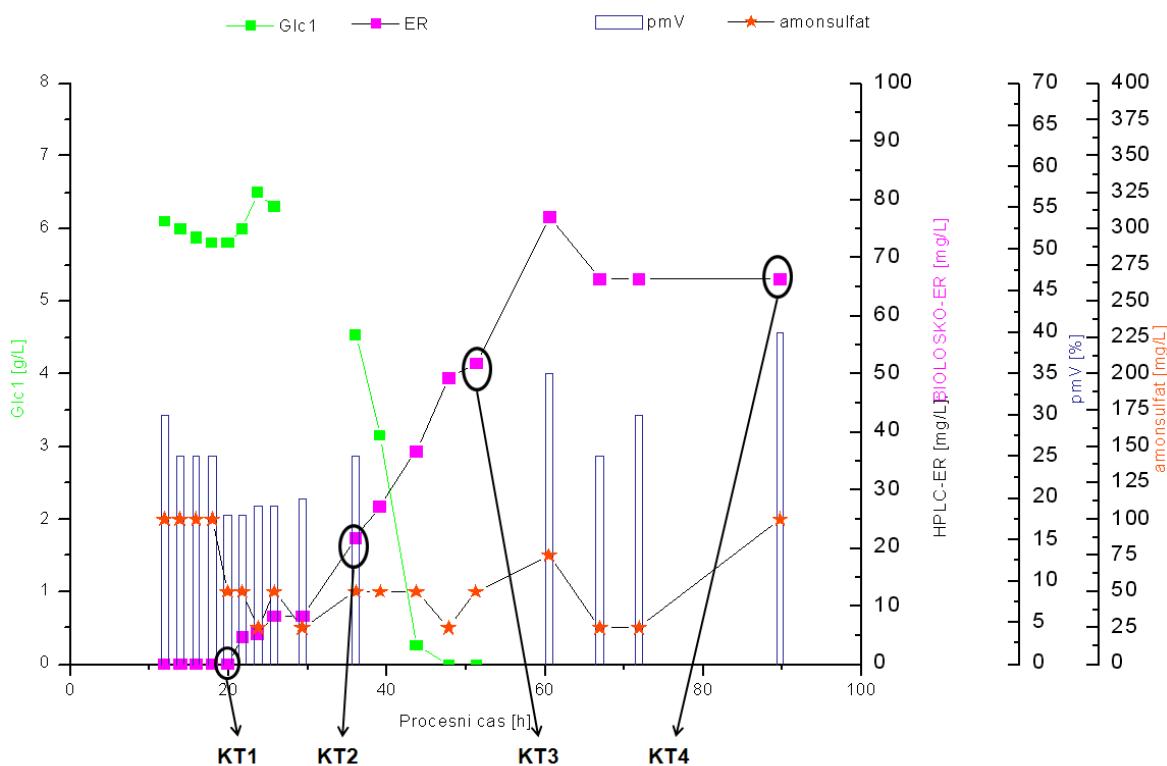
V kontrolnih točkah KT1-KT4 smo pobirali vzorce za proteomske analize.

Bioprocес je potekal v 4 fazah. Prvih 24 ur je potekala lag faza oz. faza prilagajanja (prva časovna točka je bila postavljena ob koncu lag faze, tik pred začetkom produkcije), sledila je faza hitre rasti in porabe glukoze, kjer je potekala največja produkcija eritromicina (druga časovna točka je bila postavljena ob začetku produkcije). Ko se je vsa glukoza v gojišču porabila, so celice prešle v stacionarno fazo rasti, nato pa je sledil ponoven porast produkcije eritromicina (tretja časovna točka je bila postavljena med intenzivno produkcijo eritromicina). Sledila je faza odmiranja, produkcija eritromicina se je zaključila (četrta časovna točka je bila postavljena ob koncu produkcije).



Slika 18: Potek bioprosesa pri visoko-donosnem sevu *S. erythraea* ABE1441; s črnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z metodo HPLC, z vijoličnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z biološkim testom, z zelenimi kvadratki je označena poraba glukoze, z rjavimi zvezdicami je označena koncentracija amonijevega sulfata, modri stolpci pa predstavljajo PMV. Označene so tudi kontrolne točke (KT1-KT4).

Figure 18: Fermentation proces of high-producing *S. erythraea* strain ABE1441; black squares representing erythromycin concentration determined by HPLC, violet squares representing erythromycin concentration determined by diffusion test, green squares representing glucose consumption, brown stars representing ammonium sulphate concentration, blue bars representing PMV. Also time points are marked (KT1-KT4).



Slika 19: Potek bioprocessa pri naravnem sevu *S. erythraea* NRRL2338; z vijoličnimi kvadratki je označena koncentracija eritromicina določena z biološkim testom, z zelenimi kvadratki je označena poraba glukoze, z rjavimi zvezdicami je označena koncentracija amonijevega sulfata, modri stolpcji pa predstavljajo PMV. Označene so tudi kontrolne točke (KT1-KT4).

Figure 19: Fermentation proces of *S. erythraea* wild type NRRL2338; violet squares representing erythromycin concentration determined by diffusion test, green squares representing glucose consumption, brown stars representing ammonium sulphate concentration, blue bars representing PMV. Also time points are marked (KT1-KT4).

Primerjava poteka bioprocessa pri sevih ABE1441 in NRRL2338 je pokazala, da se produkcija pri obeh sevih začne okoli 20-30 h. Med 30 in 50 h bioprocessa smo pri obeh sevih opazili intenzivno porabo glukoze, hkrati pa se je začela intenzivna produkcija eritromicina. Pri sevu ABE1441 je bila produkcija eritromicina v eksponentni fazi rasti hitrejša, poleg tega se je nadaljevala še v stacionarni fazi rasti. Rezultat je bila več kot 10-krat višja produkcija pri sevu ABE1441 v primerjavi s sevom NRRL2338. Pri sevu NRRL2338 se je produkcija ustavila že pri 60 h, medtem ko pri sevu ABE1441 potekala vse do 90 h (sliki 18 in 19).

4.3 OPTIMIZACIJA METODE ZA EKSTRAKCIJO PROTEINOV IZ MIKROBNE BIOMASE

Ker smo pri izvedbi bioprosesov uporabljali industrijska gojišča, ki vsebujejo kompleksne vire ogljika in dušika, je bila optimizacija metode za eksrakcijo proteinov iz mikrobne biomase zelo pomemben korak. V industrijskih gojiščih so namreč prisotni številni

kontaminanti (ionski detergenti, polisaharidi, lipidi ali nukleotidi), ki bi lahko motili 2-D elektroforezo. Poleg tega se je potrebno pri sami pripravi vzorcev izogniti (v kolikor se le da) izgubi proteinov. Zato je bilo zelo pomembno, da smo odstranili vse potencialne kontaminante.

Ekstrakcija proteinov je potekala v več korakih:

- centrifugiranje fermentacijske brozge,
- izpiranje biomase,
- resuspendiranje biomase v raztopini za pripravo celičnih ekstraktov *S. erythraea* (poglavlje 3.1.2.2),
- razbijanje celic,
- končno centrifugiranje,
- (opcionalno) obarjanje proteinov.

Optimizacija je obsegala testiranje različnih hitrosti centrifugiranja pri prvem koraku, testiranje različnih raztopin za izpiranje, testiranje različnih inhibitorjev proteaz v raztopini za pripravo celičnih ekstraktov in testiranje različnih načinov razbijanja celic.

4.3.1 Testiranje različnih hitrosti centrifugiranja pri začetnem centrifugiranju

Na vzorcih fermentacijske brozge smo testirali 5 različnih hitrosti začetnega centrifugiranja, ki so ustrezale različnim centrifugalnim silam: 800 g, 1000 g, 2000 g, 3000 g, 3500 g. Čas centrifugiranja je bil 30 sekund. Iz rezultatov ni razvidnih bistvenih razlik (odstotek variiranja je bil manjši od 5 %), vendar pri višji sili fermentacijska brozga bolje sedimentira, zato smo pri nadaljnjih postopkih uporabili najvišjo silo centrifugiranja (3500 g).

Preverili smo tudi ali so v sedimentu res prisotne celice, zato smo naredili mikroskopski preparat iz supernantna in sedimenta. V supernatantu nismo videli ničesar, v sedimentu pa so bile vidne vse tri značilne oblike: peleti, skupki micelija in prosti micelij (slika 20).



Slika 20: Mikroskopski preparat sedimenta fermentacijske brozge (osebni vir)
Figure 20: Microscopic image of fermentation broth pellet (personal source)

Testirali smo tudi ali s spiranjem sedimenta odstranimo proteine soje. To smo naredili tako, da smo zbirali frakcije po spiranju in merili koncentracijo proteinov po metodi Bradford. Koncentracijo proteinov smo merili v dveh tehničnih ponovitvah (označeni A in B) ter v neinokuliranem gojišču (zanimalo nas je koliko proteinov je v samem gojišču). Rezultati so pokazali, da so bili po prvem spiranju proteini v izpirku še prisotni (tako v izpirku fermentacijske brozge kot tudi v izpirku samega gojišča), v naslednjih izpirkih pa proteinov nismo več zaznali (preglednica 8).

Preglednica 8: Določanje koncentracije proteinov v izpirkih; vzorec A in B sta tehnični ponovitvi fermentacijske brozge, gojišče je neinokulirano gojišče, A595 je izmerjena absorbanca, c je koncentracija proteinov (v g/l).

Table 8: Determining the concentration of proteins in eluate; sample A and B are technical iterations of fermentation broth, medium meaning not inoculated medium, A595 meaning measured absorbance, c meaning protein concentration (in g/l).

pred spiranjem	vzorec A	vzorec B	gojišče
A ₅₉₅	0,38	0,40	0,44
c (g/l)	6,89	7,16	8,07
1. spiranje			
A ₅₉₅	0,05	0,06	0,08
c (g/l)	0,40	0,54	0,93
2. spiranje			
A ₅₉₅	0,00	0,01	0,01
c (g/l)	0,00	0,00	0,00
3. spiranje			
A ₅₉₅	0,00	0,00	0,01
c (g/l)	0,00	0,00	0,00

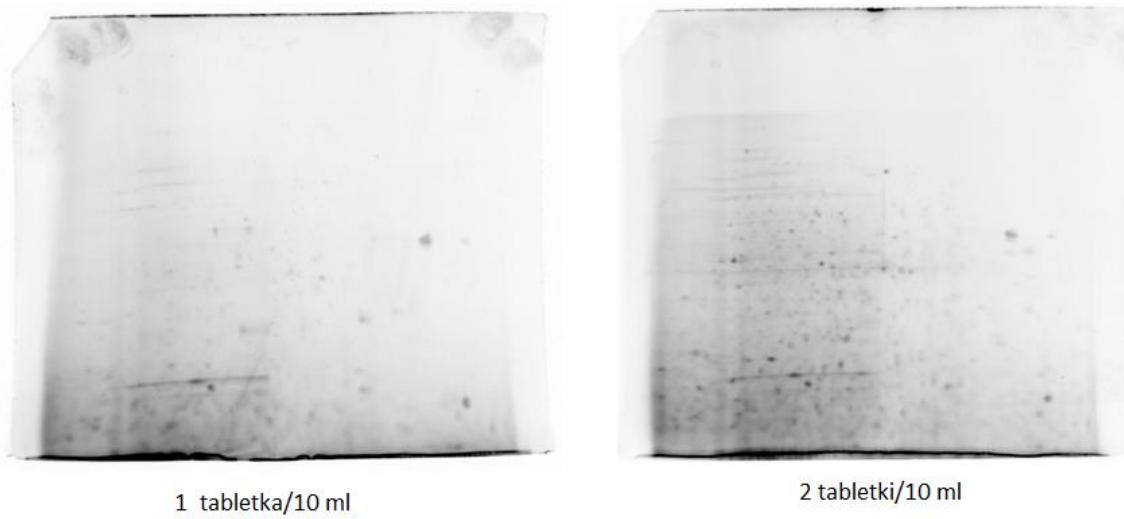
4.3.2 Testiranje različnih raztopin za izpiranje biomase

Testirali smo dve raztopini za izpiranje biomase: raztopino A (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 9,0) in raztopino B (50 mM Tris-HCl, pH 7,2). Iz vzorcev fermentacijske brozge smo naredili ekstrakcijo proteinov in pomerili koncentracijo proteinov po metodi Bradford. Povprečna koncentracija proteinov v primeru, ko smo za izpiranje uporabili raztopino A je bila 1,62 g/l, povprečna koncentracija proteinov v primeru, ko smo za izpiranje uporabili raztopino B pa 2,16 g/l. Zaključili smo da je raztopina B bolj primerna.

4.3.3 Testiranje različnih inhibitorjev proteaz v ekstrakcijski raztopini

Testirali smo 2 komercialna koktejla inhibitorjev proteaz v ekstrakcijski raztopini: tabletka Complete Mini (Roche), 2 varianti 1 tabl./10 ml pufra oz. 2 tabl./10 ml pufra in Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem). Iz vzorcev fermentacijske brozge smo naredili ekstrakcijo proteinov, izvedli 2-DE in na podlagi 2-D gelov zaključili, da so tabletke Complete Mini Roche v koncentraciji 2 tabl./10 ml pufra bolj primerne (slika 21).

Z analizo s programom 2D Dymension smo v prvem primeru (1 tabletka/10 ml) zaznali 207 proteinskih lis, v drugem primeru (2 tabletki/10 ml) pa 427 proteinskih lis.



Slika 21: Testiranje komercialnih koktejlov z inhibitorji proteaz; na sliki levo je prikaz 2-D gela, kjer smo dodali v ekstrakcijsko raztopino 1 tabletko Complete Mini (Roche), na sliki desno pa je prikazan 2-D gel, kjer smo v ekstrakcijsko raztopino dodali 2 tabletki Complete Mini (Roche)

Figure 21: Testing of comercial cocktails with protease inhibitors; left figure respresents 2-D gel with 1 tablet/10 ml Complete Mini (Roche) added in extraction solution, right figure respresents 2-D gel with 2 tablets Complete Mini (Roche) added in extraction solution

4.3.4 Testiranje različnih načinov razbijanja celic

Za razbijanje celic smo testirali različne načine sonikacije: cikel 1/ amplituda 100 %/ 3x15 s; cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s; cikel 0,9/ amplituda 100 %/ 20 s; cikel 0,8/ amplituda 100 %/ 20 s; cikel 0,7/ amplituda 100 %/ 20 s. Iz vzorcev fermentacijske brozge smo naredili ekstrakcijo proteinov in pomerili koncentracijo po metodi Bradford. Najvišje koncentracije proteinov smo dobili, če smo celice razbili z načinom cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s (preglednica 9).

Preglednica 9: Določitev koncentracije proteinov, ekstrahiranih na različne načine (z različnimi načini sonikacije)

Table 9: Determining of protein concentration, proteins were extracted by different means of sonication

Način sonikacije	Koncentracija proteinov (g/l)
cikel 1/ amplituda 100 %/ 3x15 s	1,95
cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s	2,25
cikel 0,9/ amplituda 100 %/ 20 s	2,06
cikel 0,8/ amplituda 100 %/ 20 s	1,57
cikel 0,7/ amplituda 100 %/ 20 s	1,51

4.3.5 Obarjanje proteinov s komercialnim kompletom - 2-D Clean-Up (GE Healthcare)

Po ekstrakciji proteinov je sledilo še obarjanje proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean-Up« (GE Healthcare). S tem smo odstranili prisotne kontaminante, kot so lipidi, nukleinske kisline, ionski detergenti, soli, ki lahko motijo ločevanje in vizualizacijo 2-D gela. Na sliki 22 lahko vidimo, da ima 2-D gel po uporabi komercialnega kompleta manj šuma v ozadju, proteinske lise pa so bolj izrazite.



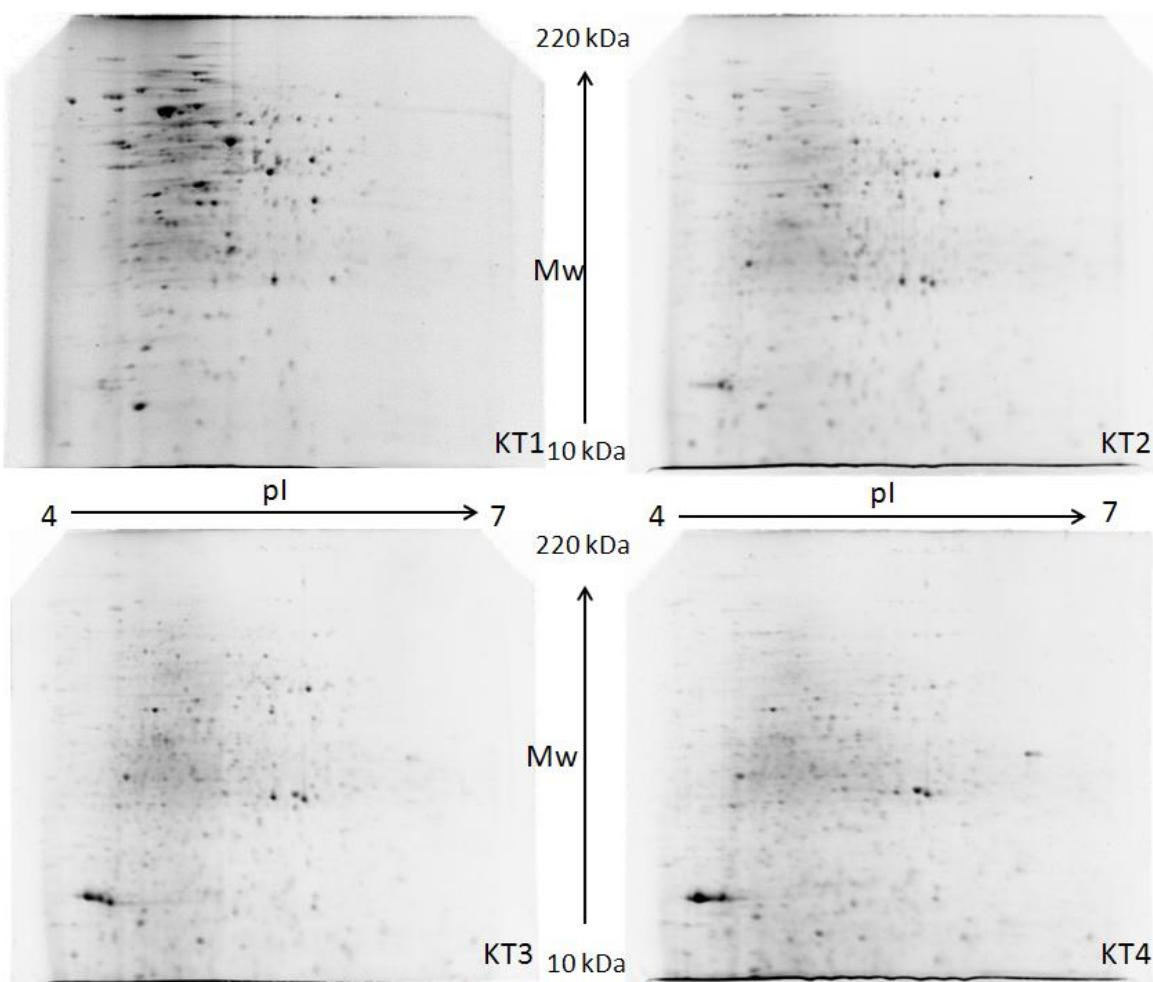
Slika 22: Prikaz 2-D gela pred in po obarjanju proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean Up«
Figure 22: 2-D gels before and after using commercial 2-D Clean Up Kit

4.4 RAČUNALNIŠKA ANALIZA PROTEINSKIH PROFILOV S PROGRAMOM 2-D DYMENSION IN IDENTIFIKACIJA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

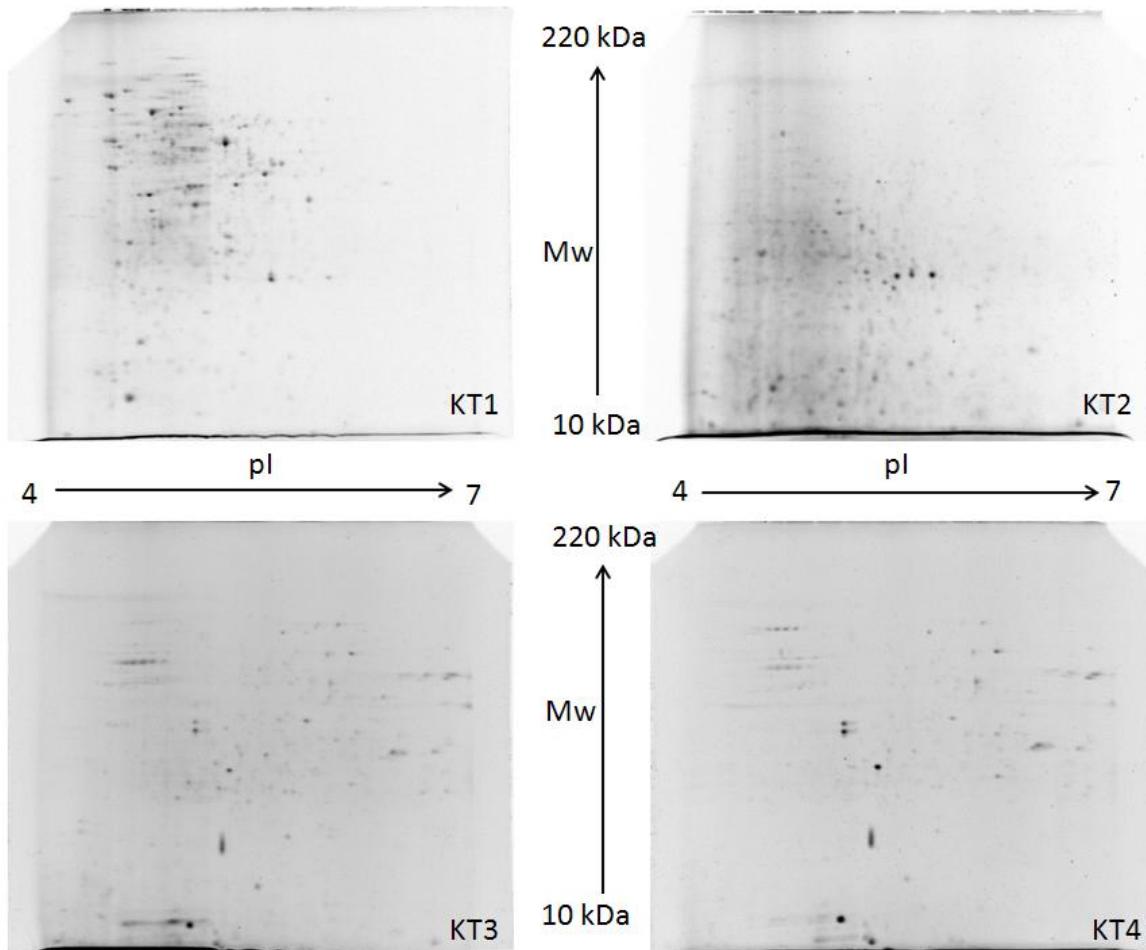
2-D elektroforezo smo izvedli z vzorci seva NRRL2338 in vzorci seva ABE1441 v 4 različnih časovnih točkah. Naredili smo 4 biološke ponovitve (4 ločeni bioprosesi za vsak sev) in 3 tehnične ponovitve za vsak bioprocес. Kot relevantne rezultate smo upoštevali tiste proteine, ki so bili prisotni na vseh bioloških in vseh tehničnih ponovitvah.

4.4.1 Slike 2-D gelov

Na slikah 23 in 24 vidimo proteinski profil seva NRRL2338 oz. ABE1441 v določeni kontrolni točki (KT1, KT2, KT3, KT4). Že s prostim očesom opazimo razlike med sevoma. Proteinski profil seva NRRL2338 se ohrani v vseh štirih KT, pri sevu ABE1441 pa v kontrolnih točkah 3 in 4 opazimo občutno manj proteinov. To smo opazili v obeh bioloških in obeh tehničnih ponovitvah. Yin in sod. (2008) so imeli podoben primer, ki so ga razložili kot posledico močne aktivnosti znotrajceličnih proteaz v srednji in pozni fazи fermentacije (Yin in sod., 2008).



Slika 23: Prikaz 2-D gelov pri sevu NRRL2338 v različnih časovnih točkah
Figure 23: 2-D gels of strain NRRL2338 in different time points



Slika 24: Prikaz 2-D gelov pri sevu ABE1441 v različnih časovnih točkah
Figure 24: 2-D gels of strain ABE1441 in different time points

4.4.2 Primerjave 2-D proteinskih profilov

Sledila je primerjava 2-D profilov med sevoma. V prvi fazi smo naredili ročno primerjavo gelov, nato pa še računalniško obdelavo s programom 2-D Dymension. Primerjali smo profila NRRL2338 in ABE1441 v točkah KT1 in KT2, pri čemer je bil referenčni sev NRRL2338. Največ razlik smo pričakovali v točki KT2. V kasnejših točkah je pri sevu ABE1441 verjetno prišlo do proteolize in primerjava ni bila mogoča oziroma ne bi mogli trditi ali je razlika v profilih posledica fiziološkega stanja ali proteolize.

Diferencialno izražene proteine (120) smo izrezali in identificirali z MS. Proteinske lise smo označili z E1-E120. Identiteta proteinov je prikazana v preglednici 10. Določene številke (E13, E14, E16, E18, E56, E57, E59, E64, E88, E94) v preglednici manjkajo, saj identifikacija z MS ni bila mogoča (prenizka vsebnost proteina v lisi). Torej, od 120 diferencialno izraženih proteinov, smo jih identificirali 110. Po identifikaciji smo

ugotovili, da so nekateri proteini prisotni v večih proteinskih lisah, tako da smo dejansko identificirali 44 različnih proteinov (preglednici 11 in 12).

V preglednici 11 so prikazani diferencialno izraženi proteini, ki smo jih identificirali na podlagi primerjave med sevoma NRRL2338 in ABE1441 v točkah KT1 in KT2 (profil NRRL2338 je referenčni). V preglednici 12 so prikazani proteini, ki smo jih identificirali ali le pri sevu ABE1441 ali le pri sevu NRRL2338.

Funkcijo proteinov smo poiskali v bazah NCBI in Uniprot. Diferencialno izražene proteine smo razvrstili v skupine glede na celične procese s skladu s hierarhijo metabolizma »KEGGPathway«.

Preglednica 10: Rezultati identifikacije proteinov z MS; navedeni so oznaka 2-D lise, ime proteina, pristopna številka v podatkovni bazi NCBI, odstotek v pokritosti AK sekvene ujemanih peptidov v identificiranem peptidu, število identificiranih peptidov najvišjega zadetka in rezultat MASCOT za najvišji oz. najbolj značilen zadetek

Table 10: Results of protein identification with MS; contains information on spot number, protein name, accession number in NCBI database, percentage of amino acid sequence coverage of matched peptides in the identified protein, number of peptides matching the top hit, MASCOT score for the most significant hit

Oznaka 2-D lise	Protein	Št. v bazi NCBI	Pokritost sekvence (%)	Število identif. peptidov	Rezultat MASCOT
E1	superoksid dismutaza (FeSOD I)	gi134097229	60,8	41	145,7
E2	domnevna glikoziltransferaza	gi134098584	12,8	7	31,7
E3	30S ribosomalni protein S1	gi134101930	66,5	152	437,9
E4	30S ribosomalni protein S1	gi134101930	74,1	199	581,4
E5	30S ribosomalni protein S1	gi134101930	23,2	27	124,4
E6	sprožitveni faktor (ang. trigger factor)	gi166229932	70,9	206	752,3
E7	glukoza-6-fosfat izomeraza	gi134098728	70,0	117	335,6
E8	glukoza-6-fosfat izomeraza	gi134098728	20,5	12	40,8
E9	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	gi134102592	83,6	209	649,3
E10	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	gi134102592	55,2	45	166,2
E11	elongacijski faktor Tu (EF-Tu)	gi166222893	77,8	233	912,8
E12	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	gi134098713	64,0	120	336,0
E15	enolaza (2-fosfo-D-glicerat hidro-liaza oz. 2-fosfoglicerat dehidrataza)	gi166232226	69,2	122	376,7
E17	DNA-usmerjena RNA polimeraza podenota alfa (RNAP podenota alfa)	gi158513554	45,4	42	151,7
E19	sukcinil-CoA ligaza podenota beta (sukcinil-CoA sintetaza podenota beta)	gi189081792	77,1	90	321,8
E20	flavoprotein za prenos elektronov, odenota alfa	gi134102633	75,9	54	187,6
E21	3-izopropilmalat dehidrataza, manjša odenota (izopropilmalat izomeraza)	gi166990775	93,5	67	177,9
E22	ketol-acid reduktoizomeraza (alfa-keto- beta-hidroksilacil reduktoizomeraza)	gi166233620	49,1	45	171,5
E23	fosfoglicerat mutaza	gi134103393	68,3	31	92,5
E24	ATP sintaza podenota delta (tipa F)	gi229544706	70,6	66	169,5
E25	domnevna peptidil-prolil cis-trans izomeraza	gi134096652	61,6	41	112,3
E26	domnevna fruktoza-specifična permeaza	gi134098843	57,3	28	80,7
E27	Chain A, Nmr Solution Structure Of Calerythrin, An Ef-Hand Calcium- Binding Protein	gi159162762	63,1	36	102,1
E28	Chain A, Nmr Solution Structure Of Calerythrin, An Ef-Hand Calcium- Binding Protein	gi159162762	47,2	19	51,4
E29	transkripcijski elongacijski faktor greA	gi166200697	68,5	37	113,9
E30	dihidrolipoamid dehidrogenaza	gi134102127	55,2	49	169,0
E31	dihidrolipoil dehidrogenaza	gi134098222	59,7	78	264,7
E32	izocitrat liaza	gi134098035	49,0	76	184,4

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 10: Rezultati identifikacije proteinov z MS; navedeni so oznaka 2-D lise, ime proteina, pristopna številka v podatkovni bazi NCBI, odstotek v pokritosti AK sekvence ujemanih peptidov v identificiranem peptidu, število identificiranih peptidov najvišjega zadetka in rezultat MASCOT za najvišji oz. najbolj značilen zadetek

Oznaka 2-D lise	Protein	Št. v bazi NCBI	Pokritost sekvence (%)	Število identif. peptidov	Rezultat MASCOT
E33	domnevna L-alanin dehidrogenaza	gi134102814	68,5	72	207,5
E34	glukoza-6-fosfat izomeraza	gi134098728	16,8	14	41,4
E35	malat dehidrogenaza	gi152032590	23,5	26	58,4
E36	malat dehidrogenaza	gi152032590	4,3	2	7,7
E37	Metilaza (eryG)	gi581650	29,1	20	53,8
E38	Met(adenozil) metiltransferaza (eryG)	gi228451	19,7	15	40,8
E39	Met(adenozil) metiltransferaza (eryG)	gi228451	25,6	17	41,4
E40	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	gi134098713	42,9	43	137,7
E41	dihidrolipoil dehidrogenaza	gi134098222	26,8	17	70,8
E42	domnevna tiosulfat sulfurtransferaza	gi135827	47,3	61	141,4
E43	sprožitveni faktor (angl. trigger factor)	gi166229932	24,0	32	98,6
E44	NAD-odvisna epimeraza/dehidratazna proteinska družina	gi134097418	34,8	28	60,1
E45	enolaza (2-fosfo-D-glicerat hidro-liaza oz. 2-fosfoglicerat dehidrataza)	gi166232226	23,1	27	92,6
E46	enolaza (2-fosfo-D-glicerat hidro-liaza oz. 2-fosfoglicerat dehidrataza)	gi166232226	20,8	14	46,5
E47	elongacijski faktor Tu (EF-Tu)	gi166222671	27,3	15	38,4
E48	protein HSP20 (stresni protein)	gi134096767	81,3	60	176,1
E49	ATP sintaza podenota delta (tipa F)	gi158513552	14,6	27	58,9
E50	DNA-usmerjena RNA polimeraza podenota alfa (RNAP podenota alfa)	gi160175648	3,6	10	11,1
E51	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	gi134102592	19,0	26	93,6
E52	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	gi134098713	21,7	25	84,0
E53	acetiltransferaza	gi134101844	17,7	8	13,1
E54	lizocim M1 prekurzor	gi134097283	70,2	53	151,3
E55	lizocim M1 prekurzor	gi134097283	70,2	61	173,5
E58	aminopeptidaza	gi291005134	58,0	88	247,5
E60	hipotetični protein SACE_3771	gi134100306	90,2	72	216,7
E61	domnevna alkalna serinska proteaza	gi134100246	38,1	45	119,7
E62	karboksipeptidaza	gi134102229	37,8	36	79,1
E63	sprožitveni faktor (angl. trigger factor)	gi166229932	61,2	92	317,1
E65	30S ribosomalni protein S1	gi134101930	66,1	192	600,8
E66	30S ribosomalni protein S1	gi134101930	36,1	30	123,7
E67	arginil-tRNA sintetaza (arginin-tRNA ligaza)	gi166232837	30,4	33	79,1
E68	elongacijski faktor Tu (EF-Tu)	gi166222893	79,4	285	1081
E69	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	gi134098713	83,3	179	518,6
E70	dihidrolipoamid dehidrogenaza	gi134102127	56,0	61	193

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 10: Rezultati identifikacije proteinov z MS; navedeni so oznaka 2-D lise, ime proteina, pristopna številka v podatkovni bazi NCBI, odstotek v pokritosti AK sekvence ujemanih peptidov v identificiranem peptidu, število identificiranih peptidov najvišjega zadetka in rezultat MASCOT za najvišji oz. najbolj značilen zadetek

Oznaka 2-D lise	Protein	Št. v bazi NCBI	Pokritost sekvence (%)	Število identif. peptidov	Rezultat MASCOT
E71	dihidrolipoil dehidrogenaza	gi134098222	60,5	93	323,8
E72	izocitrat liaza	gi134098035	57,2	78	103,8
E73	inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza	gi134103138	56,5	82	170,9
E74	fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaza	gi134098290	24,7	21	42,6
E75	bifunkcionalna fosforibozilaminoimidazolkarboksiamid formiltransferaza	gi134103094	51,6	51	125,7
E76	fosfoglukonat dehidrataza	gi134098322	44,9	99	145,1
E77	hipotetični protein SACE_6647	gi134103077	63,5	50	111
E78	elongacijski faktor Tu (EF-Tu)	gi166222893	66,0	68	173
E79	F0F1 ATP sintaza podenota beta	gi134102716	40,0	37	83,2
E80	F0F1 ATP sintaza podenota beta	gi134102716	16	9	18,7
E81	riboza-fosfat pirofosfokinaza	gi134097421	13,3	7	11,7
E82	flavodoksin/sintaza dušikovga oksida	gi134099423	37,3	29	34
E83	3-izopropilmalat dehidrataza, manjša podenota (izopropilmalat izomeraza)	gi166990775	93,5	65	116,5
E84	Chain A, Nmr Solution Structure Of Calerythrin, An Ef-Hand Calcium- Binding Protein	gi159162762	89,8	43	67,8
E85	domnevna tiosulfat sulfurtransferaza	gi135827	48,0	74	141,5
E86	ketol-acid reduktoizomeraza (alfa-keto- beta-hidroksilacil reduktoizomeraza)	gi166233620	56,6	50	134,2
E87	kompleks oksidacije maščobnih kislin, podenota alfa	gi134098402	13,6	17	34,4
E89	Met(adenozil) metiltransferaza (eryG)	gi228451	35,4	35	80,3
E90	Met(adenozil) metiltransferaza (eryG)	gi228451	30,2	30	48
E91	dihidrolipoamid sukciniltransferaza	gi134098221	30,4	41	112,1
E92	dihidrolipoamid sukciniltransferaza	gi134098221	27,9	53	130,5
E93	molekularni šaperon DnaK	gi134103632	61,3	100	353
E95	molekularni šaperon DnaK	gi134103632	36,0	24	104,3
E96	delta-1-pirolin-5-karboksilat dehidrogenazni prekurzor	gi134098553	50,9	49	133
E97	fosfodiesteraza/alkalna fosfataza D	gi134097986	44,5	65	207,3
E98	sukcinil-CoA ligaza podenota beta (sukcinil-CoA sintetaza podenota beta)	gi226703522	70,0	67	194,8
E99	sukcinil-CoA ligaza podenota beta (sukcinil-CoA sintetaza podenota beta)	gi189081792	68,9	99	336,6
E100	ribokinaza:karbohidrat kinaza, PfkB	gi134097257	64,7	38	123,9
E101	DNA-usmerjena RNA polimeraza podenota alfa (RNAP podenota alfa)	gi158513554	22,8	28	81,3
E102	Met(adenozil) metiltransferaza (eryG)	gi228451	40,3	67	161,2

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 10: Rezultati identifikacije proteinov z MS; navedeni so oznaka 2-D lise, ime proteina, pristopna številka v podatkovni bazi NCBI, odstotek v pokritosti AK sekvene ujemanih peptidov v identificiranem peptidu, število identificiranih peptidov najvišjega zadetka in rezultat MASCOT za najvišji oz. najbolj značilen zadetek

Oznaka 2-D lise	Protein	Št. v bazi NCBI	Pokritost sekvence (%)	Število identif. peptidov	Rezultat MASCOT
E103	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	gi134098713	35,7	64	173,8
E104	oksidoreduktaza	gi134097305	48,6	40	122,2
E105	hipotetični protein SeryN2_30978	gi291008969	57,8	51	133,7
E106	oksidoreduktaza	gi134097305	77,1	139	455,4
E107	6-fosfofruktokinaza	gi291004294	72,4	68	164,2
E108	4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaza	gi134097503	47,1	53	179,1
E109	sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa	gi134103098	59,4	98	339,9
E110	sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa	gi134103098	39,9	31	109,6
E111	ATP sintetaza podenota delta (tipa F)	gi229544706	74,9	71	173,6
E112	regulator za transport fosfata (PhoU-related protein)	gi134103514	78,6	55	187,7
E113	domnevna tiosulfat sulfurtransferaza	gi135827	29,5	30	67,6
E114	elongacijski faktor Tu (EF-Tu)	gi166222893	48,4	45	166,8
E115	plant-type carbonic anhydrase	gi134097046	52,5	24	69,2
E116	domnevna peptidil-prolil cis-trans izomeraza	gi134096652	58,1	35	106,7
E117	Chain A, Nmr Solution Structure Of Calerythrin, An Ef-Hand Calcium-Binding Protein	gi159162762	73,9	57	175,8
E118	Chain A, Nmr Solution Structure Of Calerythrin, An Ef-Hand Calcium-Binding Protein	gi159162762	51,7	22	70,3
E119	F0F1 ATP sintetaza podenota beta	gi134102716	19,1	37	105
E120	oksidoreduktaza	gi134097305	22,4	15	52,7

Preglednica 11: Diferencialno izraženi proteini v točkah KT1 in KT2, določeni na podlagi primerjave med sevoma NRRL23338 in ABE1441; navedene so oznaka 2-D lise (v ABE1441 in v NRRL23338), ime proteina, številka SACE, razvrstitev glede na celične procese v skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway in povečana/znižana (+/-) ravnen izražanja proteinov glede na kontrolo, sev NRRL23338 (številka pa pove razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension)

Table 11: Differentially expressed proteins in control points KT1 and KT2, determined upon comparison between strains NRRL23338 and ABE1441; contains information on spot number (in ABE1441 and NRRL23338), protein name, SACE number, KEGG Pathway classification, up/down regulation (+/-) of protein (fold change was calculated by the program 2-D Dymension dividing normalised volume of spot by the normalised volume from control gels)

Oznaka 2-D lise		Protein		SACE	Razvrstitev proteinov glede na "KEGG Pathway"	R (KT1)	R (KT2)
v ABE1441	v NRRL23338						
E1		superoksid dismutaza		SACE_0619	drugo	-1,03	-2,00
E2		(domnevna) glikoziltransferaza		SACE_2010	drugo	/	1,95
E19	E98, E99	Sukcinil-CoA ligaza podenota beta (Sukcinil-CoA sintetataza podenota beta)		SACE_6669	metabolizem ogljikovih hidratov	2,05	/
E30	E70	dihidrolipopamid dehidrogenaza		SACE_5677	metabolizem ogljikovih hidratov	-1,86	/
E12, E40, E52	E69, E103	gliceradehid 3-fosfat dehidrogenaza		SACE_2143	metabolizem ogljikovih hidratov	-1,46	1,61
E32	E72	izocitrat liaza		SACE_1449	metabolizem ogljikovih hidratov	-5,45	/
E37, E38, E39, E89, E90	E102	metiltransferaza (eryG)		SACE_0728	metabolizem terpenoidov in poliketidov	/	3,35
E48		stresni protein HSP20 (angl. heat shock)		SACE_0150	zvijanje, sortiranje in raogradija	/	-4,46
E53		acetiltransferaza		SACE_5342	drugo	/	-4,95
E85, E42	E85, E113	(domnevna) tiosulfat sulfurtransferaza (Rhodanese-like protein)		SACE_7106	energijski metabolizem	/	-2,27
E86		Ketol-acid reduktiozomera (lvcC)		SACE_6157	metabolizem aminokislin	/	-7,65
E87		Kompleks oksidacije maščobnih kislín, podenota alfa		SACE_1823	metabolizem lipidov	/	3,22
E24	E111	ATP sintaza podenota delta		SACE_6283	energijski metabolizem	-2,17	/

R pomeni razmerje normaliziranih volumnov ($V_{ABE1441}/V_{NRRL23338}$)

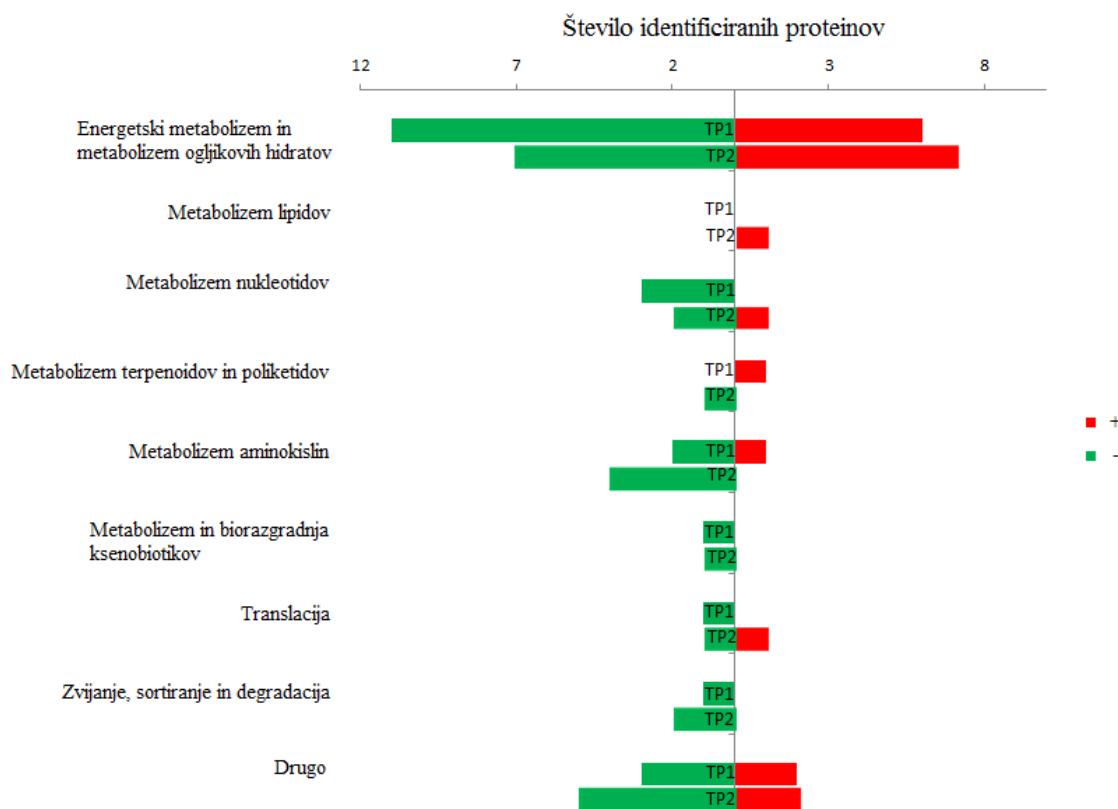
Meje za statistično značilno povečano oz. zano raven izražanja so +1,5 oz. -1,5.

Preglednica 12: Diferencialno izraženi proteini v točkah KT1 in KT2, prisotni ali le pri sevu ABE1441 ali le pri sevu NRRL23338; navedene so oznaka 2-D lisce (v ABE1441 in v NRRL23338), ime proteina, številka SACE, razvrstitev glede na celične procese v skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway in kontrolna točka, v kateri je bil protein identificiran

Table 12: Differentially expressed proteins in control points KT1 and KT2, present only in strain ABE1441 or NRRL23338; contains information on spot number (in ABE1441 and NRRL23338), protein name, SACE number, KEGG Pathway classification and control point in which the protein was identified

Oznaka 2-D lisce v ABE1441	Oznaka 2-D lisce v NRRL23338	Protein	SACE	Razvrstitev proteina glede na "KEGG Pathway"	KT
E7, E8, E34	/	glukoza-6-fosfat izomeraza	SACE_2158	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
E15, E45, E46	/	Enolaza (2-fosfo-D-glicerat hidro-laza oz. 2-fosfoglicerat dehidrataza)	SACE_0838	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
E23	/	fosfoglicerat mutaza	SACE_6967	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1
E35, E36	/	malat dehidrogenaza	SACE_3674	metabolizem ogljikovih hidratov	KT2
E20	/	electron transfer flavoprotein, alpha subunit	SACE_6196	drugo	KT1
E26	/	(domnevna) permeaza specifna za fruktozo	SACE_2274	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1
E29	/	Transcription elongation factor greA (Transcript cleavage factor greA)	SACE_0907	drugo	KT1
E33	/	(domnevna) L-alanine dehidrogenaza	SACE_6380	metabolizem aminokislín	KT1
E9, E10, E51	/	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	SACE_6155	energijski metabolism	KT1, KT2
E44	/	NAD-odvisna epimeraza	SACE_0813	drugo	KT2
E47	/	elongacijski faktor Ts (E-F-Ts)	SACE_6037	transfacija	KT2
E49	/	ATP sintaza podenota alfa	SACE_6282	energijski metabolism	KT2
E50	/	DNA-usmerjena RNA polimeraza podenota beta	SACE_6853	metabolizem nukleotidov	KT2
/	E67	Arginin-tRNA sintetaza	SACE_6300	transfacija	KT1, KT2
/	E73	inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza	SACE_6708	metabolizem nukleotidov	KT1, KT2
/	E74	fosfo-2-dehidro-3-deoksikreptonat aldolaza	SACE_1708	metabolizem nukleotidov	KT1, KT2
/	E75	bifunkcionalna fosforibozilaminonimidazolkarboksamid formiltransferaza	SACE_6664	metabolizem nukleotidov	KT1, KT2
/	E76	fosfoglikonat dehidrataza	SACE_1740	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
/	E79, E80, E119	F0F1 ATP sintaza podenota beta	SACE_6280	energijski metabolism	KT1, KT2
/	E81	riboza-fosfat pirofosfokinaza	SACE_0816	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
/	E82	flavodolskin/nitric oxide synthase	SACE_2881	drugo	KT1, KT2
/	E91, E92	dihidrolipoamid sukciniltransferaza	SACE_1638	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
/	E93, E94, E95	molekularni šaperon Dnak	SACE_7210	zvijanje, soriranje in razgradnja	KT1, KT2
/	E96	delta-1-pirolin-5-karboksilat dehidrogenazni prekurzor	SACE_1979	metabolizem aminokislín	KT1, KT2
/	E97	fosfodiesteraza/alkalina fosfataza D	SACE_1400	metabolizem in biorazgradnja ksenobiotikov	KT1, KT2
/	E104, E106, E120	oksidoreduktaza	SACE_0698	drugo	KT1, KT2
/	E107	6-fosfotrukotinaza	SACE_1704	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
/	E108	4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaza	SACE_0905	metabolizem aminokislín	KT1, KT2
/	E109, E110	sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa	SACE_6668	metabolizem ogljikovih hidratov	KT1, KT2
/	E112	regulator za transport fosfata (PhoU-related protein)	SACE_7091	drugo	KT1, KT2
/	E115	plant-type carbonic anhydrase	SACE_0433	energijski metabolism	KT2

Na sliki 25 je prikazana razvrstitev diferencialno izraženih proteinov v kontrolnih točkah 1 in 2 glede na celične procese s skladu s hierarhijo metabolizma »KEGG Pathway«. Med vsemi identificiranimi proteini jih je največ pripadalo skupini energijskega metabolizma in metabolizma ogljikovih hidratov, tako v kontrolni točki 1 kot tudi v kontrolni točki 2; v kontrolni točki 1 je 6 proteinov z zvišanim nivojem izražanja in 11 proteinov z znižanim nivojem izražanja, v kontrolni točki 2 je 7 proteinov z zvišanim nivojem izražanja in 7 proteinov z znižanim nivojem izražanja. Ostali proteini so bili razvrščeni v skupine metabolizma lipidov, metabolizma nukleotidov, metabolizma terpenoidov in poliketidov, metabolizma aminokislin, metabolizma in biorazgradnje ksenobiotikov, translacije, zvijanja, sortiranja in degradacije proteinov ter drugo.



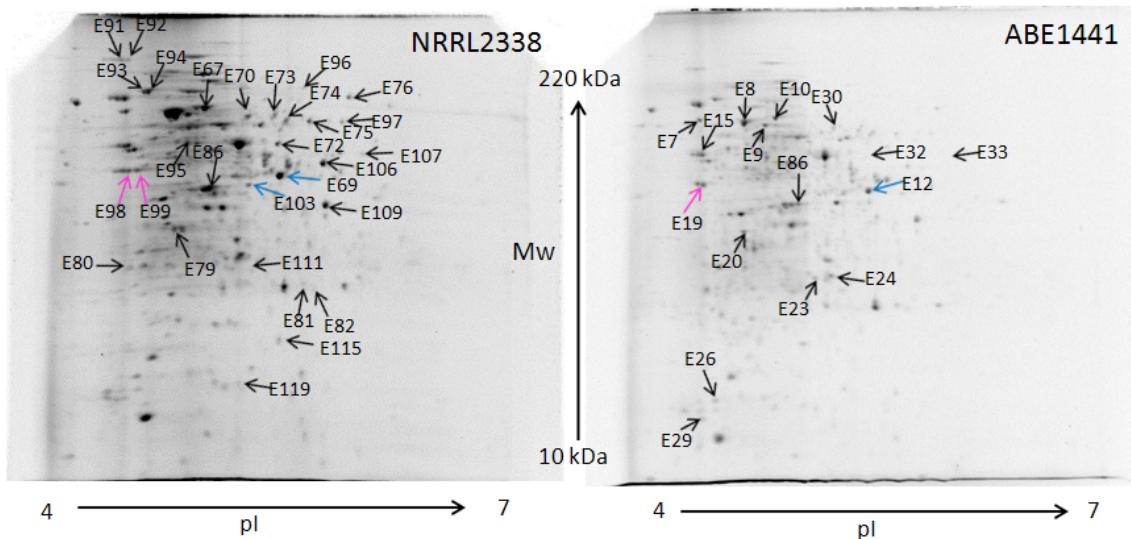
Slika 25: Razvrstitev diferencialno izraženih proteinov v točkah KT1 (TP1) in KT2 (TP2) glede na celične procese s skladu s hierarhijo metabolizma »KEGG Pathway« (zelena barva pomeni znižano raven izražanja, rdeča barva pomeni zvišano raven izražanja)

Figure 25: KEGG Pathway classification of differentially expressed proteins in time points 1 and 2 (green meaning down regulation, red meaning up regulation)

Na slikah 26 in 27 je prikazana primerjava 2-D profilov sevov NRRL2338 in ABE1441 v kontrolnih točkah 1 in 2. S puščicami so označeni diferencialno izraženi proteini (ali gre za povečano oz. znižano raven proteina, je razvidno v preglednici 11).

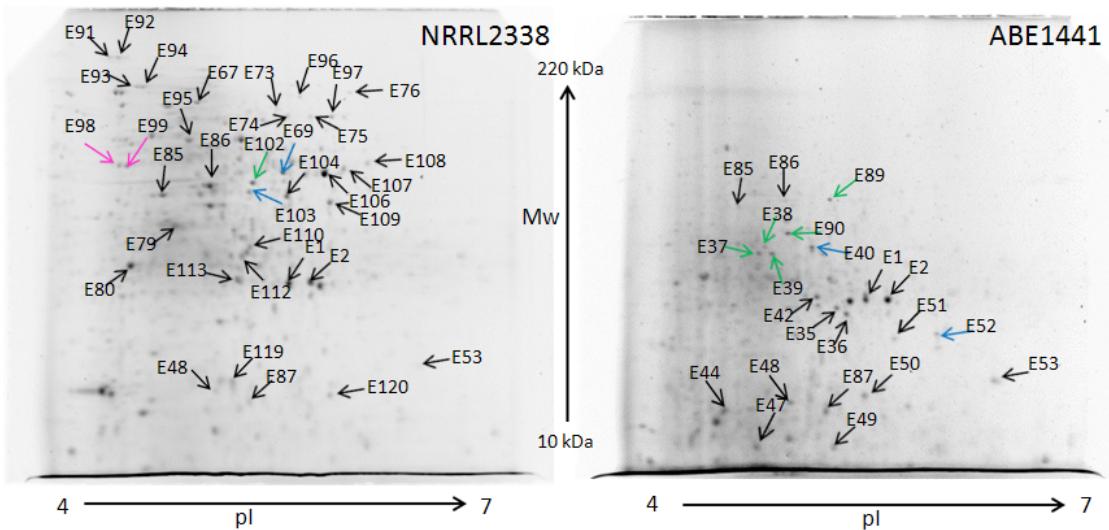
Pri nekaterih proteinih smo ugotovili, da se isti protein nahaja na večih lokacijah 2-D gela, kar verjetno nakazuje na izoblike ali post-translacijske modifikacije: metiltransferaza oz. EryG, beta podenota sukcinil-CoA ligaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, glukoza-6-fosfat izomeraza, enolaza, malat dehidrogenaza, D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza, FOF1 ATP sintaza podenota beta, dihidrolipoamid sukciniltransferaza, molekularni šaperon DnaK, oksidoreduktaza, sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa (preglednici 11 in 12).

Metiltransferaza oz. EryG se v KT2 pri sevu NRRL2338 nahaja na eni lokaciji (E102), pri sevu ABE1441 pa kar na petih različnih lokacijah (E37, E38, E39, E89, E90) (na slikah 27 označen s puščicami zelene barve). Beta podenota sukcinil-CoA ligaze se v KT1 pri sevu NRRL2338 nahaja na dveh lokacijah (E98, E99), pri sevu ABE1441 pa na eni lokaciji (E19) (na slikah 26 in 27 označen s puščicami vijolične barve; v KT2 je protein prisoten samo pri 2D profilu seva NRRL2338). Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza se v KT1 pri sevu NRRL2338 nahaja na dveh lokacijah (E69, E103), pri sevu ABE1441 pa na eni lokaciji (E12), v KT2 pa se pri sevu NRRL2338 nahaja na dveh lokacijah (E69, E103) in pri sevu ABE1441 prav tako na dveh lokacijah (E40, E52) (na slikah 26 in 27 označen s puščicami modre barve).



Slika 26: Primerjava 2-D gelov med sevoma ABE1441 in NRRL2338 v točki KT1 (številke označujejo identificirane proteine, ki so navedeni v preglednici 9)

Figure 26: Comparison of 2-D images between strains ABE1441 and NRRL2338 in time point 1 (numbers correspond to protein spot identification in table 9)



Slika 27: Primerjava 2-D gelov med sevoma ABE1441 in NRRL2338 v točki KT2 (številke označujejo identificirane proteine, ki so navedeni v preglednici 10)

Figure 27: Comparison of 2-D images between strains ABE1441 and NRRL2338 in time point 2 (numbers correspond to protein spot identification in table 10)

4.4.3 Analiza diferencialno izraženih proteinov z metodo spektralnega štetja

V času izvajanja doktorske naloge smo sodelovali tudi v večjem projektu v okviru Kompetenčnega centra Brin (KC Brin), v katerem smo skupaj z drugimi inštitucijami (Acies Bio, Nacionalni inštitut za biologijo, Inštitut Jožef Stefan in Biotehniška fakulteta) z metodami sistemске biologije primerjali naravni in visoko-donosni sev *S. erythraea*. V sklopu KC Brin so raziskovalci na Inštitutu Jožef Stefan izvedli primerjalno proteomsko analizo z metodo spektralnega štetja. Ker smo v nadaljevanju rezultate analize uporabili pri določitvi metabolnih poti oz. mehanizmov, ki so ključni za povečan donos eritromicina v sevu ABE1441, v naslednjem odstavku povzemam njihove ugotovitve.

Zanesljive podatke za proteinske profile smo pridobili le v točkah KT1 in KT2, v točkah KT3 in KT4 je namreč prišlo do obsežne proteolitske razgradnje vzorcev seva ABE1441. Identificirali smo 1000-1400 proteinov na vzorec v vsaki časovni točki. Povečano raven izražanja proteinov v sevu ABE1441 glede na sev NRRL2338 smo ugotovili pri encimih PKS, pri nekaterih encimih, ki sodelujejo pri biosintezi razvezanih aminokislin ter pri proteinih, ki so del biosinteznih poti drugih sekundarnih metabolitov (*pks6* in *tpc4* – genska skupina za biosintezo terpenoidov). Znižano raven izražanja proteinov v sevu ABE1441 glede na sev NRRL2338 smo ugotovili pri encimih, ki sodelujejo v ciklu TCA, ribosomskih proteinih in pri proteinih, ki so del biosinteznih poti drugih sekundarnih metabolitov (*pks2* in *pks8*).

4.5 BIOINFORMATSKE ANALIZE

Kot sem že omenila smo v času izvajanja doktorske naloge v okviru KC Brin sodelovali z drugimi inštitucijami (Acies Bio, Nacionalni inštitut za biologijo, Inštitut Jožef Stefan in Biotehniška fakulteta) in z metodami sistemске biologije primerjali naravni in visokodonosni sev *S. erythraea*. Poleg diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali z 2-DE (poglavlje 4.4.2) in z metodo spektralnega štetja (poglavlje 4.4.3) smo v sklopu primerjalne transkriptomske analize identificirali gene, ki se v sevih različno izražajo. Rezultate vseh omskih metod smo integrirali v skupno preglednico in na njeni podlagi skušali identificirati metabolne poti oz. mehanizme, ki so ključni za povečan donos eritromicina v sevu ABE1441. Na osnovi analiz smo postavili hipotezo, da ima pri donosu eritromicina pomembno vlogo alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko razgradnje razvejanih aminokislin. Tudi v literaturi smo zasledili indikacije za oskrbo s substrati preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin (Carata in sod., 2009). Predlagana alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev je prikazana na sliki 28. Ključni geni oz. operoni te poti so *ilvB1*, operon *bkd* in operon *mms*.

V preglednici 13 so prikazani rezultati primerjalne transkriptomske analize, ki so jih v okviru sodelovanja KC Brin pridobili sodelavci Nacionalnega inštituta za biologijo. Navedene vrednosti predstavljajo raven izražanja določenega gena v sevu ABE1441 v primerjavi s sevom NRRL2338 (referenčni sev). Pozitivne vrednosti pomenijo povečano raven izražanja (bolj intenzivna rdeča barva pomeni večjo raven izražanja), negativne vrednosti pomenijo znižano raven izražanja (bolj intenzivna zelena barva pomeni nižjo raven izražanja).

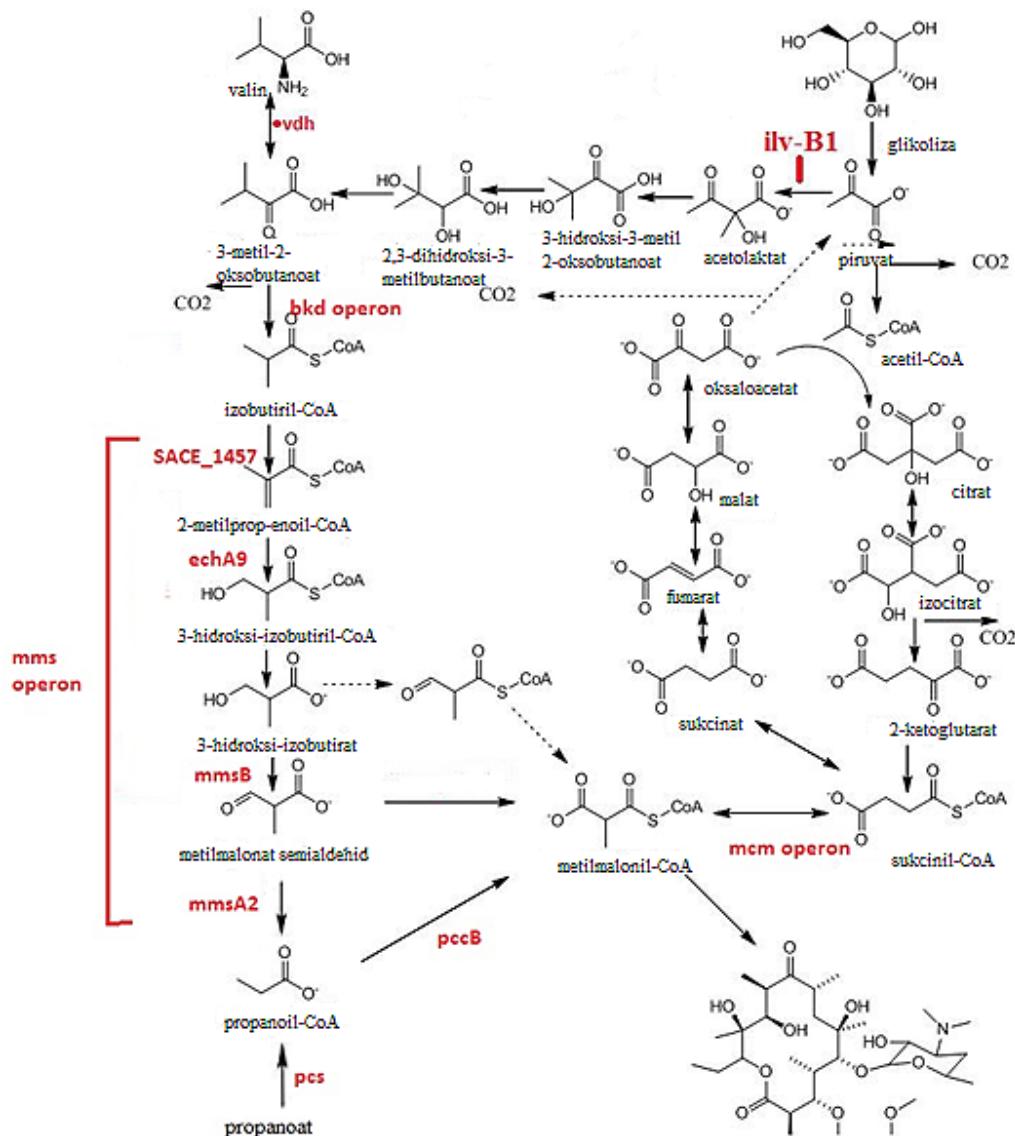
Raven izražanja gena *ilvB1* in operona *bkd* je bila pri sevu ABE1441 v vseh štirih kontrolnih točkah povečana v primerjavi z referenčnim sevom NRRL2338. Raven izražanja operona *mms* je bila v sevu ABE1441 znižana v primerjavi z referenčnim sevom (v kontrolnih točkah 2, 3 in 4). Te gene oz. njihove produkte smo podrobnejše preučili z bioinformatskimi orodji.

Preglednica 13: Rezultati primerjalne transkriptomske analize (pridobljeni v okviru KC Brin) za ključne gene predlagane alternativne poti za produkcijo eritomicinskih prekurzorjev; navedeni so ime gena, št. SACE, ime encima in raven izražanja gena v sevu ABE1441 v primerjavi z izražanjem gena v sevu NRRL2338 v štirih kontrolnih točkah.

Table 13: Results of comparative transcriptomic analysis (obtained in the context of KC Brin) for key genes of proposed alternative pathway for erythromycin precursor production; contains information on gene name, SACE number, enzyme name and (up/down) regulation of particular gene in strain ABE1441 compared to strain NRRL2338.

Gen/operon	SACE	Ime encima	Razmerje izražanja genov*			
			KT1	KT2	KT3	KT4
<i>ilvB1</i>	SACE_4565	acetolaktat sintaza	1,91	5,79	5,39	2,03
	SACE_1456	metilmalonat semialdehid dehidrogenaza	0,12	-1,29	-1,13	-0,69
<i>mmsOp1</i>	SACE_1457	acil-CoA dehidrogenaza	0,51	-1,02	-0,57	-0,69
	SACE_1458	enoil-CoA hidrataza	-0,32	-0,91	0,21	-0,92
	SACE_1459	3-hidroksibutirat dehidrogenaza	0,04	-0,28	0,4	-0,05
<i>bkdOp</i>	SACE_3952		0,32	0,56	1,26	1,26
	SACE_3953	dehidrogenaza razvejanih keto kislin	0,54	1,74	2,60	2,29
	SACE_3954		0,31	0,32	0,42	0,90
<i>mmsOp2</i>	SACE_4672	metilmalonat semialdehid dehidrogenaza	-0,32	1,49	1,11	0,42
	SACE_4673	aminotransferaza razreda III	0,07	3,15	3,27	1,43

* razmerje izražanja genov v sevu ABE1441 glede na referenčni sev NRRL2338



Slika 28: Predlagana alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislín

Figure 28: Schematic representation of the proposed alternative pathway for erythromycin precursor production via biosynthesis and degradation of branched aminoacids

V naslednjem koraku smo z bioinformatskimi orodji podrobneje analizirali gene/odprte bralne okvirje, ki so se v primerjalni analizi pokazali kot diferencialno izraženi. Na podlagi bioinformatskih analiz smo nato izbrali gene za poskuse čezmernega izražanja v *S. erythraea* (poglavje 4.7).

4.5.1 Analiza gena *ilvB1*

Produkt gena *ilvB1* (SACE_4565), ki je pokazal diferencialno izražanje tako na nivoju transkriptoma kot proteoma, obsega 556 AK in je bil v času anotiranja genoma *S. erythraea* identificiran kot verjetni homolog acetolaktat sintaze (Oliynyk in sod., 2007) z EC oznako 2.2.1.6. Acetolaktat sintaza sodi v družino encimov TPP - metabolni encimi, ki potrebujejo kofaktor tiamin pirofosfat (TPP). Acetolaktat sintaza sodeluje pri biosintezi aminokisline valin. Katalizira pretvorbo piruvata v 2-acetolaktat (slika 28).

Aminokislinsko zaporedje SACE_4565 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov aktinobakterij, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga B). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Kitasatospora mediocidica* (56 % identičnost), *Streptomyces albus* (54 % identičnost) in *Streptomyces auratus* (53 % identičnost), prav tako anotirani kot acetolaktat sintaze. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je acetolaktat sintaza (ang. acetohydroxy acid synthase) iz bakterije *Mycobacterium tuberculosis* (Choi in sod., 2005), ki s produktom gena SACE_4565 kaže 48 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_4565 acetolaktat sintaza, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov. Poravnali smo aminokislinska zaporedja acetolaktat sintaz različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_4565. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni v 4 od 7 aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov (slika 29).

<i>S.erythraea</i>	364	EVVETIA.	[6]	.ATVVVSD.	[28]	.MGFSGAGLGAAC.	[5]	.TYVLAGDGSE.	[3]	.GMEVHTA.	[5]	.PVTEVIFNNNN	463
<i>M.tuberculosis</i>	373	ELMHELD.	[6]	.ATICAD.	[28]	.MGCGIAGAIGVAL.	[6]	.VICIAGDGAF.	[3]	.GTEISTA.	[5]	.RVTWAVLNND	473
<i>Sulfitobacter</i>	375	VALCQIR.	[6]	.TIVTLID.	[27]	.MGYSPAGVSAL.	[6]	.VLSFVGDDGF.	[3]	.GQELATA.	[5]	.TPIVLLFNNG	474
<i>M.loti</i>	365	PIMTYLE.	[6]	.AIFANG.	[27]	.MGYGTFAAAVAKA.	[6]	.VIAFAGDGCF.	[3]	.GQEFTAA.	[5]	.PIIVIVVNNG	464
<i>B.linens</i>	366	QLCGALN.	[9]	.VIVAAD.	[29]	.LGYSLPAGIGAKL.	[6]	.VVAIEGDGGA.	[3]	.IAELAAA.	[5]	.SMSLIIIVDNG	470
<i>S.coelicolor</i>	386	DVLAAVR.	[6]	.APSEWD.	[28]	.LGYAFFAALGAAA.	[6]	.VLAWSGDGGA.	[3]	.IAELATA.	[5]	.NVTWLIVDNG	486
<i>S.erythraea</i>	464	S.	[24]	.DIGAGVA.	[4]	.GLRATT.	[5]	.ELRAFL.	[8]	.PCLVSVEM	532		
<i>M.tuberculosis</i>	474	Q.	[23]	.DLAMAR.	[2]	.GAEGIRR.	[5]	.ELRAGV.	[8]	.PCVLDIAI	539		
<i>Sulfitobacter</i>	475	I.	[24]	.DFCKMAE.	[2]	.GAHAER.	[5]	.DFAAAF.	[8]	.PALIELVT	541		
<i>M.loti</i>	465	I.	[24]	.DFASLAR.	[2]	.GGHGET.	[5]	.DFAPAF.	[8]	.PAIVEIRI	531		
<i>B.linens</i>	471	G.	[23]	.DFPALAE.	[2]	.GARGLH.	[5]	.QLATAL.	[8]	.PTLIHMTE	536		
<i>S.coelicolor</i>	487	G.	[25]	.DFVALAE.	[2]	.GVPGVVR.	[8]	.DLAKAL.	[4]	.PSVVVLPA	553		

Slika 29: Poravnavo aminokislinskega zaporedja acetolaktat sinzate iz *S. erythraea* (SACE_4565) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TPP-vezavnih mest)

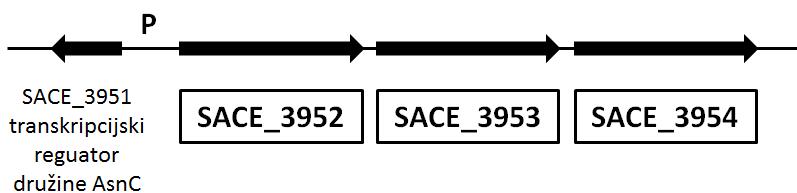
Figure 29: Alignment of the aminoacid sequence of the acetolactate synthase from *S. erythraea* (SACE_4565) with aminoacid sequence from other organisms (TPP-binding sites residues are marked with yellow color)

Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_4565. Analiza BLASTP je pokazala 50 % identičnost s produktom gena SACE_3465, ki je bil v času anotacije genoma prav tako identificiran kot verjetna acetolaktat sintaza (Oliynyk in sod., 2007).

4.5.2 Analiza operona *bkd*

Naslednja skupina genov (SACE_3952 – SACE_3954), ki je vključena v alternativno pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev, kodira encim za razgradnjo razvejanih keto kislin (ang. branched-chain α -keto acid dehydrogenase). Omenjeno skupino genov smo poimenovali »operon *bkd*«. Operon *bkd* smo najprej analizirali z bioinformatskimi orodji (BLASTP, poravnava Clustal) in ugotovili, da bi ti geni lahko kodirali piruvat dehidrogenazo (PDH) ali dehidrogenazo razvejanih keto kislin (BKD). Zaradi velike podobnosti aminokislinskih zaporedij genov *bkd* in *pdh* samo na podlagi analize zaporedij ni mogoče ugotoviti, ali geni SACE_3952 – SACE_3954 kodirajo podenote encime BKD ali PDH.

V organizmu *S. erythraea* je več encimov BKD oz. PDH, zato smo potem v analizo vzeli celotni operon skupaj z oklico. Encim BKD je sestavljen iz večih podenot: E1- α in E1- β (dehidrogenazna in dekarboksilazna aktivnost), E2 (aciltransferazna aktivnost) in E3 (dehidrogenazna aktivnost). Pri streptomicetah aktivnost podenote E3 ni povezana z isto gensko skupino in se verjetno nahaja drugje v genomu. Sprusansky in sod. (2005) so ugotovili, da ima *S. coelicolor* dve genski skupini, ki kodirata BKD (aktinomicete so edina skupina bakterij, ki ima več genskih skupin, ki kodirajo encim BKD), a le eno, ki je regulirana s transkripcijskim regulatorjem *bkdr*. Tudi v okolini genske skupine SACE_3952 – SACE_3954 se nahaja transkripcijski regulator iz družine AsnC (slika 30) (Oliynyk in sod., 2007). Na podlagi tega smo določili, da najverjetneje genska skupina SACE_3952 – SACE_3954 oz. operon *bkd* kodira encim BKD in ne PDH.



Slika 30: Organizacija genov v operonu *bkd*; SACE_3952 kodira alfa podenoto dehidrogenaze E1, SACE_3953 kodira beta podenoto dehidrogenaze E1, SACE_3954 kodira (domnevno) dihidrolipoamid aciltransferazo, komponento E2.

Figure 30: Genetic map of *bkd* operon region; SACE_3952 encodes dehydrogenase E1 component alpha subunit, SACE_3953 encodes dehydrogenase E1 component beta subunit, SACE_3954 encodes putative dihydrolipoamide acyltransferase component E2.

Dehidrogenaza razvejanih keto kislin E1, podenota alfa

Produkt gena SACE_3952, ki je pokazal diferencialno izražanje tako na nivoju transkriptoma kot proteoma, obsega 361 AK in je bil v času anotiranja genoma *S. erythraea* identificiran kot verjetni homolog alfa podenote dehidrogenaze razvejanih keto kislin E1 (Oliynyk in sod., 2007) z oznako EC 1.2.4.1. Sodi v družino encimov TPP.

Aminokislinsko zaporedje SACE_3952 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še

poravnava Clustal (priloga C). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharothrix espanaensis* (76 % identičnost), *Actinosynnema mirum* (73 % identičnost) in *Amycolatopsis benzoatilytica* (70 % identičnost), in so anotirani kot piruvat dehidrogenaza E1, podenota alfa. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je alfa podenota piruvat dehidrogenaze E1 iz *Pseudomonas aeruginosa* (Jeyaseelan in sod., 1980), ki s produktom gena SACE_3952 kaže 43 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_3952 alfa podenota dehidrogenaze razvezjanih keto kislin E1, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov; družino TPP encimov sestavlajo encimi podobni E1 podenoti piruvat dehidrogenaznega kompleksa, acetoin dehidrogenaznega kompleksa in dehidrogenaznega kompleksa za razgradnjo keto kislin. Kot sem že omenila sta si encima BKD in PDH zelo podobna. Poravnali smo aminokislinska zaporedja PDH/BKD različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_3952. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni v 6 od 11 aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov (slika 31).

S.erythraea	40	LHRRMVVGRRFDTQATALTKQGRLA.[1].YPSRGQEACQVGAVLAEE.[1].DWLFPTYRDSVALVSRG.[2].PVQ	108
D.radiodurans	48	LHRLMLQGREGFRKLITLRLQRGRTS.[1].YSQASGMEATQIGLAKAIRA.[2].DWVWGGYYRDQVLMGMLG.[2].MFT	117
Staphylococcus	17	IYKWMMDLGRKTDERLWLNNRAGKIP.[1].VVSGQQGEATQIGMAYAMQK.[1].DISSFPYRDLAFVTYMG.[2].PLD	85
E.faecalis	19	AYREVLRGRRRLDERLWQLTRIGKTS.[1].NISGQGAEVAVAMAMAFDP.[2].DYFLPPYYRDMTACLVWG.[2].SKD	88
C.pneumoniae	15	VLKLVWELRFAEHKMLLLSRQSGSG.[3].QLSCAGHELAGVLAGKSLIP.[2].DWSFPYYRDQGFPIGLG.[2].LSE	86
P.putida	79	GXRAXLKTIFDSRXVVAQRQKKXS.[1].YXQSLGEAAIGSGQALALNR.[1].DXCFPTYRQQSILXARD.[2].LVE	147
S.thermophilum	17	IYRWMLLTRLRDERLGVLQRSGAIP.[1].ALSSRGHEAAQVGAALAFAR.[2].DWWFPYYRDGLGAVLVAG.[2].PLD	86
S.erythraea	109	TLTLL.[13].RVGPQCETPATNTLHAVGMAHAARLKGEDSVSLVLLGDGATSEGDTHEALNFAGVWQAPVVFV	190
D.radiodurans	118	LISQC.[22].NFVSASSSIASQVPPAAGNARAQKYLGTDEITVVTFGDGATSEGDWHTGMNMAGAMQAPCLFVC	208
Staphylococcus	86	TMLSA.[23].GILSQSSSPVATQIPHSGVAALALKMDNKPNIATATVCEGGSNNQGDFHEGMNEAAVHKLPFVCVI	177
E.faecalis	89	IILMSA.[23].NIVFSSTSITSTQMPLATGVGYAAQLKQADFVALTTGEGSANQGEVQEAMNFGAVVKKLPVIFVV	180
C.pneumoniae	87	IFASF.[23].RICCQSSSVVGTQFLQAAGRRAVAKHSSADEVVYVSGGDGATSQGEFHEMLNEVALHQLPLITVI	178
P.putida	148	XICQL.[22].GFFTISQGATQFQAVGVWAXASAIGDKTKIASAWIGDDATAESDFHTALTFAHVYRAPVILNV	238
S.thermophilum	87	VMLSS.[23].NIVARSAPYGVQIPQAVGVQAQAVRRGDPIVVYCSFCEGAASQGDFHEGLNWAALHRLPVIFFC	178
S.erythraea	191	QNNGYAIISVPMS.[6].SLAHKG.[2].GVASELIDGNPAAVYTTVREAVAAR.[3].GPALIEALTYRVEAHT	263
D.radiodurans	209	ENNGWAISTHIR.[8].HIKAKAY GMPGFYVDGNDDVAVMEVCHAAEWVR.[3].GPALVECLTYRVGSHS	281
Staphylococcus	178	INNNKAISVPDS.[6].KLSDRAL.[2].GMHGIQVDGNPDAIYVYKAMKEARERAL.[3].GPTLIEAVTSRMTPHS	250
E.faecalis	181	ENNEYAIISVPIE.[6].RMADRAK.[2].GFEGVTVDGSDFTEVYLAFKEAARKAAR.[3].GPKLIELMVSRLTSHS	253
C.pneumoniae	179	QNHHWAISVPFE.[2].CGADLAS.[6].GLAVYEVDGGNYTSLTETFSHAVDQAR.[3].VPALILIDVVRLSSHS	251
P.putida	239	VNNQWAISTFQA.[7].TFAGRGV.[2].GIASLRVGDNDFVAVYAAASRWAERAR.[3].GPSLIEWVTYRAGPHS	312
S.thermophilum	179	QNNGWAISVPLS.[6].SVAARA.[2].GIEGVSLDGTDPFAVHAAVRAVVRAR.[3].GPALIEARVHRLDPHT	251
S.erythraea	264	[1].ADDANRYRDAG.[7].KDPVDRLERHLT.[29].323	
D.radiodurans	282	[3].ADAEGKSYRTRD.[7].RDP1QRVENILLE.[29].343	
Staphylococcus	251	SDDDDTYRTKET.[7].EDCNIKFKTALL.[28].308	
E.faecalis	254	[1].DDDQSIVRSKE.[7].NDAVKLFEKOLL.[28].312	
C.pneumoniae	252	[1].SDNQEKYRSAL.[7].KDPLILLEKEAI.[28].310	
P.putida	313	[1].SDDPSKYRPAD.[7].GDPIALRKQHLI.[28].371	
S.thermophilum	252	[1].DDNHAAYRTGA.[7].ADPLPAVADYLR.[28].310	

Slika 31: Poravnava aminokislinskega zaporedja SACE_3952 z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TPP-vezavnih mest)

Figure 31: Alignment of the aminoacid sequence of SACE_3952 with aminoacid sequence from other organisms (TPP-binding sites residues are marked with yellow color)

Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_3952. Analiza BLASTP je pokazala 56 % identičnost s

produktom gena SACE_5542 (*bkdA*) in 40 % identičnost s produktom gena SACE_7294, ki sta bila v času anotacije genoma identificirana kot verjetna alfa podenota dehidrogenaze E1 (Oliynyk in sod., 2007).

Dehidrogenaza razvejanih keto kislin E1, podenota beta

Produkt gena SACE_3953, ki je pokazal diferencialno izražanje tako na nivoju transkriptoma kot proteoma, obsega 333 AK in je bil v času anotiranja genoma *S. erythraea* identificiran kot verjetni homolog beta podenote dehidrogenaze razvejanih keto kislin E1 (Oliynyk in sod., 2007).

Aminokislinsko zaporedje SACE_3953 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga D). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharothrix espanaensis* (85 % identičnost), *Amycolatopsis orientalis* (82 % identičnost) in *Amycolatopsis decaplanina* (81 % identičnost), anotirani kot piruvat dehidrogenaza E1, podenota beta. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je beta podenota piruvat dehidrogenaze E1 iz *Pseudomonas aeruginosa* (Jeyaseelan in sod., 1980), ki s produktom gena SACE_3953 kaže 49 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_3953 beta podenota dehidrogenaze E1, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov. Poravnali smo aminokislinska zaporedja PDH/BKD različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_3953. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni v 4 od 5 aminokislinskih preostankov v TPP-vezavnih mestih na ohranjeni domeni družine TPP encimov (slika 32).

S.ery(SACE_3953)	3	. [1]. ALNRALADALEADD. [1]. VLVPFGED. [8]. RVTDTPLAESGIVGTAIGMAMNGLRPVV	74
S.avermitilis	13	. [1]. ALTRALRDAMARDP. [1]. VHVMGED. [8]. RVTDTPLAESGILGTAVGMAMMYGLRPVV	84
P. irgensii	8	. [1]. AICEAMSEEMRDE. [1]. IYLMGEE. [8]. KASKGMLDEFG. [2]. RVVDTPIAELGFAGIAIGSAMNGNRPIV	79
R. xylanophilus	8	. [1]. AIHDALAEEMRSDE. [1]. VMVLGED. [8]. RITEGLQEEFG. [2]. RVLDTPLAESLIVGSAIGLSVNGMRFVA	79
S.ery(SACE_5675)	8	. [1]. ALHDLTREEMLRDE. [1]. VLLIGEE. [8]. KITAGLILKEFG. [2]. RVRDTPIAEEGFVUGAAIGAAMLGLRPVV	79
Hydrogenivirga	5	. [1]. ALNKAMDELMEKDK. [1]. IVILGED. [8]. RVTGEGLYAKYG. [2]. RVIDTPIAENSIVGNNAVGMIAIGGLRPVA	76
S.ery(SACE_3953)	75	EMQ. [1]. DA FAY PAFEQITSHLAKLRRN. [2]. RGRVELPVVIRIPYGGG. [2]. GVEHHC. [2]. SEVYYHTPGLRVV	141
S.avermitilis	85	EMQ. [1]. DA FAY PAFEQLISHVARMRN. [2]. RGAMPPLPITIRVPYGGG. [2]. GVEHHHS. [2]. SEAYYMATPGLHVV	151
P. irgensii	80	EYM. [1]. FN FSL VGIDQIINNAAKIRQ. [2]. GGQFNCPIVFRGPTASA. [2]. LGATHS. [2]. FENWFANTPGLKV	146
R. xylanophilus	80	EIQ. [1]. AD FIP PAFDQIVSEAAFRHY. [2]. KGANSVPLTIRVPYGA. [2]. GALYHS. [2]. NEAYFCQVPGLKVV	146
S.ery(SACE_5675)	80	ELM. [1]. IN FSL IALDQIVVNHAAKIYG. [2]. GGQTSPVMVMRTPGGGG. [2]. LGATHS. [2]. IEIYAAFVPGLKVV	146
Hydrogenivirga	77	EIM. [1]. VN FSL TAYDQIVVNQAAKIRY. [2]. GGEVAVPITVRMPQGV. [2]. LAQHHS. [2]. FERIFASVPGRLRV	143
S.ery(SACE_3953)	142	SPGT. [1]. EDAYGLLRAAIDS PDPVVPLEPK	169
S.avermitilis	152	TPAT. [1]. ADAYGLLRAAIA SDDPVVPLEPK	179
P. irgensii	147	VPSN. [1]. YDAKGLLKAARI DDPVITFMESE	174
R. xylanophilus	147	APTF. [1]. ADAKGMLKS AIRD PNENVLFYEHK	174
S.ery(SACE_5675)	147	APST. [1]. ADAKALLLASIRDNDPVLFLENL	174
Hydrogenivirga	144	TAJD. [1]. ITAYHGLQAILLDDPVVPLEHE	171

Slika 32: Poravnavo aminokislinskega zaporedja beta podenote SACE_3953 z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki TPP-vezavnih mest)

Figure 32: Alignment of the aminoacid sequence of SACE_3953 with aminoacid sequence from other organisms (TPP-binding sites residues are marked with yellow color)

Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_3953. Analiza BLASTP je pokazala 70 % identičnost s

produktom gena SACE_5543 in 56 % identičnost s produktom gena SACE_7295, ki sta bila v času anotacije genoma identificirana kot verjetna beta podenota dehidrogenaze E1 (Oliynyk in sod., 2007).

(domnevna) dihidrolipoamid aciltransferaza, komponenta E2

Produkt gena SACE_3954, ki je pokazal diferencialno izražanje tako na nivoju transkriptoma kot proteoma, obsega 454 AK in je bil v času anotiranja genoma *S. erythraea* identificiran kot verjetni homolog (domnevne) dihidrolipoamid aciltransferaze, komponenta E2 (Oliynyk in sod., 2007).

Aminokislinsko zaporedje SACE_3954 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga E). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharomonospora xinjiangensis* (60 % identičnost), *Amycolatopsis jejuensis* (63 % identičnost) in *Saccharothrix syringae* (61 % identičnost), anotirani kot E2 podenota dehidrogenaze razvejanih keto kislin. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je iz *Pseudomonas aeruginosa* (Jeyaseelan in sod., 1980), ki s produktom gena SACE_3954 kaže 35 % identičnost. Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_3954. Analiza BLASTP je pokazala 51 % identičnost s produktom gena SACE_5544 in 37 % identičnost s produktom gena SACE_7296, ki sta bila v času anotacije genoma prav tako identificirana kot verjetna dihidrolipoamid aciltransferaza, komponenta E2 (Oliynyk in sod., 2007).

4.5.3 Analiza operona *mms*

Naslednja skupina genov, ki bi lahko bila udeležena pri alternativni poti za oskrbo z gradbeno enoto eritromicina metilmalonil-CoA, so geni SACE_1456 – SACE_1459. Na podlagi analize genomskega zaporedja ti geni verjetno tvorijo operon, ki smo ga poimenovali »*mms* operon«. *mms* operon sestavlja 4 geni: SACE_1456 (*mmsA2*), SACE_1457, SACE_1458 (*echA9*) in SACE_1459 (*mmsB*) (slika 33) (Oliynyk in sod., 2007).



Slika 33: Organizacija genov v operonu *mms*; *mmsA2* kodira metilmalonat-semialdehid dehidrogenazo; SACE_1457 kodira acil-CoA dehidrogenazo, *echA9* kodira enoil-CoA hidratazo, *mmsB* kodira 3-hidroksiizobutirat dehidrogenazo (Carata in sod., 2009: 9).

Figure 33: Genetic map of *mms* operon region; *mmsA2* encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, SACE_1457 encoding acyl-CoA dehydrogenase, *echA9* encoding putative enoyl-CoA hydratase, *mmsB* encoding 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (Carata et al., 2009: 9).

Z bioinformatsko analizo smo ugotovili, da sta v genomu *S. erythraea* 2 operona *mms*, poimenovali smo ju *mmsOp1* (SACE_1456 – SACE_1459) in *mmsOp2* (SACE_4672 – SACE_73). V poskusih čezmernega izražanja genov smo testirali oba operona (poglavlje 4.7.2).

Metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza

Produkt gena *mmsA2* (SACE_1456) predstavlja verjetni homolog metilmalonat-semialdehid dehidrogenaze (EC 1.2.1.27) (Oliynyk in sod., 2007). Encim sestavlja 499 AK. Metilmalonat semialdehid dehidrogenaza sodeluje pri razgradnji aminokisline valin; pretvarja metilmalonat semialdehid v propanoil-CoA (slika 28).

Aminokislinsko zaporedje SACE_1456 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga F). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharopolyspora spinosa* (91 % identičnost), *Actinopolyspora mortivallis* (84 % identičnost), *Saccharopolyspora rectivirgula* (87 % identičnost), prav tako anotirani kot metilmalonat semialdehid dehidrogenaze. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je *msdA* iz *S. coelicolor* A3(2) (Zhang in sod., 1996), ki s produktom gena SACE_1456 kaže 56 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_1456 metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov v katalitičnih mestih in NAD-vezavnih mestih na ohranjeni domeni aldehyd dehidrogenazne družine encimov. Poravnali smo aminokislinska zaporedja metilmalonat-semialdehid dehidrogenaz različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_1456. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni v 3 od 4 aminokislinskih preostankov v katalitičnih mestih in 15 od 20 aminokislinskih preostankov NAD vezavnih mestih (sliki 34 in 35).

B. <i>subtilis</i>	148	IAPFNNFPMMVP	CWMFPMAIALGNTFILKPSE.	[2]. PLLTEKLVELFEK.	[1]. GLPKGVFNVVYGAHD.	[1]. V 211
<i>S.erythraea</i>	147	ITPFNFPAMIP	LWKAAPAIACGNFVLKPSE.	[2]. PSVPLRLAELFIE.	[1]. GLPAGIFVNNGDKT.	[1]. V 210
D. <i>psychrophila</i>	147	IVPWNFPAMIP.	[1]. GWMAPICMVIGNTMVLLKAAS.	[2]. PRTAMRLMELWQE.	[1]. GLPFGVNLVLTANRT.	[1]. A 211
A. <i>baumannii</i>	169	ITPFNFPAMVA	LWMFFPMALVCGNCFILKPSE.	[2]. PSVVLFLAELLHQ.	[1]. GLPDGVFNVVNGDKE.	[1]. V 232
C. <i>violaceum</i>	145	ITPFNFPAMVP	LWMPYPLAIACGNTFILKPSE.	[2]. PSSTLIIARLHE.	[1]. GLPRGVLNVHGDKE.	[1]. V 208
L. <i>pneumophila</i>	156	VSPFNFPVMVP	IWMMPAIACGNTFILKPSE.	[2]. PSAFPVRLLLESD.	[1]. GLPPGVANCIQGNKT.	[1]. V 219
C. <i>burnetii</i>	146	ITPFNFPVMIS	AWMFVSIAICGNTFVLKPSE.	[2]. PSAALFLAELMQE.	[1]. GLPAGVLIINGNGA.	[1]. V 209
M. <i>luteus</i>	152	ITPFNFPAMVP	LWMFTTAIAAGNAVVLKPSE.	[2]. PSAANWLAEVFILE.	[1]. GLPEGILNVVHGDKE.	[1]. V 215
B. <i>subtilis</i>	212	NGILEHPI.	[1]. IKAISFVGSKPVGEYVYKRGS.	[2]. LKRVQ S LTGARNHTIVLND.	[1]. NLEDVTNIVGAAFGS	278
<i>S.erythraea</i>	211	DAVLTDP.	[1]. IQAVGFVGSSPIAEYIYSTAA.	[2]. GKRQQ C FGGARNHMIVMPD.	[1]. DLDQAVDALVGAGYGS	277
D. <i>psychrophila</i>	212	EILLRHP.	[1]. IKGVSVFGS T TVGRHIYETAT.	[2]. GKRQ A LCARAHNLVLED.	[1]. NLERTAQ G GINAFCGC	278
A. <i>baumannii</i>	233	DALLHHP.	[1]. IQAVSFVG S TPIAEYIYRTAT.	[2]. GKRQ C ALGGARNHAIIMPD.	[1]. DIDNVVT S LLGAAFGS	299
C. <i>violaceum</i>	209	DALLAAP.	[1]. VKAVSFVG S TPIAEYIYAEGS.	[2]. GKRQ V ALGGARNHHAVALPD.	[1]. DLDNTVSALMGAAYGs	275
L. <i>pneumophila</i>	220	EHLLAHP.	[1]. IAAFTAVASTPVAEYIYTAA.	[2]. GKR A H T GGARNHCVMPD.	[1]. DLDQAAANAIVGAAYGs	286
C. <i>burnetii</i>	210	DRLTHHP.	[1]. VAAVSAVG S TAEEHYIQTAA.	[2]. GKR A H T GGARNHCVITPD.	[1]. DIDEAADAILGAAYGA	276
M. <i>luteus</i>	216	DALLSHP.	[1]. VKAVSFVG S TPVAHHIYTAA.	[2]. GKRQ V ALGGARNHMMVMPD.	[1]. DLESAAA V SAAFGS	282
B. <i>subtilis</i>	279	[1]. GER CMACAVVTVE.	[3]. ADEFMAKLQEKVADI.	[9]. VFLGPVIREDNKKR T LSYEKGL.	[2]. GARLVC <small>D</small> GR	353
<i>S.erythraea</i>	278	[1]. GER CMASIVAVPV.	[4]. ADALVERKLVERVRL.	[9]. AD F GLPLIT R QAWQRVHDLVGVG.	[2]. GAE L LDGR	353
D. <i>psychrophila</i>	279	[1]. GER CMALPVIVVQ.	[3]. ADKLVERITYHAKKL.	[9]. TGMPGPVNA G HKK S ILDWIARGI.	[2]. GAD L LDGR	353
A. <i>baumannii</i>	300	[1]. GER CMALSVAVAI.	[4]. ADVVIDKL T QEMKKL.	[9]. NDFG P LITQA H KDKVQAYIQSAE.	[2]. GAKIVVDGR	375
C. <i>violaceum</i>	276	[1]. GER CMASIVAVCV.	[4]. ADALIAKLT P QI Q AL.	[9]. LDMPGPV L TRAHLDKVSGYIADGV.	[2]. GAE L VVDGR	351
L. <i>pneumophila</i>	287	[1]. GER CMALSVVVTTV.	[4]. ADALINKISPLIRAI.	[9]. TDMGPV L VSQ A HRQRV L AAIEKGV.	[2]. GARL I LDGR	362
C. <i>burnetii</i>	277	[1]. GER CMASVSVVVAI.	[4]. GDALVQL R E K IP Q L.	[9]. AD F GLPLV T KEHLEKVKAYIHLGV.	[2]. GAE L IVDGR	352
M. <i>luteus</i>	283	[1]. GER CMASIVAVVV.	[3]. GDQFVDRVTELARAL.	[9]. ADMGP L ITRDALERVTSYD S AA.	[2]. GGT L LDGR	357

Slika 34: Poravnava aminokislinskega zaporedja metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza iz *S. erythraea* (SACE_1456) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki katalitičnih mest)

Figure 34: Alignment of the aminoacid sequence of the methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *S. erythraea* (SACE_1456) with aminoacid sequence from other organisms (catalytic sites residues are marked with yellow color)

B. <i>subtilis</i>	148	IAPFNNFPMMVP	CWMFPMAIALGNTFILKPSE.	[2]. PLLTEKLVELFEK.	[1]. GLPKGVFNVVYGAHD.	[1]. V 211
<i>S.erythraea</i>	147	ITPFNFPAMIP	LWKAAPAIACGNFVLKPSE.	[2]. PSVPLRLAELFIE.	[1]. GLPAGIFVNNGDKT.	[1]. V 210
D. <i>psychrophila</i>	147	IVPWNFPAMIP.	[1]. GWMAPICMVIGNTMVLLKAAS.	[2]. PRTAMRLMELWQE.	[1]. GLPFGVNLVLTANRT.	[1]. A 211
A. <i>baumannii</i>	169	ITPFNFPAMVA	LWMFFPMALVCGNCFILKPSE.	[2]. PSVVLFLAELLHQ.	[1]. GLPDGVFNVVNGDKE.	[1]. V 232
C. <i>violaceum</i>	145	ITPFNFPAMVP	LWMPYPLAIACGNTFILKPSE.	[2]. PSSTLIIARLHE.	[1]. GLPRGVLNVHGDKE.	[1]. V 208
L. <i>pneumophila</i>	156	VSPFNFPVMVP	IWMMPAIACGNTFILKPSE.	[2]. PSAFPVRLLLESD.	[1]. GLPPGVANCIQGNKT.	[1]. V 219
C. <i>burnetii</i>	146	ITPFNFPVMIS	AWMFVSIAICGNTFVLKPSE.	[2]. PSAALFLAELMQE.	[1]. GLPAGVLIINGNGA.	[1]. V 209
M. <i>luteus</i>	152	ITPFNFPAMVP	LWMFTTAIAAGNAVVLKPSE.	[2]. PSAANWLAEVFILE.	[1]. GLPEGILNVVHGDKE.	[1]. V 215
B. <i>subtilis</i>	212	NGILEHPI.	[1]. IKAISFVGSKPVGEYVYKRGS.	[2]. LKRVQ S LTGARNHTIVLND.	[1]. NLEDVTNIVGAAFGS	278
<i>S.erythraea</i>	211	DAVLTDP.	[1]. IQAVGFVGSSPIAEYIYSTAA.	[2]. GKRQQ C FGGARNHMIVMPD.	[1]. DLDQAVDALVGAGYGS	277
D. <i>psychrophila</i>	212	EILLRHP.	[1]. IKGVSVFG S TPVGRHIYETAT.	[2]. GKRQ A LCARAHNLVLED.	[1]. NLERTAQ G GINAFCGC	278
A. <i>baumannii</i>	233	DALLHHP.	[1]. IQAVSFVG S TPIAEYIYRTAT.	[2]. GKRQ C ALGGARNHAIIMPD.	[1]. DIDNVVT S LLGAAFGS	299
C. <i>violaceum</i>	209	DALLAAP.	[1]. VKAVSFVG S TPIAEYIYAEGS.	[2]. GKRQ V ALGGARNHHAVALPD.	[1]. DLDNTVSALMGAAYGs	275
L. <i>pneumophila</i>	220	EHLLAHP.	[1]. IAAFTAVASTPVAEYIYTAA.	[2]. GKR A H T GGARNHCVMPD.	[1]. DLDQAAANAIVGAAYGs	286
C. <i>burnetii</i>	210	DRLTHHP.	[1]. VAAVSAVG S TAEEHYIQTAA.	[2]. GKR A H T GGARNHCVITPD.	[1]. DIDEAADAILGAAYGA	276
M. <i>luteus</i>	216	DALLSHP.	[1]. VKAVSFVG S TPVAHHIYTAA.	[2]. GKRQ V ALGGARNHMMVMPD.	[1]. DLESAAA V SAAFGS	282
B. <i>subtilis</i>	279	[1]. GER CMACAVVTVE.	[3]. ADEFMAKLQEKVADI.	[9]. VFLGPVIREDNKKR T LSYEKGL.	[2]. GARLVC <small>D</small> GR	353
<i>S.erythraea</i>	278	[1]. GER CMASIVAVPV.	[4]. ADALVERKLVERVRL.	[9]. AD F GLPLIT R QAWQRVHDLVGVG.	[2]. GAE L LDGR	353
D. <i>psychrophila</i>	279	[1]. GER CMALPVIVVQ.	[3]. ADKLVERITYHAKKL.	[9]. TGMPGPVNA G HKK S ILDWIARGI.	[2]. GAD L LDGR	353
A. <i>baumannii</i>	300	[1]. GER CMALSVAVAI.	[4]. ADVVIDKL T QEMKKL.	[9]. NDFG P LITQA H KDKVQAYIQSAE.	[2]. GAKIVVDGR	375
C. <i>violaceum</i>	276	[1]. GER CMASIVAVCV.	[4]. ADALIAKLT P QI Q AL.	[9]. LDMPGPV L TRAHLDKVSGYIADGV.	[2]. GAE L VVDGR	351
L. <i>pneumophila</i>	287	[1]. GER CMALSVVVTTV.	[4]. ADALINKISPLIRAI.	[9]. TDMGPV L VSQ A HRQRV L AAIEKGV.	[2]. GARL I LDGR	362
C. <i>burnetii</i>	277	[1]. GER CMASVSVVVAI.	[4]. GDALVQL R E K IP Q L.	[9]. AD F GLPLV T KEHLEKVKAYIHLGV.	[2]. GAE L IVDGR	352
M. <i>luteus</i>	283	[1]. GER CMASIVAVVV.	[3]. GDQFVDRVTELARAL.	[9]. ADMGP L ITRDALERVTSYD S AA.	[2]. GGT L LDGR	357
B. <i>subtilis</i>	279	[1]. GER CMACAVVTVE.	[3]. ADEFMAKLQEKVADI.	[9]. VFLGPVIREDNKKR T LSYEKGL.	[2]. GARLVC <small>D</small> GR	353
<i>S.erythraea</i>	278	[1]. GER CMASIVAVPV.	[4]. ADALVERKLVERVRL.	[9]. AD F GLPLIT R QAWQRVHDLVGVG.	[2]. GAE L LDGR	353
D. <i>psychrophila</i>	279	[1]. GER CMALPVIVVQ.	[3]. ADKLVERITYHAKKL.	[9]. TGMPGPVNA G HKK S ILDWIARGI.	[2]. GAD L LDGR	353
A. <i>baumannii</i>	300	[1]. GER CMALSVAVAI.	[4]. ADVVIDKL T QEMKKL.	[9]. NDFG P LITQA H KDKVQAYIQSAE.	[2]. GAKIVVDGR	375
C. <i>violaceum</i>	276	[1]. GER CMASIVAVCV.	[4]. ADALIAKLT P QI Q AL.	[9]. LDMPGPV L TRAHLDKVSGYIADGV.	[2]. GAE L VVDGR	351
L. <i>pneumophila</i>	287	[1]. GER CMALSVVVTTV.	[4]. ADALINKISPLIRAI.	[9]. TDMGPV L VSQ A HRQRV L AAIEKGV.	[2]. GARL I LDGR	362
C. <i>burnetii</i>	277	[1]. GER CMASVSVVVAI.	[4]. GDALVQL R E K IP Q L.	[9]. AD F GLPLV T KEHLEKVKAYIHLGV.	[2]. GAE L IVDGR	352
M. <i>luteus</i>	283	[1]. GER CMASIVAVVV.	[3]. GDQFVDRVTELARAL.	[9]. ADMGP L ITRDALERVTSYD S AA.	[2]. GGT L LDGR	357
B. <i>subtilis</i>	354	EN. [4]. GYFVGPTIFDNV.	[3]. MTIWKDE E IFAPVLSVIRVK.	[1]. LKEAIEIANKEFANGACLFTS.	[1]. SNAIR	422
<i>S.erythraea</i>	354	DF. [7]. GFMMGASLFDRV.	[3]. M.RIYRE E IFGPVLSVVRRA.	[1]. YEEALRLPTENEYGNVIAFTR.	[1]. GDAAR	425
D. <i>psychrophila</i>	354	RP. [8]. GFYFIGTIFDNV.	[3]. MSIGSE E IFGPVLSVVRKVR.	[1]. FAEGTALMNPNPYANGSVIYTR.	[1]. GFHAR	426
A. <i>baumannii</i>	376	DA. [7]. GFVVGPTLIDQV.	[3]. MTSYQQ E IFGPVLUQMRVN.	[1]. MQEAMQLINDHEYGNCTIYTR.	[1]. GEAAr	447
C. <i>violaceum</i>	352	GI. [7]. GFFLGGCLFDRV.	[3]. M.RIYRE E IFGPVLCVVRVN.	[1]. LEEAIALINAHEYGNCTIFTR.	[1]. GEAAr	423
L. <i>pneumophila</i>	363	TF. [7]. GFYLGPCLFDEV.	[3]. M.SVYQNE E IFGPVLVIVRVN.	[1]. FEEALALVNKHQYGNNTAIFTR.	[1]. GFTAR	434
C. <i>burnetii</i>	353	DL. [7]. GFFLGGCLFDHV.	[3]. M.RIYQE E IFGPVLAIVRVD.	[1]. FEEALALINKNEYGNVIAIFTR.	[1]. GEMAR	424
M. <i>luteus</i>	358	TH. [5]. GFFIGPSIVDHV.	[3]. MKVYDDE E IFGPVLAIVRVD.	[1]. YEDAVNLINENRFANGT3VFTR.	[1]. GKTVR	427

Slika 35: Poravnava aminokislinskega zaporedja metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza iz *S. erythraea* (SACE_1456) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki NAD vezavnih mest)

Figure 35: Alignment of the aminoacid sequence of the methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *S. erythraea* (SACE_1456) with aminoacid sequence from other organisms (NAD binding sites residues are marked with yellow color)

Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_1456. Analiza BLASTP je pokazala 56 % identičnost s produktom gena SACE_4672 in 55 % identičnost s produktom gena SACE_5185.

Acil-CoA dehidrogenaza

Produkt gena SACE_1457 predstavlja verjetni homolog acil-CoA dehidrogenaze (EC 1.3.1.8) (Oliynyk in sod., 2007). Encim acil-CoA dehidrogenaza sestavlja 389 AK. Acil-CoA dehidrogenaza je tudi del poti razgradnje aminokisline valin; katalizira pretvorbo izobutiril-CoA v 2-metil-prop-2-enoil-CoA (slika 28).

Aminokislinsko zaporedje SACE_1457 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga G). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharopolyspora spinosa* (85 % identičnost), *Saccharopolyspora rectivirgula* (84 % identičnost) in *Actinopolyspora mortivallis* (78 % identičnost), prav tako anotirani kot acil-CoA dehidrogenaze. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je krotonil-CoA reduktaza iz *Streptomyces collinus* (Li in sod., 2004), ki s produktom gena SACE_1457 kaže 45 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_1457 acil-CoA dehidrogenaza, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov FAD-vezavnih mestih na ohranjeni domeni IBD (izobutiril-CoA dehidrogenaza). Poravnali smo aminokislinska zaporedja acil-CoA dehidrogenaz različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_1457. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni vsi aminokislinski preostanki (11) v FAD vezavnih mestih na ohranjeni domeni IBD (slika 36).

<i>S. erythraea</i>	79	VLI FEAL ATGD PESI AAYV SIHNM VAGM IDRFG DDE QRRR WILPAMCS . [2] . RLG SYCLTEPEA GSDAA ALQTRAVRD	152
<i>M. loti</i>	79	VLI FEAL SHAD PGP FSSF IISI HNM VASMI DRFG ND EQR QRFL PKL TS . [2] . WL AS YCLTE PG S GSDAA ALKTRAVKS	152
<i>S. meliloti</i>	70	AM IIE ALAT GC PAIA S FV SIHNM CAGM IDR GY GT DE QRRR LL PPPL LT . [2] . VL AS YCLTE PG S GSDAA ALKTRAVRE	143
<i>C. crescentus</i>	70	SI IFE AL SY GD VP VAA YLT IHN M ASW M IDR FG S DDL R QRY L PRL TT . [2] . LI AS YCLTE PG S GSDAA M RTTAKLD	143
<i>M. bovis</i>	69	ARI FE QL AI ADP VT AA FL SIH NM CAW M ID S FG T DE Q R KDN W P RL AT . [2] . VI AS YCLTE PG S GSDA GAL STRAVRH	142
<i>P. aeruginosa</i>	70	SLIFE QL AAG CVATTAY ISI HNM AAWMLA SFTG DAA LKE AWL PGLIG . [2] . SL AS YCLTE PD AG S DAAR LR TRARRE	143
<i>S. erythraea</i>	153	GDHY VLD GV KQ F I SGG GN S DV Y V V M ART . [5] . KG I ST F V V E G . [2] . P GL S F G P N E K R MG W N A Q P T R Q V V F Q G V	224
<i>M. loti</i>	153	GG DY V L M G A K Q F I S G A G D S D V Y A V M V R T . [5] . KG I ST IV V P K . [2] . P GL S F G A N E H R MG W H M Q S T R Q V I F E D C	224
<i>S. meliloti</i>	144	G D A Y V L L T G Q K Q F I S G A G E S G L Y I V M A R T . [5] . KG I SA F V V E K . [2] . P GL T F G A N E K R MG W H A Q P T R A V M L D N V	215
<i>C. crescentus</i>	144	GD HY V L M G K A F I S G G G V S D I Y V V M A R T . [5] . KG V S A F V V E K . [2] . E GL S F G A N E K R MG W N A Q P T A Q V N F D N C	215
<i>M. bovis</i>	143 . [4]	GG DY V LD G V K Q F I S G A A S D V Y V V M A R T . [5] . RG V S A F V V E K . [2] . P GL S F G A P E A R MG W H A Q P T A Q V V L D G V	218
<i>P. aeruginosa</i>	144	G D E Y V L D G S K C F I S G A G S T Q V L I V M A R T . [5] . RG I S C F L V P A . [2] . P G I R Y G R N E D R MG W R A Q P T R T I T F E G V	215
<i>S. erythraea</i>	302	A R M L L W R A A W A L D V . [3] . S A T R L C A M A K R L A T D A G F A V A N E A L Q I H G G Y G Y L A E Y G L E K I V R D L R V H Q I L E G T N E I M R L	379
<i>M. loti</i>	302	A R I F LY A A S K L D R . [3] . D A G K W S A M A K R F V T D T G F N V A N N A L Q I L G G Y G Y L H D Y G I E K I V R D L R V H Q I L E G T N E I M R V	379
<i>S. meliloti</i>	293	A R T F L W R A A C A L D A . [3] . E A T K L C A M A K R F A T D A G F Q V A N D A L Q L H G G Y G Y L Q D Y P L E R L V R D L R V H Q I L E G T N E I M R L	370
<i>C. crescentus</i>	293	A R I M V R R A A H A L D S . [3] . E A T K L C A M A K R F A T D A G F Q V A N D A L Q L H G G Y G Y L Q D Y P L E R L V R D L R V H Q I L E G T N E I M R V	370
<i>M. bovis</i>	299	S R M L L W R A A S A L D D . [3] . D K V E L C A M A K R Y V T D T C F E V A D Q A L Q L H G G Y G Y L R E Y G L E K I V R D L R V H R I L E G T N E I M R L	376
<i>P. aeruginosa</i>	293	S R Q M V R L G A H R L D R . [3] . E A T L V C A M A K R F A T D R C F D V C M E A L Q L H G G Y G Y L N D Y P L E R W V R D T R V H Q I L E G T N E I M R V	370

Slika 36: Poravnavo aminokislinskega zaporedja acil-CoA dehidrogenaze iz *S. erythraea* (SACE_1457) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki FAD vezavnih mest)

Figure 36: Alignment of the aminoacid sequence of the acyl-CoA dehydrogenase from *S. erythraea* (SACE_1457) with aminoacid sequence from other organisms (FAD binding sites residues are marked with yellow color)

Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_1457. Analiza BLASTP je pokazala 41 % identičnost s produktom gena SACE_0645.

Enoil-CoA hidrataza

Produkt gena *echA9* (SACE_1458) predstavlja verjetni homolog enoil-CoA hidrataze (EC 4.2.1.17) (Oliynyk in sod., 2007). Encim enoil-CoA hidratazo sestavlja 346 AK. Tudi enoil-CoA hidrataza je del poti razgradnje aminokisline valin; katalizira pretvorbo 2-metil-prop-2-enoil-CoA v 3-hidroksibutiril-CoA (slika 28).

Aminokislinsko zaporedje SACE_1458 smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga H). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharopolyspora spinosa* (76 % identičnost), *Saccharopolyspora rectivirgula* (74 % identičnost) in *Actinopolyspora erythraea* (63 % identičnost), anotirani kot 3-hidroksi-izobutiril-CoA hidrolaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je *fadB* iz *B. subtilis* (Frandi in sod., 2010), ki s produktom gena SACE_1458 kaže manjšo 29 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_1458 enoil-CoA hidrataza, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov vezanih mest za substrat na ohranjeni domeni encimske družine »krotonaza/enoil-CoA hidrataza«. Poravnali smo aminokislinska zaporedja enoil-CoA hidrataz različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem SACE_1458. Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, ohranjeni aminokislinski preostanki v 9 od 15 vezavnih mestih za substrat na ohranjeni domeni (slika 37).

<i>S.erythraea</i>	7	ILVSE. [4].GRITLNRP. [2]. I NALTLGMVRIMSETLC. [8].EAVLIDG. [1].G. [1].RGLCAGGDIR. [22].R 93
<i>R.eutropha</i>	208	ILIDQ. [5].AIVTIDRP. [2].RNACDFDAWTDLKAAFE. [8].RLVVLTG. [1].G GHPFCAGDDIV. [20].E 292
<i>A.caulinodans</i>	5	LLYEAA. [4].ARITIAQD. [2].MNAMTFEMWSALPGLIS. [8].RAIIVLTG. [2].E KAFCAGADIS. [20].A 89
<i>B.parapertussis</i>	11	LAIDD. [4].LRVRIVNP. [2]. I YNAMELSMWEALGQAVER. [8].RAIIVLEG. [2].E RAFVSGADIS. [20].Q 95
<i>S.erythraea</i>	94	LNSALA. [3].KEPVVGLMDGITMGGGVGVTIA. [2].SHRVVT. [4].IGMPFVG G G. [5].GGTYLILSR. [4].LGTHMA 166
<i>R.eutropha</i>	293	AYAAVQ. [3].LPVIAAIISGVCAAGGGCSLAM. [2].DFRVAD. [4].VGVP VAKL G. [5].IQLQRLAW. [5].NARRWL 366
<i>A.caulinodans</i>	90	GMTALA. [3].KPTVALIRGIC F GGGGFGLAL. [2].DIRLAR. [4].FRVFAARL G . [5].EGVKLISR. [5].ATADIL 163
<i>B.parapertussis</i>	96	AQQALS. [3].VPTIALVRGIC M GGGMGLAL. [2].DLRYCN. [4].FRMPAARL G . [5].DGVKRMCD. [5].RAADLF 169

Slika 37: Poravnavo aminokislinskega zaporedja enoil-CoA hidrataze iz *S. erythraea* (SACE_1458) z aminokislinskimi zaporedji iz drugih organizmov (z rumneno barvo so označeni aminokislinski preostanki vezavnih mest za substrat)

Figure 37: Alignment of the aminoacid sequence of the enoyl-CoA hydratase from *S. erythraea* (SACE_1458) with aminoacid sequence from other organisms (substrate binding sites residues are marked with yellow color)

3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaza

Produkt gena *mmsB* (SACE_1459) predstavlja verjetni homolog 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaze (EC 1.1.1.31) (Oliynyk in sod., 2007). Encim 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaza sestavlja 295 AK. Tudi enoil-CoA hidrataza je del poti razgradnje

aminokislne valin; katalizira pretvorbo 3-hidroksi-izobutirat v metilmalonat semialdehid (slika 28).

Aminokislinsko zaporedje 3-hidroksizobutirat dehidrogenaze smo z analizo BLASTP primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov, nato pa smo naredili še poravnavo Clustal (priloga I). Analizi sta pokazali, da so bližnji homologi tega gena prisotni v sorodnih vrstah *Saccharopolyspora spinosa* (87 % identičnost), *Saccharopolyspora rectivirgula* (83 % identičnost) in *Actinopolyspora mortivalis* (76 % identičnost), prav tako anotirani kot 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaza iz bakterije *Rhodobacter sphaeroides* (Worral in sod., 1987), ki s produktom gena SACE_1459 kaže 51 % identičnost. Z analizo BLASTP smo preverili tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produkta gena SACE_1459 in ugotovili, da ga ni.

4.6 TESTIRANJE DELOVANJA PROMOTORJEV V NARAVNEM SEVU

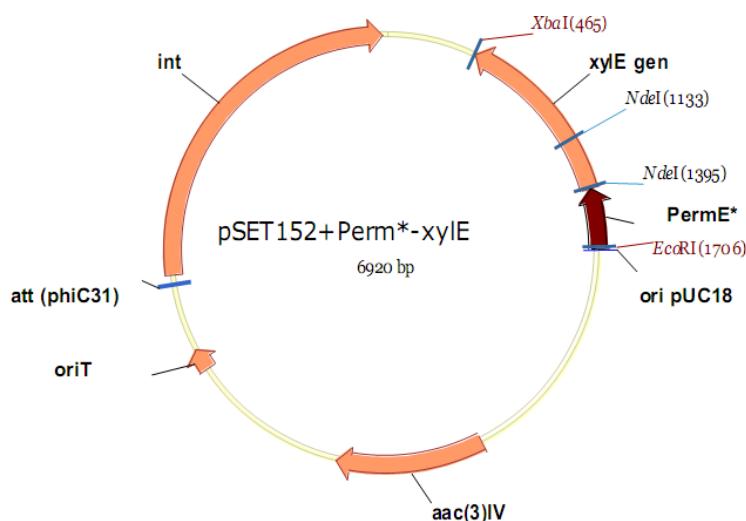
Če želimo pri določenih genih doseči močno prekomerno izražanje, potrebujemo močan promotor. Močan promotor omogoča relativno intenzivno prepisovanje gena.

Delovanje različnih promotorjev v naravnem sevu smo preverili tako, da smo izbrane promotorje ločeno vnesli v vektor pSet152, ki je vseboval poročevalski gen *xylE* iz *Pseudomonas* sp. *xylE* ima zapis za encim katehol 2,3-dioksigenazo. S pomočjo tega encima se brezbarvni katehol spremeni v rumeno obarvani produkt 2-hidroksimukonski semialdehid, ki absorbira svetlobo pri 375 nm (Zukowski in sod., 1983). Plazmid pUC19+*PermE**/*xylE* je bil pripravljen v okviru doktorske naloge Vasilke Magdevske (Magdevska, 2011). S pomočjo restriktijskih encimov *EcoRI* in *XbaI* smo v plazmid pSet152 vstavili promotor in gen. Preko restriktijskih mest za *EcoRI* in *NdeI* smo nato v plazmidu pSet152 zamenjali promotor *PermE** z drugimi promotorji.

Testirali smo 4 različne promotorje: *PermE*, *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma, *PmerR* in *PeryAI*. *PermE* je nativni promotor gena *ermE* za rezistenco na eritromicin, promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma pa je delno spremenjen *PermE* (delecija treh baznih parov v regiji -35) (Bibb in sod., 1985). Promotor *PmerR* je iz operona za rezistenco na živo srebro iz organizma *Streptomyces lividans* (Ravel in sod., 2000), promotor *PeryAI* pa je glavni promotor za PKS iz genske skupine za biosintezo eritromicina.

Najprej smo z restriktijskim encimom *NdeI* izvedli delno restrikcijo plazmida pSet152+*PermE**/*xylE* (delno restrikcijo smo izvedli zato, ker gen *xylE* znotraj zaporedja vsebuje še eno restriktijsko mesto za *NdeI*), nato pa še restrikcijo z *EcoRI* (slika 38). Dodali smo promotorje rezane z istima restriktijskima encimoma in tako pripravljene plazmide s transformacijo vnesli v celice *E. coli* ET12567/pUZ8002 in nato s konjugacijo prenesli v *S. erythraea*. Kolonije, ki so v 10-14 dneh zrasle na agarnih ploščah SM+10 mM

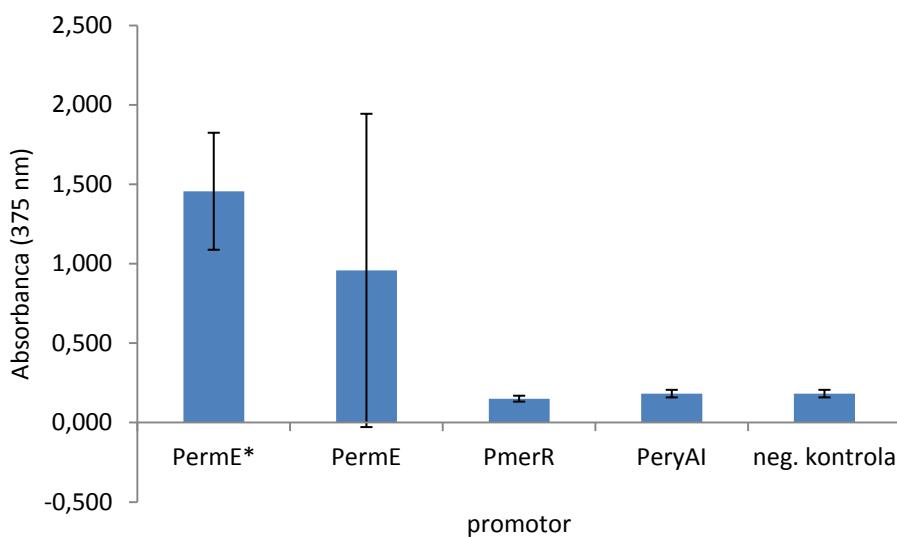
MgCl₂, prelitih z ustreznim antibiotikom, smo nato gojili na trdnem sporulacijskem gojišču ABSM4 z enakim antibiotikom. Po 14 dneh inkubacije smo tako pripravljene kolonije inokulirali v gojišče CRM z ustreznim antibiotikom. Po 48 h gojenja, smo kolonije precepili in jih gojili še 48 h, nato pa smo pobrali vzorce kultivacijske brozge, jih ustrezeno obdelali (glej poglavje 3.3.7.2) in pomerili absorbanco pri 375 nm. Kot kontrolo smo uporabili plazmid brez promotorja in brez gena *xylE*.



Slika 38: Plazmid pSet152 + *PermE**/*xylE* za testiranje delovanja promotorjev; vsebuje gen *acc(3)IV* za rezistenco bakterije proti apramicinu, mesto *oriT* za začetka podvojevanja, *att* (*phiC31*) mesto za integracijo, gen *int* za integrazo, mesto za začetek podvajanja iz pUC18, multiplo mesto za kloniranje, promotor (na sliki *PermE**) in poročevalski gen *xylE*.

Figure 38: Plasmid pSet152 + *PermE**/*xylE* for analysing promoter strength; containing gene *acc(3)IV* for bacterial resistance to apramycin, origin of transfer *oriT*, *att* (*phiC31*) site for integration, *int* gene for integrase, origin of replication from pUC18 vector, multicloning site, promoter (this figure, *PermE**) and reporter gene *xylE*.

Kot najmočnejši promotor se je izkazal promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma (za 52 % višje izražanje v primerjavi s *PermE*). Pri promotorjih *PmerR* in *PeryAI* s poročevalskim sistemom *xylE* nismo zaznali signala. Rezultati so grafično prikazani na sliki 39. Pri nadalnjem delu smo uporabljali promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma.



Slika 39: Vpliv različnih promotorjev (*PermE** brez mesta za vezavo ribosoma, *PermE*, *PmerR*, *PeryAI*) na izražanje poročevalskega gena *xylE* v *S. erythraea* NRRL2338; negativna kontrola je bil sev s plazmidom brez promotorja in gena *xylE*. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti izmerjene absorbance \pm SD, n = 15.

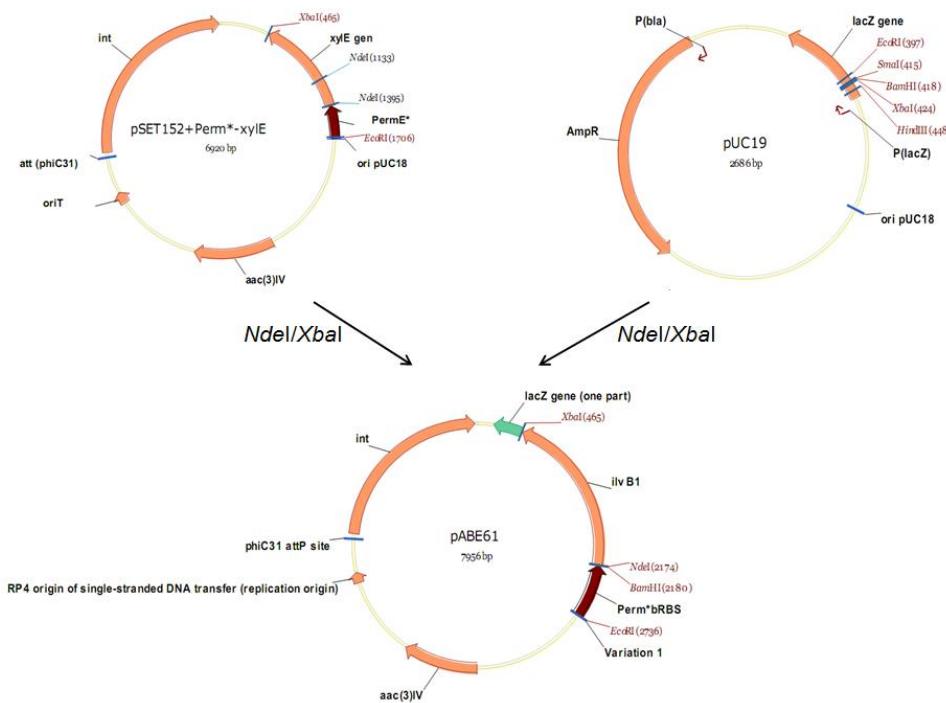
Figure 39: Expression of the *xylE* gene in *S. erythraea* NRRL2338 under regulation of different promoters (*PermE**, *PermE*, *PmerR*, *PeryAI*); strain containing plasmid without promoter and gene was used as negative control. Bars represent median values \pm SD, n = 15.

4.7 ČEZMERNO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV IN PREVERJANJE VPLIVA NA PRODUKCIJO ERITROMICINA V NARAVNEM SEVU

Na podlagi primerjalne transkriptomske in proteomske analize, ki sta bili izvedeni v okviru KC Brin in bioinformatskih analiz, ki smo jih izvedli v okviru doktorske naloge, smo identificirali gene, ki nakazujejo alternativno pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin (*ilvB1*, *bkdOp*, *mmsOp*, *mcmOp*). S povečanim izražanjem oz. inaktivacijo teh genov/operonov smo želeli preveriti njihov vpliv na produkcijo eritromicina.

Najprej smo pripravili ustrezne vektorje za izražanje ciljnih genov. Za vstavitev dodatnih kopij genov smo uporabili vektor pSet152, za prekinitev gena pa vektor pKC1132 (Kieser in sod., 2000). V vektor pSet152 smo skupaj s ciljnim genom vstavili tudi promotor *PermE**, ki se je izmed vseh testiranih promotorjev izkazal za najbolj primernega (poglavje 4.6).

Plazmide pABE smo pripravili tako, da smo ciljni gen najprej s pomočjo restrikcijskih encimov *NdeI* in *XbaI* izrezali iz plazmida pUC19. Plazmid pSet152 z že vstavljenim promotorjem *PermE** smo najprej linearizirali z restrikcijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* in nato vanj vstavili gen, izrezan iz pUC19 (slika 40).



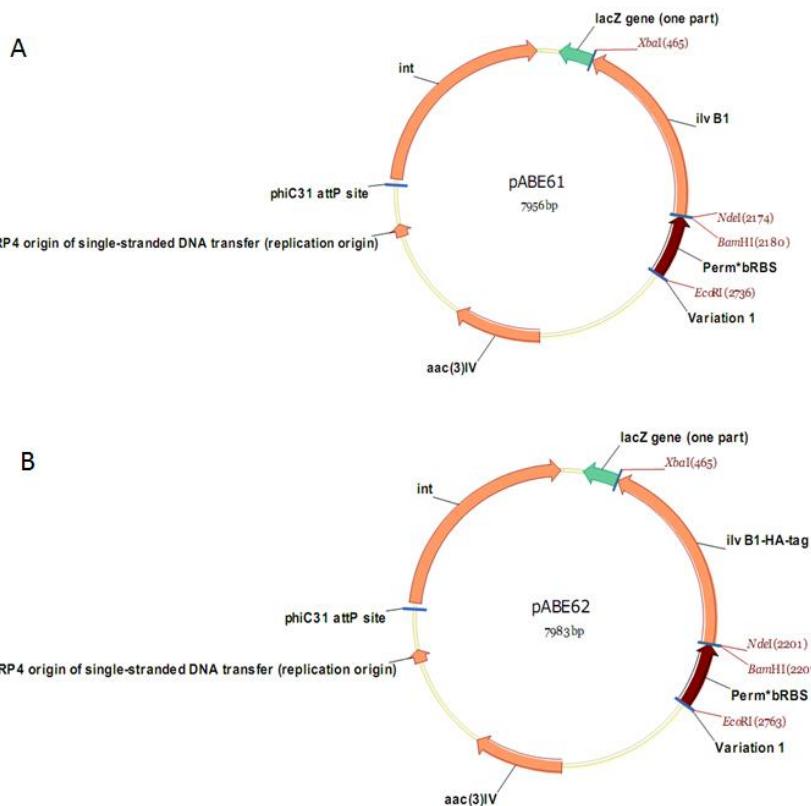
Slika 40: Shema konstrukcije plazmidov pABE (na sliki je prikazana konstrukcija plazmida pABE61, je pa princip enak za vse pABE plazmide)

Figure 40: Schematic representation of pABE plasmid construction (figure represents construction of plasmid pABE61, but the principle is the same for all pABE plasmids)

Pripravljene plazmide pABE smo najprej vnesli v sev *E. coli* ET12567/pUZ8002, nato pa s konjugativnim prenosom v *S. erythraea* NRRL2338. Konjugante *S. erythraea*, zrasle na trdnem gojišču SM+MgCl₂ smo najprej namnožili na sporulacijskem gojišču ABSM4 z dodatkom ustrezne antibiotike (poglavlje 3.3.7.3). Sledilo je testiranje produkcije eritromicina. Spremenjene seve smo iz plošč ABSM4 inokulirali v vegetativno gojišče ABVM1, po 48 h inkubacije na stresalniku pa smo jih inokulirali v produktivno gojišče ABPM8 (poglavlje 3.3.3.1). Po 7 dneh kultivacije na stresalniku smo vzorce ekstrahirali z acetonitrilom (poglavlje 3.3.4.1) in naredili mikrobiološki test za določitev koncentracije eritromicina (poglavlje 3.3.4.2).

4.7.1 Vnos dodatne kopije gena *ilvB1*

V sev NRRL2338 smo s plazmidom pABE61 oz. pABE62 (slika 41) vnesli dodatno kopijo gena *ilvB1* brez oz. s HA-epitopom na karboksiterminalu, s pomočjo katerega smo lahko potrdili uspešno izražanje dodatne kopije proteina s prenosom Western. Za pomnoževanje gena smo uporabili oligonukleotidne začetnike *ilvB1-NdeI-F*, *ilvB1-XbaI-R* in *ilvB1HA-XbaI-R*.



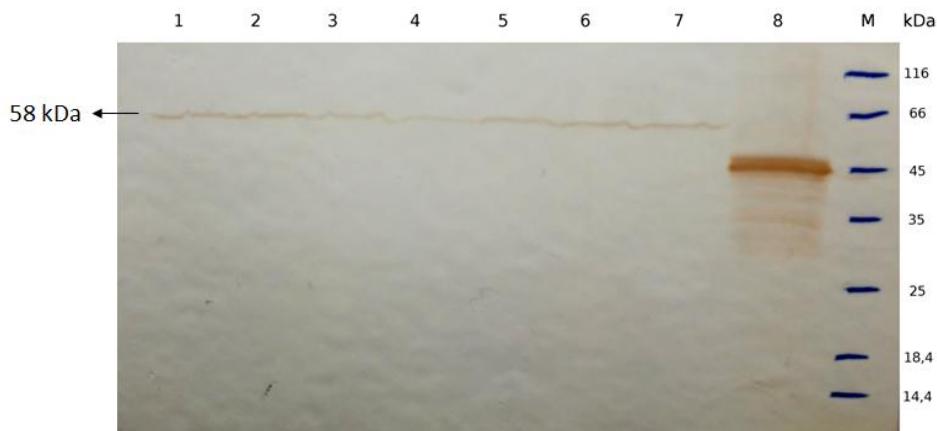
Slika 41: Plazmid z dodatno kopijo gena *ilvB1* brez in s HA-epitopom na karboksiterinalu; A) pABE61 (*ilvB1* brez HA-epitopa), B) pABE62 (*ilvB1* z HA-epitopom)

Figure 41: Plasmid with extra copy of *ilvB1* gene with and without HA-tag; A) pABE61 (*ilvB1* without HA-tag), B) pABE62 (*ilvB1* with HA-tag)

4.7.1.1 Potrditev izražanja proteina IlvB1 s prenosom Western

S prenosom Western smo želeli potrditi sintezo dodatne kopije proteina IlvB1-HA s pričakovano velikostjo 58,54 kDa. Neodvisne konjugante *S. erythraea* s plazmidom pABE62 smo inokulirali v produktivno gojišče ABPM8 in po 3 dneh kultivacije vzorčili fermentacijsko brozgo ter izolirali celokupne proteine. Sledilo je ločevanje na 12 % poliakrilamidnem gelu in prenos na nitrocelulozno membrano. Nato smo na membrano vezali primarna in sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo, in detektirali specifično vezana protitelesa s komercialnim kompletem na osnovi diaminobenzidina (DAB Substrate kit) (podrobni protokol je opisan v poglavju 3.3.5.7).

Na sliki 42 je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji s specifičnimi protitelesi. Pri vseh 7 neodvisnih konjugantah *S. erythraea* s plazmidom pABE62 smo opazili liso velikosti 58 kDa, kar ustrezza pričakovani vrednosti glede na aminokislinsko zaporedje. S tem smo potrdili uspešno izražanje dodatne kopije proteina.



Slika 42: Potrditev izražanja dodatne kopije gena *ilvB1-HA* s prenosom western, 556 AK; 1-7: neodvisne konjugante *S. erythraea* NRRL2338 s plazmidom pABE62 (opazne so lise z molekulsko maso 58 kDa); 8: pozitivna kontrola, Vdh; M: molekulska masa označevalcev.

Figure 42: Western blot analysis 556 AA; 1-7: transformants of *S. erythraea* NRRL2338 with expressed extra copy *ilvB1-HA* gene (bands of apparent molecular mass of 58 kDa are observed); 8: positive control, Vdh, M: molecular mass marker.

4.7.1.2 Vpliv dodatne kopije gena *ilvB1* na produkcijo eritromicina

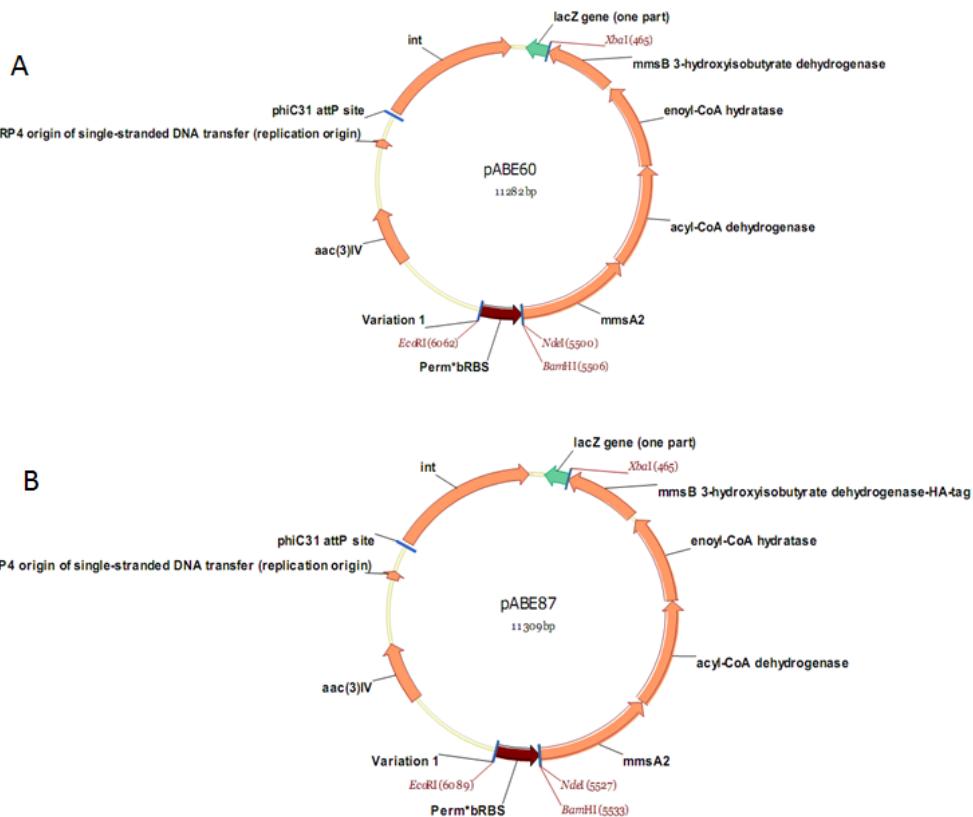
Producijo eritromicina smo testirali pri 25 neodvisnih konjugantah s pABE61 in 25 neodvisnih konjugantah s pABE62 (priloga J).

Povprečna produkcija kontrolnih sevov NRRL2338 in NRRL2338+pSet152 je bila 74 mg/l (± 12 mg/l) oz. 73 mg/l (± 15 mg/l), povprečna produkcija konjugant s plazmidom pABE61 pa 113 mg/l (± 29 mg/l) oz. 112 mg/l (± 28 mg/l) pri konjugantah s plazmidom pABE62 (slika 58). Pri obeh variantah vnosa dodatne kopije gena *ilvB1* (brez in z HA-epitopom) smo dobili višjo produkcijo eritromicina (52 % dvig produkcije) v primerjavi s kontrolnim sevom.

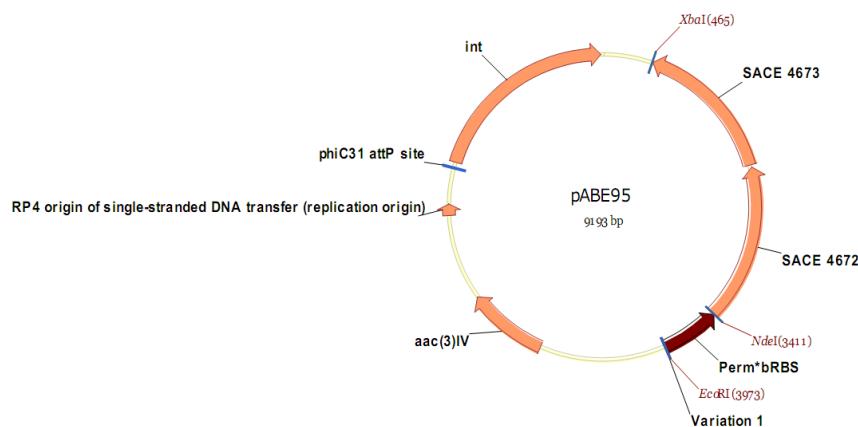
4.7.2 Vnos dodatne kopije operona *mms*

Na podlagi bioinformatske analize (poglavlje 4.5.3) smo ugotovili, da sta v organizmu *S. erythraea* 2 operona *mms*: označili smo ju *mmsOp1* (SACE_1456-59) in *mmsOp2* (SACE_4672-73). Pripravili smo več različnih plazmidov: pABE60 (*mmsOp1*), pABE87 (*mmsOp1-HA*) in pABE95 (*mmsOp2*) (sliki 43 in 44). HA-epitop smo vezali na zadnji gen v operonu *mmsOp1*, torej na SACE_1459.

Za pomnoževanje *mmsOp1* smo uporabili oligonukleotidne začetnike *mmsOp-NdeI-F*, *mmsOp-XbaI-R* in *mmsOpHA-XbaI-R*, za pomnoževanje *mmsOp2* pa SACE_4672-73-*NdeI-F* in SACE_4672-73-*XbaI-R*.



Slika 43: Plazmid z dodatno kopijo operona *mmsOp1* brez in s HA-epitopom na karboksiterinalu; A) pABE60 (*mmsOp1* brez HA-epitopa), B) pABE87 (*mmsOp1* s HA-epitopom)
 Figure 43: Plasmid with extra copy of *mms* operon with and without HA-tag; A) pABE60 (*mmsOp1* without HA-tag), B) pABE87 (*mmsOp1* with HA-tag)



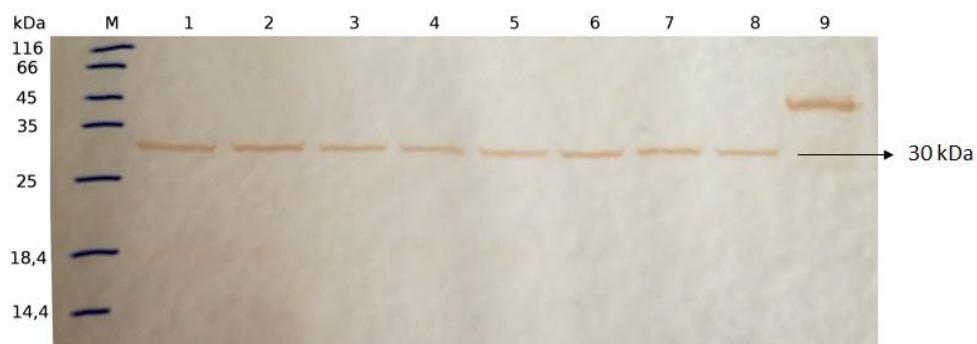
Slika 44: Plazmid z dodatno kopijo operona *mmsOp2*, pABE95
 Figure 44: Plasmid with extra copy of *mmsOp2*, pABE95

4.7.2.1 Potrditev izražanja proteina metilmalonat sintaze s prenosom Western

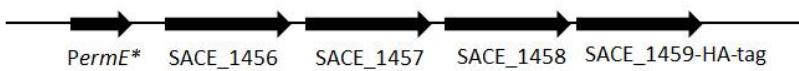
S prenosom Western smo želeli potrditi sintezo dodatne kopije proteina SACE1459-HA s pričakovano velikostjo 30 kDa.

Na sliki 45 je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji s specifičnimi protitelesi. Pri vseh 8 neodvisnih konjugantah *S. erythraea* s plazmidom pABE87 smo opazili liso velikosti 30 kDa, kar ustreza pričakovani vrednosti glede na aminokislinsko zaporedje. S tem smo potrdili uspešno izražanje dodatne kopije proteina.

A



B



Slika 45: Analiza prenosa western in genomski kontekst operona *mms*. A) Potrditev izražanja dodatne kopije SACE_1459-HA-tag, 295 AK (1-8), M: molekulsko masa označevalcev (njihova pozicija je označena na levi strani membrane), 9: pozitivna kontrola, Vdh. Opazne so lise z molekulsko maso 30 kDa pri 8 neodvisnih transformantah seva *S. erythraea* NRRL2338 z dodatno kopijo gena SACE_1459. B) Organizacija genov operona *mms* (*mmsOp1* - SACE_1456-59), zadnji gen v operonu (SACE_1459) je označen s HA epitopom.
Figure 45: Western blot analysis and genomic context of *mms* operon. A) Western blot analysis of *in trans* expression of 295 AA (lanes 1-8) SACE_1459-HA-tag, M: molecular mass marker (their position are represented on the left side of the blot), 9: positive control, Vdh. Bands od apparent molecular mass of 30 kDa are observed in 8 independent 295 AA transformants of *S. erythraea* NRRL2338 strain with expressed extra copy of SACE_1459 gene. B) Genetic map of *mmsOp1* (SACE_1456-59), the last gene in operon (SACE_1459) was HA-tagged.

4.7.2.2 Vpliv dodatne kopije operona *mms* na produkcijo eritromicina

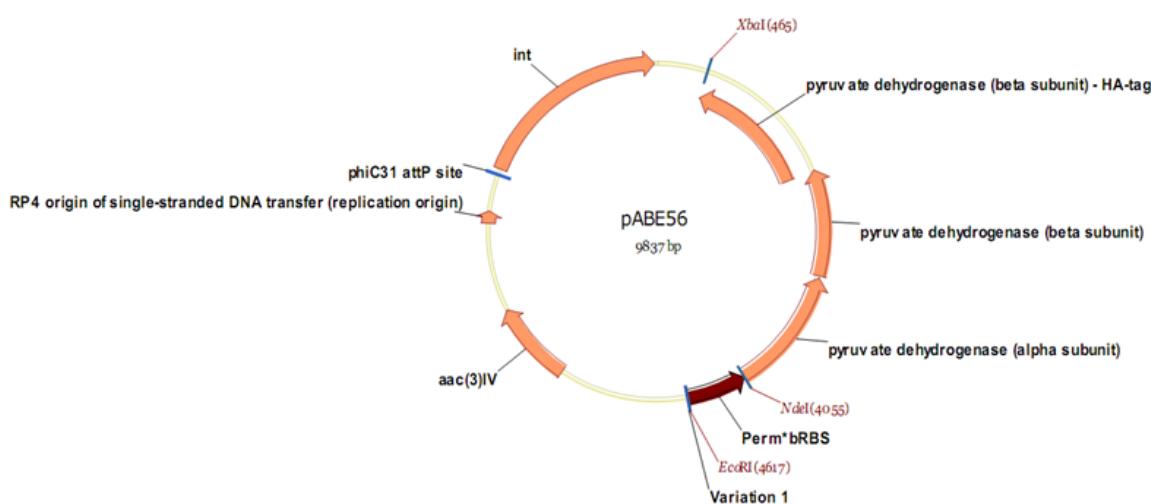
Producijo eritromicina smo testirali pri 32 neodvisnih konjugantah s pABE60, 20 neodvisnih konjugantah s pABE87 in 20 neodvisnih konjugantah s pABE95 (priloga J).

Povprečna produkcija kontrolnih sevov NRRL2338 in NRRL2338+pSet152 je bila 74 mg/l (± 12 mg/l) oz. 73 mg/l (± 15 mg/l). Povprečna produkcija konjugant s plazmidom pABE60 je bila 166 mg/l (± 32 mg/l), konjugant s plazmidom pABE87 pa 188 mg/l (± 35 mg/l) in konjugant s plazmidom pABE95 70 mg/l (± 24 mg/l) (slika 58). Pri obeh variantah vnosa dodatne kopije operona *mmsOp1* smo dobili povečano produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolnim sevom (150 % dvig produkcije), pri vnosu dodatne kopije operona

mmsOp2 pa produkcija eritromicina ni bila povečana. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je *mmsOp1* tisti, katerega geni sodelujejo pri oskrbi s substrati in posledično prispevajo k višjemu donosu eritromicina.

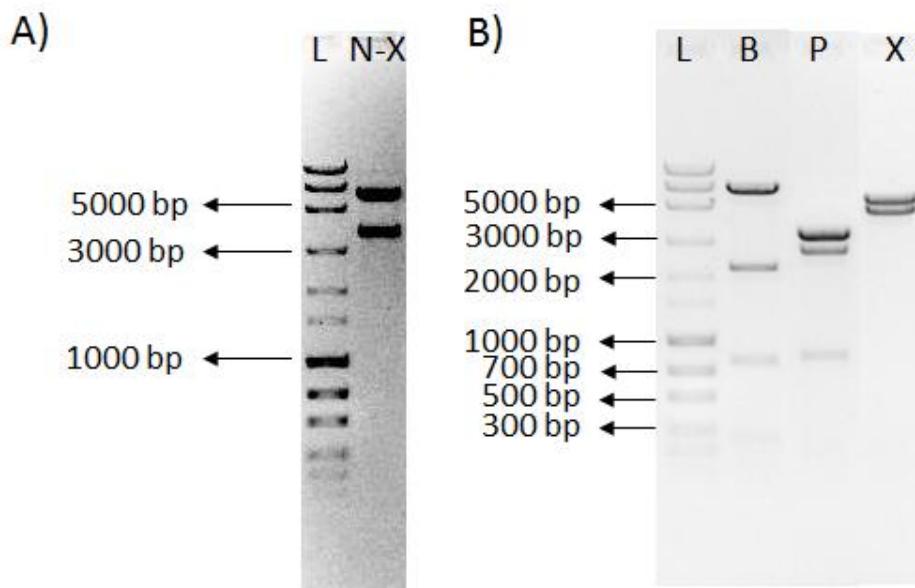
4.7.3 Vnos dodatne kopije operona *bkd*

V sev NRRL2338 smo s plazmidom pABE56 (slika 46) vnesli dodatno kopijo *bkd* operona s HA-epitopom na karboksiterinalu. Za pomnoževanje operona smo uporabili oligonukleotidne začetnike *bkdOp-NdeI-F* in *bkdOpHA-XbaI-R*.



Slika 46: Plazmid pABE56 z dodatno kopijo operona *bkd* s HA-epitopom na karboksiterinalu
Figure 46: Plasmid pABE56 with extra copy of *bkd* operon with HA-tag

Pravilnost pripravljenega plazmidnega konstrukta pABE56 smo preverili z restrikcijsko analizo z različnimi restrikcijskimi encimi (*NdeI* in *XbaI*, *BamHI*, *PstI* in *XhoI*) (slika 47).



Slika 47: Restriktionska analiza plazmida pABE56. A) pABE56 rezan z *Nde*I in *Xba*I (vrstica N-X), vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike), lisa 3590 bp se ujema s fragmentom operona *bkd*, lisa velikosti 6,2 kb se ujema s preostankom plazmida pABE56. B) pABE56 rezan z *Bam*HI (vrstica B), *Pst*I (vrstica P) in z *Xho*I (vrstica X), vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike), lise 6687 bp, 2128 bp, 763 bp in 255 bp ustrezajo fragmentom, ki nastanejo pri restrikciji z *Bam*HI (vrstica B), lise 3294 bp, 3172 bp, 2565 bp in 802 bp ustrezajo fragmentom, ki nastanejo pri restrikciji s *Pst*I (vrstica P), lisi 5396 bp in 4437 bp ustrezata fragmentoma, ki nastaneta pri restrikciji z *Xho*I (vrstica X).

Figure 47: Restriction analysis of plasmid pABE56. A) pABE56 digested with *Nde*I and *Xba*I (lane N-X), markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel, band with size 3590 bp corresponds to *bkd* operon fragment, band with size 6,2 kb corresponds to pABE56 plasmid remains. B) pABE56 digested with *Bam*HI (lane B), *Pst*I (lane P) and *Xho*I (lane X), markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel, bands with size 6687 bp, 2128 bp, 763 bp and 255 bp correspond to fragments made by restriction with *Bam*HI (lane B), bands with size 3294 bp, 3172 bp, 2565 bp and 802 bp correspond to fragments made by restriction with *Pst*I (lane P), bands with size 5396 bp and 4437 bp correspond to fragments made by restriction with *Xho*I (lane X).

4.7.3.1 Potrditev izražanja dodatne kopije dehidrogenaze razvejanih keto kislin s prenosom Western

S prenosom Western smo želeli potrditi sintezo dodatne kopije proteina SACE_3954-HA s pričakovano velikostjo 48 kDa. Dodatne kopije proteina SACE_3954-HA na membrani nismo detektirali.

4.7.3.2 Vpliv dodatne kopije operona *bkd* na produkcijo eritromicina

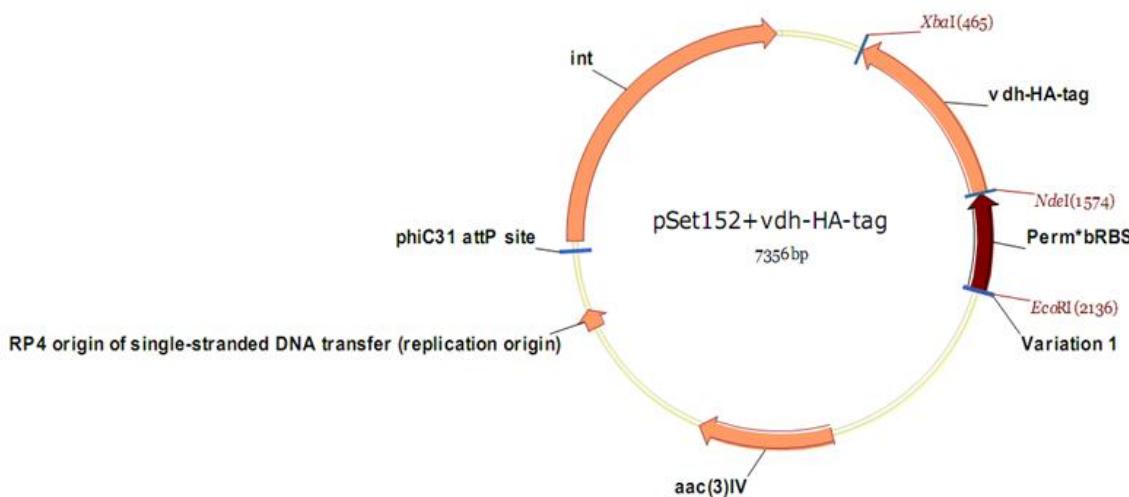
Producijo eritromicina smo testirali pri 31 neodvisnih konjugantah s pABE56 (priloga J). Povprečna produkcija kontrolnih sevov NRRL2338 in NRRL2338+pSet152 je bila 74 mg/l (± 12 mg/l) oz. 73 mg/l (± 15 mg/l), povprečna produkcija konjugant s plazmidom pABE56 pa je bila 127 mg/l (± 18 mg/l) (slika 58). Pri vseh z dodatno kopijo operona *bkd* smo

dobili povečano produkcijo eritromicina (70 % dvig produkcije) v primerjavi s kontrolnim sevom.

4.7.4 Vnos gena *vdh* iz *S. cinnamonensis*

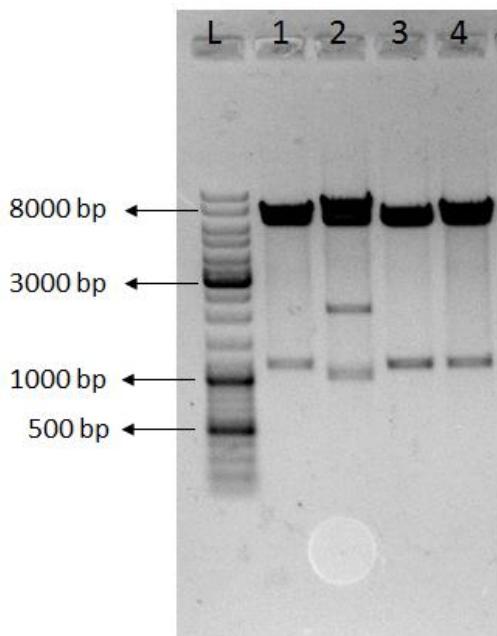
Gen *vdh* kodira encim valin dehidrogenazo. Valin dehidrogenaza je prvi encim pri razgradnji aminokisline valin (pretvorba L-valina v 3-metil-2-oksobutanoat). *S. erythraea* tega encima nima, zato smo ga v sev *S. erythraea* NRRL2338 vnesli iz organizma *S. cinnamonensis*. Z vnosom gena *vdh* in dodajanjem valina v produksijsko gojišče smo želeli povečati oskrbo s substratom metilmalonil-CoA in posledično izboljšati produkcijo eritromicina.

Postopek vnosa gena je bil enak kot pri vnosu dodatne kopije genov iz *S. erythraea*, s tem da smo pri pomnoževanju gena s PCR kot matrično DNA uporabili genomsko DNA *S. cinnamonensis*. Za vnos gena *vdh* v *S. erythraea* smo pripravili plazmid pABE96 (slika 48). Uporabili smo oligonukleotidne začetnike *vdh-NdeI-F* in *vdhHA-XbaI-R*.



Slika 48: Plazmid pABE96 z genom *vdh* s HA epitopom iz *S. cinnamonensis*
Figure 48: Plasmid pABE96 with *vdh*-HA tag gene from *S. cinnamonensis*

Pravilnost pripravljenega plazmidnega konstrukta pABE96 smo preverili z restriktijsko analizo z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* (slika 49).



Slika 49: Restriktionska analiza plazmida pABE96, rezanega z *NdeI* in *XbaI* (vrstice 1-4). Velikost DNA fragmentov (bp) označevalcev (vrstica L) in njihova pozicija je prikazana shematsko na levi strani slike. Lise z velikostjo 1109 bp (vrstice 1, 3, 4) se ujemajo s fragmenti gena *vdh*, lise z velikostjo 7,3 kb se ujemajo s preostanki plazmida pABE96.

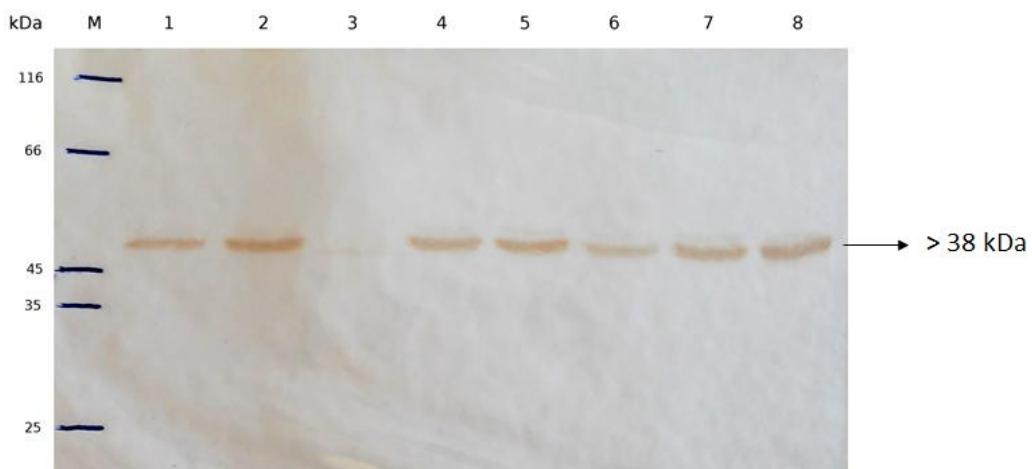
Figure 49: The restriction analysis of plasmid pABE96 digested with *NdeI* and *XbaI* (lanes 1-4). Markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel. Bands with size 1109 bp (lanes 1, 3, 4) correspond to *vdh* gene fragments, bands with size 7,3 kb correspond to pABE96 plasmid remains.

4.7.4.1 Potrditev izražanja proteina Vdh s prenosom Western

S prenosom Western smo želeli potrditi sintezo dodatne kopije proteina Vdh-HA s pričakovano velikostjo 38 kDa.

Na sliki 50 je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji s specifičnimi protitelesi. Pri vseh 8 neodvisnih konjugantah *S. erythraea* s konstruktom pSet152+*PermE**+*vdh-HA* smo smo opazili liso velikosti cca. 48 kDa (pri konjuganti v stolpcu 3 je lisa šibkejšega signala), kar je več od pričakovane velikosti. Pri procesiranju proteina lahko pride do različnih modifikacij, ki lahko privedejo do tega, da je njegova molekuljska masa večja od pričakovane.

Potrdili smo uspešno izražanje proteina Vdh.



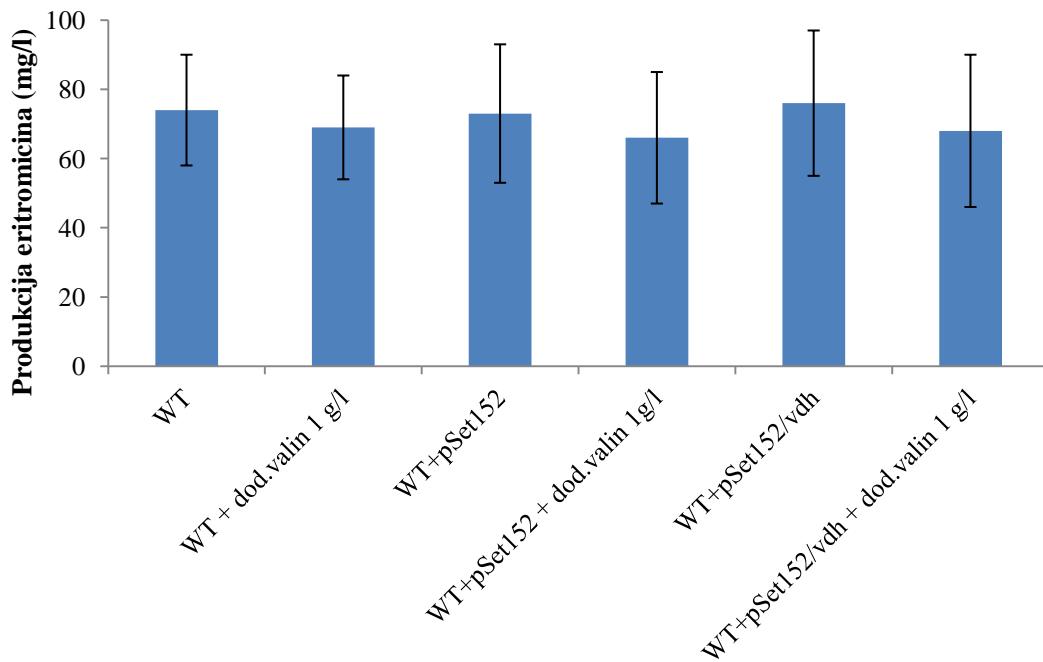
Slika 50: Potrditev izražanja vnosa gena *vdh* s prenosom western, 358 AK; 1: molekulska masa označevalcev, 1-8: neodvisne konjugante *S. erythraea* NRRL2338 s konstruktom pSet152+*PermE**+*vdh-HA* (opazne so lise z molekulsko maso cca. 48 kDa)

Figure 50: Western blot analysis 358 AA; 1: molecular mass marker, 1-8: transformants of *S. erythraea* NRRL2338 with pSet152+*PermE**+*vdh-HA* (bands of molecular mass of 48 kDa are observed)

4.7.4.2 Dodajanje valina v produksijsko gojišče

Pri testiranju konjugant, ki smo jim vnesli gen *vdh*, smo v produksijsko gojišče dodali valin. S tem smo želeli že dodatno povečati oskrbo metilmalonil-CoA. Ekspirement smo izvedli tako, da smo pri inokulaciji v produksijsko gojišče ABPM8 iz vegetativnega gojišča ABVM1 vzporedno inokulirali 4 centrifugirke za vsako kolonijo. V 2 paralelki smo po 24 h dodali 1 g/l valina, v 2 paralelki pa nismo dodali ničesar (kontroli). Po 7 dneh inkubacije na stresalniku smo vzorce ekstrahirali z acetonitrilom (poglavje 3.2.4.1) in naredili mikrobiološki test za določitev koncentracije eritromicina (poglavje 3.2.4.2).

Povprečna produkcija kontrolnih sevov je bila 74 mg/l (± 16 mg/l) (NRRL2338) in 73 mg/l (± 20 mg/l) (NRRL2338+pSet152), povprečna produkcija konjugant s plazmidom pABE96 pa 74 mg/l (± 21 mg/l). Povprečna produkcija kontrolnih sevov v paralelkah, ki smo jim dodali valin je bila 69 mg/l (± 15 mg/l) (NRRL2338) oz. 66 mg/l (± 19 mg/l) (sevu NRRL2338+pSet152), povprečna produkcija konjugant s plazmidom pABE96 v paralelkah z dodatkom valina pa 68 mg/l (± 22 mg/l) (slika 51). Vnos gena *vdh* na produkcijo eritromicina ni imel vpliva, prav tako tudi dodajanje valina v produksijsko gojišče ni imelo vpliva na produkcijo eritromicina.



Slika 51: Producija eritromicina pri transformantah z genom *vdh* in vpliv dodajanja valina v produksijsko gojišče

Figure 51: Erythromycin production in transformants with *vdh* gene and the effect of adding valine in production medium

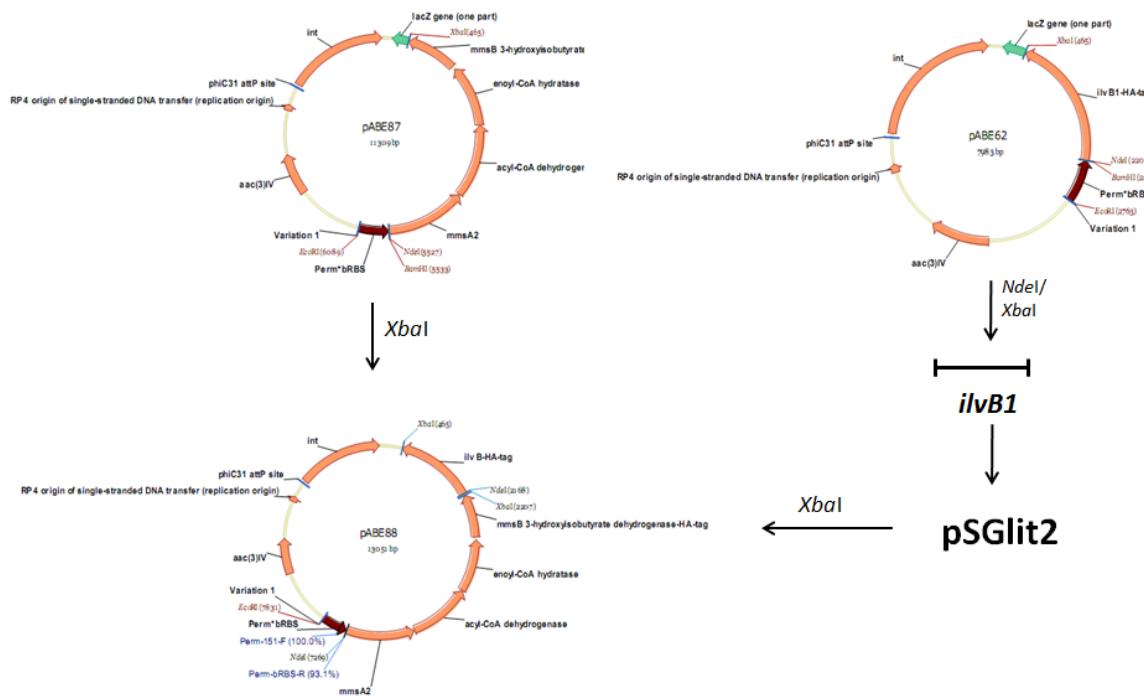
4.7.5 Vnos kombinacij gena *ilvB1* in operona *mms*

Na podlagi pridobljenih rezultatov, da operon *mmsOp1* in gen *ilvB1* omogočata povečan donos eritromicina, smo pripravili plazmide s prekomernim izražanjem obeh genov/operonov hkrati. Iz osnovnih plazmidov pABE62 in pABE87 smo konstruirali plazmida pABE88 in pABE89 (gen *ilvB1* in operon *mmsOp1* sta bila pozicionirana v različnem vrstnem redu). V plazmidu pABE88 smo gen *ilvB1* vstavili pred operon *mmsOp1*, v pABE89 pa za operonom *mmsOp1*. Postopek konstrukcije plazmidov s kombinacijo teh dveh genov je opisan v nadaljevanju.

Konstrukcija pABE88

Plazmid pABE87 smo najprej rezali z encimom *Xba*I in potem 5' konce odprtega plazmida defosforilirali z encimom FastAP po navodilih proizvajalca. S tem smo preprečili ponovno ligacijo koncev lineariziranih plazmidov. Iz plazmida pABE62 smo nato izrezali gen *ilvB1* z restriktijskima encimoma *Nde*I in *Xba*I. Ta fragment smo potem vnesli v plazmid pSGlit2, ki smo ga predhodno rezali z encimoma *Nde*I in *Xba*I. Ta plazmid vsebuje mesto vezave ribosoma pred start-kodonom oz. pred *Nde*I restriktijskim mestom in še dodatno restriktijsko mesto za *Xba*I pred mestom za vezavo ribosoma, ki pa ga encim *Xba*I ne prepozna, če je DNA modifcirana z *dam* metilacijo. Iz tega razloga smo pripravljeni plazmid najprej transformirali v *E. coli* ET12567, ki ima prekinjena gena za metilazi *dam*

in *dcm*. Nato smo z restriktionskim encimom *Xba*I iz izoliranega plazmida izrezali gen *ilvB1*, ki je na obeh koncih vseboval restriktionsko mesto *Xba*I in mesto vezave ribosoma. Ta gen pa smo potem vnesli v predhodno pripravljen odprt plazmid pABE87 in s tem dobili plazmid pABE88 (slika 52). pABE88 smo potem s transformacijo vnesli v *E. coli* ET12567/pUZ8002 in nato s konjugacijo v sev *S. erythraea* NRRL2338.



Slika 52: Shematski prikaz priprave plazmidov, ki vsebujejo različne kombinacije genov (*ilvB1* in operon *mms*)

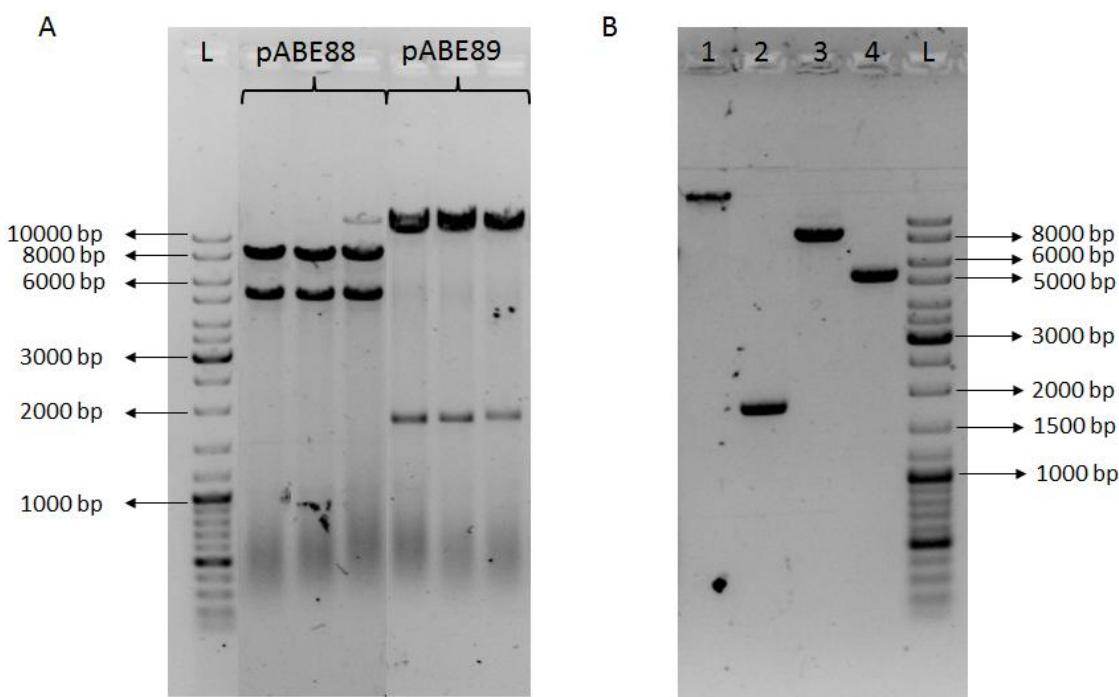
Figure 52: The general scheme of construction of plasmid with different combination of genes (*ilvB1* and *mms* operon)

Konstrukcija pABE89

Plazmid pABE62 smo najprej rezali z encimom *Xba*I in potem 5' konce odprtrega plazmida defosforilirali z encimom FastAP po navodilih proizvajalca. S tem smo preprečili ponovno ligacijo koncev lineariziranih plazmidov. Iz plazmida pABE87 smo nato izrezali *mmsOp1* operon z restriktionskima encimoma *Nde*I in *Xba*I. Ta fragment smo potem vnesli v plazmid pSGlit2, ki smo ga predhodno rezali z encimoma *Nde*I in *Xba*I. Ta plazmid vsebuje mesto vezave ribosoma pred start-kodonom oz. pred *Nde*I restriktionskim mestom in še dodatno restriktionsko mesto za *Xba*I pred mestom za vezavo ribosoma, ki pa ga encim *Xba*I ne prepozna, če je DNA modifcirana z *dam* metilacijo. Iz tega razloga smo pripravljeni plazmid najprej transformirali v *E. coli* ET12567, ki ima prekinjena gena za metilazi *dam* in *dcm*. Nato smo z restriktionskim encimom *Xba*I iz izoliranega plazmida izrezali *mmsOp1* operon, ki je na obeh koncih vseboval restriktionsko mesto *Xba*I in mesto vezave ribosoma. Ta operon pa smo potem vnesli v predhodno pripravljen odprt plazmid pABE62 in s tem

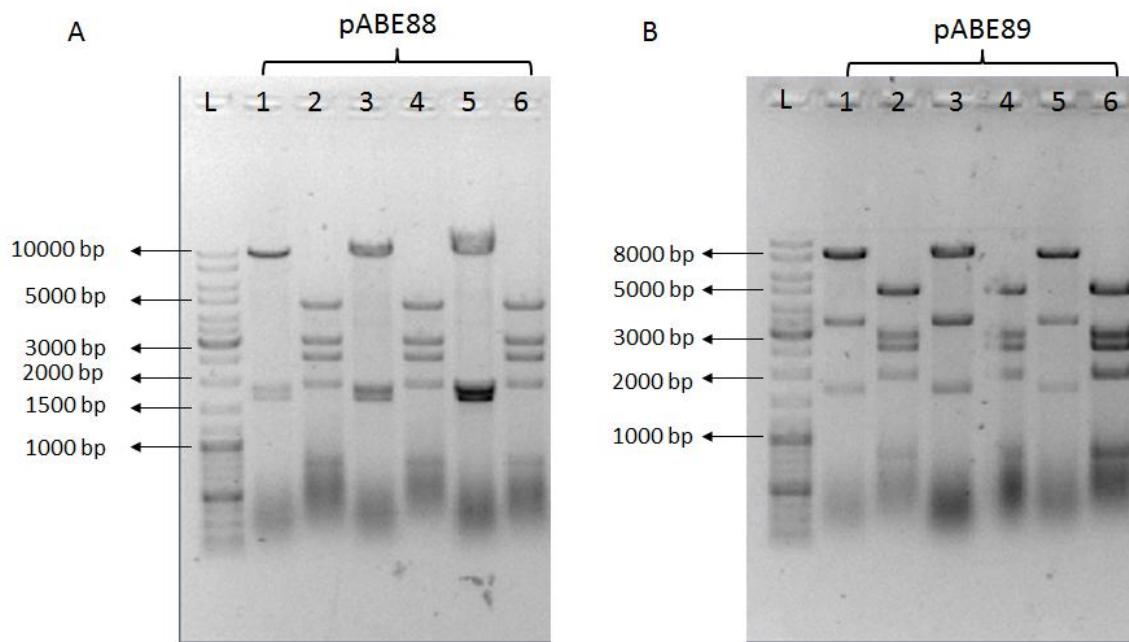
dobili plazmid pABE89. pABE89 smo potem s transformacijo vnesli v *E. coli* ET12567/pUZ8002 in nato s konjugacijo v sev *S. erythraea* NRRL2338.

Pravilnost konstruiranih plazmidov pABE88 in pABE89 smo preverili z restrikcijskimi analizami z več encimi: *NdeI*, *KpnI* in *PstI* (slike 53 in 54).



Slika 53: Restrikcijska analiza plazmidov pABE88 in pABE89 z restrikcijskim encimom *NdeI*. A) pABE88 (3 neodvisni kloni: lisa velikosti 5101 bp se ujema s fragmentom operona *mmsOp1*, lisa velikosti 7943 bp se ujema s preostalim fragmentom z *NdeI* rezanega plazmida pABE88) in pABE89 (3 neodvisni kloni: lisa velikosti 1742 bp se ujema s fragmentom gena *ilvB1-HA*, lisa velikosti 11302 bp se ujema s preostalim fragmentom z *NdeI* rezanega plazmida pABE89); vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike). B) kontrole: 1 – pABE87 (lisa velikosti 11309 bp ustrezza velikosti nerezanega plazmida pABE87), 2 – insert *ilvB1-HA* (lisa 1742 bp se ujema s fragmentom gena *ilvB1-HA*), 3 – pABE62 (lisa velikosti 7983 bp ustrezza velikosti nerezanega plazmida pABE62), 4 – insert *mmsOp1-HA* (lisa 5101 bp se ujema s fragmentom operona *mmsOp1-HA*); vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na desni strani slike).

Figure 53: Restriction analysis of plasmids pABE88 and pABE89 digested with restriction enzyme *NdeI*. A) pABE88 (3 independent clones: band with size 5101 bp corresponds to fragment of *mmsOp1* operon, band with size 7943 bp corresponds to remains of plasmid pABE88 digested with *NdeI*) in pABE89 (3 independent clones: band with size 1742 bp corresponds to fragment of *ilvB1-HA* gene, band with size 11302 bp corresponds to remains of plasmid pABE89 digested with *NdeI*); markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel. B) controls: 1 – pABE87 (band with size 11309 bp corresponds to undigested plasmid pABE87), 2 – insert *ilvB1-HA* (band with size 1742 bp corresponds to *ilvB1-HA* gene fragment), 3 – pABE62 (band with size 7983 bp corresponds to undigested plasmid pABE62), 4 – insert *mmsOp1-HA* (band with size 5101 bp corresponds to *mmsOp1-HA* operon fragment); markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the right side of the gel.



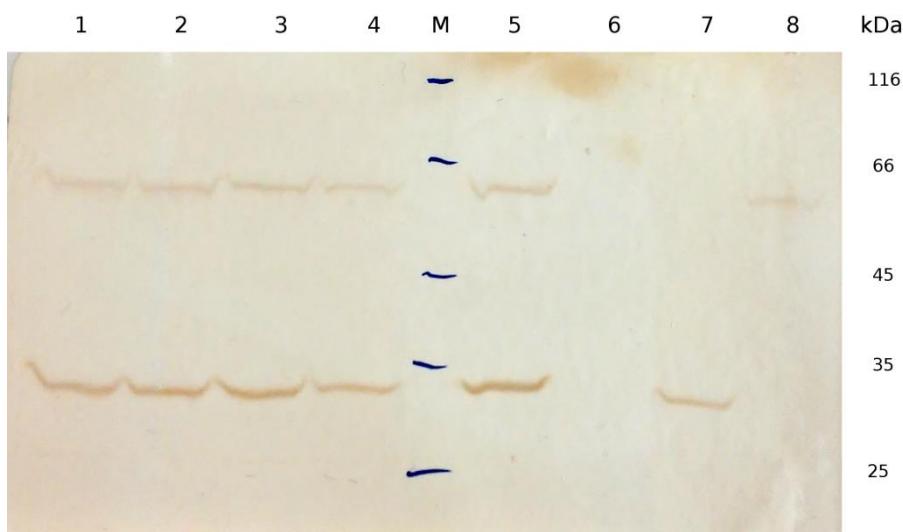
Slika 54: Restriktijska analiza plazmidov pABE88 in pABE89 z restriktijskima encimoma *KpnI* in *PstI*. A) vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike); pABE88: 1, 3, 5 – 3 neodvisni kloni rezani s *KpnI* (lise velikosti 1672 bp, 1800 bp, 9572 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE88 rezanega s *KpnI*); 2, 4, 6 – 3 neodvisni kloni rezani s *PstI* (lise velikosti 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 3084 bp, 4663 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE88 rezanega s *PstI*). B) vrstica L prikazuje velikosti DNA fragmentov označevalcev (njihova pozicija je shematsko prikazana na levi strani slike); pABE89: 1, 3, 5 – 3 neodvisni kloni rezani s *KpnI* (lise velikosti 1672 bp, 3371 bp, 8001 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE89 rezanega s *KpnI*); 2, 4, 6 – 3 neodvisni kloni rezani s *PstI* (lise velikosti 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 2921 bp, 4826 bp ustrezajo fragmentom plazmida pABE89 rezanega s *PstI*).

Figure 54: Restriction analysis of plasmids pABE88 and pABE89 digested with restriction enzymes *KpnI* and *PstI*. A) markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel; pABE88: 1, 3, 5 – 3 independent clones digested with *KpnI* (bands with size 1672 bp, 1800 bp, 9572 bp correspond to fragments of plasmid pABE88 digested with *KpnI*); 2, 4, 6 – 3 independent clones digested with *PstI* (bands with size 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 3084 bp, 4663 bp correspond to fragments of plasmid pABE88 digested with *PstI*). B) markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel; pABE89: 1, 3, 5 - 3 independent clones digested with *KpnI* (bands with size 1672 bp, 3371 bp, 8001 bp correspond to fragments of plasmid pABE89 digested with *KpnI*); 2, 4, 6 - 3 independent clones digested with *PstI* (bands with size 802 bp, 1930 bp, 2565 bp, 2921 bp, 4826 bp correspond to fragments of plasmid pABE89 digested with *PstI*).

4.7.5.1 Potrditev izražanja proteinov acetolaktat sintaze in metilmalonat sintaze s prenosom Western v transformantah s konstrukti *ilvB1+mmsOp1* oz. *mmsOp1+ilvB1*

S prenosom Western smo želeli potrditi sintezo dodatne kopije proteina IlvB1-HA s pričakovano velikostjo 58 kDa in sintezo dodatne kopije SACE_1459-HA s pričakovano velikostjo 30 kDa.

Na sliki 55 je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji s specifičnimi protitelesi. Pri dveh neodvisnih konjugantah *S. erythraea* s plazmidom pABE88 in treh neodvisnih konjugantah *S. erythraea* s plazmidom pABE89 smo opazili lise velikosti 58 kDa in 30 kDa, kar ustreza pričakovanim vrednostima glede na aminokislinsko zaporedje. S tem smo potrdili uspešno izražanje dodatnih kopij obeh proteinov.



Slika 55: Potrditev izražanja dodatne kopije operona *mms* (295 AK) in gena *ilvB1* (556 AK) s prenosom western; 1-3: NRRL2338+pABE89, 4: NRRL2338+pABE88, M: proteinski standard velikosti; 5: NRRL2338+pABE88; 6: negativna kontrola sev NRRL2338; 8: NRRL2338+pABE87, 9: NRRL2338+pABE14412 (opazne so lise z molekulsko maso 30 in 58 kDa).

Figure 55: Western blot analysis of *in trans* expression of 295 AA, SACE_1459-HA-tag and 556 AA, *ilvB1*-HA-tag. 1-3: NRRL2338+pABE89, 4: NRRL2338+pABE88, M: molecular mass marker (their position are represented on the right side of the blot); 5: NRRL2338+pABE88; 6: negative control, strain NRRL2338; 7: NRRL2338+pABE87, 8: NRRL2338+pABE14412 (bands of apparent molecular mass of 30,10 kDa and 58,54 kDa are observed).

4.7.5.2 Vpliv dodatne kopije operona *mmsOp1* in gena *ilvB1* na produkcijo eritromicina

Povprečna produkcija eritromicina kontrolnih sevov je bila 74 mg/l (± 12 mg/l) (NRRL2338) oz. 73 mg/l (± 15 mg/l) (NRRL2338+pSet152), povprečna produkcija eritromicina pri konjugantah s plazmidom pABE88 je bila 132 mg/l (± 16 mg/l), povprečna produkcija eritromicina pri konjugantah s plazmidom pABE89 pa 130 mg/l (± 19 mg/l) (slika 58). Pri obeh variantah je bila torej produkcija eritromicina povečana (75 % dvig produkcije) v primerjavi s kontrolnim sevom.

4.7.6 Prekinitev operona *mcm*

Operon *mcm* sestavlja 4 geni: *mutA*, *mutB*, *meaR* in *mutR*. *mutA* in *mutB* imata zapis za metilmalonil-CoA mutazo (MCM), *meaB* ima zapis za MCM-pomožni protein, *mutR* pa

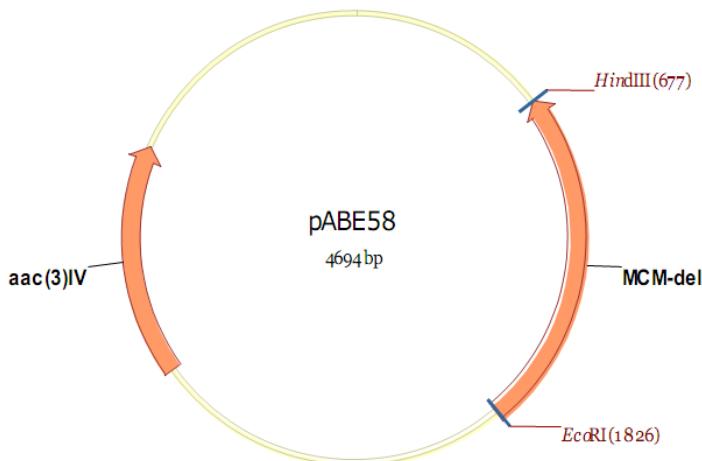
ima zapis za regulatorni gen družine *gntR* (slika 56). Encim MCM katalizira reverzibilno izomerizacijo metilmalonil-CoA in sukcinil-CoA. S prekinitvijo gena *mutB* so dvignili produkcijo eritromicina za 126 % v gojiščih, ki kot glavni vir ogljika vsebujejo ogljikove hidrate. V fermentaciji, ki temelji na gojišču, ki kot glavni vir ogljika vsebuje ogljikove hidrate, reakcija MCM prazni rezervoar z metilmalonil-CoA. S prekinitvijo operona *mcm*, se rezervoar »ne prazni« (potek reakcije v smeri nastanka sukcinil-CoA), kar je ugodno za samo produkcijo eritromicina, saj je na voljo več substrata metilmalonil-CoA (Reeves in sod., 2007). Da bi to potrdili, smo naredili eksperiment s prekinitvijo operona *mcm*.



Slika 56: Organizacija genov v *mcm* operonu; *mutA* kodira manjšo podenoto MCM, *mutB* kodira večjo podenoto MCM, *meaB* kodira MCM pomožni protein, *mutR* pa je regulatorni gen iz družine *gntR* (Reeves in sod., 2007: 296)

Figure 56: Genetic map of *mcm* operon region; *mutA* encodes the smaller subunit of MCM, *mutB* encodes the larger subunit of MCM, *meaB* encodes an MCM accessory protein and *mutR* represents *gntR*-family regulatory gene (Reeves et al., 2007: 296)

Prekinitev operona *mcm* smo izvedli tako, da smo centralno regijo operona pomnožili z oligonukleotidnimi začetniki MCMstop-encim-F1 in MCMstop-encim-R. Pomnožen in očiščen DNA fragment smo rezali z encimoma *EcoRI* in *HindIII* in z istima encimoma rezali tudi plazmid pKC1132. Nato smo plazmid pKC1132 in pripravljeni DNA fragment ligirali in tako pripravili plazmid pABE58 (slika 57). Nukleotidno zaporedje gena smo preverili s sekvenciranjem. Ko smo pABE58 s konjugacijo vnesli v sev NRRL2338, je prišlo do prekinitve gena s homologno rekombinacijo. Prekinitev oz. inaktivacijo gena smo potrdili s PCR analizo in sekvenciranjem.



Slika 57: Plazmid pABE58; vsebuje gen *aac(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicin in prekinjen operon *mcm*

Figure 57: Plasmid pABE58; contains *acc(3)IV* gene for bacterial resistance to antibiotic apramycin and deletion of *mcm* operon

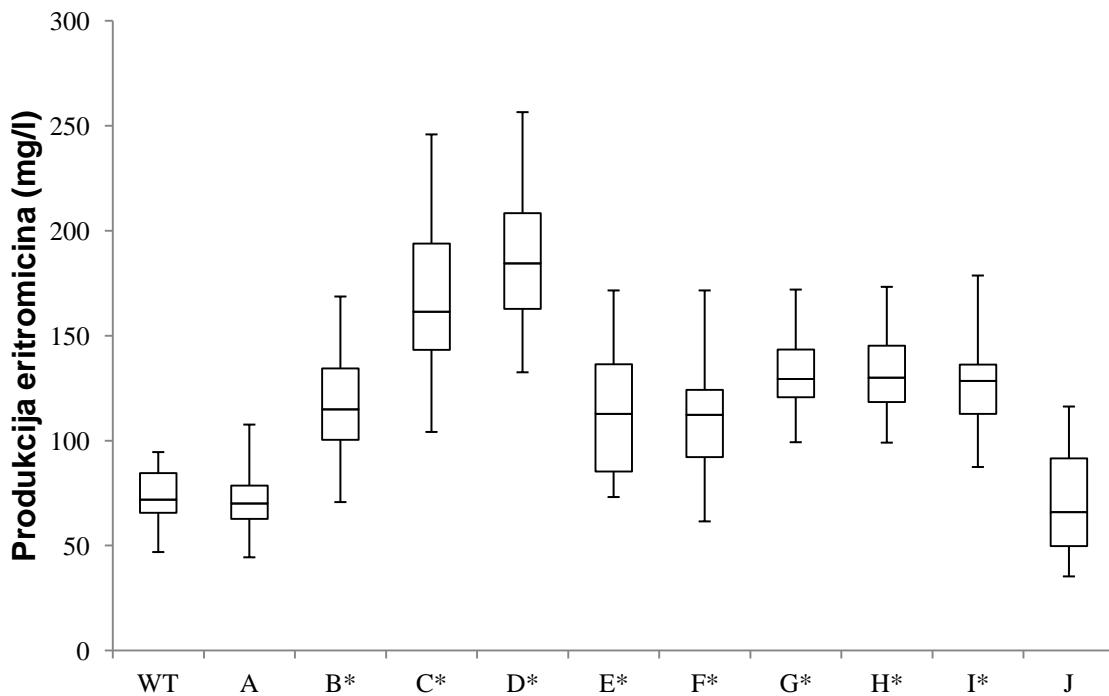
4.7.6.1 Vpliv prekinitve operona *mcm* na produkcijo eritromicina

Povprečna produkcija eritromicina pri kontrolnem sevu NRRL2338 je bila 74 mg/l (± 12 mg/l), povprečna produkcija eritromicina pri konjugantah s prekinjenim operonom *mcm* pa je bila 118 mg/l (± 24 mg/l), kar pomeni, da je bila produkcija eritromicina povečana za 58 % (slika 58).

4.7.7 Vpliv različnih mutacij na produkcijo eritromicina v sevu NRRL2338

Preglednica s produkcijo eritromicina v različnih mutantah naravnega seva NRRL2338, na podlagi katere smo izračunali povprečno produkcijo eritromicina, je v prilogi J.

Vnos dodatne kopije oz. inaktivacije gena/operona je statistično značilno vplival na produkcijo eritromicina pri transformantah, v katere smo vnesli plazmide pABE56 (operon *bkd*), pABE58 (Δmcm), pABE60 in pABE87 (operon *mmsOp1* brez in s HA-epitopom), pABE61 in pABE62 (*ilvB1* brez in s HA-epitopom), pABE88 in pABE89 (kombinacija *mmsOp1* in *ilvB1*) (slika 58). Največji vpliv na produkcijo eritromicina so imele mutante z dodatno kopijo *mmsOp1*, ki so imele v povprečju kar 150 % višjo produkcijo v primerjavi s kontrolo (sev NRRL2338 brez in s praznim plazmidom pSet152). Mutante z dodatno kopijo gena *ilvB1* so imele cca. 52 % višjo produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolo. Mutante z dodatno kopijo operona *bkd* so imele cca. 70 % višjo produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolo. Mutante z inaktivacijo operona *mcm* so imele cca. 58 % višjo produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolo. Mutante, ki so imele dodatno kopijo gena *ilvB1* in operona *mmsOp1* so imele cca. 75 % višjo produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolo. Pri transformantah, v katere smo vnesli plazmid pABE95 (*mmsOp2*) oz. plazmid pABE96 (*vdh*), nismo dokazali statistično značilnega vpliva na produkcijo eritromicina.



Slika 58: Vpliv različnih mutacij na produkcijo eritromicina v primerjavi s produkcijo eritromicina pri naravnem sevu NRRL2338. Producija eritromicina različnih transformant NRRL2338, določena z biološkim testom; WT: kontrola 1, NRRL2338, A: kontrola 2, NRRL2338 + pSet152, B: NRRL2338 + $\Delta mcmOp$ (pABE58), C: NRRL2338 + $mmsOp1$ (pABE60), D: NRRL2338 + $mmsOp1$ -HA (pABE87), E: NRRL2338 + $ilvB1$ (pABE61), F: NRRL2338 + $ilvB1$ -HA (pABE62), G: NRRL2338 + $mmsOp1$ -HA + $ilvB1$ -HA (pABE89), H: NRRL2338 + $ilvB1$ -HA + $mmsOp1$ -HA (pABE88), I: NRRL2338 + $bkdOp$ (pABE56), J: NRRL2338 + $mmsOp2$ (pABE95). Okvirji označujejo prvi in tretji kvartil vzorčne populacije. Horizontalne črte označujejo mediano, ročaji označujejo ekstremne vrednosti vzorčne populacije. Zvezdice označujejo statistično značilne ($p < 0.05$) razlike med vzorci in kontrolama 1 in 2 (podatki s produkcijo eritromicina pri različnih mutantah so navedeni v preglednici v prilogi J).

Figure 58: Effect of different mutations on erythromycin production, compared to the wild-type strain NRRL2338. Erythromycin production by NRRL2338 transformants, determined by the microbiological assay; WT: control 1, NRRL2338, A: control 2, NRRL2338 + pSet152, B: NRRL2338 + $\Delta mcmOp$ (pABE58), C: NRRL2338 + $mmsOp1$ (pABE60), D: NRRL2338 + $mmsOp1$ -HA (pABE87), E: NRRL2338 + $ilvB1$ (pABE61), F: NRRL2338 + $ilvB1$ -HA (pABE62), G: NRRL2338 + $mmsOp1$ -HA + $ilvB1$ -HA (pABE89), H: NRRL2338 + $ilvB1$ -HA + $mmsOp1$ -HA (pABE88), I: NRRL2338 + $bkdOp$ (pABE56), J: NRRL2338 + $mmsOp2$ (pABE95). Boundaries of the boxes indicate the 1st and the 3rd quartile of the sample populations. Horizontal lines represent the median values and whiskers indicate the highest and lowest values of the results. Asterisks denote statistically significant ($p < 0.05$) differences between transformants compared to control samples 1 and 2 (raw data for erythromycin production in different mutants are presented in table in appendix J).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V doktorski nalogi smo z metodološkim pristopom kombinacije proteomskega orodja in bioinformatike pridobili informacije, ki so poglobile razumevanje ključnih metabolnih poti, ki vplivajo na povečan donos eritromicina. S primerjalno proteomsko in transkriptomsko analizo, poznavanjem celotnega genoma in gojenjem sevov v industrijskih pogojih smo pridobili nove informacije o mehanizmih biosinteze eritromicina, na podlagi katerih bi lahko racionalno izboljšali obstoječe industrijske seve, pri katerih klasičen pristop ne omogoča več napredka ali pa je preveč zamuden.

5.1 OPTIMIZACIJA GOJIŠČA, KI OMOGOČA POVIŠAN DONOS ERITROMICINA IN HKRATI USPEŠNO EKSTRAKCIJO PROTEINOV IZ CELIC *S. erythraea* TER OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA PROTOKOLA

Predhodno objavljene študije, kjer so raziskovalne skupine s pomočjo omskih pristopov preučevale mehanizme biosinteze eritromicina in njene regulacije, so temeljile na enostavnih topnih gojiščih (Peano in sod., 2007, 2012, Marcellin in sod., 2013). Kultivacija v tovrstnih gojiščih je enostavna in tudi sama priprava vzorcev (odvzetih iz enostavnih topnih gojišč) za nadaljnje omske analize ni težavna. Vendar pa posledično rezultati, ki jih pridobimo iz tovrstne kultivacije niso prikaz realnega stanja industrijskega bioprocesa. Zato smo žeeli razviti bioprocес, ki bo čim bolj podoben industrijskemu (gojišče, pogoji kultivacije), hkrati pa tudi razviti protokol za uspešno ekstrakcijo proteinov iz bioprocесne brozge. Tako smo dobili vpogled v relevantne razlike v metabolnih poteh vpleteneh v biosintezo eritromicina med naravnim sevom NRRL2338 in visoko-donosnim industrijskim sevom ABE1441.

V prvem delu raziskovalne naloge smo se lotili optimizacije kompleksnega gojišča, ki v veliki meri omogoča povišan donos eritromicina in ob enem omogoča uspešno ekstrakcijo proteinov iz celic *S. erythraea* za proteomsko analizo. Industrijska gojišča imajo zelo kompleksno sestavo. Vsebujejo kompleksne vire ogljika in dušika, zato so v njih prisotni številni kontaminanti (ionski detergenti, polisaharidi, lipidi ali nukleotidi), ki bi lahko motili 2-D elektroforezo in s tem vplivali na nadaljnje proteomske analize. Poleg tega se je potrebno pri sami pripravi vzorcev izogniti (v kolikor se le da) izgubi proteinov. Objavljenih je bilo že kar nekaj proteomskih študij biosinteze različnih antibiotikov pri streptomicetah (Hesketh in sod., 2002; Vohradsky in sod., 2000; Wang in Yuan, 2005; Lu in sod., 2007; Kim in sod., 2005a, 2005b; Orsaria in sod., 1998; Vohradsky in sod., 2000; Bobek in sod., 2004; Novotna in sod., 2003), vendar so vse te študije temeljile na ekstrakciji proteinov iz enostavnih produkcijskih gojišč. Zasledili smo le en primer v literaturi, kjer so razvili protokol za ekstrakcijo proteinov iz kompleksnega industrijskega gojišča (Yin in sod., 2008).

Odločili smo se za delo s poenostavljenim industrijskim gojiščem ABPM8, v katerem je bil donos industrijskega seva ABE1441 v povprečju 2,1 g/l ($\pm 0,3$ g/l) eritromicina v 50-ml centrifugirki oz. 2,3 g/l ($\pm 0,4$ g/l) eritromicina v 250-ml erlenmajerici. Gojišče je vsebovalo sojino moko, koruzni škrob, amonijev sulfat, kalcijev karbonat in sojino olje (poglavlje 3.1.1.1). Enake sestavine se uporabljajo tudi pri pravem industrijskem bioprocесu, le da so tam dodane koncentracije sestavin večje.

V nadaljevanju smo se usmerili k optimizaciji protokola ekstrakcije proteinov iz biopresesne brozge. Pri tem smo naleteli na več problemov. V prvi fazi so problem pri ekstrakciji proteinov predstavljal netopne komponente (sojina moka, koruzni škrob, sojino olje), saj so onemogočale enostavno separacijo celic od gojišča. Ključnega pomena pri uspešni ekstrakciji proteinov iz celic je bil tudi način razbijanja celic, saj pri tem pride do sprostitve znotrajcelične vsebine, hkrati pa tudi do sprostitve proteolitičnih encimov, ki lahko v nadaljevanju vplivajo na integriteto proteoma.

Problema netopnih komponent v gojišču smo se lotili s testiranjem različnih hitrosti začetnega centrifugiranja (800 g, 1000 g, 2000 g, 3000 g, 3500 g). Bistvenih razlik ni bilo (odstotek variiranja je bil manjši od 5 %), smo pa ugotovili, da pri višji sili fermentacijska brozga bolje sedimentira, zato smo pri nadaljnjih postopkih uporabili najvišjo silo centrifugiranja (3500 g). Poleg tega smo z mikroskopskim preparatom potrdili, da se celice res usedejo (v preparatu sedimenta so bile opazne vse tri oblike celic: prosti micelij, skupki in peleti) (slika 20), saj v preparatu supernatanta nismo videli ničesar. Naslednji korak v ekstrakcijskem protokolu je bil izpiranje sedimentov fermentacijske brozge, pri čemer je bilo pomembno, da smo z izpiranjem odstranili prisotne kontaminante (proteinji soje). Pri izpiranju sedimentov smo uporabili 2 različni raztopini: raztopino A (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 9,0) in raztopino B (50 mM Tris-HCl, pH 7,2). Na podlagi izmerjenih koncentracij proteinov v celičnem ekstraktu smo določili, da je raztopina B ustrezejša. Z zbiranjem frakcij po spiranju in z določanjem koncentracije proteinov v izpirkih smo tudi preverili ali s spiranjem sedimenta (biomase) odstranimo proteine soje. Rezultati so pokazali, da so bili po prvem spiranju proteini v izpirku še prisotni, v naslednjih izpirkih pa proteinov nismo več zaznali (preglednica 8).

Razbijanje celičnih sten in membran in s tem sprostitev znotrajcelične vsebine je bilo ključnega pomena pri uspešni ekstrakciji proteinov iz celic. Za maksimalen izplen proteinov mora biti proces razbijanja celic hiter, sila pa močna (da razbije celično steno in membrano). V ta namen se uporabljajo sonikatorji, ki celice razbijejo ultrasonično. Ultrasonikacija je metoda mehanskega razbijanja celic, ki temelji na visoko frekvenčnih zvokih (nad 20 MHz) (Ince in sod., 2001). Celice smo razbijali z različnimi nastavtvami sonikatorja (cikel 1/ amplituda 100 %/ 3x15 s; cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s; cikel 0,9/ amplituda 100 %/ 20 s; cikel 0,8/ amplituda 100 %/ 20 s; cikel 0,7/ amplituda 100 %/ 20 s) in izmerili koncentracijo proteinov v celičnem ekstraktu. Najvišje koncentracije proteinov smo dobili, če smo celice razbili z načinom cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s (preglednica

9). Kot že omenjeno problem pri razbijanju celic lahko predstavljajo proteolitični encimi (proteaze in peptidaze). Proteaze so nujno potrebne pri različnih celičnih funkcijah, kot je popravljanje celic in razgradnja zunajceličnega materiala. V intaktnih celicah je proteazna aktivnost natančno regulirana s kompartmentizacijo ali s proteaznimi inhibitorji (Rawlings in sod., 2004). Ko pa pride do lize celice, je regulacija motena in lahko pride do proteolitske razgradnje vzorcev, kar lahko predstavlja velik problem. Zato moramo v ekstrakcijske pufre dodajati ustrezne proteazne inhibitorje. Proteazni inhibitorji so biološke ali kemijske spojine, ki se reverzibilno ali ireverzibilno vežejo na proteaze (Laskowski in Kato, 1980; Rawlings in sod., 2004). V kompleksnem industrijskem gojišču mikrobne celice sintetizirajo in izločajo proteaze, da lahko razgradijo proteine iz kompleksnih virov dušika. Yin in sod. (2008) so merili proteazno aktivnost med procesom biosinteze avermektina. V zgodnjih fazah bioprosesa je aktivnost proteaz narasla in dosegla visok nivo, ki je do pozne faze bioprosesa ostal enak. V pozni fazah bioprosesa je proteazna aktivnost še narasla, kar je lahko posledica citolize. Med razbijanjem celic so se iz liziranih celic sprostile endogene proteaze in prišlo je do razgradnje proteinov, kar je posledično vplivalo na integriteto proteoma. Kljub dodajanju proteaznih inhibitorjev niso uspeli preprečiti razgradnje proteinov. Do razgradnje proteinov je prišlo predvsem v srednji in pozni fazi bioprosesa. Tudi mi smo opazili problem razgradnje proteinov v kasnejših fazah bioprosesa pri sevu ABE1441 (slika 24) (pri naravnem sevu NRRL2338 tega problema ni bilo). Pri optimizaciji protokola smo testirali dva komercialna koktejla inhibitorjev proteaz v ekstrakcijski raztopini: tabletka Complete Mini (Roche) (2 varianti: 1 tabl./10 ml pufra oz. 2 tabl./10 ml pufra) in Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem). Tabletke Complete Mini se uporabljajo za inhibicijo serinskih, cisteinskih in metaloproteaz. Vsebujejo reverzibilne in ireverzibilne inhibitorje. Koktejl inhibitorjev proteaz Protease Inhibitor Cocktail Set III je koktejl 6 proteaznih inhibitorjev s široko specifičnostjo za inhibicijo aspartatskih, cisteinskih, serinskih in aminopeptidaz. Ugotovili smo, da so tabletke Complete Mini v koncentraciji 2 tabl./10 ml ekstrakcijskega pufra bolj primerne v primerjavi z inhibitorji proizvajalca Calbiochem (slika 21), vseeno pa nismo uspeli v celoti preprečiti proteolize.

V postopek ekstrakcije smo v zadnjem koraku vključili šeobarjanje proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean-Up« (GE Healthcare). S tem smo iz celičnega ekstrakta odstranili prisotne kontaminante, kot so lipidi, nukleinske kisline, ionski detergenti, soli, ki lahko motijo ločevanje in vizualizacijo 2-D gela. Slika 2-D gela je imela po uporabi komercialnega kompleta manj šuma v ozadju, proteinske lise pa so bile bolj izrazite (slika 22).

V prvem delu doktorske naloge smo pokazali, da industrijsko gojišče ABPM8 omogoča povišan donos eritromicina in hkrati tudi uspešno ekstrakcijo proteinov iz celic *S. erythraea* (potrjena hipoteza 1). Vpeljali smo uspešen protokol za ekstrakcijo proteinov iz

celic *S. erythraea*: začetno centrifugiranje fermentacijske brozge pri 3500 g, izpiranje biomase z raztopino 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, resuspendiranje biomase v ekstrakcijskem pufru, v katerega smo dodali proteaze inhibitorje Complete Mini v koncentraciji 2 tabl./10 ml ekstrakcijskega pufra, ultrasonično razbijanje celic z načinom cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s in obarjanje proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean-Up«.

5.2 RAZVOJ BIOPROCESA PRODUKCIJE ERITROMICINA, KI POSNEMA REALNE INDUSTRIJSKE POGOJE

Naslednji korak v našem raziskovalnem delu je vključeval kultivacijo sevov *S. erythraea* v kompleksnem industrijskem gojišču ABPM8 (izbranem v predhodnih eksperimentih) v pogojih, ki so čim bolj posnemali realne industrijske pogoje. Verjetno bi sicer lahko nekatere razlike med sevoma opazili tudi v enostavnnejših topnih gojiščih (kot je npr. povečano izražanje genov za biosintezo eritromicina), vendar je bilo za preučevanje razlik v metabolnih poteh, ki omogočajo oskrbo z gradbenimi enotami, izjemnega pomena, da so bili pogoji čim bolj podobni realnim industrijskim bioprocесom. Le v takih pogojih smo lahko videli realno sliko metabolnih procesov, ki prispevajo k izboljšani produkciji eritromicina v industrijskem sevu.

Kultivacije smo izvedli v 5-l bioreaktorjih. Poenostavili smo sheme dohranjevanja substratov, saj smo na ta način lažje zagotovili ponovljivost bioprocесov. Tekom celotnega bioprocesa smo spremljali pH, koncentracijo kisika v brozgi, koncentracijo glukoze in koncentracijo amonijevega sulfata. Tekom bioprocesa smo s sprotnimi meritvami določali tudi celično gostoto (z meritvami PMV) in koncentracijo nastalega eritromicina. Na podlagi teh parametrov smo določili kontrolne točke KT1-KT4, v katerih smo pobirali vzorce za proteomske analize. Ta pristop je omogočal pridobivanje vzorcev v točno določeni fazì rasti bakterije in produkcije eritromicina, s čimer smo dobili vpogled v relevantne razlike med sevoma v specifični točki bioprocesa.

Bioprocес je potekal v 4 fazah: (a) faza prilagajanja, ki je potekala prvih 24 ur bioprocesa (prva časovna točka je bila postavljena ob koncu faze prilagajanja, tik pred začetkom produkcije); (b) faza hitre rasti in porabe glukoze, kjer je potekala največja produkcija eritromicina (druga časovna točka je bila postavljena ob začetku produkcije); (c) stacionarna faza rasti, ki je nastopila, ko se je vsa glukoza v gojišču porabila, nato pa je sledil ponoven porast produkcije eritromicina (tretja časovna točka je bila postavljena med intenzivno produkcijo eritromicina); (d) faza odmiranja, v kateri se je produkcija eritromicina zaključila (četrta časovna točka je bila postavljena ob koncu produkcije).

S primerjavo poteka bioprocесov pri sevih ABE1441 in NRRL2338 (sliki 18 in 19) smo ugotovili, da se produkcija pri obeh sevih začne okoli 20-30 h. Med 30 in 50 h bioprocesa je pri obeh sevih sledila intenzivna poraba glukoze, hkrati pa se je začela intenzivna produkcija eritromicina. Pri sevu ABE1441 je bila produkcija eritromicina v eksponentni

fazi rasti hitrejša, poleg tega se je nadaljevala še v stacionarni fazi rasti. Pri sevu NRRL2338 se je produkcija zaključila že pri 60 h, medtem ko je pri sevu ABE1441 potekala vse do 90 h. Posledično je bil donos eritromicina pri sevu ABE1441 več kot 10-krat višji v primerjavi s sevom NRRL2338. V času izvajanja doktorske naloge smo skupaj z drugimi inštitucijami (Acies Bio, Nacionalni inštitut za biologijo, Inštitut Jožef Stefan in Biotehniška fakulteta) sodelovali v projektu v okviru Kompetenčnega centra Brin (KC Brin), v katerem smo z metodami sistemsko biologije primerjali naravni in visokodonosni sev *S. erythraea*. Kolegi na Nacionalnem inštitutu za biologijo so v okviru transkriptomske študije z metodo qPCR preučevali dinamiko izražanja genov za biosintezo eritromicina *eryK* in *eryAI* pri bioprocесu s sevom NRRL2338 oz. pri bioprocесu s sevom ABE1441. Rezultati so pokazali, da sta bila oba gena inducirana že pred biosintezo eritromicina, vendar je bila indukcija pri sevu ABE1441 močnejša, poleg tega pa je trajala dalj časa.

Rezultati, ki smo jih pridobili so izjemnega pomena, saj do sedaj proteomske študije pri industrijskih aktinomicetah niso temeljile na industrijskih gojiščih in posledično tudi niso pokazale rezultatov, ki bi omogočali nadaljne izboljšave industrijskih sevov. Mi smo v nadaljevanju z razvojem opisanega protokola in z gojenjem sevov v pogojih, ki so čim bolj posnemali realne industrijske kultivacije dobili vpogled v metabolne poti in mehanizme, ki sevu ABE1441 zagotavljajo cca. 10-krat višjo produkcijo v primerjavi s sevom NRRL2338.

5.3 UPORABA OMSKIH TEHNOLOGIJ KOT IZHODIŠČE ZA IZBOLJŠEVANJE DONOSA ERITROMICINA

Z objavo celotnega genoma naravnega seva *S. erythraea* so leta 2007 Oliynyk in sod. odprli nove možnosti sistemskega preučevanja genoma aktinobakterije. Kmalu po tem so bile objavljene prve primerjalne genomske in transkriptomske študije različnih sevov *S. erythraea* (Peano in sod., 2007, 2012; Marcellin in sod., 2013; Li in sod., 2013).

Zanimivo je, da smo v okviru rezultatov pridobljenih s transkriptomskimi analizami v okviru projekta KC Brin, ugotovili določene podobnosti z dvema predhodnjima transkriptomskima študijama (Li in sod., 2013; Peano in sod., 2012). In sicer, pri vseh treh industrijskih sevih je raven izražanja genov za biosintezo eritromicina povečana v primerjavi s sevom NRRL2338, raven izražanja genov, ki sodelujejo v ciklu TCA pa je znižana v primerjavi s sevom NRRL2338.

5.3.1 Uporaba proteomskega orodja za preučevanje biosinteze eritromicina

Kot že omenjeno so že bile objavljene primerjalne genomske in transkriptomske študije različnih sevov *S. erythraea*, medtem ko je proteom te bakterije zaenkrat še slabo raziskan. Izražanje genov ni vedno v korelaciji z vsebnostjo proteinov, zato lahko s preučevanjem bioloških procesov na nivoju proteoma dobimo veliko dodatnih informacij (Thongboonkerd, 2007). Proteomika namreč preučuje proteine, ki so nosilci funkcij (Lubec in sod., 2003). Poleg informacije o vsebnosti proteinov lahko z uporabo različnih proteomskega orodja dobimo tudi informacije o njihovih post-translacijskih modifikacijah in proteinskih interakcijah, kar daje še boljši vpogled v dogajanje v celici oz. tkivu (Wetmore in Merrick, 2004).

V nalogi smo za analizo proteoma uporabili metodo 2-D elektroforeza v kombinaciji z MS (za identifikacijo proteinov). Z 2-DE smo izvedli primerjalno analizo proteinskih profilov med naravnim (NRRL2338) in visoko-donosnim sevom (ABE1441) v točkah KT1 in KT2. Kot referenčni sev je bil uporabljen naravni sev NRRL2338. V kontrolnih točkah KT3 in KT4 je pri sevu ABE1441 prišlo do proteolize in primerjava ni bila mogoča. Pojav proteolize smo opazili v vseh bioloških ponovitvah. Podobno so Yin in sod. (2008) že poročali o problemu proteolize pri vzorcih, odvzetih v srednji in pozni fazi fermentacije (poglavlje 5.1).

S primerjavo proteinskih profilov sevov NRRL2338 in ABE1441 smo za identifikacijo določili 120 diferencialno izraženih proteinov. Od teh jih je bilo 110 identificiranih, medtem ko pri 10 identifikacijah zaradi prenizke vsebnosti proteina v lisi ni bila uspešna. Med 110 identificiranimi proteini so bili nekateri prisotni v večih proteinskih lisah, tako da smo dejansko identificirali le 44 različnih proteinov (preglednici 11 in 12). Sledila je njihova razvrstitev v skupine glede na celične procese v skladu s hierarhijo metabolizma KEGG Pathway (slika 25). Največje razlike med sevoma smo ugotovili v KT2, torej ob začetku produkcije eritromicina. Kontrolna točka 1 (KT1) je bila postavljena pred začetek produkcije eritromicina, t.j. v fazo prilagajanja, kjer smo opazili podoben proteinski profil pri obeh sevih. To je smiselno, saj se v fazi prilagajanja celična populacija adaptira na novo okolje in se pri tem praktično ne spreminja. V fazi hitre rasti pa potem pride do večjih razlik med sevoma. Naravni sev sicer prav tako kot visokodonosni začne z intenzivno produkcijo eritromicina, vendar ta pri visokodonosnem sevu poteka hitreje in bolj intenzivno (poglavlje 5.1.1).

Ugotovili smo, da največ diferencialno izraženih proteinov sodi v skupino energijskega metabolizma in metabolizma ogljikovih hidratov (predvsem proteini glikolize in cikla TCA). Poleg teh pa so bili identificirani še proteini vključeni v metabolizem terpenov in poliketidov, metabolizem nukleotidov, metabolizem aminokislin, metabolizem lipidov, metabolizem in razgradnjo ksenobiotikov, pa tudi proteini translacije in proteini, ki sodelujejo pri zvijanju, sortiranju in degradaciji. Nekatere proteine smo detektirali samo pri naravnem sevu, v visokodonosnem pa ne: proteini vključeni v metabolizem ogljikovih

hidratov (sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa, SACE_6668; dihidrolipoamid sukciniltransferaza, SACE_1638; fosfoglukonat dehidrataza, SACE_1740; 6-fosfofruktokinaza, SACE_1704; riboza-fosfat pirofosfokinaza, SACE_0816) in proteini vključeni v metabolizem nukleotidov (inozin-5-monofosfat dehidrogenaza, SACE_6708; fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaza, SACE_1708; fosforibozilaminoimidazol karboksamid formiltransferaza, SACE_6664). Protein EryG (metilaza) smo pri sevu ABE1441 zaznali na petih različnih lokacijah, pri sevu NRRL2338 pa le na eni. Encim EryG katalizira post-PKS reakcijo v biosintezi eritromicina (pretvorba v aktivno obliko eritromicina A). Tri glikolitične encime smo detektirali le v sevu ABE1441 (glukoza-6-fosfat izomeraza, SACE_2158; 2-fosfoglicerat dehidrataza, SACE_0838; fosfoglycerat mutaza, SACE_6967), encim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (SACE_2143) pa je imel v sevu ABE1441 povečano raven izražanja v primerjavi s sevom NRRL2338. Protein IlvC (SACE_6157), ki sodeluje pri biosintezi valina, je imel v sevu ABE1441 znižano raven izražanja v primerjavi s sevom NRRL2338.

Pri nekaterih proteinih smo ugotovili, da se protein nahaja na večih lokacijah 2-D gela, kar verjetno nakazuje na prisotnost izoblik ali post-translacijske modifikacije (metiltransferaza oz. EryG, beta podenota sukcinil-CoA ligaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, glukoza-6-fosfat izomeraza, enolaza, malat dehidrogenaza, D-3-fosfoglycerat dehidrogenaza, FOF1 ATP sintaza podenota beta, dihidrolipoamid sukciniltransferaza, molekularni šaperon DnaK, oksidoreduktaza, sukcinil-CoA sintetaza podenota alfa). Post-translacijske modifikacije (PTM) vključujejo kovalentno procesiranje polipeptidne verige s proteolitsko cepitvijo ali z dodajanjem funkcionalne skupine (fosforilacija, glikozilacija, acilacija itd.) na eno ali več aminokislin (Mann in Jensen, 2003). PTM povzročajo strukturne spremembe proteinov, spremenijo aktivnost proteinov, vplivajo na njihovo lokalizacijo, stabilnost in interakcije z drugimi proteini. PTM tako močno povečajo kompleksnost in dinamiko proteinov, kar posledično pomeni zapleteno regulacijo bioloških dogodkov (Mann in Jensen, 2003; Kwon in sod., 2006). Pri bakterijah je fosforilacija prevladujoča post-translacijska modifikacija, ki regulira funkcionalnost proteinov (Mjakovic, 2010; Kobir in sod., 2011). Primer preučevanja vloge acetilacije in fosforilacije smo zasledili tudi pri *S. erythraea*. Licona-Cassani in sod. (2014) so preučevali vlogo fosforilacije pri koordinaciji metabolnega preklopa v *S. erythraea*. Pokazali so velik potencial fosfoproteomske raziskav pri mikrobnii fiziologiji in dokazali izjemno dinamičnost fosforilacijskih dogodkov tekom razvojnega cikla aktinomicet. Huang in sod. (2014) so preučevali acetilacijo v *S. erythraea*. Ugotovili so, da so acetilirani proteini vpletjeni v številne biološke procese, kot so sinteza proteinov, glikoliza/glukoneogeneza, cikel TCA, metabolizem maščobnih kislin, sekundarni metabolizem in metabolne poti za oskrbo s substrati pri biosintezi eritromicina. Natančno so analizirali vpliv acetilacije na različne celične funkcije in s tem dobili vpogled v regulatorne funkcije acetilacije v primarnem in sekundarnem metabolizmu.

5.3.2 Primernost proteomskega pristopa za študij biosinteze antibiotikov

Objavljenih je bilo kar nekaj proteomskih študij na aktinomicetah, ki so za preučevanje biosinteze antibiotikov ali njene regulacije uporabile metodologijo 2-DE v kombinaciji z MS (Hesketh in sod., 2002; Vohradsky in sod., 2000; Wang in Yuan, 2005; Lu in sod., 2007; Kim in sod., 2005a, 2005b; Orsaria in sod., 1998; Vohradsky in sod., 2000; Bobek in sod., 2004; Novotna in sod., 2003). Od vseh teh je le ena študija, ki se je preučevanja biosinteze antibiotika avermektina lotila s primerjavo 2-D proteinskih profilov naravnega in visokodonosnega seva (Yin in sod., 2013). Glavne spremembe v izražanju proteinov pri produkciji avermektina so bile (podobno kot pri nas) povezane z metabolizmom aminokislin, metabolizmom ogljika, energijskim metabolizmom in z odzivom na okoljski stres.

Metodologija, ki temelji na 2-DE, ima nekaj omejitev. Kljub številnim tehničnim izboljšavam, to ni avtomatizirana metoda, zato je težko zagotoviti ponovljivost. Poleg tega so pomanjkljivosti metode še nizka občutljivost detekcije, omejena je kapaciteta nanašanja gradientnih pH trakov, nizko linearno območje vizualizacijskih postopkov (Rabilloud, 2002; Monteoliva in Albar, 2004). Glavna omejitev je, da lahko detektiramo le proteine v določenem območju molekulskih mas in izoelektričnih točk. Zelo pomembno je tudi ustrezeno vzorčenje, saj je proteom dinamičen (nabor proteinov se tekom kultivacije spreminja). To pomeni, da smo morali čas odvzema vzorev prilagoditi ustreznemu fiziološkemu stanju celic. Zato smo vsak bioprocес natančno spremljali (pH, koncentracijo kisika v brozgi, koncentracijo glukoze, koncentracijo amonijevega sulfata, celično gostoto, produkcijo eritromicina) in v skladu z ustreznimi parametri vzorčili v ustreznih časovnih točkah (KT1-KT4) (poglavlje 5.1.1).

S primerjalno proteomsko analizo smo opazili razlike v proteomskem profilu med naravnim sevom *S. erythraea* in visokodonosnim industrijskim sevom (potrjena hipoteza 2). Največ razlik smo opazili v točki KT2. Identificirali smo predvsem proteine vključene v primarne metabolne poti, kar je pomembno, saj primarni metabolizem zagotavlja prekurzorje za biosintezo sekundarnih metabolitov. Poleg tega smo z analizo 2-DE detektirali tudi regulatorni protein (regulator za transport fosfata, SACE_7091). Dodatna prednost analize 2-DE je možnost preučevanja post-translacijskih modifikacij, poznavanje teh pa omogoča boljše razumevanje biosinteze eritromicina in njene regulacije.

5.3.3 Rezultati primerjalne transkriptomsko-proteomske analize ter uporaba bioinformatskih orodij za preučevanje biosinteze eritromicina

Poleg diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali z 2-DE, smo v sklopu širše primerjalne transkriptomske analize in proteomske analize z metodo spektralnega štetja (KC Brin) identificirali gene oz. proteine, ki se v obeh sevih različno izražajo. Rezultati vseh omskih metod so bili integrirani in na podlagi integracije vseh podatkov smo skušali

identificirati metabolne poti oz. mehanizme, ki so ključni za povečan donos eritromicina v sevu ABE1441. Ugotovili smo, da imajo geni, ki sodelujejo pri oskrbi z gradbeno enoto metilmalonil-CoA v sevu ABE1441 povečano raven izražanja v primerjavi z naravnim sevom NRRL2338, kar zelo verjetno prispeva k povišanem donosu eritromicina v sevu ABE1441. Postavili smo hipotezo, da ima pri donosu eritromicina pomembno vlogo alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin. Ključni geni oz. operoni te poti so *ilvB1*, operon *bkd* in operon *mms* (slika 28) (potrjena hipoteza 3).

V nadaljevanju smo z bioinformatskimi orodji podrobnejše analizirali gene/odprte bralne okvirje, ki so se v primerjalni analizi pokazali kot diferencialno izraženi. Namen teh analiz je bil, da preverimo ali je izbrani gen/odprt bralni okvir res tisti, ki ga je avtomatska anotacija predvidela. Z analizo BLASTP smo aminokislinska zaporedja diferencialno izraženih produktov genov primerjali z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov aktinobakterij in poiskali najbližjega homologa, ki je že bil biokemijsko karakteriziran. Nato smo naredili še poravnave Clustal (priloge B-I). Domnevo, da je produkt določenega gena predvideni encim, smo preverili še s podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov na ohranjeni domeni encima. Preverili smo tudi ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog produktov genov (poglavlje 4.5).

Analiza gena *ilvB1* je pokazala, da je njegov produkt verjetno acetolaktat sintaza, ki sodeluje pri biosintezi aminokisline valin (katalizira pretvorbo piruvata v 2-acetolaktat). Geni SACE_3952 – SACE_3954, ki sestavlja t.i. operon *bkd*, predvidoma kodirajo encim za razgradnjo razvejanih keto kislin (BKD), kar je pokazala tudi bioinformatska analiza genov. Produkt gena SACE_3952 je verjetno alfa podenota dehidrogenaze razvejanih keto kislin E1, produkt gena SACE_3953 je verjetno beta podenota dehidrogenaze razvejanih keto kislin E1, produkt gena SACE_3954 pa dihidrolipoamid aciltransferaza, komponenta E2. Ugotovili smo, da sta v organizmu *S. erythraea* prisotna še dva homologna *bkd* operona, SACE_5542 - SACE_5544 in SACE_7294 - SACE_7296. Na podlagi analize celotnega operona in njegove okolice (prisotnost transkripcionskega regulatorja AsnC) smo določili, da je genska skupina SACE_3952 – SACE_3954 tista, ki je vključena v oskrbo eritromicinskih prekurzorjev (poglavlje 4.5.2). Z bioinformatsko analizo smo ugotovili tudi, da sta v genomu *S. erythraea* 2 operona *mms*, poimenovali smo ju *mmsOp1* (SACE_1456 – SACE_1459) in *mmsOp2* (SACE_4672 – SACE_73). Analiza gena *mmsA2* (SACE_1456, SACE_4672) je pokazala, da je njegov produkt verjetno homolog metilmalonat-semialdehid dehidrogenaze, ki je vključen v razgradnjo valina – pretvarja metilmalonat semialdehid v propanoil-CoA (slika 28). Produkt gena SACE_1457 je verjetno acil-CoA dehidrogenaza, ki katalizira pretvorbo izobutiril-CoA v 2-metil-prop-2-enoil-CoA (slika 28). Produkt gena SACE_1458 je verjetno enoil-CoA hidrataza, ki katalizira pretvorbo 2-metil-prop-2-enoil-CoA v 3-hidroksibutiril-CoA (slika 28), produkt gena SACE_1459 pa je verjetno enoil-CoA hidrataza, ki katalizira pretvorbo 3-hidroksi-izobutirat v metilmalonat semialdehid (slika 28).

Za preučevanje biosinteze eritromicina je bil proteomski pristop primeren. Sama metodologija 2-DE/MS ima sicer nekaj omejitev (detekcija proteinov le v določenem območju molekulskega mas in izoelektričnih točk), vendar je v kombinaciji z drugimi analizami (transkriptomika, LC-MS/MS proteomika) odlično izhodišče za nadaljnje izboljšave industrijskih sevov. Prednost proteomskega pristopa je tudi možnost preučevanja post-translacijskih modifikacij, ki lahko prispevajo k boljšemu razumevanju zapletenih mehanizmov biosinteze antibiotikov. Predenj se lotimo usmerjenega genskega inžineringa pa je smiselno narediti bioinformatske analize, saj se z uporabo bioinformatskih orodij (npr. iskanje bližnjih kemijsko karakteriziranih homologov, poravnave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij) lahko še dodatno prepričamo o identiteti diferencialno izraženih genov.

5.4 UPORABA METABOLNEGA INŽINERINGA ZA VREDNOTENJE VPLIVA RAZLIČNIH TRANSFORMANT NA PRODUKCIJO ERITROMICINA

Z uporabo genetskih orodij smo konstruirali mutante v naravnem sevu NRRL2338 (vstavljanje dodatne kopije genov), da bi preverili našo hipotezo o alternativni poti produkcije eritromicinskih prekurzorjev. Poleg tega smo konstruirali tudi mutante s prekinjenim operonom *mcm* (kodira encim metilmalonil-CoA mutazo) in mutante, v katere smo vnesli gen *vdh* (kodira valin dehidrogenazo) iz bakterije *S. cinnamonensis*. Pred tem smo testirali delovanje različnih promotorjev in določili najučinkovitejšega.

5.4.1 Izbor promotorja za učinkovito izražanje vnešenih genov

Pomemben dejavnik pri testiranju vpliva prekomernega izražanja genov je izbor učinkovitega promotorja, ki omogoča uspešno prepisovanje genov. Testirali smo več promotorjev, ki se uporabljajo za prekomerno konstitutivno izražanje v aktinomicetah: *PermE*, *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma, *PmerR* in *PeryAI*. Za testiranje različnih promotorjev smo uporabili poročevalski gen *xylE*, ki nosi zapis za encim katehol 2,3-dioksigenazo. S pomočjo tega encima pride do barvne reakcije (brezbarvni katehol se spremeni v rumenoobarvani produkt) in z merjenjem intenzitete signala (A_{375}) lahko določimo učinkovitost promotorja. Rezultati so pokazali, da je najbolj učinkovit promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma, saj je imel kar za 52 % višje izražanje v primerjavi s promotorjem *PermE* (slika 39). Pri promotorjih *PmerR* in *PeryAI* s poročevalskim sistemom *xylE* nismo zaznali signala (slika 39). Pri nadalnjem delu smo uporabljali promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma.

5.4.2 Potrditev hipoteze o alternativni poti za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev

Na podlagi rezultatov proteomskeih in bioinformatskih analiz ter rezultatov širše primerjalne transkriptomske analize in proteomske analize z metodo spektralnega štetja smo postavili hipotezo, da ima pri donosu eritromicina pomembno vlogo alternativna pot za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin (slika 28). Da bi to potrdili, smo konstruirali transformante seva NRRL2338 s čezmernim izražanjem ključnih genov te poti (preglednica 4) in preverili njihov vpliv na produkcijo eritromicina (potrjena hipoteza 4).

Osredotočili smo se na 3 gene oz. operone, ki kodirajo ključne encime biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin: gen za acetolaktat sintazo (*ilvB1* oz. SACE_4565), ki katalizira prvo stopnjo biosinteze razvejanih aminokislin, operon, ki kodira podenote dehidrogenaze za razgradnjo keto kislin (operon *bkd* oz. SACE_3952-54) in operon, ki kodira metilmalonat-semialdehid dehidrogenazo, acil-CoA dehidrogenazo, enoil-CoA hidratazo in 3-hidroksibutirat dehidrogenazo (operon *mmsOp1* – SACE_1456-59 in *mmsOp2* – SACE_4672-73). Vsi konstrukti so bili izraženi pod močnim konstitutivnim promotorjem (*PermE** brez mesta za vezavo ribosoma), poleg tega smo konstruirali tudi variacije genov s HA epitopom na C-terminalnem koncu, kar je omogočalo preverjanje izražanja genov s prenosom western. Za ugotavljanje vpliva mutant na produkcijo eritromicina smo testirali vsaj 20 različnih neodvisnih transformant. Povprečni donosi različnih mutant so prikazani na sliki 58. Najvišji porast donosa smo opazili pri transformantah z dodatno kopijo operona *mmsOp1* (cca. 150 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom). Tudi pri transformantah z dodatno kopijo gena *ilvB1* in operona *bkd* smo opazili povečan donos v primerjavi z naravnim sevom (52 % oz. 70 % višji donos). Pri transformantah z dodatno kopijo operona *mmsOp2* nismo opazili povišanega donosa. Presenetljiva je bila ugotovitev, da kombinacija prekomerno izraženih genov *ilvB1* in operona *mms* ni dodatno povečala donosa, ampak je bil donos v povprečju višji za 75 %, kar je približno enako kot pri transformantah z dodatno kopijo gena *ilvB1* in manj kot pri transformantah z dodatno kopijo operona *mmsOp1*.

Poleg povečanega izražanja biosintetskih genov je oskrba z biosintetskimi prekurzorji ključni dejavnik za visoke donose sekundarnih metabolitov v industrijsko vodenih bioprocесih. Pri aktinomicetah lahko več različnih metabolnih poti prispeva k oskrbi z metilmalonil-CoA (podaljševalna enota za biosintezo eritromicina): (a) karboksilacija propionil-CoA s propionil-CoA karboksilazo, (b) pretvorba metabolita cikla TCA sukcinil-CoA v metilmalonil-CoA (katalizira MCM), (c) razgradnja razvejanih aminokislin in (d) večstopenjska pretvorba acetoacil-CoA v (2S)-metilmalonil-CoA preko krotonil-CoA-odvisne poti (Chan in sod., 2009; Erb in sod., 2007). Karboksilacija propionil-CoA v metilmalonil-CoA je najverjetneje najpomembnejši vir za oskrbo prekurzorjev za biosintezo eritromicina pri industrijskih procesih, saj je donos industrijskih fermentacij

močno odvisen od dohranjevanja s propanolom ali kalcijevim propionatom (Marini in Teatini, 1973; Sanchez in sod., 1984; Potvin in Peringer, 1993). Objava genoma *S. erythraea* (Oliynik in sod., 2007) je razkrila, da *S. erythraea* nima gena za krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo, torej nima funkcionalne etilmalonil-CoA metabolne poti (Erb in sod., 2007), ki tudi lahko pretvori metabolite centralne metabolne poti v propionil-CoA in nato v metilmalonil-CoA. Reeves in sod. (2007) so pokazali, da fermentacija bakterije *S. erythraea*, ki temelji na gojiščih, ki kot glavni vir vsebujejo ogljikove hidrate, omogoča pretvorbo metilmalonil-CoA v sukcinil-CoA, kar pomeni, da porablja metilmalonil-CoA in ne služi kot rezervoar za oskrbo s substrati. Poleg tega smo tudi v okviru naše transkriptomske študije (KC Brin) ugotovili, da ima visokodonosni sev mutacijo v 5'-UTR v genu, ki kodira izocitrat liaz (SACE_1449) in ima znižano raven izražanja na nivoju transkriptoma in proteoma, kar še dodatno nakazuje kako pomembna je pretvorba metilmalonil-CoA v sukcinil-CoA pri visoko-donosnem sevu. V okviru primerjalne transkriptomske in proteomske analize smo tudi ugotovili, da ima visoko-donosni sev več genov z znižanim nivojem izražanja, ki sodelujejo v ciklu TCA, zato je posledično verjetno razvil alternativno pot za oskrbo z metilmalonil-CoA preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin. To hipotezo smo tudi potrdili z prekomernim izražanjem že omenjenih genov/operonov. Naši rezultati torej nakazujejo, da je dodatni vir za oskrbo s substrati metabolizem razvejanih aminokislin in ne cikel TCA.

Kot potencialni vir za oskrbo z metilmalonil-CoA so določene raziskovalne skupine že predlagale metabolne poti biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin (Carata in sod., 2009; Peano in sod., 2012; Li in sod., 2013). Naši rezultati nakazujejo, da določeni deli metabolnih poti biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin lahko zagotavljajo oskrbo s prekurzorjem metilmalonil-CoA, ne da bi sploh vključile aminokisline kot intermediat. Namreč, ko smo med bioprosesom seva NRRL2338 v produksijsko gojišče dodajali aminokislino valin, ni bilo statistično značilnega vpliva na produkcijo eritromicina. V *S. fradiae* so Vančura in sod. (1989) pokazali, da je dodajanje valina v gojišče induciralo sintezo valin dehidrogenaze, kar nakazuje katabolno funkcijo tega encima. Pripravili smo tudi konstrukte seva NRRL2338, v katerega smo iz *S. cinnamonensis* vnesli kopijo gena *vdh* in nato testirali produkcijo eritromicina, vendar statistično značilnega vpliva nismo opazili tudi pri dodajanju valina v produksijsko gojišče (slika 51).

Encim metilmalonil-CoA mutaza (MCM) katalizira reverzibilno izomerizacijo metilmalonil-CoA in sukcinil-CoA. Reeves in sod. (2007) so s prekinivijo gena *mutB* dvignili produkcijo eritromicina za 126 % v gojiščih, ki kot glavni vir ogljika vsebujejo ogljikove hidrate. V fermentaciji, ki temelji na gojišču, ki kot glavni vir ogljika vsebuje ogljikove hidrate, reakcija MCM prazni rezervoar z metilmalonil-CoA. S prekinivijo operona *mcm*, se rezervoar ne prazni (potek reakcije v smeri nastanka sukcinil-CoA), kar je ugodno za samo produkcijo eritromicina, saj je na voljo več substrata metilmalonil-CoA (Reeves in sod., 2007). Z bioinformatskimi analizami smo preverili ali v genomu *S. erythraea* obstaja še kakšen homolog tega operona in ugotovili, da ga ni. S konstrukcijo

mutant s prekinjenim operonom *mcm* pa smo potrdili potek reakcije v smeri nastanka sukcinil-CoA, saj je bila produkcija eritromicina pri teh mutantah povišana za 58 %.

Pokazali smo, da je najbolj učinkovit promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma. Učinkovit promotor je namreč predpogoj za uspešno prepisovanje čezmerno izraženih genov. Z uporabo genskega inženiringa smo potrdili hipotezo o alternativni poti za produkcijo eritromicinskih prekurzorjev preko biosinteze in razgradnje razvejanih aminokislin. Hipotezo smo potrdili s prekomernim izražanjem treh genov oz. operonov v naravnem sevu NRRL2338, ki so ključni del te poti (*ilvB1*, operon *bkd* in operon *mms*). Najvišji porast donosa eritromicina smo opazili pri transformantah z dodatno kopijo operona *mmsOp1* (cca. 150 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom). Povišan donos eritromicina v primerjavi z naravnim sevom smo opazili tudi pri transformantah z dodatno kopijo gena *ilvB1* (52 %) in operona *bkd* (70 %) ter pri transformantah s kombinacijo prekomerno izraženih genov *ilvB1* in operona *mms* (75 %). Sklepamo torej lahko, da je dodatni vir za oskrbo s substrati metabolizem razvejanih aminokislin in ne cikel TCA. Pridobljeni rezultati so izjemnega pomena, saj potrjujejo, da so omske tehnologije odlično izhodišče za pridobitev informacij o ključnih metabolnih poteh, ki prispevajo k povečanemu donosu eritromicina v visoko-donosnem sevu, v kolikor eksperimente izvedemo v pogojih, ki čim bolj posnemajo realne industrijske pogoje. Poleg tega bi lahko konstruirali enake transformante tudi v visoko-donosnem industrijskem sevu in na ta način potencialno še izboljšali njegov donos eritromicina.

5.5 SKLEPI

Namen doktorske naloge je, da bi z metodološkim pristopom kombinacije proteomskih orodij in bioinformatike dobili boljši vpogled v relevantne razlike med ekspresijskimi razlikami naravnega in visoko-donosnega seva. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

- Poenostavljeni industrijsko gojišče ABPM8 omogoča povišan donos eritromicina in hkrati tudi uspešno ekstrakcijo proteinov iz celic *S. erythraea*. Optimiziran protokol za pripravo celičnih ekstraktov je sledeč: začetno centrifugiranje fermentacijske brozge pri 3500 g, izpiranje biomase z raztopino 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, resuspendiranje biomase v ekstrakcijskem pufru, v katerega smo dodali proteazne inhibitorje Complete Mini v koncentraciji 2 tabl./10 ml ekstrakcijskega pufra, ultrasonično razbijanje celic z načinom cikel 1/ amplituda 100 %/ 4x15 s in obarjanje proteinov s komercialnim kompletom »2-D Clean-Up«.
- Postavili smo bioprocес za produkcijo eritromicina, ki je posnemal pogoje realnega industrijskega bioprocesa. Za preučevanje razlik v metabolnih poteh, ki omogočajo oskrbo z gradbenimi enotami, je bilo to bistvenega pomena, saj smo le v takih

pogojih lahko videli realno sliko metabolnih procesov, ki prispevajo k izboljšani produkciji eritromicina v industrijskem sevu.

- S primerjalno proteomsko analizo smo opazili razlike v proteomskem profilu med naravnim sevom in visoko-donosnim industrijskim sevom *S. erythraea*. Največ razlik smo opazili v točki KT2. Identificirali smo predvsem proteine vključene v primarne metabolne poti, kar je pomembno, saj primarni metabolizem zagotavlja prekurzorje za biosintezo sekundarnih metabolitov. Poleg tega smo nekatere proteine identificirali na več lokacijah, kar nakazuje na PTM ali izoblike. Poznavanje PTM bi lahko omogočilo boljše razumevanje biosinteze eritromicina in njene regulacije.
- Poleg diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali z 2-DE, so bili v sklopu širše primerjalne transkriptomske analize in proteomske analize z metodo spektralnega štetja identificirani geni oz. proteini, ki se v obeh sevih različno izražajo. S primerjavo rezultatov vseh analiz smo izbrali gene, ki kodirajo ključne encime v biosintezi in razgradnji razvejanih aminokislin (*ilvB1*, operon *bkd* in operon *mms*) ter v nadaljevanju s čezmernim izražanjem le-teh preverili njihov vpliv na produkcijo eritromicina.
- Največji vpliv na produkcijo eritromicina so imele transformante z dodatno kopijo operona *mmsOp1*. Ugotovili smo kar 150 % dvig produkcije eritromicina glede na naravni sev. Povišan donos eritromicina v primerjavi z naravnim sevom smo opazili tudi pri transformantah z dodatno kopijo gena *ilvB1* (52 %) in operona *bkd* (70 %) ter pri transformantah s kombinacijo prekomerno izraženih genov *ilvB1* in operona *mms* (75 %).
- Na podlagi omskih in bioinformatskih analiz smo ugotovili, da ima pri produkciji eritromicina pomembno vlogo za oskrbo eritromicinskih prekurzorjev biosinteza in razgradnja razvejanih aminokislin in ne cikel TCA.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Poliketidi so sekundarni metaboliti s širokim spektrom bioloških aktivnosti in izredno strukturno raznolikostjo. Kot primer medicinsko pomembnih sekundarnih metabolitov lahko navedemo eritromicin (protibakterijska aktivnost), nistatin (protiglivna aktivnost), FK506 (imunosupresant), doksorubicin in rapamicin (protirakasta aktivnost). V doktorskem delu smo se osredotočili na preučevanje ključnih stopenj biosinteze in regulacije eritromicina. Eritromicin je medicinsko pomemben makrolidni antibiotik širokega spektra, ki ga proizvaja po Gramu pozitivna aktinomiceta *Saccharopolyspora erythraea*.

Za biosintezo makrolaktonskega prekurzorja 6-deoksieritronolida B (6-DEB) je odgovorna poliketid sintaza (PKS) tipa I. To je velik multiencimski kompleks, ki je skupaj z encimi, ki so udeleženi v nadalnjih modifikacijah makrolaktonskega obroča (hidroksilacija, dva koraka glikozilacije in O-metilacija), kodiran v genski skupini za biosintezo eritromicina (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991). Kljub številnim raziskavam in industrijskemu pomenu te molekule, ključne metabolne poti ter stopnje biosinteze in regulacije biosinteze eritromicina, ki vplivajo na donos molekule, še vedno niso zadovoljivo pojasnjene. Poznani so sicer določeni posamezni dejavniki, ki vplivajo na biosintezo in izkoristek biosinteznega procesa (geni vpleteni v sintezo primarnih metabolitov in regulatorni geni), vendar te informacije ne omogočajo celostnega razumevanja kompleksnega procesa biosinteze (Brunker in sod., 1998; Reeves in sod., 2007; Chng in sod., 2008).

S klasičnimi postopki izboljševanja mikrobnih sevov so v preteklosti že več stokrat dvignili donose mnogih biotehnološko pridobljenih spojin. Vendar ti postopki temelijo na naključni mutagenezi in selekciji mutiranih sevov, zato na osnovi teh sevov ni enostavno pridobiti informacij o nastalih mutacijah in mehanizmih, ki omogočajo višje donose želenih spojin. Omejeno število usmerjenih raziskav posameznih genov, ki vplivajo na donos eritromicina oz. sorodnih spojin (Reeves in sod., 2007), praviloma ne zadoščajo za celostni vpogled v ozka grla biosinteze ter ne omogočajo nadaljnega izboljševanja industrijskih sevov.

Poglobljeno razumevanje metabolnih poti, ki vplivajo na biosintezo eritromicina in njeno regulacijo, bi lahko omogočila celovita analiza izražanja odgovornih proteinov, ki jo omogočajo v zadnjih letih razvite tehnike sistemsko-biološke biologije in spremljajoča programska oprema. Velik korak za celostno sistemsko-biološko razumevanje biosinteze eritromicina je leta 2007 naredila raziskovalna skupina Univerze v Cambridgeu, ko je prvič javno objavila DNA zaporedje celotnega genoma bakterije *Saccharopolyspora erythraea* (Oliynyk in sod., 2007).

Namen doktorske naloge je bil, da bi s pomočjo proteomskega orodja in bioinformatične tehnologije pridobili informacije, ki bodo poglobile razumevanje ključnih metabolnih poti, ki vplivajo na povečan donos eritromicina.

V prvem koraku raziskovalne naloge smo pokazali, da industrijsko gojišče ABPM8 omogoča povišan donos eritromicina v visoko-donosnem sevu v primerjavi z naravnim sevom *S. erythraea*. Hkrati smo razvili in optimizirali učinkovit protokol za ekstrakcijo celokupnih proteinov iz bioprosesne brozge, ki smo jih potem uporabili za nadaljnje proteomske analize. Vzorce za proteomske analize smo pridobili v štirih različnih kontrolnih točkah (KT1-KT4), ki smo jih določili na podlagi natančnega spremljanja parametrov tekom celotnega bioprosesa. Postavili smo tudi bioproses za produkcijo eritromicina, ki je posnemal pogoje realnega industrijskega bioprosesa.

S primerjalno proteomsko analizo smo določili razlike v proteomskeh profilih med obema sevoma (referenčni sev je bil naravni sev NRRL2338). Identificirali smo 44 različnih diferencialno izraženih proteinov. Največ razlik smo opazili v točki KT2. Identificirali smo predvsem proteine vključene v primarne metabolne poti. Poleg tega smo nekatere proteine identificirali na več lokacijah, kar nakazuje na post-translacijske modifikacije ali izooblike, poznavanje teh pa bi lahko omogočilo boljše razumevanje biosinteze eritromicina in njene regulacije.

Poleg diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali z 2-DE, so bili v sklopu širše primerjalne transkriptomske analize in proteomske analize z metodo spektralnega štetja identificirani geni oz. proteini, ki se v obeh sevih različno izražajo. S primerjavo rezultatov vseh analiz smo izbrali gene, ki kodirajo ključne encime v biosintezi in razgradnji razvezanih aminokislin (*ilvB1*, operon *bkd* in operon *mms*). V nadaljevanju smo z bioinformatskimi orodji podrobnejše analizirali te gene oz. operone. Namen bioinformatskih analiz je bil, da preverimo ali je izbrani gen/operon res tisti, ki ga je avtomatska anotacija predvidela.

V zadnjem koraku smo s čezmernim izražanjem genov/operonov preverili vpliv različnih transformant. Največji vpliv na produkcijo eritromicina so imele transformante z dodatno kopijo operona *mmsOp1*. Ugotovili smo kar 150 % dvig produkcije eritromicina glede na naravni sev. Povišan donos eritromicina smo pokazali tudi pri transformantah z dodatno kopijo gena *ilvB1* (52 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom) in operona *bkd* (70 % višji donos v primerjavi z naravnim sevom). Testirali smo tudi vpliv kombinacije genov *ilvB1* in operona *mmsOp1* na produkcijo eritromicina. Ugotovili smo višji donos eritromicina v primerjavi z naravnim sevom (cca. 75 % dvig produkcije), vendar v manjši meri kot pri mutantah z dodatno kopijo operona *mmsOp1*.

V okviru doktorske naloge smo s pomočjo omskih in bioinformatskih analiz ugotovili, da ima pri produkciji eritromicina pomembno vlogo za oskrbo eritromicinskih prekurzorjev metabolizem razvezanih aminokislin in ne cikel TCA. Z gojenjem sevov v pogojih, ki so posnemali realne industrijske kultivacije smo dobili vpogled v metabolne poti in

mehanizme, ki sevu ABE1441 zagotavljajo cca. 10-krat višjo produkcijo v primerjavi s sevom NRRL2338. Pomen pridobljenih rezultatov je še toliko večji, saj predhodno objavljene proteomske študije pri industrijskih aktinomicetah niso temeljile na industrijskih gojiščih in posledično tudi niso pokazale rezultatov, ki bi omogočali nadaljnje izboljšave industrijskih sevov.

6.2 SUMMARY

Polyketides are secondary metabolites with a broad spectrum of biological activities and enormous structural diversity. Examples of medically important secondary metabolites are erythromycin (antibacterial agent), nystatin (antifungal agent), FK506 (immunosupresant), doxorubicin and rapamicin (anti-cancer agents). This doctoral thesis was focused on the study of key steps of erythromycin biosynthesis and regulation. Erythromycin is medically important broad-spectrum macrolide antibiotic, produced by Gram-positive actinomycete *Saccharopolyspora erythraea*.

Biosynthesis of macrolactone precursor 6-deoxyerithronolide B (6-DEB) is catalyzed by type I polyketide synthase (PKS). PKS is a large multienzyme complex. The gene cluster governing the biosynthesis of erythromycin A contains genes encoding PKS and genes encoding enzymes that catalyze post-PKS modifications of macrolactone ring (hydroxylation, two steps of glycosylation and O-methylation) (Cortes et al., 1990; Donadio et al., 1991). Despite many research studies and the industrial importance of erythromycin, key metabolic and regulatory pathways are still poorly understood. Although individual factors that influence the erythromycin biosynthesis and biosynthesis process efficiency have been identified (genes involved in the synthesis of primary metabolites and regulatory genes), these information do not allow a holistic understanding of the complex process of biosynthesis (Brunker et al., 1998; Reeves et al., 2007; Chng et al., 2008).

In the past classical random mutagenesis was traditionally used in strain improvement processes of many different biological compounds. However, these methods are based on random mutagenesis and screening, so these strains are not very useful for obtaining information about the resulting mutations and mechanisms that enabled higher yields of desired compounds. A limited number of focused studies of individual genes that affect erythromycin yield (Reeves et al., 2007) do not suffice for a comprehensive insight into the bottlenecks of biosynthesis and do not allow further improvement of industrial strains.

Development of modern technologies such as systems biology would enable a comprehensive analysis of expressed proteins that are of key importance and would subsequently enable in-depth understanding of the metabolic pathways that are involved in erythromycin production. In 2007 a research group from the University of Cambridge published DNA sequence of the entire genome of the bacterium *Saccharopolyspora*

erythraea. This was a big step for holistic systems biological understanding of the erythromycin biosynthesis (Oliynyk et al., 2007).

The purpose of this doctoral thesis was to obtain new information using proteomic and bioinformatic tools to better understand key metabolic pathways of erythromycin production.

In the first step of this thesis we have shown, that industrial medium ABPM8 enables increased erythromycin yield in high-producing strain of *S. erythraea* compared to wild type. Also we have developed and optimized an effective protocol for extracting total proteins from the fermentation broth, which were subsequently used for proteomic analysis. The samples for proteomic analysis were obtained in four different time points (KT1 - KT4), which were determined with careful monitoring of parameters throughout the entire bioprocess. We set up a bioprocess for the production of erythromycin that simulated real industrial bioprocess.

Using comparative proteomic analysis we determined several differences in proteomic profiles between the two strains (reference strain was wild type strain NRRL2338). We have identified 44 differentially expressed proteins. Most differences were observed in time point KT2. Most of identified proteins were proteins of primary metabolic pathways. Some of these proteins were identified on more than one 2-D gel locations, indicating post-translational modifications (PTM) or different isoforms. Identifying PTM could lead to better understanding of the erythromycin biosynthesis and its regulation.

Additionally, in the context of a complex transcriptomic analysis and proteomic analysis using spectral counting approach, differentially expressed genes or proteins have been identified. Different omic approaches gave results that enabled us to select genes that encode key enzymes in metabolism of branched-chain amino acids (*ilvB1*, *bkd* operon, *mms* operon). Subsequently, bioinformatic analysis was performed. The purpose of bioinformatic analysis was to check whether the selected gene/operon was really the one that automatic annotation predicted.

In the final step we obtained transformants with metabolic engineering (overexpression) and tested the effect on erythromycin production. Transformants constitutively overexpressing *mmsOp1* construct showed highest erythromycin yield increase (approximately 150 % higher yield compared to wild-type). In addition, transformants overexpressing the *ilvB1* gene and *bkd* operon also showed significantly increased erythromycin yield, reaching 52 % in 70 % of wild-type yield. When *mmsOp1* operon and *ilvB1* gene were constitutively expressed together, average erythromycin yield increase of 75 % was shown, which was slightly lower compared to transformants overexpressing *mmsOp1* genes.

Results obtained in this doctoral thesis using omic and bioinformatic analysis suggest that the amino acid metabolism pathways, rather than the TCA cycle, are likely the source of increased supply of erythromycin precursors. Cultivating the strains in a simulated

industrial setting gave us new insight in metabolic pathways and mechanisms that enables approximately 10-times higher erythromycin production in ABE1441 compared to NRRL2338. The importance of these results is even more significant, because previously published studies of industrial actinomycetes were not based on industrial media and consequently did not show results for further improvement of industrial strains.

7 VIRI

- Adhya S., Schwartz M. 1971. Phosphoglucomutase mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 108, 2: 621-626
- Adrio J. L., Demain A. L. 2006. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 2: 187-214
- Allard S. T., Cleland W. W., Holden H. M. 2004. High resolution X-ray structure of dTDP-glucose 4, 6-dehydratase from *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 3: 2211-2220
- 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*. *European Journal of Biochemistry*, 257, 2: 395-402
- An J., Lee G., Jung J., Lee W., Kim Y. 1999. Identification of residues essential for a two-step reaction by malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium trifolii*. *Biochemistry Journal*, 344: 159-166
- Anderson R. F., Törnqvist E. G. M., Peterson W. H. 1956. Effect of oil in pilot plant fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4: 556–559
- Anderson N. G., Anderson N. L. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, 17, 3: 443-453
- Andersson U., Rådström P. 2002. B-Glucose 1-phosphate-interconverting enzymes in maltose- and trehalose-fermenting lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology*, 4, 2: 81-88
- Angert E. R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3): 214-224
- Aparicio J. F., Caffrey P., Marsden A. F., Staunton J., Leadlay P. F. 1994. Limited proteolysis and active-site studies of the first multienzyme component of the erythromycin-producing polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11: 8524-8528
- Austin M. B., Noel J. P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 20, 1: 79-110
- 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., Wietzorek 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
- Bevitt D. J., Cortes J., Haydock S. F., Leadley P. F. 1992. 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. *European Journal of Biochemistry*, 204, 1, 39-49
- Bibb M. J., Molle V., Buttner M. J. 2000. ζ BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 182, 16: 4606-4616
- Bibb M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 2: 208-215
- Bibb M. J., Janssen G. R., Ward J. M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38, 1-3: 215-226
- Bobek J., Halada P., Angelis J., Vohradsky J., Mikulik K. 2004. Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Proteomics*, 4: 3864-3880
- Boos W., Shuman H. 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1: 204-229
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1: 248-254
- Brikun I. A., Reeves A. R., Cernota W. H., Luu M. B., Weber J. M. 2004. The erythromycin biosynthetic gene cluster of *Aeromicrobium erythreum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 7: 335-344
- Bro C., Nielsen J. 2004. Impact of ‘ome’analyses on inverse metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 6, 3: 204-211
- Brünker P., Minas W., Kallio P. T., Baile J. E. 1998. Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the *Vitreoscilla* haemoglobin gene (*vhb*). *Microbiology*, 144, 9: 2441-2448
- Brunker P., Minas W., Kallio P., Bailey J. 1998. Enhancement of erythromycin production by expression of a cloned oxygen-binding protein. PCT patent WO 98/53084: 43 str.

- Buckley N. D., Hamilton I. R. 1994. Vesicles prepared from *Streptococcus mutans* demonstrate the presence of a second glucose transport system. *Microbiology*, 140, 10: 2639-2648
- Butler M. J., Bruheim P., Jovetic S., Marinelli F., Postma P. W., Bibb M. J. 2002. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 10: 4731-4739
- Caffrey P., Bevitt D. J., Staunton J., Leadlay P. F. 1992. Identification of DEBS 1, DEBS 2 and DEBS 3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS Letters*, 304, 2: 225-228
- Cane D. E. 2010. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 36: 27517-27523
- Cantoni G. L. 1953. S-Adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 204, 1: 403-416
- Chiang P. K., Cantoni G. L. 1977. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 252: 4506-4513
- Carata E., Peano C., Tredici S. M., Ferrari F., Talà A., Corti G., Bicciato S., De Bellis G., Alifano P. 2009. Phenotypes and gene expression profiles of *Saccharopolyspora erythraea* rifampicin-resistant (rif) mutants affected in erythromycin production. *Microbial Cell Factories*, 8, 18: 1-15
- Carmody M., Byrne B., Murphy B., Breen C., Lynch S., Flood E., Finn S., Caffrey P. 2004. Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques. *Gene*, 343, 1: 107-115
- Carreras C., Frykman S., Ou S., Cadapan L., Zavala S., Woo E., Leaf T., Carney J., Burlingame M., Patel S., Ashley G., Licari P. 2002. *Saccharopolyspora erythraea*-catalyzed bioconversion of 6-deoxyerythronolide B analogs for production of novel erythromycins. *Journal of Biotechnology*, 92, 3: 217-228
- 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
- Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. 2009. BRENDa, AMENDA and FRENDa the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*, 37, suppl 1: D588-D592
- Chater K. F., Horinouchi S. 2003. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology*, 48, 1: 9-15

- Chater K. F., Bruton C. J., Plaskitt K. A., Buttner M. J., Méndez C., Helmann J. D. 1989. The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B. subtilis*. *Cell*, 59, 1: 133-143
- Chen W., Yu Z., Zheng Y. 2003. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Streptomyces fradiae* and its effect on cell growth and synthesis of tylisin. *Chinese Journal of Antibiotics*, 29, 9: 516-520
- Chng C., Lum A. M., Vroom J. A., Kao C. M. 2008. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 32: 11346-11351
- Choi D. B., Tamura S., Park, Y. S., Okabe M., Seriu Y., Takeda S. 1996. Effects of rapeseed oil on activity of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase in culture of *Streptomyces frediae*. *Journal of Fermentation Technology*, 82: 183-186
- Choi K. J., Yu Y. G., Hahn H. G., Choi J. D., Yoon M. Y. 2005. Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Letters*, 579, 21: 4903-4910
- Connell N. D. 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 5: 446-449
- Cortes J., Haydock S. F., Roberts G. A., Bevitt D. J., Leadlay P. F. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, 348: 176 – 178
- Cox J., Mann M. 2008. Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26: 1367-1372
- Cox J., Michalski A., Mann M. 2011. Software lock mass by two-dimensional minimization of peptide mass errors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22: 1373-1380
- Crameri R., Davies J. E. 1986. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. *The Journal of Antibiotics*, 39, 1: 128-135
- Cropp A., Chen S., Liu H., Zhang W., Reynolds K. A. 2001. Genetic approaches for controlling ratios of related polyketide products in fermentation processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 6: 368-377
- Cundliffe E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annual Reviews in Microbiology*, 43, 1: 207-233
- Cundliffe E. 2006. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 7: 500-506

- Dahl J. L. 2004. Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. *FEMS Microbiology Letters*, 240, 1: 15-20
- Davenport R. J., Curtis T. P., Goodfellow M., Stainsby F. M., Bingley M. 2000. Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3: 1158-1166
- Davies J. L., Baganz F., Ison A. P., Lye G. J. 2000. Studies on the interaction of fermentation and microfiltration operations: erythromycin recovery from *Saccharopolyspora erythraea* fermentation broths. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 4: 429-439
- 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
- Diacovich L., Mitchell D. L., Pham H., Gago G., Melgar M. M., Khosla C., Gramajo H., Tsai S. C. 2004. Crystal structure of the β -subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity. *Biochemistry*, 43, 44: 14027-14036
- Donadio S., Staver, M. J., McAlpine J. B., Swanson S. J., Katz L. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, 252, 5006: 675-679
- 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
- Doumith M., Weingarten P., Wehmeier U. F., Salah-Bey K., Benhamou B., Capdevila C., Michel J. M., Piepersberg W., Raynal M. C. 2000. Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular and General Genetics*, 264, 4: 477-485
- Du W., Chen C. 2007. Effects of Co²⁺ on the erythromycin biosynthesis. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 1, 3: 246-250
- Edgar R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 19: 2460-2461
- Edman P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 7: 283-293
- Edman P., Begg G. 1967. A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, 1, 1: 80-91
- Elander R. P. 2003. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 5-6: 385-392

- El-Enshasy H. A., Mohamed N. A., Farid M. A., El-Diwany A. I. 2008. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*, 99, 10: 4263-4268
- Elliot M. A., Bibb M. J., Buttner M. J., Leskiw B. K. 2001. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular Microbiology*, 40, 1: 257-269
- Elliot M. A., Talbot N. J. 2004. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 6: 594-601
- Elliot M. A., Locke T. R., Galibois C. M., Leskiw B. K. 2003. BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 1: 35-40
- Erb T. J., Berg I. A., Brecht V., Müller M., Fuchs G., Alber B. E. 2007. Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 25: 10631-10636
- Erb T. J., Brecht V., Fuchs G., Müller M., Alber B. E. 2009. Carboxylation mechanism and stereochemistry of crotonyl-CoA carboxylase/reductase, a carboxylating enoyl-thioester reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 22: 8871-8876
- Fiehn O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48: 155-171
- Firn R. D., Jones C. G. 2003. Natural products—a simple model to explain chemical diversity. *Natural product reports*, 20, 4: 382-391
- Fontecave M., Atta M., Mulliez E. 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 5: 243-249
- Fournier M. L., Gilmore J. M., Martin-Brown S. A., Washburn M. P. 2007. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chemical Reviews*, 107, 8: 3654-3686
- Frandi A., Zucca P., Marvasti M., Mastromei G., Sanjus, E., Perito, B. 2011. *Bacillus subtilis fadB (ysiB)* gene encodes an enoyl-CoA hydratase. *Annals of Microbiology*, 61, 2, 371-374
- Gaißer S., Böhm G. A., Cortés J., Leadlay P. F. 1997. Analysis of seven genes from the eryAI–eryK region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular and General Genetics*, 256, 3: 239-251
- Ghojavand H., Bonakdarpour B., Heydarian S. M., Hamedi J. 2011. The inter-relationship between inoculum concentration, morphology, rheology and erythromycin productivity

- in submerged cultivation of *Saccharopolyspora erythraea*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28, 4: 565-574
- González B., Pajares M. A., Hermoso J. A., Alvarez L., Garrido F., Sufrin J. R., Sanz-Aparicio J. 2000. The crystal structure of tetrameric methionine adenosyltransferase from rat liver reveals the methionine-binding site. Journal of Molecular Biology, 300, 2: 363-375
- Goodfellow M., Stainsby F. M., Davenport R., Chun J., Curtis T. 1998. Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. Water Science and Technology, 37, 4: 511-519
- Goranovič D., Blažič M., Magdevska V., Horvat J., Kuščer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martínez-Castro M., Barreiro C., Mrak P., Kopitar G., Kosec G., Fujs Š., Martín J. F., Petković H. 2012. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. BioMed Central Microbiology, 12, 1: 238-253
- Gottschalk G. 1986. Bacterial metabolism. 2nd ed. New York, Springer Verlag: 359 str.
- Goward C. R., Hartwell R., Atkinson T., Scawen M. D. 1986. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*. Biochemical Journal, 237, 2: 415-420
- Grünewald J., Marahiel M. A. 2006. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70, 1: 121-146
- Hamedi J., Malekzadeh F., Saghafi-Nia A. E. 2004. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31, 10: 447-456
- Han J. M., Kim S. M., Lee H. J., Yoo J. C. 2006. Cloning and expression of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase gene (schS6) from *Streptomyces* sp. SCC-2136. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 4: 685-690
- Hansen T., Reichstein B., Schmid R., Schönheit P. 2002. The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. Journal of Bacteriology, 184, 21: 5955-5965
- Haydock S. F., Dowson J. A., Dhillon N., Roberts G. A., Cortes J., Leadlay P. F. 1991. Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Molecular and General Genetics, 230, 1-2: 120-128

- Hesketh A. R., Chandra G., Shaw A. D., Rowland J. J., Kell D. B., Bibb M. J., Chater K. F. 2002. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. Molecular Microbiology, 46, 4: 917-932
- Horinouchi S., Hara O., Beppu T. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces lividans*. Journal of Bacteriology, 155, 3: 1238-1248
- Horinouchi S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Frontiers in Bioscience, 7: 2045-2057
- 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
- Hosoya Y., Okamoto S., Muramatsu H., Ochi K. 1998. Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 8: 2041-2047
- Huang J., Lih C. J., Pan K. H., Cohen S. N. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. Genes & Development, 15, 23: 3183-3192
- Huang D., Li Z. H., You D., Zhou Y., Ye B. C. 2014. Lysine acetylproteome analysis suggests its roles in primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora erythraea*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 3: 1399-1413
- Hunaiti A. A., Kolattukudy P. E. 1984. Source of methylmalonyl-coenzyme A for erythromycin synthesis: methylmalonyl-coenzyme A mutase from *Streptomyces erythreus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 25, 2: 173-178
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Ōmura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnology, 21, 5: 526-531
- Ince N. H., Tezcanli G., Belen R. K., Apikyan İ. G. 2001. Ultrasound as a catalyst of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications. Applied Catalysis B: Environmental, 29, 3: 167-176
- Inoue A., Deguchi T., Yoshida M., Shirahata K. 1983. Biosynthesis and the metabolic fate of carbon-14 labeled spiramycin I. The Journal of Antibiotics, 36, 4: 442-444

- Javidpour P., Korman T. P., Shakya G., Tsai S. C. 2011. Structural and biochemical analyses of regio-and stereospecificities observed in a type II polyketide ketoreductase. *Biochemistry*, 50, 21: 4638-4649
- Jeyaseelan K., Guest J. R., Visser J. 1980. The pyruvate dehydrogenase complex of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Purification, properties and characterization of mutants. *Journal of General Microbiology*, 120, 2: 393-402
- Joshi J. G., Handler P. 1964. Phosphoglucomutase I. Purification and properties of phosphoglucomutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 9: 2741-2751
- Jung W. S., Lee S. K., Hong J. S. J., Park S. R., Jeong S. J., Han A. R., Sohng J. K., Kim B. G., Choi C. Y., Sherman D. K., Yoon, Y. J. 2006. Heterologous expression of tylosin polyketide synthase and production of a hybrid bioactive macrolide in *Streptomyces venezuelae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 4: 763-769
- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 1: 27-30
- Katz L. 1997. Manipulation of modular polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97, 7: 2557-2576
- Katz L., Ashley G.W. 2005. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chemical Reviews*, 105: 499-527
- Katz L., McDaniel R. 1999. Novel macrolides through genetic engineering. *Medicinal Research Reviews*, 19, 6: 543-558
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, The John Innes Foundation: 613 str.
- Kim Y. S. 2002. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 5: 443-451
- Kim C. Y., Park H. J., Kim E. S. 2005a. Proteomics-driven identification of putative AfsR2-target proteins stimulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10: 248-253
- Kim D. W., Chater K., Lee K. J., Hesketh A. 2005b. Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 187, 9: 2957-2966
- Kim D. J., Huh J. H., Yang Y. Y., Kang C. M., Lee I. H., Hyun C. G., Hong S. K., Suh, J. W. 2003. Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *Journal of Bacteriology*, 185, 2: 592-600

- Kirm B., Magdevska V., Tome M., Horvat M., Karnicar K., Petek M., Vidmar R., Baebler Š., Jamnik P., Fujs Š., Horvat J., Fonovič M., Turk B., Gruden K., Petković H., Kosec G. 2013. SACE_5599, a putative regulatory protein, is involved in morphological differentiation and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbial Cell Factories*, 12, 1: 126
- Kislinger T., Emili A. 2005. Multidimensional protein identification technology: current status and future prospects. *Expert Review of Proteomics*, 2, 1: 27-39
- Klieneberger-Nobel E. 1947. The life cycle of sporing Actinomyces as revealed by a study of their structure and septation. *Microbiology*, 1, 1: 22-32
- Kobir A., Shi L., Boskovic A., Grangeasse C., Franjevic D., Mijakovic I. 2011. Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810, 10: 989-994
- Kwon S. J., Choi E. Y., Choi Y. J., Ahn J. H., Park O. K. 2006. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57, 7: 1547-1551
- Labeda D. P. 1987. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 1: 19-22
- Laskowski M. J., Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593-626
- Lasmoner E., Ishihama Y., Andersen J. S., Vermunt A. M., Pain A., Sauerwein R. W., Eling W. M. C., Hall N., Waters A. P., Stunnenberg H. G., Mann M. 2002. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, 419, 6906: 537-542
- Lee S. Y., Lee D. Y., Kim T. Y. 2005. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends in Biotechnology*, 23, 7: 349-358
- Lechevalier H. A., Lechevalier M. P. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. *The Prokaryotes*, 2: 1915-1922
- Li C., Florova G., Akopants K., Reynolds K. A. 2004. Crotonyl-coenzyme A reductase provides methylmalonyl-CoA precursors for monensin biosynthesis by *Streptomyces cinnamonensis* in an oil-based extended fermentation. *Microbiology*, 150, 10: 3463-3472
- Li R., Townsend C. A. 2006. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering*, 8, 3: 240-252

- Li Y. Y., Chang X., Yu W. B., Li H., Ye Z. Q., Yu H., Liu B. H., Zhang Y., Zhang S. L., Ye B. C., Li Y. X. 2013. Systems perspectives on erythromycin biosynthesis by comparative genomic and transcriptomic analyses of *S. erythraea* E3 and NRRL2338 strains. *BMC Genomics*, 14, 1: 523
- Licona-Cassani C., Lim S., Marcellin E., Nielsen L. K. 2014. Temporal dynamics of the *Saccharopolyspora erythraea* phosphoproteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13,5: 1219-1230
- Liu C. M. 1982. Microbial aspects of polyether antibiotics: activity, production and biosynthesis. V: Polyether Antibiotics. Naturally Occurring Acid Ionophores. Vol. 2. Westley J. W. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 43-102
- Liu H., Reynolds K. A. 1999. Role of crotonyl coenzyme a reductase in determining the ratio of polyketides monensin A and monensin B produced by *Streptomyces cinnamonensis*. *Journal of Bacteriology*, 181, 21: 6806-6813
- Liu H., Reynolds K. A. 2001. Precursor supply for polyketide biosynthesis: the role of crotonyl-CoA reductase. *Metabolic Engineering*, 3, 1: 40-48
- Liu Z., Guo M., Qian J., Zhuang Y., Zhang S. 2008. Disruption of zwf2 gene to improve oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M4018. *Acta Microbiologica Sinica*, 48, 1: 21-25
- Lombardini J. B., Chou T. C., Talalay P. 1973. Regulatory properties of adenosine triphosphate-L-methionine S-adenosyltransferase of rat liver. *Biochemical Journal*, 135, 1: 43-57
- Lombo F., Siems K., Braña A. F., Méndez C., Bindseil K., Salas J. A. 1997. Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *Journal of Bacteriology*, 179, 10: 3354-3357
- Lombó F., Braña A. F., Méndez C., Salas J. A. 1999. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *Journal of Bacteriology*, 181, 2: 642-647
- Lu S. C. 2000. S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32, 4: 391-395
- Lu Y., Wang W., Shu D., Zhang W., Chen L., Qin Z., Yang S., Jiang W. 2007. Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 625-635

- Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, 69: 193-211
- Ma Y., Mills J. A., Belisle J. T., Vissa V., Howell M., Bowlin K., Scherman M.S., McNeil M. 1997. Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding α -D-glucose-1-phosphate thymidylyltransferase. *Microbiology*, 143, 3: 937-945
- 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
- Maddock S. E., Oyston P. C. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154, 12: 3609-3623
- Magdevska V. 2011. *Streptomyces rimosus* kot potencialni gostitelj za izražanje heterolognih proteinov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 150 str.
- Mann M., Jensen O. N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21, 3: 255-261
- Manuselis G., Mahon C. R. 2007. Bacterial cell structure, physiology, metabolism and genetics. V: *Textbook of diagnostic microbiology*. Manon C. R., Lehman D. C., Mauselis G. (eds.). Saunders: 3-13
- Marcellin E., Mercer T. R., Licona-Cassani C., Palfreyman R. W., Dinger M. E., Steen J. A., Mattick J. S., Nielsen L. K. 2013. *Saccharopolyspora erythraea*'s genome is organised in high-order transcriptional regions mediated by targeted degradation at the metabolic switch. *BMC Genomics*, 14, 1: 1-9
- Marini F., Teatini L. 1973. Erythromycin production kinetics. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 4: 209–215
- Mato J., Alvarez L., Ortiz P., Pajares M. A. 1997. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 73, 3: 265-280
- McDaniel R., Ebert-Khosla S., Hopwood D. A., Khosla C. 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature*, 375: 549-554
- McGuire J. M., Bunch R. L., Anderson R. C., Boaz H. E., Flynn E. H., Powell H. M., Smith J. W. 1952. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiotics & chemotherapy*, 2, 6: 281-283
- Mendes M. V., Tunca S., Antón N., Recio E., Sola-Landa A., Aparicio J. F., Martín J. F. 2007. The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: inactivation

- or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metabolic Engineering*, 9, 2: 217-227
- Méndez C., Salas J. A. 2001. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology*, 152, 3: 341-350
- Menéndez N., Braña A. F., Salas J. A., Méndez C. 2007. Involvement of a chromomycin ABC transporter system in secretion of a deacetylated precursor during chromomycin biosynthesis. *Microbiology*, 153, 9: 3061-3070
- Meyer D., Schneider-Fresenius C., Horlacher R., Peist R., Boos W. 1997. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 179, 4: 1298-1306
- Mijkovic I. 2010. Protein phosphorylation in bacteria. *Microbe*, 5: 21–25
- Miller E. S., Woese C. R., Brenner S. 1991. Description of the Erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. Strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 3: 363-368
- Moore B. S., Hertweck C. 2002. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Natural Product Reports*, 19, 1: 70-99
- Monteoliva L., Albar J. P. 2004. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 3, 3: 220-239
- Morris E. O. 1951. The life cycle of *Actinomyces bovis*. *Journal of Hygiene*, 49, 1: 46-51
- Mutka S. C., Bondi S. M., Carney J. R., Da Silva N. A., Kealey J. T. 2006. Metabolic pathway engineering for complex polyketide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6, 1: 40-47
- Nakashima N., Mitani Y., Tamura T. 2005. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, 4, 1: 7
- Nielsen J. 1998. The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 3: 330-336
- Nihira T. 2002. Virginiamycin: biosynthetic pathway and its regulation, with special emphasis on the genetic aspects and autoregulator-dependent regulation. V: *Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation*. Fierro F., Martin J. F. (eds.). Kerala, India, Research Signpost: 99-119
- Northrop D. B. 1969. Transcarboxylase VI. Kinetic analysis of the reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 21: 5808-5819
- Novotna J., Vohradsky J., Berndt P., Gramajo H., Langen H., Li X.-M., Minas W., Orsaria L., Roeder D., Thompson C. J. 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the

- differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. Molecular Microbiology, 48, 5: 1289-1303
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250, 10: 4007-4021
- Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J. Y., Tomono A., Horinouchi S. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 69, 3: 431-439
- Okamoto S., Lezhava A., Hosaka T., Okamoto-Hosoya Y., Ochi K. 2003. Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Journal of Bacteriology, 185, 2: 601-609
- Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., Ochi K. 2003. Development of antibiotic-overproducing strains by site-directed mutagenesis of the *rpsL* gene in *Streptomyces lividans*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 7: 4256-4259
- Olano C., Rodriguez A. M., Méndez C., Salas J. A. 1995. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. Molecular Microbiology, 16, 2: 333-343
- Olano C., Lombó F., Méndez C., Salas J. A. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. Metabolic Engineering, 10, 5: 281-292
- Oliver D. J., Nikolau B., Wurtele E. S. 2002. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. Metabolic Engineering, 4, 1: 98-106
- 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* NRRL2338. 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
- Orsaria L., Paoletti L., Gramajo H. 1998. Characterization of stationary-phase proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiology Letters, 12: 275-281
- Pandey A., Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. Nature, 405, 6788: 837-846
- Papagianni M. 2012. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. Microbial Cell Factories, 11, 1: 1-13

- Paradkar A. S., Aidoo K. A., Jensen S. E. 1998. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular Microbiology*, 27, 4: 831-843
- Parajuli N., Viet H. T., Ishida K., Tong H. T., Lee H. C., Liou K., Sohng J. K. 2005. Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. *Research in Microbiology*, 156, 5: 707-712
- Park Y. S., Momose I., Tsunoda K., Okabe M. 1994. Enhancement of cephamicin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 6: 773-779
- Peano C., Bicciato S., Corti G., Ferrari F., Rizzi E., Bonnal R. J., Bordoni R., Albertini A., Bernardi L. R., Donadio S., De Bellis G. 2007. Complete gene expression profiling of *Saccharopolyspora erythraea* using GeneChip DNA microarrays. *Microbial Cell Factories*, 6, 1: 37
- Peano C., Talà A., Corti G., Pasanisi D., Durante M., Mita G., Bicciato S., De Bellis G., Alifano P. 2012. Comparative genomics and transcriptional profiles of *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 and a classically improved erythromycin over-producing strain. *Microbial Cell Factories*, 11, 1: 32
- Peiru S., Menzella H. G., Rodriguez E., Carney J., Gramajo H. 2005. Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5: 2539-2547
- Pereda A., Summers R. G., Stassi D. L., Ruan X., Katz L. 1998. The loading domain of the erythromycin polyketide synthase is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology*, 144, 2: 543-553
- Perez-Redondo R., Rodriguez-Garcia A., Martin J. F., Liras P. 1998. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. *Gene*, 211, 2: 311-321
- Pfeifer B. A., Admiraal S. J., Gramajo H., Cane D. E., Khosla C. 2001. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 291, 5509: 1790-1792
- Pigac J., Schrempf H. 1995. A Simple and Rapid Method of Transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and Other Streptomycetes by Electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 352-356
- Podojil M., Blumauerova M., Culik K., Vanek Z. 1984. The tetracyclines: properties, biosynthesis and fermentation. V: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Vandamme E. J. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 259–279

- Pospišil S., Sedmera P., Havranek M., Krumphanzl V., Vaněk Z. 1983. Biosynthesis of monensins A and B. *The Journal of Antibiotics*, 36, 5: 617-619
- Potvin J., Périsson P. 1993. Influence of n-propanol on growth and antibiotic production by an industrial strain of *Streptomyces erythreus* under different nutritional conditions. *Biotechnology Letters*, 15, 5: 455-460
- Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2: 3-10
- Rascher A., Hu Z., Viswanathan N., Schirmer A., Reid R., Nierman W. C., Lewis M., Hutchinson C. R. 2003. Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiology Letters*, 218, 2: 223-230
- Ravel J., DiRuggiero J., Robb F. T., Hill R. T. 2000. Cloning and sequence analysis of the mercury resistance operon of *Streptomyces* sp. strain CHR28 reveals a novel putative second regulatory gene. *Journal of Bacteriology*, 182, 8: 2345-2349
- Rawlings J. 2001. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A – erythromycin biosynthesis). *Natural Product Reports*, 18: 190-227
- Rawlings N. D., Tolle D. P., Barrett A. J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705-716
- Reeve L. M., Baumberg S. 1998. Physiological controls of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* are exerted at least in part at the level of transcription. *Biotechnology Letters*, 20, 6: 585-589
- Reeves A. R., English R. S., Lampel J. S., Post D. A., Boom T. J. V. 1999. Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Bacteriology*, 181, 22: 7098-7106
- Reeves A. R., Cernota W. H., Brikun I. A., Wesley R. K., Weber J. M. 2004. Engineering precursor flow for increased erythromycin production in *Aeromicobium erythreum*. *Metabolic Engineering*, 6, 4: 300-312
- 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 in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 7: 600-609
- Reeves A. R., Brikun I. A., Cernota W. H., Leach B. I., Gonzalez M. C., Weber J. M. 2007. Engineering of the methylmalonyl-CoA metabolite node of *Saccharopolyspora erythraea* for increased erythromycin production. *Metabolic Engineering*, 9, 3: 293-303
- Reynolds K. A., O'Hagan D., Gani D., Robinson J. A. 1988. Butyrate metabolism in streptomycetes. Characterization of an intramolecular vicinal interchange rearrangement

- linking isobutyrate and butyrate in *Streptomyces cinnamonensis*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 12: 3195-3207
- Rimmele M., Boos W. 1994. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 176, 18: 5654-5664
- Rodríguez M., Núñez L. E., Braña A. F., Méndez C., Salas J. A., Blanco G. 2008. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephämycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. Molecular Microbiology, 69, 3: 633-645
- 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
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1: 6-39
- Sanchez S., del Carmen Mateos R., Escalante L., Rubio J., Lopez H., Faxes A., Flores M. 1984. Regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. V: Biological, biochemical and biomedical aspects of Actinomycetes. Demain A. (ed.). New York, Academic Press: 343-355
- Sánchez S., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Avalos M., Guzman-Trampe S., Rodríguez-Sanoja R., Langley E., Ruiz, B. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. The Journal of Antibiotics, 63, 8: 442-459
- Santos-Beneit F., Rodríguez-García A., Sola-Landa A., Martín J. F. 2009. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. Molecular Microbiology, 72, 1: 53-68
- Schirle M., Heurtier M. A., Kuster B. 2003. Profiling core proteomes of human cell lines by one-dimensional PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics, 2, 12: 1297-1305
- Schwecke T., Aparicio J. F., Molnar I., König A., Khaw L. E., Haydock S. F., Oliynyk M., Caffrey P., Cortés J., Lester, J. B. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 17: 7839-7843
- Sekurova O. N., Brautaset T., Sletta H., Borgos S. E., Jakobsen Ø. M., Ellingsen T. E., Strom A. R., Valla S., Zotchev S. B. 2004. In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. Journal of Bacteriology, 186, 5: 1345-1354

- Seow K. T., Meurer G., Gerlitz M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson C. R., Davies, J. 1997. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 179, 23: 7360-7368
- Shen B. 2000. Biosynthesis of aromatic polyketides. V: Biosynthesis. Aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids. Leeper F. J., Vedera J. C. (eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 1-51
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I,II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 285-295
- Shendure J., Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 10: 1135-1145
- Sherman M. M., Yue S., Hutchinson C. R. 1986. Biosynthesis of lasalocid A. Metabolic interrelationships of carboxylic acid precursors and polyether antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 39, 8: 1135-1143
- Shima J., Hesketh A., Okamoto S., Kawamoto S., Ochi K. 1996. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 178, 24: 7276-7284
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D., Higgins D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 1: 1-6
- Simpson I. N., Caten C. E. 1979. Induced quantitative variation for penicillin titre in clonal populations of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 110, 1: 1-12
- Simpson D. C., Smith R. D. 2005. Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis*, 26, 7-8: 1291-1305
- Sivaraman J., Sauvé V., Matte A., Cygler M. 2002. Crystal structure of *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg²⁺. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46: 44214-44219
- Solanki R., Khanna M., Lal, R. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 4: 410-431
- Sprusansky O., Stirrett K., Skinner D., Denoya C., Westpheling J. 2005. The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *Journal of Bacteriology*, 187, 2: 664-671

- Stassi D., Donadio S., Staver M. J., Katz L. 1993. Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 175, 1: 182-189
- Staunton J. 1998. Combinatorial biosynthesis of erythromycin and complex polyketides. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 3: 339-345
- Staunton J., Wilkinson B. 1997. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chemical Reviews*, 97: 2611-2629
- Staunton J., Weissman K. J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 18, 4: 380-416
- Stocks S. M., Thomas C. R. 2001. Viability, strength, and fragmentation of *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 6: 702-709
- Takahashi H., Liu Y. N., Liu H. W. 2006. A two-stage one-pot enzymatic synthesis of TDP-L-mycarose from thymidine and glucose-1-phosphate. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 5: 1432-1433
- Tan J., Chu J., Hao Y., Wang Y., Yao S., Zhuang Y., Zhang S. 2013. A high-throughput screening strategy for accurate quantification of erythromycin. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 4: 538-544
- Tang Y., Kim C. Y., Mathews I. I., Cane D. E., Khosla C. 2006. The 2.7-Å crystal structure of a 194-kDa homodimeric fragment of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 30: 11124-11129
- Tang Y., Chen A. Y., Kim C. Y., Cane D. E., Khosla C. 2007. Structural and mechanistic analysis of protein interactions in module 3 of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *Chemistry and Biology*, 14, 8: 931-943
- Tang Z., Xiao C., Zhuang Y., Chu J., Zhang S., Herron P. R., Hunter I. S., Guo M. 2011. Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 1: 17-24
- Thompson M. W., Strohl W. R., Floss H. G. 1992. Purification and characterization of TDP-D-glucose 4, 6-dehydratase from anthracycline-producing streptomycetes. *Journal of General Microbiology*, 138, 4: 779-786
- Thongboonkerd V. 2007. Proteomics. *Forum of Nutrition*, 60: 80-90
- Tian W., Skolnick J. 2003. How well is enzyme function conserved as a function of pairwise sequence identity? *Journal of Molecular Biology*, 333, 4: 863-882
- 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

- Ünlü M., Morgan M. E., Minden J. S. 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11): 2071-2077
- Vančura A., Vančurová I., Kopecký J., Maršílek J., Cikánek D., Basařová G., Křišťan V. 1989. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Streptomyces fradiae*, a producer of tylisin. *Archives of Microbiology*, 151, 6: 537-540
- Vara J. A., in Hutchinson C. R. 1988. Purification of thymidine-diphospho-D-glucose 4, 6-dehydratase from an erythromycin-producing strain of *Saccharopolyspora erythraea* by high resolution liquid chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 29: 14992-14995
- Villas-Boas S. G., Rasmussen S., Lane G. A. 2005. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends in Biotechnology*, 23, 8: 385-386
- Vohradsky J., Li X.-M., Dale G., Folcher M., Nguyen L., Viollier P. H., Thompson C. J. 2000. Developmental control of stress stimulons in *Streptomyces coelicolor* revealed by statistical analyses of global gene expression patterns. *Journal of Bacteriology*, 182, 17: 4979-4986
- 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
- Wang S. F., Gabriel O. 1969. Biological mechanisms involved in the formation of deoxy sugars. V. Isolation and crystallization of thymidine diphosphate-d-glucose oxidoreductase from *Escherichia coli* B*. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 13: 3430-3437
- Wang Y., Boghigian B. A., Pfeifer B. A. 2007. Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by overexpression of an S-adenosylmethionine synthetase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 2: 367-373
- Weissman K. J., Bycroft M., Staunton J., Leadlay P. F. 1998. Origin of starter units for erythromycin biosynthesis. *Biochemistry*, 37, 31: 11012-11017
- Weissman K. J., Leadlay P. F. 2005. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 12: 925-936
- Wetmore B. A., Merrick B. A. 2004. Toxicoproteomics: Proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicologic Pathology*, 32: 619-642
- White-Phillip J., Thibodeaux C. J., Liu H. W. 2009. Enzymatic synthesis of TDP-deoxysugars. *Methods in Enzymology*, 459: 521-544

- Wietzorre A., Bibb M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular Microbiology*, 25, 6: 1181-1184
- Wilkins M. R., Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphrey-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L. 1995. Progress with proteom projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 13: 19-50
- Wilkins M. R., Pasquali C., Appel R. D., Ou K., Golaz O., Sanchez J. C., Yan J. X., Gooley A. A., Hughes G., Humphrey-Smith I., Williams K. L., Hochstrasser D. F. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technolgy*, 14: 61-65
- Wilson D. J., Xue Y., Reynolds K. A., Sherman D. H. 2001. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Bacteriology*, 183, 11: 3468-3475
- Worrall E. B., Gassain S., Cox D. J., Sugden M. C., Palmer T. N. 1987. 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase, an impurity in commercial 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Journal of Biochemistry*, 241: 297-300
- Wu H., Chen M., Mao Y., Li W., Liu J., Huang X., Zhou Y., Ye B. C., Zhang L., Weaver D. T., Zhang B. 2014. Dissecting and engineering of the TetR family regulator SACE_7301 for enhanced erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbial Cell Factories*, 13, 1: 158
- Yamada Y. 1999. Autoregulatory factors and regulation of antibiotic production in Streptomyces. V: Microbial signalling and communication. England R, Hobbs G, Bainton N, McRoberts DL. (eds.). Cambridge University Press: 177-196
- Yang K., Han L., Vining L. C. 1995. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, *jadR2*. *Journal of Bacteriology*, 177, 21: 6111-6117
- Yin P., Wang Y. H., Zhang S. L., Chu J., Zhuang Y. P., Wang M. L., Zhou J. 2008. Isolation of soluble proteins from an industrial strain *Streptomyces avermitilis* in complex culture medium for two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 73, 2: 105-110
- Yin P., Li Y. Y., Zhou J., Wang Y. H., Zhang S. L., Ye B. C., Ge W.F., Xia Y. L. 2013. Direct proteomic mapping of *Streptomyces avermitilis* wild and industrial strain and insights into avermectin production. *Journal of Proteomics*, 79: 1-12
- Yu D., Xu F., Zeng J., Zhan J. 2012. Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life*, 64, 4: 285-295

- Zarkowsky H., Lipkin E., Glaser L. 1970. The Mechanism of 6-Deoxyhexose Synthesis V. The relation of pyridine nucleotide to the structure of the deoxythymidine diphosphate-glucose oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 24: 6599-6606
- Zhang Y. X., Tang L., Hutchinson C. R. 1996. Cloning and characterization of a gene (*msdA*) encoding methylmalonic acid semialdehyde dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 178, 2: 490-495
- Zhang H., Wang Y., Wu J., Skalina K., Pfeifer B. A. 2010. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chemistry & Biology*, 17, 11: 1232-1240
- Zheng L., Bai Z., Xu T., He B. 2012. Glucokinase contributes to glucose phosphorylation in d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 11: 1685-1692
- Ziermann R., Betlach M. C. 1999. Recombinant polyketide synthesis in *Streptomyces*: engineering of improved host strain. *Biotechniques*, 26: 106-110
- Zou X., Li W. J., Zeng W., Chu J., Zhuang Y. P., Zhang S. L. 2011. An assessment of seed quality on erythromycin production by recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain. *Bioresource Technology*, 102, 3: 3360-3365
- Zukowski M.M., Gaffney D.F., Speck D., Kauffmann M., Findeli A., Wisecup A., Lecocq J.P. 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 4: 1101-1105

ZAHVALA

Izr. prof. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč pri izvedbi proteomskega eksperimenta, temeljito recenzijo naloge ter za vse nasvete in predloge tekom nastajanja doktorske naloge.

Dr. Gregorju Koscu, dr. Vasilki Magdevski in dr. Štefanu Fusu se zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč pri izvedbi eksperimentov in za vse popravke ter komentarje pri pisanju.

Članu komisije doc. dr. Marku Fonoviču se zahvaljujem za temeljito recenzijo, konstruktivne popravke in predloge pri pisanju doktorske naloge. Tudi članoma komisije izr. prof. dr. Hrvoju Petkoviču in prof. dr. Branki Javornik se zahvaljujem za recenzijo doktorske naloge.

Zahvaljujem se tudi raziskovalcem iz Inštituta Jožef Stefan, ki so izvedli analize MS ter raziskovalcem iz Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so izvedli transkriptomske analize.

Hvala tudi podjetju Acies Bio za možnost opravljanja doktorata.

Hvala acies bandi za super delovno vzdušje in pomoč pri delu. Blaž, Jaka, Urška, Petra, Mare, Dušan, Tadeja, Beno, Marinka, Helena, Katarina, Nina K in Nina Č, Tjaša...hvala vsem!

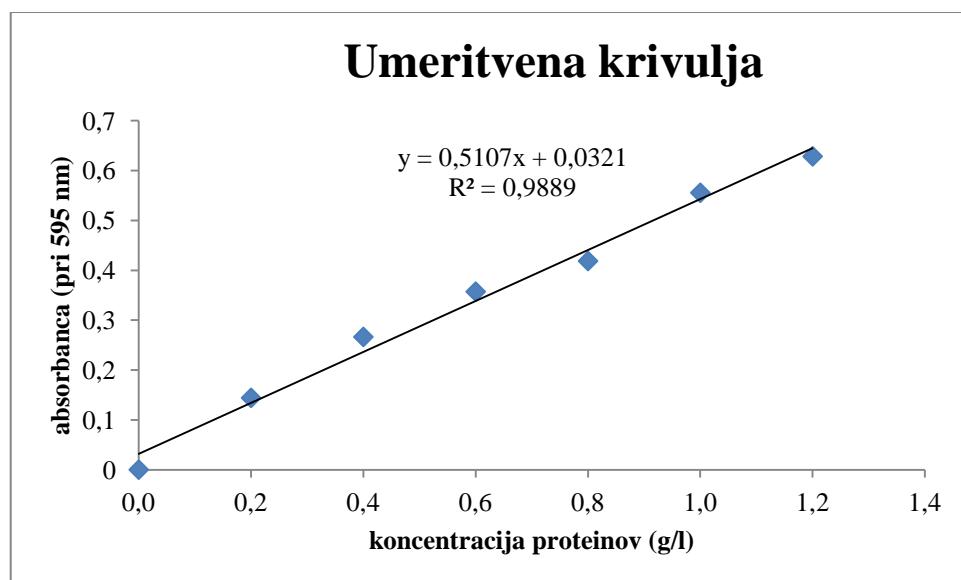
Zahvaljujem se tudi Spirit Slovenija (P-MR-09/103) za financiranje.

Hvala tudi družini, predvsem mojim fantom Žigi, Martinu in Roku, za vso podporo in potrpežljivost.

PRILOGE

PRILOGA A

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu po metodi Bradford



PRILOGA B

Poravnavo aminokislinskih zaporedij acetolaktat sintaz (SACE_1456)

Mycobacterium Sac.erythraea S.albus	MFPGLTSVDVSDADGLGAAMNAALGIDGPAVISVECATDEIPPFAPFLAALASKGGAVNQ MFPGLRATTVRGLEELRAFLAETGRTRAPCLVSVEMRRDEMPPYLPFVPAQPATERTSPK
Kitasatospora S.auratus	MFPSLRTATATTAAEELRALLAANERTGPALVCVEADPDELPPFLPFL----- MFPGLDVTRAEDGAQLRAALSRTNAGGGPAFVTIDFDPAEIPPFILPFLPRTEESAHERAA AFPSLDATGAGDVAQLRAALLRGNGSGPAFVAVDCDPREIPPFILPFR----- *.* . * : .*: :: *:**: **
Mycobacterium Sac.erythraea S.albus	VSFDKEIQNNVAASA -----
Kitasatospora S.auratus	VHVG-----

PRILOGA C

Poravnavo aminokislinskih zaporedij alfa podenote piruvat dehidrogenaze E1 (SACE_3952)

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

--MVHN-----RIDPPFTRYLDSDGRPLGELPAWAGDSDLVGLYRQMLLTRLFDQKA
MTTTERTAASYFLPSDEP-LGLVTADGTPMPDPALEMPADDVLLRLYRGMVSGRRFDTQA
---MTTARQRSLLPSDTP-LTLLGDGEPTTAE--ELPAGEVLLELHRRMVVGRRFDTQA
---MVATRERSLLPTEEP-LSLLRKDGAPVTDSPILAMPDDDVLLLEHRRMVIGRRFDTQA
--MATATPDRTLLPTEEP-LALLRPDGSAVEGSPLRMPDDEVLELHRRMVVGRRFDTQA
*: * : ** : *.* : * *** : *

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

VALQRTGRIGTYAPTLGQEAIGVAIGSQMRAEDDVLVPYYRDTAVQLMRGVRMEDILLYWG
TALTKQGRILAVYPSARGQEAAEIGSILALRPQDWLFPTYRDSVAIVARGVDPVEVLTLR
TALTKQGRILAVYPSSRGQEACQVGAVALAEE RDWLFLPTYRDSVALVSRGVDPVQTLLQ
TALTKQGRILAVYPSSRGQEACQVGAVALRSHDWLFPTYRDSVALVTRGVDPGETLTLQ
TALTRQGRILAVYPSSRGQEACQVGAVALRERDWLFPTYRDSVALVTRGVPAAGALTLLR
.** : *:**. * : * * * : . : . . *.* * * * : *** *

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

GDERGSDYAELPLAQDFPICVPIATQALHACGVASA FRIRGEHRVAVTTCGDGATSKGDF
GDWHC--GYDPYRTNVAPQCTPLATNTLHAVGFAARVKGEDTVSLVLLGDGATSEGDT
GSWHL--GYDPYEHRVGPQCTPLATNTLHAVGMAHAARLKGEDSVSLVLLGDGATSEGDT
GGWHL--GYDPYEHRVGPQCTPLATNTLHAVGFAA HARVKGEDTAALVLLGDGATSEGDT
GDWHL--GYDPREHRVGPQCTPLATNTPHAVGFAAARYKG DETAALVLLGDGATSEGDT
*: : * . * *.* * : ** *.* * * : **. . : . * * * * : ***

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

LEALNVAGAWQLPVLFLVVNNNQWAI SVPRRIQCGAPTLAEKAVGAGFPGEQVDGNDLVAV
HEALNF AA VWKAPVVFLVQNNGYAI SVPLEKQTAAPSLAHKGVGYGMPSVLVDGNDAAA
HEALNFAGVWQAPVVFLVQNNGYAI SVPM SKQNAAPSLAHKGIGGYGVASELIDGNDPAAV
HEALNFAGVWRAPVVFLVQNNGYAI SVPLSKQTAAPTLAAKGVGYGVPSVLVDGNDVAAV
HEALNFAGVW KAPVVFLVQNNGYAI SVPLSKQTAAPTLAHKGIGGYGIRSVLVDGNDAAA
*****.*** : * * : * : * : * : * : * : * . : * . : * : * . : * : * :

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

AERVRAALERARQGKGP TLLECISYRLCDHTTADDASRYRSAAEVNQAWREEPIKRLRAF
HAVVEQAVARA AAGEGPTLIEALTYRIESHTNADDATRYRERVEVEQWLTRDPISRLKQY
YTTVREAAARAGAGPALIEALTYRVEAHTNADDANRYRDAGEVAAWL GKDPVDRLERH
YAVVREALD---SGGPTLIEALTYRIEAHTNADDATRYRTSDEVAAWLDRDPVDRIDAY
HAVVSEALA---SGEPVLVEALTYRIEAHTNADDASRYRDSA EVAWHLARDP VDR LASH
*: * : . *.* : * : * : ** . * * . *** * ** . : * : * . : * : * :

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

LAGRGQWDEEREQALVGECQARVQEAVERFETFAAQAPQALFEHVYARWPAVLEEQREQL
LTD RG LLD KVQEEI DARAEAAA ALRTRMNVDTE LD PADLFRHVYAEPTAALRQQAEL
LTSRGLLDEARAAVAEEAEAFASVRNRMNV DVEPDPAELFTHVYAEPTAALREQAGLL
LTARGL LDAARKAEVAAEAEFDAASVRAKLNVDHEYDPATLFEHVYATPTTHLREQAAAL
LASRG LLD PARRDSVDAEAEFFAA ALRAELNADARVDPADLFRHVYAEPTAQLREQAAML
*: * * . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : .

P.aeruginosa Amycolatopsis Sac.erythraea Saccharothrix Actinosynnema

LERAARRRGGA EHE----
AAENAQNSEDHA-----
AEEIAGAKS-----
AEELA-----
ARELDAEHSGADDL DGGRA

PRILOGA D

Poravnavo aminokislinskih zaporedij beta podenote piruvat dehidrogenaze E1 (SACE_3953)

Pseudomonas	-----MSERNGEAKRLALLEAVNLALHRAAEDETVVVLGEDVG
A.orientalis	-----MSEI SMAQALNAALRDAVKDDDRVLIFGEDVG
A.decaplanina	-----MTEI SMAQALNIALRDAVKDDDRVLIFGEDVG
Sac.erythraea	-----MAAALNRALADALEADDRVLVFGEDVG
Saccharothrix	MTASLAGSQPGSHLGSHSGARAGSRSLAGTNLSMAGALNRLSALEDDPSVLFVFGEDVG : * :* * * : * * ::*****
Pseudomonas	VNGGVFRATLGLRERFGFKRVLDTPLAENMIAGLSIGMAAQGLKPVMEIQFMGFIYAAAME
A.orientalis	PLGGVFRVTGDITADFGEERCDFDPLAESGIVFGFAVMAMGGFRPVVEMQFDAFAYPAFE
A.decaplanina	PLGGVFRVTGDITADFGEERCDFDPLAESGIVFGFAVMAMGGFRPVVEMQFDAFAYPAFE
Sac.erythraea	PLGGVFRVTGDITADFGEERCDFDPLAESGIVFGTAIGMAMNGLRPVVMEMQFDAFAYPAFE
Saccharothrix	PLGGVFRVTGDITADFGEERCDFDPLAESGIVFGTAIGMAMNGLRPVVMEMQFDAFAYPAFE *****.* * : * :*****. *. * :*** * :*** :*** . * * :* :
Pseudomonas	QLVSHASRLRNTRGRRLACPLVLRTPMAGIRAPEHHSEATEAMFAHIPGVRVLPVSSPA
A.orientalis	QITSHVAKLRNRTRGALSPLMVIRIPYAGGIGGVHHCDsseayTHTPGLRVVTPGTPQ
A.decaplanina	QITSHVAKLRNRTRGALSPLMVIRIPYAGGIGGVHHCDsseayTHTPGLRVVTPGTPQ
Sac.erythraea	QITSHLAKLRNRTRGRVELPVPVIRIPYGGGIGGVHHCDsseayTHTPGLRVVSPGTP
Saccharothrix	QITSHLAKMRNRTRGRVSLPIVIRVPYGGGIGGVHHCDsseayTHTPGLRVVTPGTP *:*** : :***** : * :*** * . *** . *** . :* :*** * : * . :*
Pseudomonas	RAYGLLAAIDDPDVIFLEPTRLYRMMNPQPLADDARRPLDSCFTLREGGDLTLVSWGA
A.orientalis	DAYDLLRDAIDSPPVIFLEPKCRYWSKE-PVSFTREGAAMDRAVVRREGKDVTLIAYGP
A.decaplanina	DAYDLLRDAIDSPPVIFLEPKCRYWSKE-PVSFTRDGAAMDRAIVRREGKDVTLIAYGP
Sac.erythraea	DAYGLLRAAIDSPDPVVFLEPKHRYWAKD-AVSLDPA-GSLDRAVIRRPGRDVTLIAYGP
Saccharothrix	DAYRLLRDSIASPDPVIFLEPKRRYWAKG-ELT-DAA-VPMDRALVRRGTDTVLTIAYGP ** ** :* .*****:****. * : : :* .. * * :*** :*** :* . :*
Pseudomonas	SVHETLQAAERLAQRGIEAEVIDVACLKPDLDTLEASVRKTGRCVVHEAPKGGLGGE
A.orientalis	MVATALETAEEATAEGWDVEVVDLRLSPFDDETVAAASVRRTGRAVVVHEAGFCGGYGAE
A.decaplanina	MVATALETAEEATAEGWDVEVVDLRLSPFDDETVASVRRTGRAVVVHEAGFCGGYGAE
Sac.erythraea	MVATALETAEEATAEGWDVEVVDLRLSPFDDETCASVRKTGRVVVHEASGFGGYGAE
Saccharothrix	MVATALETAEEAVEEGWDVEVVDLRLSPFDDETCASVRKTGRVVVHEASGFGGYGAE * :*:** .*. * :***: * : * :* * : .***:***.*:*** * . :* . :*
Pseudomonas	IAASLYERVLSDLRAPIQRVAADIPPLYLREPLYMPAVERDILAACDTVLG-----Y
A.orientalis	VVARITEQCFHQHLHAPVLRVTGLDIYPPPPQLERHQLPDVDRILDTVARLQWNDEPVVAG
A.decaplanina	VVARITEQCFHQHLHAPVLRVTGLDIYPPPPQLERHQLPDVDRILDTVARLQWNDEPVVAG
Sac.erythraea	VAARITERCFHHHLHAPVLRVTGFIDIPYPPPQLEEHHHLPGVDRILDAIRLQWDDEVVRGY
Saccharothrix	VVARITERCFHHHLHAPVLRVTGFIDIPYPPPQLEEHHHLPGVDRILDAVARLQWDDEVVRGY . * : * : . * :***: ***. *** * :** : * : * : * : :
Pseudomonas	A-----
A.orientalis	A-----
A.decaplanina	A-----
Sac.erythraea	PAGEVQHA
Saccharothrix	GA-----

PRILOGA E

Poravnavi aminokislinskih zaporedij dihidrolipoamid aciltransferaze, komponenta E2 (SACE_3954)

PRILOGA F

Poravnavo aminokislinskih zaporedij metilmalonat semialdehid dehidrogenaze (SACE_1456)

PRILOGA G

Poravnava aminokislinskih zaporedij acil-CoA dehidrogenaze (SACE_1457)

PRILOGA H

Poravnava aminokislinskih zaporedij enoil-CoA hidrataze (SACE_1458)

B.subtilis	-----MNAISLAVDQFVAVLTIHNPP-ANALSSRILEELSSCLDQCETDAGVRSTIIH
Actinopolyspora	MTTHAAEQQQVLLDVQGHLGRITLNRPKALNSLTMEMVTAVLGAEWRSDDRVRTVLVE
Sac.rectivirgula	-----MTEPEVLLSERGALGRITLNRPKALNSLTLMVRAAMTEALQRWRDAEHIRVIAVD
Sac.erythraea	-----MTASPEILVSEQGALGRITLNRPKALNALTLMVRAAMTEALQRWRDAEHIEAVLID
Sac.spinosa	-----MTEPEILVREQGSLGRITLNRPKALNSLTLMVRAAMAEAVEQWRTAEHIRAILID : : . : * : . * : * : : : : . : . : . : . : . : .
 B.subtilis	 GEGR-FFSAGADIKEFTSLKGNESSL---LAERGQQILMERIESFPKPPIIAAIHGAALGG
Actinopolyspora	GAGERGLCAGGDIRAMYDAVKAGEPELTERFWAAEYRMNAALAHYPKPVVGIMDGICMGG
Sac.rectivirgula	GAGERGLCAGGDVRALHDAAKAGDET LAETFWAAEYQLNAALARYPKPVVGIMDGICMGG
Sac.erythraea	GAGERGLCAGGDITRALYDAAKAGDEEFPATFWAAEYRLNSALARYPKPVVGIMDGITMGG
Sac.spinosa	GAGERGLCAGGDVRALHDAAKAGDESLPAAFWTEEQYLNSALAGYPKPVVGIMDGICMGG * . : . * . : . : : : : : : * : * : * : * : * : **
 B.subtilis	 GLELAMACHIRIAEADAKLGLPELNIGIIPGFAGTQRPLPRYVGTTAKALELIGSGEPISGK
Actinopolyspora	GVGISAHGSHRVVTERSKVGMPEVGIGFAPDVGGTYLLQKAPQQLG-THMALTGAPISGA
Sac.rectivirgula	GVGVTAGSHRVVTERSKIAMPEVGIGFAPDVGGTYLLQKAPQQLG-VHLGLTGTITGP
Sac.erythraea	GVGVTAGSHRVVTERSKIGMPEVGIGFAPDVGGTYLLQKAPQQLG-THMALTGAPVTGA
Sac.spinosa	GVGISAHGSHRVVTERSKVGMPEVGIGFIPDVGGTYLLQKAPQQLG-THIALTGAPIGGA *: : : * : : : : : : * ..** * : * .. : * : * : * : *
 B.subtilis	 EALDLGLVSIGAKDE-----AEVIEKAKALAFAEKSPQTLASLELLYSNKVSYE
Actinopolyspora	DAIHGLADHYVDSSELDGLVNLTEGEASALLEALKYTSAPESGLAA-ARPWIDEVYAAD
Sac.rectivirgula	DAIYCGLADHYVPSSLEALLEALSDGDPDAALQKFAEQPPEPLAE-HREWIDAAYSAS
Sac.erythraea	DAVLAGFADHHVDSRLGELVEGLAGGAVDQVLGELSQQPQAPLEA-EREWIDAAYSAE
Sac.spinosa	DAIYCGVADYYVNSANLPGLVEDLAGGEVDEVLQKFSEPAPEAPLAA-QREWIDAAYSAD *: : * : . : * : : : . : * : : . : * : .
 B.subtilis	 GSLKLEAKRFGE-----
Actinopolyspora	SVERIL-TELRSRNEPEAGEAAETIATKSPTSLKVTLRALRSAELGSLEEVLQDFEYRVS
Sac.rectivirgula	TVEEIL-QRLRDRPEPAAREAADTIEQKSPTSLKVTLRSLR--EFTSLEQALEQEYRVS
Sac.erythraea	TVEEIL-RRLRERPEEAARTAAETIQTKSPTSLKVTLRSLR--GFSSLEQALDQEFRVS
Sac.spinosa	SVEEVL-RRRLRERPEEAARETAAEIEHKSPPTSLKVTLKALRS--DYGSLEEALVQEFLA . : .
 B.subtilis	 --AFESEDAKEGIQAFLE--KRKPQFKGE-----
Actinopolyspora	LACVHRGDFLEGVRATLVDKDRSPAWSPGQLEDVGEEHVAFFRRPANGDLGLSG
Sac.rectivirgula	LACVRIGDFVEGVRATLVDKDRNPWAWSPTLGEVDEQRVEKFFPVEGLDLSS--
Sac.erythraea	MACILIGDLVEGVRATLVDKDRDPKWSPAWLDEVDGALVEKFFEPRGAGELGLDG
Sac.spinosa	MACVRIGDFVEGVRATLVDKDRNPQWSPAQLSDVDESREVKEFFEPVADEPKLLG-

PRILOGA I

Poravnava aminokislinskih zaporedij 3-hidroksi-izobutirat dehidrogenaze (SACE_1459)

Rhodobacter	-MKIAFIGLGNMGS PMARNLAAAGHEVTGFDTAAP-----	APEGVTMAPSAADAAGAEV
Actinopolyspora	MAVIGFIGLGHMGGPMSANLVKAGHTVRGFDLASEATRRAE	HGVTVAA SAVE AVEGVDA
Sac.rectivirgula	MAVIGFIGLGHMGGPMSANLVKAGHEVRF DLSSEALAKAEQHGVNAVG	SVPEAVSGVDA
Sac.erythraea	MAVIGFIGLGHMGGPMSANLVKGHEVRF DLPAALEAAEATGV	T PAGSIAEAVAGADA
Sac.spinosa	MAVIGFIGLGHMGGPMSANLVKAGHAVQGF DLPAALEAADRH	GVT TVASVADAVAGVDA
	*.*****.*.*: *.*. .** * ***	**. . * :*. *..
Rhodobacter	VFTMLPNGQI LRTVADELVPAMAAGAVLCDCSTVDVQSARE	VAQAEEAGL GALDAPVSG
Actinopolyspora	VVTMLPGGQHLLCYDRILA VSPGTLLIDSSTVDVADARRA	HEL AEEAGLDSVDAPVSG
Sac.rectivirgula	VITMLPGGQQLLCYDEALPAADPGTLFID SSTDVADARRA	HEL AGIAGFGSLDAPVSG
Sac.erythraea	VITMLPGGKQLLCYDQVLGAAS PETL LIDSSTVDVADAR	KAHERAAEAGFGSVDAPVSG
Sac.spinosa	VITMLPSGKHVLACYDEVLA AKPGTLLIDSSTVDVADARRA	HERAAEAGFGSIDAPVSG
	*.**** * : : * . : * :: * .***** .**.. * **: :*****	*
Rhodobacter	GVGAAAGT LT FMVGGSDAAFATVRPLFEIMGQKAVHC GGPAGQAAKICNNMILGVTMI	
Actinopolyspora	GTAGAEAGT LT FMVGGTERAYLAARDFLEPMARKVIHCGGAGNGQVTKMCNNLMLATSM	
Sac.rectivirgula	GTAGAEAGT LT FMVGGAEEDFARAEPILLEPMARKVIHCGGPGNGQVAKMCNNLILGASMI	
Sac.erythraea	GTAGAEAGT LT FMVGGTEENYNRAQPVLEPMARKVIHCGGPGNGQVTKMCNNLVLGASMI	
Sac.spinosa	GTAGAEAGT LT FMVGGSEEDFHRAESLLEPMARKVIHCGGPGNGQVTKMCNNLILGASMV	
	*.*** *****: : .. .*: *.:**** * ***. :****:****:****:	*
Rhodobacter	ATCEAFALADKLGLDRQKMFDVV STSSGYWSM NAYCPAPGVGPQSPADNGYKPGFAEL	
Actinopolyspora	GVAAEAFVLGERLGLSHRALYDV ASVSTGQCWSLTNCVPDMVETSRANHDYE PGFAASL	
Sac.rectivirgula	AVSEAFVLGERLGLDHQAFYDV ASISTGQCWSLTNCVPGLVETSRANHDYE PGFAAAL	
Sac.erythraea	AVSEAFVLGERLGLHQALYDV ASISTGQCWA LTTNCVPDLVETSRANHDYE PGFAAAL	
Sac.spinosa	AVSEAFVLGERLGLHQALYDV ASISTGQCWA LTTNCVPDLVETSRANHDYE PGFAAAL	
	*.***.*.:****: : ***.* * :* .*: : *.* : * *:. *:**** *	
Rhodobacter	MLKDLRLSQQAAEGADADTPMGR LAADLYARF VEEEDGRGRDFSAM LPRF EGRGRS---	
Actinopolyspora	MLKDLGLAVSAADRGADTELARIAARIYERFNEE-GGGGYDFSAVIDSIRRHSGEVGT	
Sac.rectivirgula	MLKDLKLA VSAAEQSGTNTEVGR LAAELYQRFNDE-GGGGYDFGAI KLVREHS-----	
Sac.erythraea	MLKDLKLAASAAE QSGTDAAIGRLATELYQRFNDE-GGAGFDGF GAI KSVREHSGH---	
Sac.spinosa	MLKDLKLATSAAE QSGTDAAIGRLATELYQRFNDE-GGGSLDFGAI KSVREHSEQR--	
	***** *: .*: : : :****: : * ** :* * . **. : : .. :	
Rhodobacter	---	
Actinopolyspora	QRG	
Sac.rectivirgula	---	
Sac.erythraea	---	
Sac.spinosa	---	

PRILOGA J

Preglednica produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
NRRL2338	WT1	70,8	68,8		
	WT2	73,8	75,1		
	WT3	83,1	88,7		
	WT4	80,0	79,6		
	WT5	90,1	90,6		
	WT6	65,8	68,8		
	WT7	61,2	69,9		
	WT8	66,7	69,9		
	WT9	66,7	61,3		
	WT10	65,3	69,9	74,5	12,2
	WT11	65,3	72,9		
	WT12	47,0	54,2		
	WT13	88,7	93,2		
	WT14	53,4	61,3		
	WT15	78,1	64,8		
	WT16	68,8	64,8		
	WT17	79,6	91,3		
	WT18	88,7	93,2		
	WT19	90,6	81,9		
	WT20	94,6	82,5		
NRRL2338 + pSET152	WT21	72,9	76,4		
	WT22	88,6	91,3		
	WT23	101,2	107,7		
	WT24	94,6	93,8		
	WT25	61,3	58,9		
	WT26	70,3	69,9		
	WT27	61,3	44,5		
	WT28	52,2	44,5		
	WT29	72,9	69,9		
	WT30	60,7	62,7	72,7	15,5
	WT31	72,9	78,0		
	WT32	88,7	78,0		
	WT33	90,6	105,4		
	WT34	72,9	62,7		
	WT35	68,3	78,0		
	WT36	65,5	62,7		
	WT37	64,8	46,5		
	WT38	68,4	58,9		
	WT39	65,5	69,9		
	WT40	74,4	80,4		
NRRL2338 + pABE60	E12382	161,4	151,9		
	E12383	161,4	152,8		
	E12384	127,2	143,3		
	E12385	127,2	135,6	166,0	32,1
	E12386	218,3	207,4		
	E12387	193,8	204,8		
	E12388	161,4	152,8		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
NRRL2338 + pABE60	E12389	218,3	210,5		
	E12390	161,4	161,4		
	E12391	181,8	193,8		
	E12392	218,3	210,5		
	E12393	193,8	193,8		
	E12394	193,8	185,6		
	E12395	161,4	172,1		
	E12396	152,8	161,4		
	E12397	152,8	161,4		
	E12398	135,6	143,3		
	E12399	134,9	143,3		
	E12400	112,9	104,2		
	E12401	127,4	143,3	166,0	32,1
NRRL2338 + pABE87	E12402	143,3	145,1		
	E12403	143,3	145,1		
	E12404	120,4	135,6		
	E12405	135,6	135,6		
	E12406	204,8	218,3		
	E12407	143,3	164,4		
	E12408	181,8	172,1		
	E12409	161,4	152,2		
	E12410	145,1	152,2		
	E12411	245,9	237,8		
	E12412	193,8	216,4		
	E12413	151,9	146,5		
NRRL2338 + pABE56	E13234	184,4	173,6		
	E13235	205,9	205,9		
	E13236	132,6	155,5		
	E13237	184,4	173,6		
	E13238	193,8	205,9		
	E13239	165,2	155,5		
	E13240	165,2	173,6		
	E13241	205,9	205,9		
	E13242	256,5	165,7		
	E13243	229,8	227,1	187,9	34,7
	E13244	229,8	233,9		
	E13245	205,9	215,8		
	E13246	241,5	245,1		
	E13247	228,0	233,9		
	E13248	155,5	165,2		
	E13249	173,6	165,2		
	E13250	155,5	139,3		
	E13251	193,8	205,9		
	E13252	139,3	134,2		
	E13253	139,3	149,7		
	E12500	123,4	122,4		
	E12501	129,5	136,2	126,7	18,0
	E12502	123,4	111,6		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
	E12503	129,5	111,6		
	E12504	109,9	112,8		
	E12505	109,9	112,8		
	E12506	144,2	128,4		
	E12507	178,7	145,4		
	E12508	122,4	145,4		
	E12509	129,5	128,1		
	E12510	155,7	145,4		
	E12511	155,7	128,1		
	E12512	136,2	128,4		
	E12513	104,2	87,5		
	E12514	109,9	99,3		
	E12515	109,9	99,3		
NRRL2338 + pABE56	E12516	144,2	145,4	126,7	18,0
	E12517	116,3	112,8		
	E12518	136,2	128,4		
	E12519	168,9	155,4		
	E12520	144,5	145,5		
	E12521	136,7	128,4		
	E12522	116,0	111,6		
	E12523	122,4	111,6		
	E12524	129,1	128,4		
	E12525	90,4	97,0		
	E12526	118,9	112,8		
	E12527	116,3	112,8		
	E12528	132,2	129,5		
	E12529	144,5	136,2		
	E12530	136,1	129,5		
	E12668	74,4	87,1		
	E12669	74,4	78,4		
	E12670	90,2	99,3		
	E12671	116,5	112,8		
	E12672	124,2	112,8		
	E12673	132,9	128,1		
	E12674	84,6	77,0		
	E12675	84,6	87,5		
	E12676	109,2	112,8		
NRRL2338 + pABE61	E12677	96,1	102,5	113,5	29,5
	E12678	171,6	165,1		
	E12679	141,1	137,5		
	E12680	151,0	171,6		
	E12681	79,6	74,4		
	E12682	79,6	84,6		
	E12683	137,5	138,7		
	E12684	137,5	128,4		
	E12685	74,8	73,2		
	E12686	74,8	99,3		
	E12687	151,0	138,7		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
NRRL2338 + pABE61	E12688	124,2	128,4		
	E12689	171,6	165,0		
	E12690	116,5	112,9	113,5	29,5
	E12691	116,5	124,2		
	E12692	111,6	109,2		
NRRL2338 + pABE62	E12693	69,8	87,5		
	E12694	61,6	87,5		
	E12695	132,9	128,1		
	E12696	70,1	77,0		
	E12697	79,6	87,5		
	E12698	102,8	111,6		
	E12699	102,8	90,5		
	E12700	116,5	124,2		
	E12701	171,6	170,1		
	E12702	151,0	165,1		
	E12703	151,0	170,1		
	E12704	102,8	90,5		
	E12705	102,8	99,3	112,3	28,5
	E12706	124,2	112,8		
	E12707	116,5	99,3		
	E12708	116,5	112,8		
NRRL2338 + pABE96	E12709	120,6	128,1		
	E12710	170,1	165,1		
	E12711	74,4	77,0		
	E12712	99,3	87,5		
	E12713	97,2	99,3		
	E12714	116,5	112,8		
	E12715	120,6	112,8		
NRRL2338 + pABE88	E12716	116,5	128,1		
	E12717	102,8	99,3		
	E12718	122,1	54,6		
	E12719	122,1	60,2		
	E12720	34,3	85,0		
	E12721	50,6	87,5	73,9	27,8
	E12722	69,1	106,1		
NRRL2338 + pABE88	E12723	75,8	100,1		
	E12724	57,0	68,4		
	E12725	34,3	54,6		
	E13331	139,9	132,0		
	E13332	149,5	129,2		
	E13333	142,7	145,7		
	E13334	151,7	140,7		
NRRL2338 + pABE88	E13335	172,0	163,2	131,6	16,5
	E13336	121,0	119,6		
	E13337	146,4	133,0		
	E13338	129,5	128,6		
	E13339	132,1	129,2		
	E13340	114,4	119,6		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
NRRL2338 + pABE88	E13341	110,0	108,0		
	E13342	124,3	114,8		
	E13343	126,8	132,3		
	E13344	115,3	114,8		
	E13345	163,3	146,1	131,6	16,5
	E13346	145,7	151,7		
	E13347	100,1	99,3		
	E13348	129,1	121,9		
	E13349	128,6	131,7		
	E13350	132,0	128,6		
NRRL2338 + pABE89	E13351	161,1	148,9		
	E13352	121,0	119,6		
	E13353	102,4	100,1		
	E13354	120,2	119,6		
	E13355	131,8	128,6		
	E13356	100,5	99,1		
	E13357	146,6	140,7		
	E13358	161,2	145,7		
	E13359	157,2	132,0		
	E13360	108,9	114,8	129,9	19,5
	E13361	156,2	145,0		
	E13362	145,6	136,3		
	E13363	131,4	128,6		
	E13364	131,7	132,0		
NRRL2338 + pABE95	E13365	173,3	163,2		
	E13366	132,0	119,6		
	E13367	100,1	102,3		
	E13368	119,6	114,8		
	E13369	128,6	114,8		
	E13370	132,0	128,6		
	E13571	106,3	108,0		
	E13572	115,8	116,3		
	E13573	79,6	73,0		
	E13574	90,8	91,6		
	E13575	91,6	68,6		
	E13576	99,8	81,5		
	E13577	49,7	44,8		
	E13578	46,9	44,5		
NRRL2338 + pABE95	E13579	54,4	51,6	69,6	24,4
	E13580	65,8	66,1		
	E13581	40,1	43,1		
	E13582	100,5	98,2		
	E13583	73,0	65,8		
	E13584	108,0	94,2		
	E13585	52,4	51,3		
	E13586	50,1	43,1		
	E13587	62,7	42,5		
	E13588	69,0	49,8		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice produkcije eritromicina v naravnem sevu *S. erythraea* in v različnih konjugantah z določeno gensko mutacijo

Sev	Oznaka kolonij	Gojenje 1 (mg/l)	Gojenje 2 (mg/l)	Povprečna vrednost (mg/l)	Standardni odklon (mg/l)
NRRL2338 + pABE95	E13588	69,0	49,8		
	E13589	35,4	39,0	69,6	
	E13590	69,0	51,3		24,4
NRRL2338 + pABE58	E13415	110,5	115,3		
	E13416	101,6	105,7		
	E13417	95,1	95,8		
	E13418	102,0	107,4		
	E13419	70,8	94,2		
	E13420	148,5	154,5		
	E13421	134,7	128,0		
	E13422	89,0	81,2		
	E13423	147,0	152,3		
	E13424	134,4	133,0		
	E13425	93,1	96,8	117,9	23,7
	E13426	165,2	168,7		
	E13427	142,3	134,1		
	E13428	134,6	135,8		
	E13429	121,9	128,0		
	E13430	82,1	90,9		
	E13431	120,6	129,0		
	E13432	113,7	122,4		
	E13433	107,1	105,0		
	E13434	110,0	114,4		