UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Benjamin KIRM

POZNE STOPNJE BIOSINTEZE ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI Saccharopolyspora erythraea

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Benjamin KIRM

POZNE STOPNJE BIOSINTEZE ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI Saccharopolyspora erythraea

DOKTORSKA DISERTACIJA

LATE STAGES OF ERYTHROMYCIN BIOSYNTHESIS IN THE ACTINOBACTERIUM Saccharopolyspora erythraea

DISERTATION THESIS

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 20011 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na doktorskem študiju Bioznanosti na znanstvenem področju biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Hrvoje Petković.

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

Mentor: doc. dr. Hrvoje PETKOVIĆ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica	doc. dr. Polona Jamn	ik			
	Univerza v Ljubljani,	Biotehniška	fakulteta,	Oddelek za živilstv	VO

Član: doc. dr. Hrvoje Petkovič Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Daslav Hranueli Prehrambeni biotehnološki fakultet, Zagreb, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Kabinet za bioinformatiku

Datum zagovora: 27. maj 2014

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

Doktorand: Benjamin Kirm

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK UDK 604.4:615.33:579.873:577.2(043.3)=163.6
- KG aktinomicete/*Saccharopolyspora erythraea*/biosinteza/sekundarni metaboliti/poliketidi/post-PKS/eritromicin//bioinformatske metode/molekularna genetika/genska manipulacija/regulacija/fiziologija
- AV KIRM, Benjamin univ.dipl.ing.živ.teh.
- SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
- LI 2014
- IN POZNE STOPNJE BIOSINTEZE ERITROMICINA PRI AKTINOBAKTERIJI Saccharopolyspora erythraea
- TD Doktorska disertacija
- OP XV, 151 str., 12 pregl., 60 sl., 14 pril., 285 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Aktinobakterija Saccharopolyspora erythraea proizvaja eritromicin, makrolidni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Biosintezo osnovnega makrolidnega obroča katalizira modularna poliketid sintaza (PKS) tipa I, temu pa sledijo pozne stopnje biosinteze (t.i. post-PKS stopnje), serija reakcij, ki nastali aglikon pretvorijo v biološko aktivno učinkovino eritromicin A. V genski skupini za biosintezo eritromicina ni pot-specifičnega regulatorja, regulacija biosinteze pa je predvsem povezana z regulatornimi procesi, ki nadzirajo tudi morfološki razvoj bakterije. Namen doktorske naloge je bil identificirati gene v S. erythraea, ki imajo pomembno vlogo v poznih fazah biosinteze eritromicina ter regulatorne gene, ki imajo vpliv na produkcijo eritromicina. Identifikacija genov, ki vplivajo na donos eritromicina, je temeljila na bioinformatskih analizah, identifikaciji relevantnih metabolnih poti in rezultatih primerjave genomov ter proteomov naravnega seva S. erythraea NRRL23338 ter industrijskega visokodonosnega seva ABE1441. Na osnovi različnih pristopov, tako bioinformatske analize in omskih pristopov, smo določili gene, ki bi lahko imeli vpliv na donos eritromicina. Vpliv na biosintezo eritromicina pri izbranih genih smo preverjali s čezmernim izražanjem oziroma njihovo inaktivacijo. Na podlagi uporabljenega pristopa smo identificirali nov regulatorni gen SACE 5599, ki vpliva na morfološki razvoj in produkcijo eritromicina. Čezmerno izražanje tega gena v sevu divjega tipa je povečalo produkcijo eritromicina za 32 %, medtem ko je inaktivacija tega gena pri sevu ABE1441 produkcijo zmanjšala za 37 %. Povečano produkcijo eritromicina smo opazili tudi pri čezmernem izražanju genov SACE 6479 in SACE 6480, ki sodelujeta pri biosintezi deoksisladkorjev desozamina, mikaroze in ramnoze, pri čemer je bilo povečanje produkcije najbolj izrazito (za 24 %) pri čezmernem izražanju v visokodonosnem sevu ABE1441. S čezmernim izražanjem genov eryK in eryG, ki sodelujeta v zadnjih dveh stopnjah biosinteze, smo uspeli zmanjšati delež eritromicina B za 25 %, ni pa nam uspelo zmanjšati deleža eritromicina C. Ovrednotili smo tudi, kako različni fiziološki dejavniki vplivajo na biosintezo eritromicina pri izbranih mutantih in ugotovili, da lahko nekateri pomembno vplivajo na donos eritromicina.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dd

- DC UDC 604.4:615.33:579.873:577.2(043.3)=163.6
- CX actinomycete/Saccharopolyspora erythraea/biosynthesis/secondary metabolites/polyketides/post-PKS/erythromycin//bioinformatics methods/molecular genetics/gen manipulation/regulation/physiology
- AU KIRM, Benjamin univ.dipl.ing.živ.teh.
- AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, field Biotechnology
- PY 2014
- TI LATE STAGES OF ERYTHROMYCIN BIOSYNTHESIS IN THE ACTINOBACTERIUM Saccharopolyspora erythraea
- DT Doctoral Dissertation
- NO XV, 151 p., 12 tab., 60 fig., 14 ann., 285 ref.
- LA sl
- AL sl/en

AB Actinobacterium Saccharopolyspora erythraea produces medically important antibiotic erythromycin. The polyketide synthase (PKS) type I catalyzes the biosynthesis of the basic macrolide ring and is followed by a series of reactions which convert synthesized aglycone into a biologically active erythromycin A. The erythromycin biosynthetic cluster (ery) lacks a pathway-specific regulator. Regulation of biosynthesis is therefore mainly associated with the regulatory process that controls the morphological development of the bacterium. The purpose of this research was to identify genes in S. erythraea that play an important role in the late stages of the erythromycin biosynthesis and furthermore, to identify regulatory genes that have an effect on the production of erythromycin. Identification of the genes with putative effect on erythromycin biosynthesis was based on bioinformatic metods, identification of relevant metabolic pathways and comparison of genomes and proteomes of S. erythraea wild type NRRL23338 and industrial high-producing strain ABE1441. We determined genes with putative effect on erythromycin biosynthesis with bioinformatic methods and omics approaches. By constitutive overexpression or inactivation of target genes we evaluated the influence of selected genes on erythromycin biosynthesis. We identified a new regulatory gene SACE 5599 that effects the morphological development and production of erythromycin. Overexpression of this gene in strain NRRL2338 increased the production of erythromycin for 32 %, while the inactivation of this gene in the strain ABE1441 decreased the production by 37 %. The increased production of erythromycin (24 %) was also observed in high-producing strain ABE1441 with overexpressed genes SACE_6479 and SACE_6480, which are involved in the biosynthesis of deoxy sugars desosamine, mycarose and rhamnose. With overexpression of genes eryK and eryG, involved in the last two stages of erythromycin biosynthesis, we managed to reduce the proportion of intermediate erythromycin B by 25 %, but we did not observe the reductione of erythromycin C content at the end of biosynthetic process. We also evaluated how different physiological parameters influence the biosynthesis of erythromycin using selected mutants and we demonstrated that some parameters can have a significant impact on the yield of erythromycin.

KAZALO

K	LJU	ČNA	DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJAI	II
K			D DOCUMENTATION	v V
K		LO	SLIK	x
K	AZA	LOF	PREGLEDNICX	Π
K	AZA	VLÔ Đ	PRILOGXI	Π
0	KRA	AJSAV	VE IN SIMBOLIXI	V
I	11	UV NA	MEN NALOGE	. 1 2
	1.1	DE	LOVNE HIPOTEZE	.2
2		PR.	FCLED OBIAV	4
4	2.1	PO	MEMEBNE KARAKTERISTIKE BAKTERIJ IZ REDA Actinomycetales	.4
	2.	1.1	Aktinomiceta Saccharopolyspora erythraea	.5
	2.2	BIC	DSINTEZA POLIKETIDOV	.7
	2.3	MA	KROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN	.9
	2.	3.1	Genska skupina za biosintezo eritromicina	0
	2.4	ME	HANIZEM BIOSINTEZE ERITROMICINA	2
	2.	4.1	Biosinteza eritromicinske poliketidne verige	2
	2.	4.2	Pozne stopnje biosinteze eritromicina	3
	2.	4.2.1	Hidroksilacija 6-dEB1	4
	2.	4.2.2	Vezava mikaroze na makrolaktonski obroč1	5
	2.	4.2.3	Vezava dezozamina na makrolaktonski obroč1	7
	2.	4.2.4	Hidroksilacija in metilacija eritromicina D1	8
	2.	4.3	Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo eritromicina2	20
	2.	4.3.1	Oskrba s propionil-CoA in metilmalonil-CoA	20
	2.	4.3.2	Biosinteza izhodne spojine timidin difosfat-4-keto-6-D deoksiglukoza2	22
	2.	4.3.3	S-adenozil-L-metionin, donor metilne skupine	23
	2.5	RE	GULACIJA BIOSINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITOV	24
	2.	5.1	Vloga globalne (pleiotropne) regulacije pri biosintezi sekundarnih metabolitov	24
	2.	5.2	Pot-specifična regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov	25
	2.6	VP PR	LIV FIZIOLOŠKIH PARAMETROV IN KULTIVACIJSKIH POGOJEV NA ODUKCIJO ERITROMICINA	۱ 27

2.6.	.1	Sestava produkcijskega gojišča - viri ogljika	, 27
2.6.	.2	Sestava produkcijskega gojišča - viri dušika	, 29
2.6.	.3	Sestava produkcijskega gojišča - viri fosforja	. 29
2.6.	.4	Optimizacija sestave hranil v produkcijskem gojišču	. 30
2.6.	.5	Vodenje fizioloških parametrov med bioprocesom	. 30
2.7	PRI	STOPI ZA POVEČANJE DONOSA ERITROMICINA	. 31
2.7.	.1	Izboljševanje produkcijskega organizma <i>S. eryhraea</i> z metodami klasič mutageneze in selekcije	čne . 31
2.7.	.2	Povečevanje donosa eritromicina s postopki metabolnega inženirstva	. 32
3	MA	TERIALI IN METODE	.34
3.1	MA		. 33
3.1.	. I	Gojišča in raztopine	. 35
3.1.	1.1		. 33
3.1.	1.2		. 37
3.1.	.2	Antibiotiki in indikatorji	, 38
3.1.	.3	Bakterijski sevi, encimi in plazmidi	, 38
3.1.	3.1	Sevi Escherichia coli	. 38
3.1.	3.2	Sevi Saccharopolyspora erythraea	. 39
3.1.	3.3	Uporaba encimov	. 39
3.1.	3.4	Konstrukcija plazmidov	. 39
3.1.	3.5	Uporaba protiteles	. 44
3.2	ME	TODE	. 45
3.2.	.1	Shranjevanje sevov S. erythraea in E. coli	, 45
3.2.	.2	Vnos plazmidne dna v <i>E. coli</i> in <i>S. erythraea</i>	. 45
3.2.	2.1	Priprava elektrokompetentnih celic sevov E. coli	. 45
3.2.	2.2	Transformacija sevov E. coli	45
3.2.	2.3	Konjugacija sevov S. erythraea	45
3.2.	2.4	Subkultivacija konjugantov	. 46
3.2.	.3	Molekularne tehnike	. 46
3.2.	3.1	Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i>	46
3.2.	3.2	Pomnoževanje DNA in vitro s PCR	. 47
3.2.	3.3	Rezanje DNA z restrikcijskimi encimi	. 47

3.	2.3.4	Ligacija fragmentov DNA	47
3.	2.3.5	Defosforilacija linearnih DNA fragmentov	47
3.	2.3.6	Fosforilacija DNA fragmentov	48
3.	2.3.7	Agarozna gelska elektroforeza	48
3.	2.3.8	Izolacija DNA iz agaroznega gela	48
3.	2.3.9	Priprava vzorcev za sekvenciranje	48
3.	2.3.10) Izvedba prenosa po westernu	48
3.	2.4	Bioinformacijska analiza genov	50
3.	2.5	Kultivacijski pogoji za gojenje različnih sevov	53
3.	2.5.1	Gojenje E. coli	53
3.	2.5.2	Gojenje S. erythraea	53
3.	2.5.3	Merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze	54
3.	2.6	Analitske metode	54
3.	2.6.1	Ekstrakcija eritromicina iz produkcijske brozge za merjenje z mikrobiološi testom in LC-MS	kim 54
3.	2.6.2	Ekstrakcija eritromicina iz produkcijske brozge za merjenje s HPLC	54
3.	2.6.3	Mikrobiološki test za določnje koncentracije eritromicina v ekstraktu produkcijske brozge	55
3.	2.6.4	Merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih z visoko zmogljivo metodo tekočinsko kromatografijo (HPLC)	55
3.	2.6.5	Merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih z metodo tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom (LC-MS)	56
3.	2.7	Statistična obdelava podatkov	57
4.1	RE RA PRO	ZULTATI ZVOJ GENSKIH ORODIJ ZA TRANSFORMACIJO IN IZRAŽANJE OTEINOV V <i>S. erythraea</i>	58 58
4.	1.1	Testiranje delovanja promotorjev v visokodonosnem sevu ABE1441	58
4.	1.2	Konstrukcija integracijskih mest att v genom <i>S. erythraea</i> za vgradnjo vektorjev	, 60
4.2	BIC	DINFORMACIJSKA ANALIZA GENOV POZNIH STOPENJ BIOSINTEZ	ZE
	ER	ITROMICINA IN REGULATORNIH GENOV, KI BI LAHKO SODELOV	/ALI
	2 1	I KEGULACIJI BIOSIN I EZE EKI I KOMICINA	64
4.	2.1	Analiza metabolnih poti za oskrbo s substrati za biosintezo eritromicii	1865
4.	2.1.1	Biosinteza IDP-4-keto-6-deoksiglukoze pri S. erythraea	65

4

	4.2.	1.2	Biosinteza S-adenozil-L-metionina pri S. erythraea	. 70
	4.2.	.2	Identifikacija potencialnih regulatornih genov na podlagi rezultatov primerjalne transkriptomske in proteomske analize	. 74
	4.2.	2.1	Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_5599	. 74
	4.2.	2.2	Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_0044	. 76
	4.2.	2.3	Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_2890	. 76
	4.2.	2.4	Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_3978	. 77
	4.2.	.3	Identifikacija mutacij v metabolnih poteh, pomembnih za pozne stopn biosinteze	je . 77
4	.3	UPO	ORABA PRISTOPOV METABOLNEGA INŽENIRSTVA ZA	
		IZB	OLJŠEVANJE PRODUKCIJSKEGA SEVA S.erythraea	. 79
	4.3.	.1	Potrjevanje mutacij in čezmerno izražanje mutiranih genov v sev NRF 23338	₹L . 80
	4.3.	.2	Vpliv čezmernega izražanja SACE_6479 in SACE_6480	. 82
	4.3.	.3	Vpliv čezmernega izražanja <i>eryK</i> in <i>eryG</i> na biosintezo eritromicina	. 90
	4.3.	.4	Vloga izbranih regulatornih genov pri regulaciji biosinteze eritromicir	ıa in
			morfologiji S. erythraea	101
	4.3.	4.1	Vloga gena SACE_5599	101
	4.3.	4.2	Vpliv regulatornega gena <i>BldD</i> na donos eritromicina	105
	4.3.	4.3	Določanje vpliva s transkriptomsko analizo identificiranih potencialnih regulatornih genov na produkcijo eritromicina	105
5	.1	RA : IZB	ZPRAVA IN SKLEPI OLJŠEVANJE INDUSTRIJSKIH MIKRORGANIZMOV	108 108
5	.2	DO	LOČANJE METABOLNIH POTI IN UPORABA PRISTOPOV	
		ME	TABOLNEGA INZENIRSTVA ZA BOLJSE RAZUMEVANJE POZNIH	100
	5 2	1	Pozvoj postopkov je orodij za gonsko manjevlacijo S. <i>arythraca</i>	110
	5.2.	.I つ	Kazvoj postopkov in orouj za gensko manpulacijo 5. <i>er juli ded</i>	
	5.2.	.2	pozne stopnje biosinteze eritromicina v S. erythraea	112 112
	5.2.	.3	Vpliv čezmernega izražanja genov za oskrbo s substrati za pozne stopi biosinteze SACE_6480 in SACE_6479 na donos eritromicina	nje 114
	5.2.	.4	Vrednotenje vpliva mutacij v genih za pozne stopnje biosinteze eritromicina v visokodonosnem sevu ABE1441 na donos eritromicina 1	117
	5.2.	.5	Čezmerno izražanje genov <i>eryG</i> in <i>eryK</i> za zmanjšanje nečistoč eritromicina B in eritromicina C v bioprocesni brozgi	118

5.3	VP	LIV IZBRANIH VERJETNIH REGULATORNIH GENOV NA BIO	SINTEZO
	ER	ITROMICINA	
5.	3.1	Identifikacija verjetnih regulatornih genov, ki bi lahko sodelova	ıli pri
		biosintezi eritromicina	
5.	3.2	Vloga novo identificiranega proteina SACE_5599 v biosintezi er	ritromicina
		in morfološki diferenciaciji <i>S. erythraea</i>	
5.4	SK	LEPI	
6	РО	VZETEK (SUMMARY)	
6.1	PO	VZETEK	
6.2	SU	MMARY	
7	VI	RI	
ZAHV	/ALA		
PRILO	UGE		

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Življenjski cikel aktinomicet (Angert, 2005: 222)	5
Sl. 2:	Micelij S. ervthraea goiene na trdnem gojišču (Skepper, 2008).	6
S1. 3:	Primer tipične morfologije S. ervthraea (Ghojavand in sod., 2011; 568)	6
Sl. 4:	Sinteza poliketidne verige na PKS tipa I (Staunton in Wilkinson, 1997:	-
	2616)	8
SI. 5:	Struktura eritromicina in medproduktov (Mironov in sod 2004 [,] 532)	9
Sl. 6:	Shema genske skupine za sintezo eritromicina (Staunton in Weissman, 2001: 387)	11
SI 7.	Biosinteza 6 -dEB na PKS (Wu in sod. 2002: 5061)	13
SI. 7. SI 8.	Pozne stopnie biosinteze eritromicina A (Summers in sod 1997: 3252)	14
SI. 0. SI. 9:	Predlagana biosintezna pot dTDP-L-mikaroze v <i>Streptomyces fradiae</i> in <i>S.</i> <i>arvthraga</i> (Gaisser in sod 1997: 248: Summers in sod 1997: 3256: Bate in	14
	sod 2000: 142: Mironov in sod 2004: 532)	16
Sl. 10:	Predlagana biosintezna pot dTDP-D-desozamina v S. erythraea (Schell in	10
	sod., 2008: 331	18
Sl. 11:	Biosintezne poti in strukture ErA, ErB, ErC, in ErD (Chen in sod.,	
	2008: 1821)	19
Sl. 12:	Biosintezne poti propionil-CoA in metilmalonil-CoA v aktinomicetah (Bott	
	in sod., 1997: 591; Bermúdez in sod., 1998: 78; Chan in sod., 2009: 35)	21
Sl. 13:	Aktivacija glukoze in sinteza TDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoze (White-	าา
C1 14.	Chama notalia dala	24
SI. 14.	Valtor zo izrožonio pSot152 (Viecer in cod. 2000, 520)	34 40
SI. 13:	Vektor za izrazanje pseti 52 (Kieser in sod., 2000: 550)	40
SI. 10:	Vektor pRC1152 (Riesel III sou., 2000. 500)	41
SI. 1/:	Vektor p1555 (Sinokvina in sod., 1997)	41
SI. 18:	Vektor pOC19 J (Invitrogen)	42
SI. 19:	Vektor pAD05 (Acles B10 0.0.0.).	42
51. 20:	Potek osvezevanja in anotacije baze podatkov (Kanemsa in Goto,	51
01 01	2000: 29)	51
SI. 21:	Shematski prikaz dela za izdelavo sneme domnevnih metabolnih poti	52
SI. 22:	Plazmid za testiranje ucinkovitosti promotorjev	39
SI. 23:	vpliv promotorjev acti, <i>PermE</i> , <i>PermE</i> * z mestom vezave ribosoma in	
	<i>PermE</i> * brez mesta vezave ribosoma na izrazanje gena xylE v S.	50
C1 04	erythraea	59
SI. 24:	Lokus genske skupine ChIB na kromosomu z geni in njihovimi anotacijami	60
SI. 25:	Integracijska mesta $\Phi C31$, $\Phi B11$ in $\Phi SAM2$, ki smo jih vnesli v plazmid pABE57	61
SL 26:	Plazmid pABE57	61
SI 27.	Restrikcijska analiza plazmida pABE57	62
SI 28.	Način voradnje integracijskih mest $\Phi C31$ $\Phi BT1$ in pSAM2 v gensko	02
51. 20.	skunino ChlB	63
SI 29.	Domneyna biosintezna pot TDP-4-keto-6-deoksiglukoze	66
SI 30.	Poravnava aminokislinskega zaporedia glukokinaze iz F_{col}	67
SI 30.	Poravnava aminokislinskega zaporedia fosfo-sladkor-mutaza (SACF 6548)	69
SI 32.	Domnevna biosintezna pot SAM	71
~		· +

Sl. 33: Sl. 34:	Genska skupina genov, ki domnevno sodeluje pri biosintezi SAM Poravnava zaporedja SACE_5599 in njegovih homologov iz drugih	74
	aktinomicetnih vrst (Clustal Omega)	75
Sl. 35:	Zaporedje 219 aminokislin identificiranega proteina in 184 ak varianta	76
S1. 36: S1. 37:	Poravnava odsekov nukleotidnih zaporedij sevov NRRL23338 in ABE1441. Vpliv prekomernega izražanja genov eryCII in eryCVI na produkcijo v	79
S1. 38:	primerjavi s kontrolami NRRL23338 Vpliv dodatnih genov eryCII in eryCVI na produkcijo v primerjavi s	81
S1. 39:	kontrolami ABE1441 Prikaz odprtih bralnih okvirjev verjetnih genov SACE_6479 in SACE_6480	81
S1. 40:	v istem operonu. Vpliv prekomernega izražanja genov SACE_6479 in SACE_6480 v	82
Sl. 41:	Shema konstrukcije plazmida pABE23 z genom SACE_6479 in	83
S1 12.	Destrikajiska analiza plazmida pADE22	04 85
SI. 42.	Valiv prokomernago izroženje genev SACE 6470 in SACE 6490	0J 07
S1. 45: S1. 44:	Pojav rjavo-rdečega pigmenta pri sevih ABE1441+pABE23 s prekomerno	00 07
S1 15.	Viliv nutriantov z različnimi koncentracijami na produkcija critromicina pri	87
51. 45.	kultivaciji seva ABE1441	89
SI. 46:	Vpliv nutrientov z različnimi koncentracijami na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE12170	89
Sl. 47:	Shema priprave plazmidov, ki vsebujejo umetne operone z različnim številom kopij genov <i>ervK</i> in <i>ervG</i> z različnim vrstnim redom	93
S1. 48:	Restrikcijska analiza plazmidov pABE41, pABE44 in pABE45	94
Sl. 49:	Shematski prikaz možnih zaporedij genov pri integraciji plazmida pABE38 v genom <i>S. erythraea</i>	95
S1. 50:	Koncentracije eritromicina A, B in C v vzorcih bioprocesnih brozg sevov z različnim kombinacijami genov <i>eryK</i> in <i>eryG</i>	97
Sl. 51:	Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC pri gojenju seva ABE1441 z dodajanjem donorjev metilne skupine	99
Sl. 52:	Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC pri gojenju seva ABE1441+pSet152 z dodajanjem donorjev metilne skupine	99
Sl. 53:	Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC pri gojenju seva ABE10291 z dodajanjem donorjev metilne skupine.	100
Sl. 54:	Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC pri gojenju seva ABE10124 z dodajanjem donorjev metilne skupine	100
Sl. 55:	Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC pri gojenju seva ABE10311 z dodajanjem donorjev metilne skupine	101
Sl. 56:	Primerjava fenotipov rekombinantnih sevov S. ervthraea na plošči	102
Sl. 57:	Produkcija eritromicina v sevih S. erythraea s čezmerno izraženim oziroma inaktiviranim genom SACE 5599 ali BldD	103
S1. 58:	Analiza izražanja dodane kopije gena SACE 5599-HA s prenosom western.	104
Sl. 59:	Restrikcijska analiza plazmidov, pABE116, pABE115 in pABE113	106
Sl. 60:	Produkcija eritromicina pri sevih, ki izhajajo iz seva NRRL23338 in imajo prekinjene izbrane regulatorne gene	106

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Antibiotiki in indikatorji, ki smo jih uporabljali pri delu	38
Pregl. 2:	Encimi, ki smo jih uporabljali med eksperimentalnim delom	39
Pregl. 3:	Plazmidi, ki smo jih pripravili v okviru te študije	43
Pregl. 4:	Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri tej študiji	44
Pregl. 5:	Recepture za pripravo raztopin gelov za ločitev in kopičenje za	
	elektroforezo SDS-PAGE	49
Pregl. 6:	Učinkovitost integracije plazmidov pSet152 (ΦC31), pTS55 (pSAM2) in	
	pAB03 (ΦBT1)	64
Pregl. 7:	Mutacije v genih, vpletenih v biosintezno pot poznih stopenj biositeze	
	eritromicina pri sevu ABE1441	78
Pregl. 8:	Nutrienti in končne koncentracije vsakega nutrienta, ki smo jih testirali	88
Pregl. 9:	Gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika	88
Pregl. 10:	Plazmidi z različnimi razmerji kopij genov <i>eryK/eryG</i>	92
Pregl. 11:	Možna zaporedja genov pri integraciji plazmidov pABE44 in pABE45 v	
-	genom S. erythraea	96
Pregl. 12:	Povprečna produkcija eritromicina A, B in C pri kultivaciji kontrolnih	
-	sevov ABE1441	98
0	sevov ABE1441	98

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Poravnava aminokislinskih zaporedij glukokinaz (S. erythraea SACE_1700)
- Pril. B: Poravnava aminokislinskih zaporedij polifosfat glukokinaz (S. erythraea SACE 1802
- Pril. C: Poravnava aminokislinskih zaporedij fosfo-sladkor-mutaza (S. erythraea SACE_6548)
- Pril. D: Poravnava aminokislinskih zaporedij glukoza-1-fosfat timidilil transferaza (S. erythraea SACE_6883)
- Pril. E: Poravnava aminokislinskih zaporedij S-adenozil-homocistein hidrolaza (S. erythraea SACE_6450 in SACE_3897)
- Pril. F: Poravnava aminokislinskih zaporedij homocistein metiltransferaza (*S. erythraea* SACE_3890)
- Pril. G: Poravnava aminokislinskih zaporedij metionin sintaza (S. erythraea SACE_3898)
- Pril. H: Poravnava aminokislinskih zaporedij 5-metiltetrahidropteroil-triglutamathomocistein S-metiltransferaza (*S. erythraea* SACE_4744 in SACE 6349)
- Pril. I: Poravnava aminokislinskih zaporedij metionin adenoziltransferaza (*S. erythraea* SACE_2103 in SACE 3900)
- Pril. J: Poravnava aminokislinskih zaporedij serin/treonin kinaze (*S. erythraea* SACE_0044)
- Pril. K: Poravnava aminokislinskih zaporedij transkripcijskega regulatorja iz družine LuxR (*S. erythraea* SACE_2890)
- Pril. L: Poravnava aminokislinskih zaporedij proteina z vezavno domeno za ciklične nukleotide (*S. erythraea* SACE_3978)
- Pril. M: Vpliv različnih dodatkov v različnih koncentracijah na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva NRRL 23338
- Pril. N: Vpliv različnih dodatkov v različnih koncentracijah na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE135

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

6-dEB	6-deoksieritronolid B
А	adenin
ACP	acil prenašalni protein (angl. Acyl carrier protein)
ak	aminokislina
Amp	ampicilin
Apra	apramicin
Arg	arginin
AT	aciltransferaza
ATP	adenozin trifosfat (angl. adenozine triphosphate)
BLAST	osnovno programsko orodje za iskanje in poravnavo zaporedji
	(angl. Basic Local Alignment Search Tool)
С	citozin
C-C	vez ogljik – ogljik
C-0	vez ogljik - kisik
CH ₃	metilna skupina
Co-A	koencim-A
DAP	diaminopimelična kislina
DEBS	deoksieritronolid B sintaza
ddH2O	dvakrat deionizirana voda
DH	dehidrataza
dH2O	deionizirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dUTP	deoksiuridin trifosfat
EC	numerična klasifikacijska shema za encime (angl. Enzyme commission umber)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	enoilreduktaza
Er	eritormicin
ErA	eritormicin A
ErB	eritormicin B
ErC	eritormicin C
G	gvanin
GTP	gvanozin trifosfat (angl. guanosine triphosphate)
HCl	klorvodikova kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
	(angl. High Performance Liquid Chromatography)
kb	kilobaza
KCl	kalijev klorid
kDa	kilodalton
KEGG	Kyoto enciklopedija genov in genomov (angl. Kyoto Encyclopedia of Genes
VD	anu Ochomes)
	NGLUIGUUNIAZA

KS	ketosintaza
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopjena z masnim spektrometrom
	(angl.Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)
MCM	metilmalonil-CoA mutaza
NADP(H)	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
	(angl. Nicotineamide Adeine Dinucleotide Phosphate)
NaOH	natrijev hidroksid
NCBI	nacionalni center za biotehnološke informacije
	(angl. National Center for Biotechnology Information)
NRRL	zbirka sevov (angl. Northern Regional Research Laboratory)
nt	nukleotid
OD	optična gostota (angl. Optical Denisity)
OH	hidroksilna skupina
ORF	odprt bralni okvir (angl. Open Reading Frame)
pABE	plazmid Acies bio erithraea
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polimerase Chain Reaction)
PKS	poliketid sintaza
post-PKS	pozne stopnje biosinteze eritromicina
PPi	pirofosfat
ppGpp	gvanozin tetrafosfat
RNA	ribonukleinska kislina
ROK	represor, odprti bralni okvir, kinaza
	(angl. repressor, open reading frame, kinase)
SAM	S-adenozilmetionin
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. Sodium Dodecil Sulphate)
Т	timin
TDP	timidin difosfat (angl. Thymidine diphosphate)
TE	tioesteraza
TES	pufer iz Tris-a, EDTA-ja in saharoze
Tm	temperatura tališča (angl. Melting Temperature)
TMP	timidin mono fosfat (angl. Thymidine monophosphate)
Tsr	tiostrepton
TTP	timidin tri fosfat (angl. Thymidine triphosphate)
U	uracil
UTP	uridin trifosfat (angl. Uridine triphosphate)
UV	ultravijolična svetloba
°C	stopinj celzija

1 UVOD

Skupino aktinomicet sestavljajo pomembne in raznolike bakterije z edinstveno biologijo. Večina aktinomicet je zemeljskih bakterij, v zemeljskem ekosistemu pa imajo pomembno vlogo pri kroženju ogljika. Odkrivanje novih vrst aktinomicet iz različnih okolij pogosto vodi do identifikacije novih protimikrobnih učinkovin. Iz aktinomicet so izolirali in karakterizirali različne protimikrobne spojine, kot so aminoglikozidi, antraciklini, glikopeptidi, makrolidi, beta-laktami, polieni, fenazini in tetraciklini (Adegboye in Babalola, 2013).

Med aktinomicete spada tudi Saccharopolyspora erythraea, ki je Gram-pozitivna bakterija (Marcellin in sod., 2013) z visoko vsebnostjo nukleotidov G in C v genomu in je sposobna preživeti v neugodnem okolju z malo hranili (Oliynyk in sod., 2007). S. erythraea proizvaja veliko število sekundarnih metabolitov, med njimi tudi medicinsko in industrijsko pomemben antibiotik eritromicin. Da lahko ta organizem uporabljamo za ekonomično industrijsko proizvodnjo eritromicina, moramo ustrezno optimizirati njegove metabolne poti. Pri tem se je predvsem v preteklosti običajno uporabljal t.i. klasični pristop, ki temelji na naključni mutagenezi in selekciji. Zadnje čase se vse pogosteje uporablja bolj racionalen pristop metabolnega inženirstva, po možnosti podprtega z uporabo genomike, transkriptomike, proteomike in metabolomike (Lee in sod., 2005; van der Werf in sod., 2005). Sekvenciranje celotnega zaporedja genoma S. erythraea NRRL 23338 (Oliynyk in sod., 2007), je omogočilo naknadne primerjave z genomi mutantov na nivoju genoma in transkriptoma (Peano in sod., 2012; Marcellin in sod., 2013). Biosintezo eritromicina so v preteklosti preučevali predvsem v povezavi s poliketid sintazami, ki sintetizirajo ta antibiotik, ob tem pa je regulacija biosinteze ostala slabo raziskana. Dosedanje raziskave kažejo, da v genski skupini za biosintezo eritromicina ni specifičnega regulatornega gena. To je sicer zelo nenavadno, saj večina genskih skupin za biosintezo antibiotikov pri streptomicetah vsebuje enega ali več regulatornih genov (Katz in Donadio 1993; Atkins in Baumberg 1998). Do sedaj je znan samo en globalni regulatorni gen, ki vpliva na biosintezo eritromicina (Chng in sod., 2008).

Eritromicin je makrolidni antibiotik, ki učinkuje proti Gram-pozitivnim patogenim bakterijam. Biosinteza poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji se na encimskem kompleksu poliketid sintazi sintetizira makrolidni obroč, v drugi stopnji, t. i. poznih stopnjah biosinteze ali post-PKS reakcije, pa vezava dveh sladkorjev na makrolidni obroč, katerim sledijo specifične končne modifikacije molekule, kot je hidroksilacija in metilacija. Pri biosintezi sodeluje neposredno vsaj 20 genov. Trije za poliketid sintazo, sedem za vezavo sladkorjev in druge post-PKS modifikacije ter deset za biosintezo dveh različnih sladkorjev (Zhang H. in sod., 2010).

V študiji smo se osredotočili na preučevanje poznih stopenj biosinteze eritromicina. Te stopnje vključujejo procesiranje makrolaktona 6-deoksieritronolida (6-dEB), ki obsega biosintezo sladkorjev mikaroze in dezozamina ter njuno pripenjanje na osnovno makrolidno strukturo 6-dEB, ki ga katalizirata odgovarjajoči glikozil transferazi. V pozne stopnje biosinteze štejemo tudi modifikacije osnovnega poliketidnega skeleta, t. i. post-PKS reakcije. Poleg metabolnih genov smo preučevali tudi izbrane regulatorne gene, ki so razporejeni po genomu *S. erythraea* in bi lahko imeli vpliv na biosintezo eritromicina v različnih stopnjah biosinteze, in tako posledično tudi na donos eritromicina.

S pomočjo pristopov bioinformatske analize in metabolnega inženiringa smo preučevali vlogo genov, ki so predvidoma vpleteni v pozne stopnje biosinteze eritromicina. Del raziskovalnega dela je zajemal tudi preučevanje fiziologije modificiranih sevov v različnih gojiščih in vpliv ključnih sestavin gojišča, ki lahko pozitivno vplivajo na procesiranje in na končni donos eritromicina.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen te doktorskega dela je, da z uporabo molekularno-bioloških metod razvijemo učinkovita orodja in metodologijo za transformacijo in gensko manipulacijo divjega seva, kot tudi visokodonosnega seva *Saccharopolyspora erythraea*. S pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *S. erythraea*, bomo identificirali verjetne metabolne poti in/ali regulatorne gene, vključene v biosintezo gradbenih enot potrebnih za pozne stopnje biosinteze eritromicina ter v nadaljevanju s pristopi metabolnega inžineringa poskušali ciljano vplivati na delovanje teh genov in poglobiti razumevanje biosinteze eritromicina. Z mikrobiološkimi metodami gojenja *S. erythraea* v laboratorijskem merilu bi določili vpliv genskih manipulacij, ob optimizaciji fizioloških parametrov in kultivacijskih pogojev na biosintezo eritromicina.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na dosedanje raziskave na področju biosinteze in regulacije eritromicina lahko trdimo:

- 1) Da bomo uspeli razviti učinkovita orodja in metodologijo za transformacijo in gensko manipulacijo divjega seva, kot tudi visokodonosnega seva *S. erythraea*. Z namenom razvoja primernih genskih orodji bomo testirali različne integracijske vektorje in aktivne promotorje in pripravili potrebne plazmidne vektorje.
- 2) Da je mogoče s pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *S. erythraea*, identificirati verjetne metabolne poti in/ali regulatorne gene, tako ključne primarne poti, kot tudi metabolne poti neposredno vpletene v biosintezo gradbenih enot

potrebnih za pozne stopnje biosinteze eritromicina

- 3) Da bo mogoče, na osnovi bioinformatskih analiz določiti verjetne ključne genske homologe oziroma metabolne poti v katerih so ti geni udeleženi, in s pomočjo metabolnega inženiringa (genska inaktivacija ali povečano izražanje) ciljano vplivati na njihovo delovanje, ki bo posledično tudi vplivalo na biosintezo eritromicina.
- 4) Da bo vpliv genskih sprememb na biosintezo eritromicina odvisen tudi od fizioloških parametrov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POMEMEBNE KARAKTERISTIKE BAKTERIJ IZ REDA *Actinomycetales*

Aktinomicete (red *Actinomycetales*) so raznolika skupina nitastih aerobnih Grampozitivnih bakterij. Večina aktinomicet je talnih bakterij, ki imajo pomembno vlogo pri mineralizacijskem procesu v naravi (Lechevalier in Lechevalier, 1981). Značilne lastnosti reda *Actinomycetales* so tvorba substratnega in zračnega micelija na trdem gojišču, prisotnost spor in visoka vsebnost nukleotidov G in C v genomu (60-70 %) (Kalakoutskii in Agre, 1976). Aktinomicete so tudi industrijsko pomembne bakterije, ki producirajo številne bioaktivne naravne produkte, kot so antibiotiki in encimi (Edwards, 1993). Aktinomicete proizvajajo več kot 65 % vseh znanih antibiotikov (Berdy, 2005).

Življenjski cikel sporulirajočih aktinomicet obsega dve fazi rasti in fazo sporulacije. Vegetativna rast se prične s kaljenjem spor, pri čemer se iz posamezne spore razvijejo nove substratne hife, ki z razraščanjem po površini rastne podlage in vanjo tvorijo substratni micelij. Pri razvoju substratnega micelija rastejo razvejani filamenti, ki se občasno septirajo in tvorijo podolgovate celice, ki vsebujejo več nukleidov. Ko v okolju začne primanjkovati hranil, se iz t.i. »začetnih celic« začnejo razvijati zračne hife in tvori se zračni micelij. Ko se podaljševanje hif ustavi, se zračni miceliji s sinhrono septacijo delno ali v celoti transformira v verigo spor (Slika 1) (Klieneberger-Nobel, 1947; Morris, 1951; Dahl, 2004; Angert, 2005). Morfologija in diferenciacija aktinomicet pa sta običajno zelo različni, če gre za rast na trdnem ali tekočem gojišču. Na trdnem gojišču se tvori hidrofoben zračni micelij, v tekočem gojišču pa se iz prostega micelija tvorijo peleti. Te razlike lahko običajno povežemo z gradientom oskrbe hranil, akumulacijo toksičnih snovi in medceličnimi signali (Kalakoutskii in Agre, 1976).

Aktinomicete so glede na morfologijo, fizikalne in kemijske kriterije razvrščene v različne družine in rodove. Glede na prisotnosti različnih komponent v celični steni se aktinomicete ločijo na štiri tipe :

- tip I LL-DAP (diaminopimelična kislina) in glicin,
- tip II *mezo*-DAP in glicin,
- tip III *mezo*-DAP,
- tip IV *mezo*-DAP, arabinoza in galaktoza (Lechevalier in Lechevalier, 1970).

Bakterija *Saccharopolyspora erythraea*, ki je predmet tega doktorskega dela, se uvršča v tip IV oziroma v družino *Pseudonocardiaceae*. Za to družino je značilna prisotnost ostankov N-acetil muramične kisline in maščobnih kislin bogatih z izo- in anteizo-razvejanimi komponentami ter odsotnost mikolne kisline v celični steni (Ochi, 1995;

Majumdar in sod., 2006). Med seboj se psevdonokardije razlikujejo po prisotnosti oziroma odsotnosti mikolne kisline. Družina *Pseudonocardiaceae* vsebuje tudi številne industrijsko pomembne organizme. Poleg *S. erythraea*, ki sintetizira antibiotik eritromicin (Ribeiro in Ribeiro, 2005), imajo velik industrijski pomen še *Saccharopolyspora spinosa*, ki proizvaja insekticid spinozin (Huang in sod., 2008), *Amycolatopsis orientalis*, ki sintetizira antibiotik vankomicin (Geib in sod., 2007) in *Amycolatopsis mediterranei*, ki se uporablja za sintezo antibiotika rifamicina (Mejía in sod., 2002).



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

2.1.1 Aktinomiceta Saccharopolyspora erythraea

Aktinomiceta *Saccharopolyspora erythraea* je Gram-pozitivna, filamentozna bakterija, ki sintetizira 14-členski makrolidni antibiotik eritromicin (Wiley in sod., 1957a). Ob odkritju je bila klasificirana kot *Streptomyces erythraeus*, kasneje pa so jo zaradi prisotnosti *mezo*-DAP, arabinoze in galaktoze ter odsotnosti mikolne kisline razvrstili v rod *Saccharopolyspora*. Pri rasti *S. erythraea* na trdnem gojišču se odvisno od sestave gojišča barva substratnega micelija razlikuje od bledo oranžnorumene do rdečerjave. Na večini gojišč lahko nastajajo nežno rumeni do rožnatooranžnorjavi topni pigmenti. Pigment melanin ne nastaja. Zračni micelij je na mnogih gojiščih bledo roza do zmerno rjavkasto

 Acc.V. Spot Magn
 Det WD Exp
 10 µm

sive, lahko pa je tudi bel (Labeda, 1987; Lu in sod., 2001).

Slika 2: Micelij *S. erythraea* gojene na trdnem gojišču (Skepper, 2008). Figure 2: Electron micrograph of *S. erythraea* mycelium growing on solid medium (Skepper, 2008).

Pri rasti *S. erythraea* v tekočem gojišču se micelij pojavlja v treh oblikah: prosti micelij, skupki in peleti (Slika 3). Katera je prevladujoča oblika v gojišču, je odvisno od več dejavnikov, med njimi so: sestava gojišča, strižne sile, ki nastanejo zaradi mešanja in delež inokuluma (Stocks in Thomas, 2001; Ghojavand in sod., 2011).



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

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

2.2 BIOSINTEZA POLIKETIDOV

Aktinomicete imajo izreden znanstven in industrijski pomen zaradi sposobnosti biosinteze velikega števila naravnih produktov, med katerimi so zaradi svojih bioloških aktivnosti še posebej pomembni poliketidi. Poliketide poleg aktinomicet proizvajajo še nekatere druge skupine bakterij, npr. bacili in miksobakterije, ter nitaste glive (Weymouth-Wilson, 1997). Poliketidi se uporabljajo kot antibiotiki (eritromicin A, rifamicin S), protirakasta zdravila (doksorubicin, epotilon), učinkovine za zniževanje holesterola (lovastatin), antiparazitiki (avermektin), fungicidi (amfotericin B), insekticidi (spinozin) in imunosupresivi (rapamicin) (Weissman in Leadlay, 2005). Tarče pomembnejših antibiotikov so: biosinteza bakterijske celične stene, biosinteza bakterijskih proteinov in replikacija ter popravljanje bakterijske DNA. Tarča nekaterih makrolidnih antibiotikov, ki vsebujejo deoksisladkorje (kot je eritromicin), je biosinteza proteinov. Eritromicin deluje tako, da se veže na obroč peptidil-transferaze (50S ribosomalna podenota) in blokira tunel, ki usmerja nastajajoče peptide stran od centra peptidil-transferaze, in tako prepreči sintezo proteinov (Yonath in sod., 1987; Nissen in sod., 2000).

Biosinteza poliketidov se začne s kondenzacijo preprostih tioestrov karboksilnih kislin v poliketidno verigo, ki jo katalizirajo multidomenski kompleksi poliketid-sintaze (PKS). PKS katalizirajo dekarboksilacijsko kondenzacijo s koencimom A (CoA) aktiviranih tioestrov preprostih organskih kislin, kot so malonil-CoA, metilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA. Mehanizem biosinteze je podoben biosintezi maščobnih kislin, strukturna kompleksnost poliketidov pa je večja zaradi uporabe različnih gradbenih enot, različnih stopenj redukcije po vsakem koraku kondenzacije, ciklizacije verig do t.i. aglikonov in kiralnih centrov. Kompleksnost poliketidnih struktur še dodatno povečajo tako imenovane post-PKS reakcije oziroma pozne stopnje biosinteze, ki navadno sledijo po zaključeni sintezi poliketidne verige. Te specifične modifikacije vključujejo hidroksilacijo ali druge oksidativne reakcije, metilacijo in glikozilacijo. Te modifikacije so v večini primerov bistvene za biološko aktivnost poliketidnih spojin (Katz in Donadio, 1993; Liu in Thorson, 1994; Tang in McDaniel; 2001).

Ključne encimske domene, ki sestavljajo PKS, so: aciltransferaza (AT), ki prepozna in veže gradbeno molekulo na acil prenašalni protein (ACP). ACP prenaša rastočo verigo tako, da si jo ACP domene podajajo v sosledju po encimskem kompleksu s pomočjo prožne fosfopanteteinske roke. Keto-sintaza (KS) katalizira reakcijo dekarboksilativne kondenzacije med vstopajočo podaljševalno enoto in rastočo verigo. V vsakem koraku podaljševanja lahko kondenzaciji sledi redukcija nastale β -keto skupine, ki je lahko popolna ali delna. Pri redukciji sodelujejo domene keto-reduktaza (KR), dehidrataza (DH) in enoil-reduktaza (ER) (Staunton in Weissman, 2001; Shen, 2003).

Glede na strukturne značilnosti lahko poliketid-sintaze (PKS) delimo na tri glavne tipe, tip I, tip II in tip III. Za PKS tipa I je značilno, da so domene med seboj kovalentno povezane (Staunton in Weissman, 2001). PKS tipa I podrobneje delimo na linearne/modularne PKS, in iterativne PKS. Bistvena lastnost linearnih/modularnih PKS tipa I je, da so encimske domene organizirane v module, pri čemer vsak modul katalizira eno stopnjo podaljševanja poliketidne verige. Rastoča veriga z vsakim modulom interagira samo enkrat, zato je število ogljikovih atomov v verigi določeno s številom modulov (Slika 4). Iterativne PKS tipa I imajo en modul, sestavljen iz domen, ki so v interakciji z verigo uporabljeni večkrat in so zančilni za fungalne sisteme. Število členov verige zato določa število ponovitev (iteracij).



Slika 4: Sinteza poliketidne verige na linearni/modularni PKS tipa I (Staunton in Wilkinson, 1997: 2616). Figure 4: Synthesis of polyketide chains on modular type I PKS (Staunton and Wilkinson, 1997: 2616).

Pri PKS tipa II se posamezne domene ne nahajajo na isti polipeptidni verigi. Tudi pri tipu II gre za iterativne PKS, saj se pri sintezi poliketidne verige zaporedje reakcij na istih domenah ponavlja. Ta tip PKS sintetizira aromatske poliketide, med katerimi so najbolj znani tetraciklinski antibiotiki (Seow in sod., 1997; Javidpour in sod., 2011). PKS tipa III so homodimerni encimi, med katerimi je najbolj znana kalkon sintaza. Sistem deluje iterativno, eno samo aktivno mesto vsakega monomera katalizira nalaganje gradnikov, podaljševanje in ciklizacijo. Kljub preprosti strukturi, sintetizirajo širok spekter spojin kot so kalkoni, pironi in stilbeni. PKS tipa III najdemo predvsem pri rastlinah, lahko pa tudi v glivah in bakterijah (Yu in sod., 2012). Tip I in II PKS uporabljata acil prenašalni protein(ACP) za aktivacijo acil CoA substratov in za usmerjanje rastoče verige, medtem

ko PKS tipa III nima ACP in deluje direktno na substrat acil CoA (Shen, 2003).

2.3 MAKROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN

Poliketid eritromicin je makrolidni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Eritromicin in njegove polsintezne derivate (klaritromicin, azitromicin, itd.) najpogosteje uporabljamo pri zdravljenju infekcij zgornjih dihalnih poti (Miyatake in sod., 1991). Imajo podoben aktivni spekter kot penicilin in se uporabljajo zlasti pri bolnikih, ki so na penicilin občutljivi. Makrolidi delujejo proti Gram-pozitivnim bakterijam, poleg tega se uporabljajo tudi proti bakterijam *Mycoplasma*, *Campylobacter* in *Legionella* (Ribeiro in Ribeiro, 2005). Mehanizem njihovega delovanja vključuje vezavo na 50S podenoto bakterijskega ribosoma, s čimer inhibirajo sintezo proteinov (Vester in Douthwaite, 2001).

Molekula eritromicina (molekulska formula $C_{37}H_{67}O_{13}$) je sestavljena iz 14-členskega makrolidnega obroča, na katerega sta pripeta dva deoksisladkorja, D-desozamin in Lkladinoza (Slika 5). D-desozamin je vezan na peti ogljikov atom, L-kladinoza pa na tretji ogljikov atom laktonskega obroča (Wiley in sod., 1957a). L-kladinoza je 3-O-metil eter L-mikaroze (Howarth in Jones, 1967). Metilacija mikaroze se zgodi šele, ko je sladkor že vezan na makrolaktonski obroč (Majer in sod., 1977).



Slika 5: Struktura eritromicina in medproduktov (Mironov in sod., 2004: 532).

Figure 5: Chemical structure of erythromycin A and its biosynthetic intermediates (Mironov et al., 2004: 532).

Za industrijsko proizvodnjo eritromicina se uporablja aktinomiceta Saccharopolyspora

erythraea. Zaradi velikega ekonomskega pomena te bakterije so v celoti sekvencirali tudi genom tipskega seva *S. erythraea* NRRL23338 (Oliynyk in sod., 2007). Pri biosintezi eritromicina A (ErA) nastajajo tudi medprodukti eritromicin B (ErB), eritromicin C (ErC) in eritromicin D (ErD). Med seboj se ločijo po prisotnosti hidroksilne skupine (OH) na dvanajstem ogljikovem atomu makrolaktonskega ogrodja ter prisotnosti metilne skupine (CH₃) na tretjem ogljikovem atomu sladkorja L-kladinoze (Slika 5) (Wiley in sod., 1957a, 1957b, 1957c, Majer in sod., 1977). Izmed vseh štirih navedenih oblik eritromicina, ima najboljšo protimikrobno aktivnost ErA (Kibwage in sod., 1985), preostali trije pa se obravnavajo kot nečistoče in se s postopki čiščenja (zaključnimi procesi) odstranjujejo iz zmesi (Zou in sod., 2009a).

2.3.1 Genska skupina za biosintezo eritromicina

Kromosom *S. erythraea* je krožne oblike, vsebnost nukleotidov G in C v genomu je 71,1 %, sestavlja ga 8.212.805 baznih parov in vsebuje 7.198 predvidenih zaporedij, ki kodirajo proteine. Za genom *S. erythraea* je značilen širok spekter genov, ki so potencialno vključeni v obrambo ali v različne odzive na stres. Z vidika evolucije je zanimiv dokaz za horizontalni prenos genov, 20 restrikcijskih endonukleaz in osem mestno-specifičnih metiltransferaz. Čeprav njihovih prepoznavnih mest samo na podlagi genskega zaporedja ni možno določiti, predvidevajo, da bi lahko ti restrikcijski encimi predstavljali pomembno oviro za vstop tuje DNA. V genomu sta prisotna tudi gena (*pglY* in *pglZ*), ki omogočata odpornost pred okužbo z bakteriofagi. V kromosomu *S. erythraea* so tudi številni geni za encime, ki omogočajo rezistenco na različne antibiotike (17 genov za β -laktamaze in 2 gena za makrolid esteraze) (Oliynyk in sod., 2007).

Geni za biosintezo eritromicina se na kromosomu *S. erythraea* nahajajo v genski skupini (*ery*), podobno kot geni za večino biosinteznih poti sekundarnega metabolizma. Eritromicinska genska skupina vsebuje 20 genov. Geni za PKS, ki sodelujejo pri biosintezi poliketidnega obroča, imajo oznako *eryA*, geni iz skupine *eryB* sodelujejo pri biosintezi in vezavi mikaroze na makrolidni obroč, pri biosintezi in vezavi desozamina na makrolidni obroč pa sodelujejo geni iz skupine *eryC*. Vezava mikaroze in desozamina spadata med t.i. pozne (post-PKS) modifikacije makrolaktonskega obroča. Poleg teh so v eritromicinski genski skupini še trije geni, ki kodirajo encime post-PKS modifikacij makrolaktona *eryF*, *eryG* in *eryK*. V skupini *ery* je še gen *ermE*, ki kodira rRNA metilazo ribosoma, potrebno za lastno rezistenco produkcijskega organizma na eritromicin ter dva gena *orf5* in *orf21*, katerih funkcija ni poznana. V osrednjem delu genske skupine (Slika 6) se nahajajo trije geni PKS tipa I *eryAI*, *eryAII* in *eryAIII*, ki kodirajo velike multimodularne proteine DEBS1, DEBS2 in DEBS3. Levo od osrednje PKS regije so trije geni *eryB* (*eryBI*, *eryBII* in *eryBIII*), trije *eryC* geni (*eryCI*, *eryCII in eryCIII*), poleg pa še *eryF* (C-6 hidroksilaza), *eryG* (O-metil-transferaza), *ermE* in *orf5*. Desno od PKS regije so štirje geni *eryB* (*eryBIV*,

eryBV, eryBVI in *eryBVII*), trije *eryC* geni (*eryCIV, eryCV* in *eryCVI*), gen *eryK* (C-12 hidroksilaza) in *orf21*(Weber in sod., 1990; Caffrey in sod., 1992; Summers in sod., 1997; Reeves in sod., 1999). Predvideni geni za biosintezo mikaroze so *eryBII, eryBIII, eryBIV eryBVI, eryBVII* in za vezavo mikaroze na lakton *eryBV* (Gaisser in sod., 1997; Summers in sod., 1997; Bate in sod., 2000). Predvideni geni za biosintezo desozamina so *eryCI, eryCV, eryCV, eryCVI* (Schell in sod., 2008) in za vezavo desozamina na lakton *eryCIII* (Gaisser in sod., 1997; Summers in sod., 1997).

Genska skupina *ery* se prepisuje v obliki štirih policistronskih mRNA: *eryAI-eryG*, *eryBIV-eryBVII*, *eryBVI-eryBVII* in *eryBIII-eryF*. Identificirani sta bili tudi dve večji promotorski regiji, ki prepisujeta gene za sintezo deoksisladkorjev na desni strani *ery* genske skupine. Ti dve regiji omogočata sintezo prekrivajočih prepisov. Prvi se začne navzgor od *eryBIV* in se razteza do *eryBVII*, drugi pa navzgor od *eryBVI* in se razteza do *eryBVII* (Slika 6). Možni lokaciji za dva sekundarna promotorja sta v regiji med *eryAI* in *eryAIII* ter regija navzgor od *eryAIII*. Funkcija *orf5* ni znana, pokazali pa so, da ta gen ni ključen za produkcijo eritromicina (Weber in sod., 1990; Caffrey in sod., 1992; Summers in sod., 1997; Reeves in sod., 1999). Tudi vloga gena *eryBI* (β-glukozidaza) zaenkrat ni poznana. Prekinitev tega gena ni imela vpliva na biosintezo eritromicina pri *S. erythraea*, medtem ko je prekinitev njegovega homologa pri *Aeromicrobium erythreum*, ki prav tako proizvaja eritromicin, imela negativen vpliv na produkcijo (Reeves in sod., 2008).



Slika 6: Shema genske skupine za sintezo eritromicina (Staunton in Weissman, 2001: 387). Figure 6: Organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster (Staunton and Weissman, 2001: 387).

2.4 MEHANIZEM BIOSINTEZE ERITROMICINA

Eritromicin je makrolidni antibiotik, ki ga sintetizira linearna (modularna) PKS tipa I. Multi-encimski kompleks eritromicinske PKS je sestavljen iz treh velikih polipeptidov (približno 350 kDa vsak). Po zaključku podaljševanja se eritromicinska poliketidna veriga ciklizira v makrolaktonski obroč 6-deoksieritronolid B (6-dEB), ki je še brez protimikrobne aktivnosti. V t.i. post-PKS oziroma poznih stopnjah biosinteze nato potečejo modifikacije osnovnega makrolaktonskega obroča 6-dEB, ob čemer molekula pridobi biološko aktivnost (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991). Da biosinteza eritromicina lahko poteče, so potrebne izhodne spojine (začetna enota propionil-CoA, podaljševalna enota metilmalonil-CoA in glukoza), donorji funkcionalnih skupin (npr., *S*-adenozil-L-metionin), NADPH in kofaktorji (npr. dvovalentni kovinski ioni) (Wiesmann in sod., 1995; Fontecave in sod., 2004; Takahashi in sod., 2006). Te molekule v celici nastajajo iz vira hranil s pomočjo metabolnih reakcij primarnega metabolizma. Tako je molekula eritromicina rezultat spleta mnogih metabolnih reakcij, kjer iz različnih virov hranil preko številnih reakcij nastane končni produkt (Hertweck, 2009).

2.4.1 Biosinteza eritromicinske poliketidne verige

Biosintezo eritromicinske poliketidne verige katalizira PKS tipa I. Za sintezo makrolaktonskega obroča 6-dEB iz ene molekule propionil-CoA in šestih molekul metilmalonil-CoA (Wiesmann in sod., 1995) so potrebni začetni – nanašalni modul, šest podaljševalnih modulov in tioesterazna domena, ki sprosti rastočo verigo z encima. Moduli so organizirani v tri velike multiencimske komplekse imenovane DEBS 1, DEBS 2 in DEBS 3. Njihovo sintezo kodirajo geni *eryAI, eryAII, eryAIII* (Slika 7) (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991; Caffrey in sod., 1992; Donadio S. in Katz L., 1992).

Biosinteza 6-dEB se prične na začetnem – nanašalnem modulu, kjer aciltransferazna domena (AT) prepozna in veže propionil-CoA na acilprenašalni protein (ACP) (Slika 7). Po vezavi propionata na ACP nanašalnega modula, AT prvega podaljševalnega modula prepozna in veže metilmalonat (iz [S]-metilmalonil-CoA) na ACP modula 1, nato pa ketosintaza (KS) katalizira reakcijo dekarboksilativne kondezacije, da nastane C-C vez med propionatom (z ACP začetnega modula) in metilmalonatom (s prvega podaljševalnega modula). Sledi redukcija nastale β -karbonilne skupine s ketoreduktazo (KR) v β -hidroksilno skupino. Enako zaporedje reakcij se ponovi na modulu 2, s tem da se veriga prenese z ACP modula 1. Na modulu 3 je zaradi odsotnosti KR končni produkt, β -karbonilna skupina. Na modulu 4 se najprej ponovijo reakcije do nastanka β -hidroksilne skupine, nato se sinteza nadaljuje na dehidratazi (DH) modula 4, ki katalizira nastanek dvojne vezi s dehidracijo. Enoil reduktaza (ER) modula 4 reducira dvojno vez, do enojne C-C vezi. Modula 5 in 6 vežeta na verigo še dve enoti metilmalonil-CoA in reducirata

nastalo β-keto skupino do β-hidroksilnih skupin. Z zadnjo reakcijo na modulu 6 se veriga prenese z ACP na aktivno mesto tioesteraze (TE), kjer pride do sprostitve verige in sočasno do njene ciklizacije v makrolakton, 6-dEB (Slika 7) (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991; Caffrey in sod., 1992; Donadio S. in Katz L., 1992; Aparicio, 1994; Pereda in sod., 1998; Staunton, 1998; Tang in sod., 2006; Tang in sod., 2007; Cane, 2010). Pri ciklizaciji molekule 6-dEB sodeluje tudi ACP z modula 6, ki vstavi verigo v aktivno mesto (v obliki kanala) TE. V aktivnem mestu se veriga pod vplivom interakcij med funkcionalnimi skupinami verige in aktivnim mestom TE domene zvije v obroč. Novo nastale vodikove vezi med skupinami in aktivnim skupine na trinajstem ogljikovem atomu. Po končani ciklizaciji se makrolaktonski obroč 6-deoksieritronolid B sprosti iz aktivnega mesta (Tsai in sod., 2001).



Slika 7: Biosinteza 6-dEB na PKS (ACP-acil prenašalni protein, AT-acil transferaza, KS-ketosintaza KR-ketoreduktaza, DH-dehitrataza, ER-enoilreduktaza, TE-tioesteraza) (Wu in sod., 2002: 5061).

Figure 7: Assembly of 6-dEB, on a modular polyketide synthase (AT-adenyltransferase, KS-ketosynthase, ACP-acyl carrier protein, KR-ketoreductase, DH-dehydratase, ER-enoyl reductase, TE-thioesterase) (Wu et al., 2002: 5061).

2.4.2 Pozne stopnje biosinteze eritromicina

S serijo reakcij v poznih stopnjah biosinteze se neaktivna molekula aglikona 6-dEB pretvori v eritromicin A, molekulo z antibiotično aktivnostjo (Slika 8). Pri tem so ključne encimske aktivnosti hidroksilaz, glikoziltransferaz in metiltransferaz. V pozne stopnje

uvrščamo tudi dve seriji reakcij za biosintezo dveh deoksisladkorjev D-desozamina in Lmikaroze, ki se potem vežeta na 6-dEB. Po vezavi se L-mikaroza metilira, tako da je v molekuli eritromicina A vezan sladkor L-kladinoza (Staunton, 1998; Mironov in sod., 2004).

2.4.2.1 Hidroksilacija 6-dEB

Prva modifikacija 6-dEB po ciklizaciji makrolidnega obroča je vezava hidroksilne skupine na šesti ogljikov atom (Slika 8), s čimer nastane eritronolid B. Reakcijo katalizira encim EryF iz družine citokromov P450. Reakcija poteka preko naslednjih stopenj: vezava substrata, prenos elektronov ter oksidacija substrata. Citokromi P450 vsebujejo običajno prostetično skupino hem, ki deluje kot donor aktivnega kisikovega atoma med oksidacijo substrata (Chang in sod., 1996). Pri reakciji, ki jo katalizira encim EryF (Weber in sod., 1991), je vir elektronov, potrebnih za redukcijo O₂ vezanega na železo, NAD(P)H. Nastala peroksidna skupina (O–O) je protonirana, kar omogoči cepitev nestabilne vezi med kisikoma (Nagano in sod., 2005).



Slika 8: Pozne stopnje biosinteze eritromicina A (Summers in sod., 1997: 3252).

Figure 8: Second phase of erythromycin A biosynthesis (Summers et al., 1997: 3252).

2.4.2.2 Vezava mikaroze na makrolaktonski obroč

V naslednji fazi biosinteze se na hidroksilno skupino, tretjega ogljikovega atoma v molekuli eritronolida B (Slika 8) veže aktiviran deoksisladkor TDP-L-mikaroza. Reakcijo, pri kateri nastane $3-\alpha$ -mikarozileritronolid B, katalizira encim mikaroziltransferaza iz skupine glikoziltransferaz, EryBV (Gaisser in sod., 1997; Summers in sod., 1997; Salah-Bey in sod., 1998; Zhang in sod., 2007). Glikoziltransferaze za donorje funkcionalnih skupin uporabljajo aktivirane oblike sladkorjev, vezanih na TDP. Encim prenese funkcionalno skupino sladkorja na akceptorsko molekulo (v primeru biosinteze eritromicina makrolaktonski obroč) (Coutinho in sod., 2003).

Biosinteza dTDP-L-mikaroze

TDP-L-mikaroza spada med sladkorje, aktivirane z vezavo na timidin difosfat, ki so najbolj strukturno raznolik razred nukleotidnih sladkorjev (aktivirane oblike sladkorjev), ki jih najdemo v naravi. Poleg gradbenih molekul za mnoge bakterijske polisaharide, se TDP-sladkorji uporabljajo tudi kot donorji sladkorjev pri biosintezi različnih glikoziliranih produktov. Večina poznanih TDP-sladkorjev so 6-deoksiheksoze in pri mnogih od njih, na drugem, tretjem ali četrtem ogljikovem atomu piranoznega obroča ni prisotnega kisikovega atoma. Kombinacija različnih modifikacij in odsotnost kisika na enem ali več mestih, vodijo do velike raznolikosti struktur TDP-sladkorjev. Vsi naravni TDP-sladkorji nastanejo iz glukoze-1-fosfata, ki se v dveh korakih pretvori do timidindifosfat-4-keto-6-deoksiglukoze (TDP-4-keto-6-deoksi-glukoza) (Thibodeaux in sod., 2004).

Biosinteza deoksisladkorjev dTDP-L-mikaroze in dTDP-D-desozamina iz izhodne spojine TDP-4-keto-6-deoksiglukoza poteka z encimi, ki jih kodirajo geni iz skupin eryB in eryC. Pri biosintezi dTDP-L-mikaroze (Slika 9) prvo reakcijo, izomerizacijo TDP-4-keto-6deoksiglukoze na petem ogljikovem atomu, katalizira encim EryBVII. Produkt reakcije je L-enantiomer. Drugi korak sinteze je dehidracija, ki jo katalizira encim EryBVI 2,3dehidrataza. Do dehidratacije pride na drugem in tretjem ogljikovem atomu, pri čemer se s tretjega odcepi vodikov ion, z drugega pa hidroksilna skupina. Naslednji, tretji korak sinteze je redukcija dvojne vezi med drugim in tretjim ogljikovim atomom, ki jo katalizira protein EryBII (Salah-Bey in sod., 1998). Rezultat reakcij dehidracije (drugi korak) in redukcije (tretji korak) na drugem in tretjem ogljikovem atomu je odstranitev kisika z drugega ogljikovega atoma. Naslednji, četrti korak je metilacija na tretjem ogljikovem atomu. Encim, ki je kodiran z genom eryBIII, je bil identificiran kot od Sadenozilmetionina odvisna metiltransferaza (Gaisser in sod., 1998). Poleg tega je encim EryBIII podoben encimu TylCIII iz S. fradiae (70 % identiteta sekvence), ki tudi sodeluje pri biosintezi L-mikaroze in je domnevno od S-adenozilmetionina odvisna metiltransferaza (Chen in sod., 2001). Zadnja, peta reakcija biosinteze L-mikaroze je redukcija keto skupine na četrtem ogljikovem atomu, ki jo katalizira encim EryBIV. Encim je podoben encimu TylCIV iz *S. fradiae* (49 % identiteta sekvence), ki tudi sodeluje pri biosintezi L-mikaroze. Encim EryBIV je podoben tudi dTDP-glukoza-4,6-dehidratazi iz *S. fradiae* in *S. griseus*. Del N-terminalne regije encima EryBIV se dovolj ujema z N-terminalno regijo encima dTDP-glukoza-4,6-dehidrataze iz *S. erythraea*, na katero se domnevno veže kofaktor NAD⁺(Gaisser in sod., 1997; Summers in sod., 1997; Gaisser in sod., 1998; Bate, 2000; Doumith in sod., 2000). Opisana biosintezna pot mikaroze še ni ustrezno znanstveno potrjena, zato je to predlagana pot.



Slika 9: Predlagana biosintezna pot dTDP-L-mikaroze v *Streptomyces fradiae*, v oklepaju so geni za biosintezo v *S. erythraea* (Gaisser in sod., 1997: 248; Summers in sod., 1997: 3256; Bate in sod., 2000: 142; Mironov in sod., 2004: 532).

Figure 9: Proposed biosynthetic route to dTDP-L-mycarose in *Streptomyces fradiae*, in brackets are genes for biosynthesis in *S. erythraea* (Gaisser et al., 1997: 248; Summers et al., 1997: 3256; Bate et al., 2000: 142; Mironov et al., 2004: 532).

2.4.2.3 Vezava dezozamina na makrolaktonski obroč

Tretjo post-PKS reakcijo katalizira encim desozaminiltransferaza, glikoziltransferaza, ki veže TDP-D-desozamin na peti ogljikov atom makrolaktonskega obroča (Slika 8) in tako pretvori α-mikarozileritronolid B v eritromicin D, prvi biosintezni intermediat s protimikrobno aktivnostjo. Desozaminil-transferazo kodira gen eryCIII (Gaisser in sod., 1997; Summers in sod., 1997; Salah-Bey in sod., 1998). Osnovni mehanizem reakcije je enak kot pri vezavi mikaroze (poglavje 2.4.2.2). Pri reakciji sodeluje tudi protein iz skupine citokromov P450 EryCII (Yuan in sod., 2005; Moncrieffe in sod., 2012), ki se veže na EryCIII in tako omogoči stabilizacijo strukture EryCIII ter vezavo substrata na aktivno mesto. EryCII pri katalizi deluje kot alosterični aktivator. Za razliko od mikaroziltransferze EryBV je desozaminiltransferaza EryCIII zelo selektivna do nukleotidnih sladkorjev in do makrolidnih obročev. To nakazuje, da vrstni red glikozilacije v večji meri določa specifičnost EryCIII do makrolaktonskega obroča (Lee in sod., 2004; Yuan in sod., 2005; Moncrieffe in sod., 2012). EryCII se strukturno zelo razlikuje od običajnih citokromov P450. Najbolj očitna razlika je odsotnost cisteina, ki pri običajnih citokromih P450 omogoča vzdolžno vezavo funkcionalne skupine na hem, zatorej nima običajne aktivnosti citokromov P450.

Biosinteza dTDP-D-desozamina

D-desozamin je pomemben deoksiamino-sladkor, ki je poleg eritromicina prisoten tudi v drugih makrolidnih antibiotikih kot so oleandomicin, pikromicin in megalomicin (Tang in McDaniel, 2001).

Biosinteza dTDP-D-desozamina (Slika 10) se prične z od pirodoksal fosfata-odvisno dehidratazo EryCIV, ki s transaminacijo tvori 4-aminosladkor (Salah-Bey in sod., 1998; Zhao in sod., 2001; Schell in sod., 2008). Sledi deaminacija z encimom EryCV dTDP-4,6-deoksi-heksoza-3,4-reduktaza. Pri tem nastane produkt 3-keto-4,6-deoksiheksoza (Salah-Bey in sod., 1998; Szu in sod., 2005; Schell in sod., 2008). Sledi tretja reakcija, pri kateri 3-aminotransferaza EryCI veže aminoskupino na tretji ogljikov atom. Pri tem kot kofaktor sodeluje pirodoksal fosfat. Od SAM odvisna metiltransferaza EryCVI, katalizira zadnjo reakcijo pri biosintezi L-desozamina, pri kateri pride do vezave dveh metilnih skupin na aminoskupino na tretjem ogljikovem atomu (Salah-Bey in sod., 1998; Schell in sod., 2008). Opisana biosintezna pot desozamina še ni ustrezno znanstveno potrjena, zato je to predlagana pot.



Slika 10: Predlagana biosintezna pot dTDP-D-desozamina v *S. erythraea* (Schell in sod., 2008: 3316). Figure 10: Proposed biosynthetic route dTDP-D-desosamine in *S. erythraea* (Schell in sod., 2008: 3316).

2.4.2.4 Hidroksilacija in metilacija eritromicina D

V zadnjih dveh reakcijah biosinteze se eritromicin D (ErD) pretvori v eritromicin A (ErA) (Slika 11). Najprej EryK hiroksilaza iz skupine citokromov P450 katalizira hidroksilacijo ErD na dvanajstem ogljikovem atomu makrolaktonskega obroča (Slika 11), do ErC, nato pa EryG, od S-adenozilmetionina odvisna *O*-metiltransferaza, metilira mikarozo na tretjem ogljikovem atomu (Slika 11) in tako pretvori ErC v ErA. Reakciji lahko potečeta tudi v obratnem vrstnem redu zaradi delovanja proteina EryG na ErD. Pri tem nastane medprodukt ErB, ki pa predstavlja slab substrat za protein EryK. Spektrofotometrični test vezave je pokazal, da se ErD na EryK veže 20-krat močneje kot ErB. Metilacija hidroksilne skupine na mikarozi v ErB ima izrazit vpliv na jakost vezave substrata na aktivno mesto EryK (Lambalot in sod., 1995). Kristalna struktura encima EryK je omogočila tudi vpogled v mehanizem hidroksilacije. Pri prepoznavanju substrata ErD ima
ključno vlogo sidranje dveh sladkorjev (desozamina in mikaroze), ki sta vezana na makrolaktonski obroč. Desozamin interagira v glavnem z zanko na C-terminalnem koncu encima. Mikaroza se na encim veže s štirimi vodikovimi vezmi. Vezavi substrata sledi zaprtje dveh "rok", zanke in helikaz. Metilna skupina na mikarozi v ErB ovira popolno zapiranje "rok," kar posledično vpliva na slabšo vezavo substrata (Savino in sod., 2009). Hidroksilaza EryK se po strukturi razlikuje od hidroksilaze EryF, vendar imata oba encima enak katalitski mehanizem (Stassi in sod., 1993; Lambalot in sod., 1995).

Protein EryG spada med od S-adenozil-L-metionina (SAM) odvisne *O*-metiltransferaze, ki katalizirajo prenos aktivirane metilne skupine s SAM na dušikov, ogljikov, kisikov ali žveplov nukleofil v različnih molekulah. Encimsko katalizirana metilacija poteče z nukleofilnim napadom tarčnega atoma na aktivno metilno skupino SAM, pri čemer nastane stranski produkt S-adenozil-L-homocistein (Woodard in sod., 1980; Ho in sod., 1991), ki pri mnogih od SAM odvisnih *O*-metiltransferazah inhibira reakcijo (Weidner in sod., 1998). S čezmernim izražanjem genov *eryK* in *eryG* so uspeli povečati stopnjo pretvorbe medproduktov ErD, ErC in ErB do ErA v času biosinteznega procesa. Rezultat povečanja števila kopij teh dveh genov v razmerju 3:2 (*eryK/eryG*), je omogočil skoraj popolno odstranitev ErB in ErC ter povečanje produkcije ErA za 25 % v rekombinantnem sevu (Chen in sod., 2008).



Slika 11: Zadnji dve stopnji biosintezne poti eritromicina in strukture ErA, ErB, ErC in ErD. Krogi označujejo spremebe (Chen in sod., 2008: 1821).

Figure 11: Final two stages of the erythromycin biosynthetic pathway and structures of ErA, ErB, ErC and ErD. Circles highlight changes (Chen et al., 2008: 1821).

2.4.3 Oskrba z gradbenimi enotami za biosintezo eritromicina

Biosinteza eritromicina predstavlja kompleksno mrežo metabolnih reakcij. Poleg usklajenega delovanja številnih biosinteznih encimov (opisano v poglavju 2.4.1 in 2.4.2) je za učinkovito biosintezo nujna tudi ustrezna oskrba s substrati, ki jih večinoma zagotavljajo katabolne metabolne poti v organizmu (Beppu, 1992; Vining, 1992). Pri aerobnih bakterijah je osrednja metabolna pot citratni cikel, ki je poleg ostalih metabolnih poti, kot so glikoliza, pentoza-fosfatna pot, razgradnja aminokislin in druge, pomemben vir metabolnih intermediatov (Kornberg, 1966; Pronk in sod., 1996; Owen in sod., 2002; Papagianni, 2012). V grobem imajo intermediati v metabolizmu vlogo prenašalcev energije ali redukcijskega potenciala (npr., ATP, NADH in NADPH) ali pa vlogo izhodnih spojin (npr., glukoza 6-fosfat, glukoza 1-fosfat in piruvat). Izhodne spojine se porabljajo za sintezo novih bolj kompleksnih molekul (Maitra in sod., 2001, Csete in Doyle, 2004; Smith in Morowitz, 2004; Han S. O. in sod., 2007).

Izhodne spojine, ki vstopajo v biosintezno pot eritromicina, so propionil-CoA in metilmalonil-CoA za biosintezo makrolaktonskega obroča ter TDP-4-keto-6-deoksiglukoza za biosintezo deoksisladkorjev. Pomembna molekula, ki vstopa v biosintezno pot, je tudi SAM, ki pri različnih reakcijah sodeluje kot donor metilne skupine (Wiesmann in sod., 1995; Fontecave in sod., 2004; Takahashi in sod., 2006).

2.4.3.1 Oskrba s propionil-CoA in metilmalonil-CoA

Biosinteza poliektidne verige eritromicina se začne z molekulo propionil-CoA in nadaljuje s klaisenovo kondenzacijo šestih molekul [S]-metilmalonil-CoA (Friedman in sod., 1964). Te molekule lahko v aktinomicetah izvirajo iz več različnih metabolnih poti (Slika 12). Propionil-CoA je lahko produkt β-oksidacije neparnih in razvejanih maščobnih kislin, razgradnje aminokislin izolevcin in metionin, razgradnja holesterola, dekarboksilacija [R]-metilmalonil-CoA in pretvorbe eksogenega propanola (Gottschalk, 1986; Tang in sod., 1994; Chan in sod., 2009). Pri pretvorbi eksogenega propanola se ta najprej pretvori v propionat s propionil-kinazo, nato pa s propionil-CoA-sintazo v propionil-CoA (Chen in sod., 2013a).

Viri [S]-metilmalonil-CoA so izomerizacija sukcinil-CoA (intermediat citratnega cikla) z metilmalonil-CoA mutazo karboskilacija propionil-CoA, degradacija aminokisline valin, in v nekaterih bakterijah tudi konverzija acetoactil-CoA preko krotonil-CoA odvisne poti (Chan in sod., 2009). Pri pretvorbi sukcinil-CoA v S-metilmalonil-CoA, metilmalonil-CoA mutaza najprej katalizira pretvorbo sukcinil-CoA v [R]-metilmalonil-CoA (Kellermeyer in sod., 1964; Vlasie and Banerjee, 2003). [R]-metilmalonil-CoA se nato pretvori v gradnik eritromicina, [S]-metilmalonil-CoA s pomočjo epimeraze (Cane in sod., 1986). Druga pot

sinteze [S]-metilmalonil-CoA je karboksilacija propionil-CoA, ki jo katalizira propionil-CoA-karboksilaza (Hunaiti in Kolattukudy, 1982; Hunaiti in Kolattukudy, 1984; Jung in sod., 2011). Koncentraciji propionil-CoA in metilmalonil-CoA sta med seboj povezani. Pri tem ima velik vpliv citratni cikel, saj je reakcija, ki jo katalizira metilmalonil-CoA mutaza (MCM) reverzibilna, zato se lahko nastali metilmalonil-CoA steka nazaj v citratni cikel (Donadio in sod., 1996; Revees in sod., 2004). Analize sevov *S. erythraea* z inaktivirano oziroma čezmerno izraženo MCM so pokazale, da v gojišču z ogljikovimi hidrati MCM pretvarja metilmalonil-CoA v sukcinil-CoA, ki se nato metabolizira v citratnem ciklu, medtem ko v gojišču z oljem reakcija poteka v nasprotni smeri. Sev z inaktivirano MCM (mutacije na *mutB, meaB, Se*ORF5) ima zato v gojišču z ogljikovimi hidrati kot glavnim virom ogljika višjo produkcijo eritromicina od seva divjega tipa. Zanimivo pa je, da ima v enakem gojišču tudi sev s podvojenim MCM operonom višjo produkcijo v primerjavi z divjim sevom. Predvidevajo, da lahko regulatorni gen *mutR*, ki je prav tako prisoten v MCM operonu, vpliva tudi na druge relevantne metabolne poti v celici in s tem na produkcijo eritromicina (Revees in sod., 2006; Revees in sod., 2009).



Slika 12: Biosintezne poti propionil-CoA in metilmalonil-CoA v aktinomicetah (Bott in sod., 1997: 591; Bermúdez in sod., 1998: 78; Chan in sod., 2009: 35).

Figure 12: Routes of formation of propionyl-CoA and methylmalonyl-CoA reported in actinomycetes (Bott et al., 1997: 591; Bermúdez et al., 1998: 78; Chan et al., 2009: 35).

2.4.3.2 Biosinteza izhodne spojine timidin difosfat-4-keto-6-D deoksiglukoza

Izhodna spojina za sintezo obeh deoksisladkorjev, ki sodelujeta pri biosintezi eritromicina, L-mikaroze in D-desozamina, je timidin difosfat-4-keto-6-deoksiglukoza (TDP-4-keto-6deoksiglukoza). Sintetizira se iz TDP-D-glukoze, ki se tvori iz glukoze-1-fosfata in timidin trifosfata (TTP) (Takahashi in sod., 2006). Pri bakterijah se glukoza-1-fosfat sintetizira iz glukoza-6-fosfata z reakcijo, ki jo katalizira fosfoglukomutaza (Slika 13) (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). Za sintezo glukoza-6-fosfata potrebuje encim glukokinaza: glukozo, donor fosfatne skupine (npr., ATP, GTP in UTP) in dvovalentni kovinski ion. Bakterijske glukokinaze kažejo zelo ozko specifičnost do substrata, izražanje encima pa se inducira samo z glukozo. Glukoza-6-fosfat lahko nastaja tudi v drugih metabolnih poteh (npr. razgradnja 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 13: Aktivacija glukoze in sinteza TDP-4-keto-6-deoksi-D-glukoze (White-Phillip in sod., 2009: 16,18). Figure 13: Glucose activation and syntesis of TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose (White-Phillip et al., 2009: 16,18).

Glukoza-1-fosfat se nato z encimom glukoza-1-fosfat timidilil transferaza pretvori v TDP-D-glukozo. Da lahko reakcija poteče, se na aktivno mesto encima glukoza-1-fosfat timidilil transferaza najprej veže TTP, nato glukoza-1-fosfat in ob prisotnosti Mg²⁺ nastaneta TDP-D-glukoza in pirofosfat (Ma in sod., 1997; Sivaraman in sod., 2002; Han in sod., 2006). Pri naslednji reakciji se TDP-D-glukoza z encimom TDP-D-glukoza 4,6-dehidrataza pretvori v TDP-4-keto-6-deoksiglukozo (Lombo in sod., 1997; Doumith in sod., 2000). Po vezavi substrata na encim, poteče konverzija v dveh fazah. Prva faza je oksidacija hidroksilne skupine na ogljikovem atomu sladkorja v keto-skupino, pri čemer odcepljeni vodikov ion reducira NAD⁺ v NADH. V drugi fazi se s šestega ogljikovega atoma odcepi hidroksilna skupina, po vezavi vodikovega iona z NADH pa nastane metilna skupina in s tem končni produkt (Vara in Hutchinson, 1988; Allard in sod., 2004). Aktivnost TDP-D-glukoza 4,6dehidrataze regulirajo fosforilirani timidin nukleotidi (TTP, TDP in TMP), med katerimi jo najmočneje inhibira TDP, končni produkti pa nimajo inhibitornega učinka (Wang in Gabriel, 1969; Zarkowsky in sod., 1970; Thompson in sod., 1992).

Kot že omenjeno v poglavjih 2.4.2.2 in 2.4.2.3 je TDP-4-keto-6-deoksiglukoza izhodna spojina za biosintezo mikaroze in desozamina (Salah-Bey in sod., 1998), hkrati pa tudi ramnoze, ki je gradnik celičnih sten bakterij (Shibaev, 1987; Doumith in sod., 1999; Madduri in sod., 2001). Pri *S. erythraea* so pokazali, da je aktivnost encima TDP-glukoza 4,6-dehidrataza, najvišja v času produkcije eritromicina (Vara in Hutchinson, 1988; Linton in sod., 1995). Ugotovili so tudi, da je poleg gena SACE_6480, ki kodira encim TDP-glukoza 4,6-dehidratazo v istem operonu tudi gen SACE_6479 (Linton in sod., 1995; Oliynyk in sod., 2007).

2.4.3.3 S-adenozil-L-metionin, donor metilne skupine

Pri biosintezi eritromicina ima pomembno vlogo tudi oskrba s *S*-adenozil-L-metioninom (SAM), ki predstavlja najpomembnejši vir metilne skupine pri reakcijah, ki jih katalizirajo metilaze EryBIII, EryCVI, EryF in EryG (Fontecave in sod., 2004). Pri sintezi SAM iz aminokisline L-metionin in ATP, sodeluje encim metionin adenozil-transferaza. Pri reakciji se adenozilna skupina iz ATP prenese na L-metionin, da nastane sulfonijev ion, ki je visokoenergijski reagent in lahko prenese metilno skupino na substrat. Končni produkti reakcije so poleg SAM še pirofosfat (PP_i) in anorganski fosfat (P_i), Da reakcija lahko poteče, encim potrebuje še Mg²⁺ in K⁺ ione (Cantoni, 1953; Lombardini in sod., 1973; Chiang in Cantoni, 1977; Mato in sod., 1997; González in sod., 2000; Lu, 2000). Metionin adenozil-transferaza je evolucijsko zelo dobro ohranjen encim (Kotb in Geller, 1993), saj reakcija poteka po enakem mehanizmu tako v *E. coli* (Tabor in Tabor, 1964) kot v *Saccharomyces cerevisiae* (Chiang in Cantoni, 1977) in tudi jetrih sesalcev (Lombardini in sod., 1973).

2.5 REGULACIJA BIOSINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITOV

Tako v *S. erythraea* kot tudi drugih bakterijah je produkcija antibiotikov regulirana glede na fazo življenjskega cikla, količino hranil in druge okoljske vplive (Yang in sod., 1995). Okoljski vplivi povzročijo nastanek znotrajceličnih signalov, ki poleg produkcije antibiotikov lahko inducirajo tudi morfološko diferenciacijo ter sintezo sekundarnih metabolitov. Signali se lahko prenašajo preko signalnih molekul, ki se vežejo na regulatorne proteine in tako vplivajo na njihovo delovanje. Na primer, z vezavo signalne molekule na represor, ki blokira transkripcijo operona, se ta sprosti z operona in omogoči transkripcijo gena. Signalne molekule so pri aktinomicetah pogosto: γ -butirolaktoni, aminokisline, ko dosežejo koncentracijsko neravnovesje in visoko fosforiliran nukleotid gvanozin tetrafosfat ppGpp (Sanchez in Demain, 2002; Sánchez in sod., 2010). Biosinteza antibiotikov je regulirana tudi preko regulatornih genov/proteinov z različnim območjem regulacije.

Prepleteno mrežo regulatornih interakcij lahko delimo na t. i. globalno regulacijo (pleiotropna) in pot-specifično regulacijo. Globalni regulatorji glede na fazo rasti in razmere v okolju regulirajo enega ali več različnih fizioloških procesov v celici. Pot-specifični regulatorji prenašajo globalne signale in regulirajo eno fiziološko funkcijo (Chater in Horinouchi, 2003; Martınez-Antonio in Collado-Vides, 2003, Bibb, 2005). V genskih skupinah za biosintezo antibiotikov so poleg genov za biosintezo prisotni tudi geni za rezistenco na antibiotik in običajno tudi eden ali več pot-specifičnih regulatornih genov, ki regulirajo transkripcijo genov iz skupine v kateri se nahajajo (Yang in sod., 1995; Cundliffe, 2006). Primer takšne organizacije je genska skupina za biosintezo tilozina v *Streptomyces fradiae*, ki je s petimi regulatornimi geni, ena najbolj kompleksno reguliranih. Produkti teh genov kažejo homologijo z γ -butirolaktoni in pot-specifičnimi regulatornimi proteini iz družine SARP (Cundliffe, 2008). V nasprotju s prevladujočo strukturo genskih skupin pa pri *S. erythraea* v genski skupini za biosintezo eritromicina ni prisotnega pot-specifičnega regulatorja (Oliynyk in sod., 2007).

2.5.1 Vloga globalne (pleiotropne) regulacije pri biosintezi sekundarnih metabolitov

Globalna regulacija deluje na višji ravni regulacije ter vpliva na mnoge celične procese v primarnem in sekundarnem metabolizmu. Sem spada tudi regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov preko regulatornih proteinov in tudi signalnih molekul, kot je prikazano v nadaljevanju.

Zelo pomembna skupina regulatornih proteinov, ki poleg biosinteze sekundarnih metabolitov regulirajo tudi druge procese v celici so produkti regulatornih genov bld. Regulatorji iz skupine *bld* kodirajo različne vrste produktov kot so tRNK in sigma faktorje ter številne transkripcijske faktorje, njihova skupna lastnost pa je, da sodelujejo pri regulaciji morfološke diferenciacije substratnega micelija v zračni micelij, zato mutacije v teh genih vodijo do t.i. »bald« fenotipa brez zračnega micelija. Številni *bld* geni poleg vloge pri metabolizmu in morfoloških spremembah vplivajo tudi na produkcijo antibiotikov (Elliot in sod., 2001). Posebej pomembna je vloga gena bldD pri regulaciji biosinteze eritromicina v S. erythraea. Genska skupina za biosintezo eritromicina leži na kromosomu na sredini regije v kateri je večina esencialnih genov (Olivnyk in sod., 2007) in ne vsebuje pot-specifičnih regulatornih genov (Slika 6). Gen *bldD* leži na robu osrednje regije, 1,5 Mb od ery genske skupine. Mutirani sevi S. erythraea, s prekinjenim genom *bldD* niso tvorili zračnega micelija in spor, bistveno pa se je zmanjšala tudi produkcija eritromicina. Ta rezultat in pa dokazana vezava BldD na promotorske regije genov iz genske skupine ery kažeta, da je BldD pozitivni regulator biosinteze eritromicina (Chng in sod., 2008).

 γ -butirolaktoni so globalno delujoče signalne molekule, ki se med seboj ločijo po dolžini, razvejanosti in stehiometriji maščobnih kislin v stranskih verigah, pogosto inducirajo produkcijo in transport antibiotikov, rezistenco, sporulacijo in v nekaterih primerih diferenciacijo. Vežejo se na receptorske proteine, ki represirajo transkripcijo DNA, kot je na primer ArpA pri *S. griseus*. Vsak receptorski protein je visoko specifičen za posamezen γ -butirolakton (Horinouchi, 2002; Takano, 2006; Kato in sod., 2007). Za indukcijo transkripcije so potrebne nanomolarne koncentracije γ -butirolaktonov (Takano, 2006).

Regulacija, pri kateri sodeluje ppGpp, temelji na bifunkcionalnem encimu RelA/SpoT, ki bodisi sintetizira ali pa razgrajuje (hidrolizira) ppGpp, zato se lahko bakterije hitro odzivajo na spremembe v okolju. Pri *S. clavuligerus* in *S. coelicolor* je pri pogojih z omejenim dušikom ali fosfatom ta regulacija potrebna za biosintezo antibiotikov (Chakraburtty in Bibb, 1997; Jin in sod., 2004). Obsežne študije na *E. coli* so potrdile vlogo signalnega nukleotida ppGpp kot globalnega regulatorja transkripcije genov v pogojih pomanjkanja hranil. Spremembe v koncentraciji ppGpp lahko neposredno regulirajo aktivnost RNA-polimeraze (Jishage in sod., 2002; Potrykus in Cashel, 2008).

2.5.2 Pot-specifična regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov

Pot-specifični regulatorji predstavljajo najnižjo raven regulacije, saj so največkrat zadnji člen v regulatorni kaskadi. Nahajajo se znotraj genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov, najpogosteje kodirajo transkripcijske regulatorje biosinteznih genov v isti genski skupini. Pripadajo različnim družinam, med katerimi so najpogostejše:

- Regulatorni proteini družine LAL (angl. Large ATP-binding regulators of the LuxR family) so transkripcijski regulatorji. Na aminoterminalnem koncu vsebujejo vezavno mesto za nukleotid trifosfat, na karboksiterminalnem koncu pa motiv HTH (ang. helix-turn-helix) mesti za vezavo na DNA, ki je značilno za družino proteinov LuxR. Regulatorji LAL regulirajo biosintezo poliketidov tipa I in glikopeptidov (Bibb, 2005), do sedaj pa so jih identificirali samo pri aktinomicetah, npr. pri *Streptomyces tsukubaensis* regulator fkbN za biosintezo FK506 (Goranovič in sod., 2012), *Pseudonocardia autotrophica* regulator nppRIII za biosintezo NPP (angl. Nystatin-like Pseudonocardia polyene) (Jeon in sod., 2011), *Streptomyces avermitilis* regulator aveR regulira biosintezo avermektina (Kitani in sod., 2009) in *Streptomyces hygroscopicus* regulator rapH za biosintezo rapamicina (Kuščer in sod., 2007). V vseh navedenih primerih je manipulacija regulatornega gena vplivala na biosintezo oziroma donos ciljnega produkta.
- Regulatorne proteine družine SARP (angl. *Streptomyces* antibiotic regulatory protein) so našli samo v aktinomicetah, večino izmed njih v streptomicetah. So transkripcijski aktivatorji in regulirajo biosintezo β-laktamov, aromatskih poliketidov, ki jih sintetizirajo PKS tipa I itd. Regulatorji vsebujejo N-terminalno HTH DNA vezavno regijo. Mnogi regulatorji iz te skupine prepoznajo zaporedje sedmih nukleotidov v promotorski regiji genov, ki jih regulirajo (Bibb, 2005). Prisotnost regulatorjev iz družine SARP so dokazali že pri številnih sevih, kot so *Streptomyces coeruleobidus* regulator dnrI za biosintezo daunorubicina (Yuan in sod., 2011), *Streptomyces aureofaciens* regulator aur1PR3 za biosintezo auricina (Novakova in sod., 2011), *Streptomyces viridifaciens* regulator vlml za biosintezo valanimicina (Garg in Parry, 2010) in *Nocardia uniformis* regulator NocR za biosintezo nokardicina A (Davidsen in Townsend, 2009). V vseh primerih je prekinitev regulatornega gena ustavila ali zmanjšala biosintezo produkta.
- Družina regulatornih proteinov LTTR (ang. LysR-type transcriptional regulators) je najbolj razširjena družina pot-specifičnih transkripcijskih regulatorjev pri prokariontih. Regulirajo različne celične funkcije, kot so gibanje, metabolizem, zaznavanje celične gostote in virulenco. Vsebujejo ohranjeno N-terminalno HTH DNA-vezavno domeno in C-terminalno domeno, ki sodeluje pri vezavi signalnih molekul. Njihova aktivnost je pogosto pogojena z vezavo majhnih signalnih molekul, koinduktorjev (angl. co-inducer) (Maddocks in Oyston, 2008; Knapp in Hu, 2010). Prisotnost LTTR regulatorjev so dokazali pri *Streptomyces tsukubaensis* regulator fkbR za biosintezo FK506 (Goranovič in sod., 2012), *Pseudomonas* sp. M18 regulator pqsR za biosintezo pioluteorina in fenazin-1-karboksilne kisline (Lu in sod., 2009), *Streptomyces cattleya* regulator thnI za biosintezo tienamicina (Rodríguez in sod., 2008) in *Streptomyces clavuligerus* regulator claR za biosintezo klavulanske kisline (Paradkar in sod., 1998; Pérez-Redondo in sod., 1998).

2.6 VPLIV FIZIOLOŠKIH PARAMETROV IN KULTIVACIJSKIH POGOJEV NA PRODUKCIJO ERITROMICINA

V aktinomicetah hranila v rastnem gojišču in fiziološki parametri, na primer vir ogljika in dušika ali pa temperatura in dostopnost kisika, bistveno vplivajo na začetek in stopnjo produkcije sekundarnih metabolitov. To je še posebej pomembno v industrijskih pogojih, saj lahko bistveno vplivajo na ekonomičnost proizvodnega procesa. Pri sestavi gojišč je pomembna tako vrsta kot tudi koncenteracija, določenega vira hranil. Določeni bioprocesni parametri kot so na primer viskoznost brozge, vzdrževanje raztopljenega kisika, pH, temperatura in dohranjevanje hranil, imajo prav tako zelo pomemben vpliv na produkcijo eritromicina. Kljub hitremu razvoju znanja o molekularni genetiki sekundarnih metabolitov, vključno s karakterizacijo regulatornih genov in njihovih produktov, še vedno relativno slabo razumemo vpliv posameznih hranil na biosintezo sekundarnih metabolitov (Revee in Baumberg, 1998).

2.6.1 Sestava produkcijskega gojišča - viri ogljika

Vir hranil je pomemben dejavnik, ki vpliva na celično rast in sintezo produkta pri bioprocesu. Napačna izbira vira ogljika lahko zmanjša produkcijo želenega metabolita za več redov velikosti (Chen in Liu, 1996). Vir ogljika in dušika lahko deluje represivno ali inducibilno tudi na prisotnost zunajceličnih encimov. Na primer, škrob inducira prepisovanje genov za glukoamilazo, amilazo in α -glukozidazo, medtem ko jih glukoza represira (Archer in Peberdy, 1997).

Za večino bakterij je značilno, da v primeru, ko je na voljo več virov ogljika, določene enostavne vire ogljika, najpogosteje glukozo, porabljajo prednostno pred ostalimi. Zaradi tako imenovane katabolne represije z glukozo se poraba ostalih virov ogljika začne šele, ko glukoze v gojišču zmanjka (Muñoz-Elías in McKinney, 2006). Pri bioprocesih za proizvodnjo sekundarnih metabolitov glukoza in drugi enostavni viri ogljika omogočajo hitro rast biomase, vendar pa pogosto negativno vplivajo na biosintezo sekundarnih metabolitov, ki jo pogosto sprožijo ravno signali pomanjkanja določenih hranil v okolju (Sánchez in sod., 2010). Za učinkovito produkcijo sekundarnih metabolitov pogosto uporabljamo gojišča, ki so sestavljena iz kompleksnih in enostavnih virov ogljika. V tem primeru se najprej porabijo enostavni viri ogljika za rast celične biomase, pri tem pa nastaja zelo malo sekundarnih metabolitov. Ko enostavnih virov ogljika zmanjka, se prične poraba kompleksnih virov ogljika, ki omogočajo tudi učinkovito biosintezo sekundarnih metabolitov. Nizko koncentracijo enostavnih virov ogljika lahko vzdržujemo tudi s dohranjevanjem, tako se lahko z dohranjevanjem glukoze vpliva na metabolizem in s tem na produkcijo. Pri bioprocesu za produkcijo eritromicina so testirali različne vrste enostavnih sladkorjev (npr. glukoza, manoza, arabinoza in fukoza). Eksperimentalno so pokazali, da sta bili tako maksimalna produkcija eritromicina kot dobra celična rast doseženi v gojišču s glukozo. V gojiščih s galaktozo, fukozo ali arabinozo je bila rast dobra, produkcija antibiotika pa je bila slaba (El-Enshasy in sod., 2008). V industrijskem merilu je pri produkciji eritromicina s *S. erythraea*, dohranjevanje glukoze pomembno vplivalo na produkcijo eritromicina. Pri dohranjevanju glukoze in propanola med bioprocesom s *S. erythraea* je zmanjšano dohranjevanje glukoze povečalo porabo propanola. Zaradi večje porabe propanola se je posledično povečala zaloga propionil-CoA in metilmalonil-CoA v celici (Chen in sod., 2013a).

Uporaba kompleksnih virov ogljika v produkcijskih gojiščih

Običajno je vir ogljika v primerjavi z ostalimi hranili v gojišču, v relativno visokih koncentracijah zato je uporaba kompleksnih hranil kot so npr. škrob, dekstrini in podobni polimeri namesto enostavnih virov (npr. glukoza) tudi cenovno bolj ugodna. Poleg tega pri pripravi gojišč za produkcijo eritromicina uporaba kompleksnih virov ogljika kot je npr. škrob omogoča tudi visoke donose (El-Enshasy in sod., 2008).

Kot vir ogljika se pogosto uporabljajo v produkcijskih gojiščih tudi različna rastlinska olja in maščobe. Uporabljajo se lahko tudi kot protipenilci in kot glavni ali dodatni vir ogljika (Mironov in sod., 2004). Maščobe vstopajo v centralni metabolizem z razgradnjo maščobnih kislin do acetil-CoA, ki vstopa v citratni cikel. Več raziskav je pokazalo, da uporaba olja kot glavnega vira ogljika namesto škroba ali glukoze poveča produkcijo. Slabosti uporabe olja sta povečana potreba po kisiku in ostanek olja v brozgi po končanem bioprocesu, ki otežuje zaključne procese pri izolaciji antibiotikov (Mirjalili in sod., 1999). Povečana potreba po kisiku je posledica slabšega masnega prenosa, do katerega pride zaradi povečanega zadrževanja kisika v gojišču in povečane viskoznosti gojišča (Mohd Sauid in sod., 2013). Pomembna dejavnika, ki vplivata na ostanek olja v gojišču, sta zmožnost organizma, da v celoti razgradi vse komponente olja ter dostopnost olj zaradi masnega transporta in velikosti kapljic. Poleg tega lahko nekatera olja in maščobne kisline delujejo inhibitorno, druga pa stimulativno (Mirjalili in sod., 1999). Na primeru S. erythraea je raziskava možnosti uporabe olja oljne repice kot dodatnega vira ogljika pokazala, da je bila v tem primeru produkcija eritromicina povečana. Večji delež maščobnih kislin v produkcijskem gojišču, je povzročil zmanjšano porabo sladkorjev med procesom (Hamedi in sod., 2002). Kljub temu je pri asimilaciji olja, kot glavnega vira ogljika potrebno ovrednotiti več dejavnikov, ki vplivajo na produkcijo eritromicina (Hamedi in sod., 2004).

2.6.2 Sestava produkcijskega gojišča - viri dušika

Vir dušika pogosto bistveno vpliva na produkcijo antibiotikov in lahko zavira biosintezo antibiotikov ter drugih sekundarnih metabolitov. Pri pripravi gojišča za produkcijo eritromicina se zelo pogosto uporablja kombinacija organskega in anorganskega vira dušika. Organski viri dušika so najpogosteje proteini, peptidi in aminokisline v različnih kompleksnih hranilih kot so na primer koruzna namakalna vodica, sojina moka, kazein, pepton, kvas in drugi. Proteini in peptidi se pred prehodom v celico v rastnem gojišču hidrolizirajo do prostih aminokislin s pomočjo ekstraceličnih proteaz. Dejanski organski vir dušika tako predstavljajo aminokisline (Bapat in sod., 2006). Med temi se industrijsko najpogosteje uporabljata sojina moka in koruzna namakalna vodica. Za anorganski vir dušika se lahko uporabljajo različne amonijeve spojine med katerimi se industrijsko najpogosteje uporablja amonijev sulfat (El-Enshasy in sod., 2008). Tako kot velja za vire ogljika, sta koncentracija in razmerje med različnimi viri dušika prav tako pomemben dejavnik, ki vpliva na produkcijo sekundarnih metabolitov. V tem primeru je pomembno razmerje med organskim virom dušika, ki predstavlja kompleksen vir in anorganskim, ki predstavlja enostaven vir dušika. Najbolj pogosto opažanje pri opravljenih raziskavah je bilo, da se pri prebitku vira dušika hitrost produkcije antibiotikov zmanjša (Zou in sod., 2009a). Tako je vpliv na biosintezo antibiotikov pri visoki koncentracija amonijevih ionov v gojišču negativen, medtem ko je pri nizki koncentraciji amonija produkcija antibiotika povečana (Technikova-Dobrova in sod., 2004). Ugotovili so tudi, da zamenjava amonijevega sulfata z drugimi amonijevimi solmi ne poveča produkcije (El-Enshasy in sod., 2008). V industrijskih pogojih pri produkciji eritromicina s S. erythraea so ugotovili, da uravnavanje koncentracije amonijevega sulfata vpliva na viskoznost gojišča in porabo glukoze. Tako je bila pri bioprocesu z gojiščem z visoko koncentracijo kvasnega ekstrakta poraba glukoze mnogo večja kot pri gojišču z višjo koncentracijo amonijevega sulfata, vendar pa je bila produkcija eritromicina pri obeh gojiščih enaka (Chen in sod., 2013b).

2.6.3 Sestava produkcijskega gojišča - viri fosforja

Na biosintezo različnih tipov antibiotikov in drugih sekundarnih metabolitov vpliva tudi količina fosforja v rastnem gojišču. Najbolj pogosta oblika fosforja je fosfatna skupina. Produkcija sekundarnih metabolitov običajno nastopi le v gojiščih z omejeno količino fosfata. Pomanjkanje fosfata sproži biosintezo sekundarnih metabolitov, ko je fosfat v okolju izčrpan in je nadaljnja rast mikroorganizma onemogočena. To je v skladu s predvideno fiziološko/ekološko vlogo sekundarnih metabolitov, ki so namenjeni zaviranju rasti drugih mikroorganizmov oziroma so signalne molekule (Sola-Landa in sod., 2005). Pomanjkanje fosfata sproži tudi sintezo ekstracelularnih encimov, ki sproščajo organski fosfat iz okolja. Med te encime spadajo fitaze in fosfataze (Santos-Beneit in sod., 2008).

Negativen vpliv fosfata na produkcijo sekundarnih metabolitov se pogosto kaže v negativni regulaciji transkripcije biosinteznih genov. Pri *Streptomyces lividans* in *Streptomyces coelicolor*, fosfat nadzira biosintezo sekundarnih metabolitov preko dvodelnega PhoR-PhoP sistema. PhoR protein je običajna membranska senzorska kinaza, medtem ko je PhoP element DNA-vezavnega regulatorja. PhoP tako regulira transkripcijo z vezavo na promotorje genov, ki se izražajo v odvisnosti od koncentracije fosfata v okolju (phoA, pstS, phoU in phoRP) (Martin, 2004; Santos-Beneit in sod., 2008; Rodríguez-García in sod., 2009). Pri bioprocesu za produkcijo rapamicina ima dodatek 100 mM fosfata (K₂HPO₄) v produkcijsko gojišče pozitiven vpliv na rast, vendar je produkcija rapamicina slaba. Najboljša produkcija je dosežena v gojišču s 5 - 10 mM fosfata (Cheng in sod., 1995). Tudi pri produkciji eritromicina je dodatek fosfata v začetno gojišče povečalo produkcijo eritromicina (Chen in sod., 2013b).

2.6.4 Optimizacija sestave hranil v produkcijskem gojišču

Da lahko pri proizvodnji sekundarnih metabolitov omogočimo optimalne pogoje za produkcijo sekundarnih metabolitov, se v gojiščih uporablja različne kombinacije in koncentracije virov, ki so ključna za donose ciljnega sekundarnega metabolita. Organizmu je potrebno zagotoviti vir ogljika, dušika, fosforja in drugih hranil, ki omogočajo ustrezno rast biomase in se jih nato pretvori v izhodne spojine za biosintezo produkta. Zato se pripravljajo kompleksna gojišča, ki zagotavljajo zadosten vir potrebnih hranil. Običajno se uporablja kompleksna vire ogljika, dušika in dušika, ki običajno vsebujejo tudi druga hranila ter enostavne vire ogljika, dušika in mineralov. S pravo kombinacijo hranil lahko vzdržujemo fiziološko stanje organizma, ki omogoča preživetje in visoko produkcijo sekundarnih metabolitov (Corum in sod., 1954).

Pri produkciji eritromicina ima hkratna uporabe glukoze in amonijevega sulfata ali koruzne namakalne vodice v začetnem gojišču, pozitiven vpliv na produkcijo. Hitra poraba glukoze pogosto zmanjša produktivnost antibiotikov, zato je na primer pri produkciji penicilina bioproces voden z uporabo drugih virov ogljika (npr. laktozo) ali z počasnim dohranjevanjem glukoze. Da se izognemo slabši produkciji, se lahko uporabi kompleksni vir ogljika (npr., škrob, dekstrini) (Martín in Demain 1980; El-Tayeb in sod., 2004a, El-Tayeb in sod., 2004b). Produkcijo sekundarnih metabolitov, pa lahko povečamo tudi z dodajanjem izhodnih spojin v gojišče med bioprocesom. Tako je dodajanje propanola in glukoze med bioprocesom povečalo produkcijo eritromicina, pri tem pa je zopet ključni dejavnik koncentracija, ki je dodana v gojišče (Chen in sod., 2013a).

2.6.5 Vodenje fizioloških parametrov med bioprocesom

Produktivnost bioprocesa pogosto korelira tudi od morfologije kulture, čeprav ni vedno

neposredne povezave. Tipični filamentozni mikroorganizmi s hifami, ki so pogosto razvejane, tvorijo strukturo imenovano micelij. Oblike struktur so od prosto dispergiranih hif do peletov (gosto prepredene hife s premerom do enega centimetra) (Cox in sod., 1998). Vsaka morfološka oblika strukture micelija ima različne vplive na reologijo brozge, kar ima lahko za posledico slabši masni transport in posledično slabšo produktivnost. Kljub dobremu masnemu transportu v gojišču, lahko pri prevelikem obsegu peletov pride, zaradi omejenega masnega transporta do pomanjkanja kisika v notranjosti peleta. Mnogi parametri kot so lastnosti inokuluma, začetna pH vrednost gojišča, mešanje, sestava gojišča in uporaba površinsko aktivnih snovi, vplivajo na obliko strukture micelija (Sarra in sod., 1996; Wang in sod., 2005).

Da lahko bioproces primerno vodimo, merimo procesne parametre, ki nam dajejo informacije o stanju bioprocesa. Pri odločitvah kako bomo vodili proces pa je potrebno upoštevati, da se parametri med seboj povezujejo. Na primer, pri uravnavanju pH vrednosti lahko uporabljamo amonijev hidroksid, v tem primeru vzdrževanje optimalnega pH lahko vpliva na povišano koncentracijo amonija v gojišču, za katerega pa smo že omenili, da ima pomemben vpliv na produkcijo. Drug primer je vzdrževanje koncentracije topnega kisika v gojišču, ki se ga meri s pO₂ sondo. Pri tem se pri vodenju bioprocesa pogosto osredotoča na optimalne in kritične vrednosti raztopljenega kisika, pozablja pa se na stopnjo porabe kisika med bioprocesom (Zhang S. in sod., 2010).

2.7 PRISTOPI ZA POVEČANJE DONOSA ERITROMICINA

2.7.1 Izboljševanje produkcijskega organizma *S. eryhraea* z metodami klasične mutageneze in selekcije

Izboljševanje produkcije eritromicina z aktinomiceto *S. erythraea* poteka že več kot 50 let. Večinoma so industrijske visokodonosne seve razvijali s tradicionalnimi metodami klasične mutageneze in selekcije. Poleg povsem naključne mutageneze so uporabljali tudi racionalen pristop, pri katerem bakterijsko kulturo po izpostavitvi mutagenu nacepimo na trdno gojišče, ki vsebuje toksične metabolne inhibitorje. Primer tovrstnega postopka je pridobitev mutantov, odpornih na 2-deoksiglukozo (DOG), ki imajo pogosto odpravljeno preferenčno porabo glukoze v gojiščih, kjer je na voljo več virov ogljika. Mutanti rezistentni na DOG, imajo pogosto povečano sposobnost produkcije sekundarnih metabolitov (Verstrepen in sod., 2004; Oda in Nakamura, 2009). Seve s povečano produkcijo želenega produkta lahko pridobimo tudi s selekcijo na trdnem gojišču, ki vsebuje antibiotike. Pokazali so, da lahko spontani mutanti *S. erythraea*, rezistentni na antibiotik rifampicin, proizvajajo tudi do štirikrat več eritromicina, kot izhodni sev divjega tipa (Carata in sod., 2009). Ugotovili so tudi, da je donos eritromicina pri teh mutantih najverjetneje povečan zaradi mutacij, ki so nastale v genu za RNA polimerazo, ki je sicer

tarča antibiotičnega delovanja rifampicina. Mutacije po eni strani preprečijo vezavo rifampicina na ciljni protein, hkrati pa bistveno vplivajo na raven transkripcije različnih genov, zato z ustreznimi postopki selekcije lahko identificiramo mutante s povečano sposobnostjo produkcije eritromicina.

Divji tip *S. erythraea* NRRL2338 pri kultivaciji v laboratorijskem merilu tipično ne presega donos eritromicina 100 mg/L. Z več desetletji izboljševanja so uspeli donos bistveno dvigniti, tako da zdaj pri najboljših industrijskih sevih in v optimiziranih pogojih industrijskega bioprocesa z dohranjevanjem ključnih hranil dosega med 7 in 9 g/L (Zou in sod., 2011; Tan in sod., 2013). Kljub velikemu pomenu klasičnih selekcijskih metod pri razvoju izboljšanih sevov pa brez obsežnih sistemskih analiz izboljšanih sevov ne moramo dobiti vpogleda v celične mehanizme, ki so povzročili tako veliko razliko v donosu eritromicina. Šele pred kratkim so na podlagi genoma divjega seva *S. erythraea* NRRL23338 (Oliynyk in sod., 2007) naredili prve primerjalne genomske in transkriptomske analize, ki zdaj omogočajo vsaj delno razumevanje mehanizmov, ki so privedli do izboljšanega donosa (Peano in sod., 2012; Li in sod., 2013). Tovrstne študije, ki dajejo globalni vpogled v razlike v izražanju genov v visokodonosnih sevih, bodo v prihodnje omogočile bolj učinkovito ciljno spreminjanje ključnih metabolnih poti in regulatornih procesov s pristopi metabolnega inženirstva.

2.7.2 Povečevanje donosa eritromicina s postopki metabolnega inženirstva

Zaradi velikega medicinskega in industrijskega pomena eritromicina so poleg klasičnih selekcijskih metod začeli sev S. erythraea izboljševati tudi s postopki metabolnega inženirstva. Poleg tega so biosintezo eritromicina proučevali tudi kot modelni sistem za produkcijo antibiotikov, zlasti za biosintezo poliketidov, ki jih sinteitzirajo poliketid sintaze tipa I (opisano podrobneje v poglavju 2.2). S pristopom metabolnega inženirstva so pokazali, da lahko donos eritromicina v industrijskem sevu S.erythraea bistveno izboljšamo s čezmernim izražanjem gena za bakterijski hemoglobin iz bakterije Vitreoscilla stercoraria (vhb) (Brunker in sod., 1998). Pomembna možnost za izboljševanje donosa eritromicina je tudi povečevanje koncentracije njegovega ključnega gradnika/ izhodne spojine, metilmalonil-CoA. Pokazali so, da čezmerno izražanje celotnega operona, ki vsebuje gena za metilmalonil-CoA mutazo, bistveno poveča donos eritromicina zlasti v gojišču, v katerem je glavni vir ogljika olje (Reeves in sod., 2007). Zanimivo je, da se gojišču, v katerem so glavni vir ogljika ogljikovi hidrati, donos eritromicina poveča tako ob čezmernem izražanju kot pri inaktivaciji genov za metilmalonil-CoA mutazo (Reeves in sod., 2006; Reeves in sod., 2007), kar kaže na veliko kompleksnost metabolnih poti, ki tekom bioprocesa zagotavljajo oskrbo z metilmalonil-CoA.

Pri mnogih aktinomicetah so donos želenih produktov uspešno povečali tudi s čezmernim

izražanjem pot-specifičnih regulatornih genov, ki se nahajajo znotraj genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov (Kuščer in sod, 2007; Lu in sod., 2009; Novakova in sod., 2011; Goranovič in sod., 2012). Pri *S. erythraea* tega pristopa niso mogli uporabiti, saj genska skupina za biosintezo eritromicina ne vsebuje regulatornih genov. Potencial čezmernega izražanja regulatornih genov za dvig donosa eritromicina je tako dolgo ostal neraziskan.

3 MATERIALI IN METODE

Slika 14 prikazuje na kakšen način je potekalo raziskovalno delo.



Slika 14: Shema poteka dela. Figure 14: Experiment flow chart.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča in raztopine

Pri pripravi gojišč in raztopin smo uporabljali produkte proizvajalcev Sigma, Merck, Biolife in Fluka. Vsa gojišča in raztopine smo sterilizirali na 121 °C, čas sterilizacije se je razlikoval in je znašal od 15 do 40 min.

3.1.1.1 Raztopine

<u>0,5 M EDTA pH 8</u>

V 1 litru dH₂O smo raztopili 186,1 g Na₂EDTA×2H₂O. S peleti NaOH smo uravnali pH na 8,0 (Sambrook in Russell, 2001).

50x TAE pufra

V 1 litru dH₂O smo raztopili 242,0 g tris baze , dodali 57,1 mL ledocetne kisline in 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Sambrook in Russell, 2001).

10x elektroforezni pufer za SDS-PAGE

V 1L dH₂O smo raztopili 30,3 g tris baze , 144 g glicina in 10 g natrijevega dodecil sulfata (SDS).

<u>10x založna raztopina za prenašalni pufer</u> V 1L dH₂O smo raztopili 30,3 g tris baze in 144,1 g glicina.

<u>10x Tris s soljo (TBS)</u>

V 1L dH₂O smo raztopili 12,1 g tris baze in 87,8 g NaCl.

0,5 M založna raztopina za fosfatni pufer

Najprej smo pripravili dve raztopini 0,5 M KH₂PO₄ (13,61 g v 200 mL dH₂O) in 0,5 M K₂HPO₄ (17,42 g v 200 mL dH₂O). Nato smo 200 mL 0,5 M K₂HPO₄ uravnali pH na 7,5 z 0,5 M raztopino KH₂PO₄.

<u>20 mM fosfatni pufer</u> Pripravimo iz 0,5 M založne raztopine fosfatnega pufra.

<u>100 mM založna raztopina fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)</u> V 10 mL izopropanola smo raztopili 174 mg PMSF.

Pufer za proteinske vzorce

Zmešali smo 0,5 M fosfatni pufer (100mM), 0,5 M EDTA (20mM) in 100mM PMSF (2mM).

Prenašalni pufer

Zmešali smo 100 mL 10x založne raztopine za prenašalni pufer, 200 mL metanola in do 1 L dopolnili z dH₂O. Hranili smo ga na 4°C.

10x PBS

V 800 mL dH₂O smo raztopili 8 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ in 2,4 g KH₂PO₄. Nastavili pH na 7,4 in dopolnili dH2O do 1 L.

Raztopina za detekcijo proteinov na membrani

V 30 mL 1 % ocetne raztopine smo raztopili 0,03 g barvila Ponceau S.

Pufer za izpiranje

Pripravili smo 20 mM kalijev fosfat in nastavili pH na 7,2-7,5 z dodajanjem raztopine KH₂PO_{4.}

Pufer za katehol test

Zmešali smo 100 mM kalijev fosfat (pH 7,5) in 20 mM EDTA (pH 8,0), ter dodali 10 % aceton (vol./vol.).

<u>Pufer za merjenje katehol dioksigenazne aktivnosti</u> Zmešali smo 100 mM kalijev fosfat (pH 7,5) in 0,2 mM katehol. Katehol smo pripravili kot 20 mM založno raztopino (raztopili smo ga v 96 % etanol) in shranili na -20 °C.

<u>Raztopina TBSM</u> V 200 mL dH₂O smo zmešali 20 mL 10x TBS in 6 g instant posnetega mleka v prahu.

Založna raztopina 1 % DAB

V 10 mL dH₂O smo raztopili 0,1 g 3,3'-diaminobenzidina (DAB) in 0,25mL HCl. Dobro smo stresali, da se je DAB raztopil in shranili na -20 °C.

<u>Raztopina za detekcijo aktivnosti HRP (hrenove peroksidaze)</u> Zmešali smo 1 mL 10x PBS, 10 µl dH2O2, 500 µL 1 % DAB in 9 mL dH₂O.

Agarozni gel

Agarozo (Sigma, electrophoresis grade) smo zatehtali v 1x pufer TAE in jo raztopili v mikrovalovni pečici. Na 100 mL gela smo pred vlivanjem dodali 1 μ L SyberSafe (Invitrogen) barvila.

3.1.1.2 Gojišča

<u>2TY</u>

v 1 litru d H_2O smo zmešali 16 g kazein peptona, 10 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl in z NaOH uravnali pH na 7,0 (Sambrook and Russell, 2001).

Trdno gojišče SM (Soja manitol agar)

V 1 litru d H_2O smo zmešali 20,0 g manitola, 20 g sojine moke in 16 g agarja (Kieser in sod., 2000).

TSB (Tripton soja gojišče)

V 1 litru dH₂O smo zmešali 17 g pepton iz kazeina (tripton), 3 g pepton iz sojine moke, 2,5 g D(+)glukoza, 5 g NaCl, 2,5 g K₂HPO₄, z NaOH smo nastavili pH na 7,3 (Kieser in sod., 2000).

Raztopina elementov v sledovih

V 1 litru dH₂O smo raztopili 40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₃*6H₂O, 10 mg CuCl₂*2H₂O, 10 mg MnCl₂*4H₂O, 10 mg Na₂ B₄O₇*10H₂O in 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O (Kieser in sod., 2000).

<u>R5</u>

V 1 litru dH₂O smo zmešali 103 g saharoze, 0,1 g kislinski hidrolizat kazeina (Difco), 0,25 g K₂SO₄, 10 g glukoze, 5 g kvasni ekstrakt, 10,12 g MgSO₄*7 H₂O, 2 mL raztopina elementov v sledovih, 5,73 g TES pufer in 22 g bakteriološki agar. Po avtoklaviranju smo v sterilnih pogojih dodali še 1,5 mL L-prolina (20 %), 5 mL (1M) CaCl₂*2 H₂O, 0,7 mL (1N) NaOH, 1 mL (0,5 %) KH₂PO₄.

ABSM4

v 1 litru dH₂O smo zmešali 11 g koruznega škroba, 1 g koruzne namakalne vodice, 3 g $(NH_4)_2SO_4$, 3 g NaCl, 3 g CaCO₃ in z NaOH uravnali pH na 7,2 (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

ABVM1

V 20 % končnega volumna dH₂O smo zmešali 30 g koruzne namakalne vodice in segrevali do vrenja. V ohlajeno raztopino smo dodali preostanek destilirane vode in še 30 g saharoze, 4 g (NH₄)₂SO₄, 6 g CaCO₃, pH smo z NaOH ali HCl uravnali na 5,5 (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

ABPM8

V 80 % končnega volumna destilirane vode smo zmešali 36 g sojine moke, 36 g koruznega

škroba, 2,4 g (NH4)2SO4 in uravnali pH na 6,3. Po korekciji pH-ja smo dodali še 7,2 g CaCO₃ zmešanega v 20 % končnega volumna destilirane vode, končni pH je bil 6,8. Na koncu smo dodali še 5 g sojinega olja. Po avtoklaviranju smo tekom procesa dodali še 30 g/L glukoze in 1,2 mL/L n-propanola (industrijsko gojišče v uporabi, Acies Bio).

ABA

V 1 litru dH₂O smo zmešali 25,5 g Anitbiotic base agar A2 (ABA) (Biolife), uravnali pH na 6,9 in kuhali do 80 °C.

3.1.2 Antibiotiki in indikatorji

Tekom doktorske naloge smo pri delu uporabljali tudi različne antibiotike in indikatorje.

Preglednica 1: Antibiotiki in indikatorji, ki smo jih uporabljali pri delu. V preglednici so navedene končne koncentracije v gojiščih, koncentracije založnih raztopin in topila v katerih smo jih shranjevali.

Table 1: Antibiotics and indicators used during this work, with final concentration in medium, stated concentrations of stock solutions and solvents that we used.

Antibiotiki ali indikatorji	Topilo	Založna raztopina (mg/mL)	Končna koncentracija v gojišču (µg/L)
apramicin (Apr)	dH ₂ O	50	50
nalidinska kislina	0,15 M NaOH	25	25
tiostrepton (Tsr)	DMSO	30	30 (trdno gojišče) 5 (tekoče gojišče)
IPTG	dH ₂ O	2,5	10
X-gal	DMSO	20	30

Vse raztopine so bile hranjene na -20 °C. X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktozid) smo uporabljali v kombinaciji z induktorjem IPTG za t.i. modro-beli test. S testom smo ločevali bele klone s plazmidi, ki so imeli gen *lacZ* prekinjen z insertom, od modrih klonov, ki niso imeli z insertom prekinjenega gena *lacZ*.

3.1.3 Bakterijski sevi, encimi in plazmidi

3.1.3.1 Sevi Escherichia coli

Pri delu smo uporabljali naslednje seve E.coli:

DH10β sev vsebuje genotip: F- *mcr*A Δ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*Z Δ M15 Δ *lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ (*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ - *rpsL nup*G (Invitrogen).

ET12567/pUZ8002 sev vsebuje genotip: F- *dam13::*Tn9, *dcm6*, *hsdM*, *hsdR*, *recF143::*Tn1*I*, *galK2*, *galT22*, *ara14*, *lacY1*, *xyl5*, *leuB6*, *thi1*, *tonA31*, *rpsL136*, *hisG4*, *tsx78*, *mtl1 glnV44* (MacNeil in sod., 1992). Vsebuje še plazmid pUZ8002. Sev brez *dam* in *dcm* metilaze je primeren za vnos tuje DNA v seve *Saccharopolyspora*. Pri vnosu DNA ni poškodovana z restrikcijskim sistemom.

3.1.3.2 Sevi Saccharopolyspora erythraea

Pri delu smo uporabljali naslednje seve:

Saccharopolyspora erythraea sev NRRL 23338 divji tip.

Saccharopolyspora erythraea sev ABE1441 industrijski – visokodonosni (Acies Bio d.o.o.).

3.1.3.3 Uporaba encimov

Pri delu smo uporabljali naslednje encime:

Preglednica 2: Encimi, ki smo jih uporabljali med eksperimentalnim delom. Table 2: Enzymes used during experimental work.

ENCIM	UPORABA	VIRI
EcoRI	rezanje DNA	Thermo scientific
PstI	rezanje DNA	Thermo scientific
BglII	rezanje DNA	Thermo scientific
NdeI	rezanje DNA	Thermo scientific
XhoI	rezanje DNA	Thermo scientific
HindIII	rezanje DNA	Thermo scientific
XbaI	rezanje DNA	Thermo scientific
SmaI	rezanje DNA	Thermo scientific
BamHI	rezanje DNA	Thermo scientific
T4 DNA ligaza	ligacija DNA fragmentov	Thermo scientific
Phusion polimeraza	PCR	Thermo scientific

3.1.3.4 Konstrukcija plazmidov

Pri kloniranju in izražanju ciljnih genov smo uporabljali vektor pSet152 za čezmerno izražanje genov (Slika 15), vektor pKC1132 (Slika 16), za inaktivacijo genov (Bierman in

sod., 1992), za testiranje integracijskega mesta smo uporabili pTS55 (Slika 17) (Smokvina et al., 1997) in pAB03 (Slika 19) (Acies Bio d.o.o.) ter za pripravo plazmidov z več geni standardni klonirni vektor pUC19 (Invitrogen) (Slika 18).



Slika 15: Vektor za izražanje pSet152. Vsebuje laktozni operon (LacO) in zapis za α -podenoto gena *lacZ*, gen *acc(3)IV*, za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu, multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka podvojevanja (*oriT*) (Kieser in sod., 2000: 530).

Figure 15: Expression vector pSet152. Contain lactose operone (LacO) and transcript for α -subunit of *lacZ* gene, gene *acc(3)IV* for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site and origin of transfer (*oriT*) (Kieser et al., 2000: 530).



Slika 16: Vektor pKC1132. Vsebuje zapis za α -podenoto gena *lacZ*, gen *acc(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu, multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka podvojevanja (*oriT*) (Kieser in sod., 2000: 566).

Figure 16: Suicide vector pKC1132. Contains transcript for α -subunit of *lacZ* gene, gene *acc(3)IV* for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site and origin of transfer (*oriT*) (Kieser et al., 2000: 566).



Slika 17: Vektor pTS55, vsebuje gen *tsr* za rezistenco na tiostrepton, *amp* gen za rezistenco na ampicilin, *ori* pUC18-začetek podvojenvanja iz vektorja pUC18, *oriT* - mesto začetka podvojevanja, *repSA* - replikaza, *xis* - ekscizionaza, *int* - integrazni gen in integracijsko mesto *attP* od pSAM2 (Smokvina in sod., 1997).

Figure 17: Vector pTS55, contains *tsr*-thiostrepton resistance gene for selection, *amp*-ampicillin resistance gene for selection, *ori* pUC18-origin of replication from pUC18 vector, *oriT* origin of replication, *repSA* - replicase, *xis* - excisionase, *int* - integrase gene and attachment site - *attP* of the pSAM2 (Smokvina et al, 1997).



Slika 18: Vektor pUC19 je plazmid z velikim številom kopij v *E. coli*, ki nosi gen *lacZ*, ki kodira β -galaktozidazo v njem pa se nahaja mesto za kloniranje (MCS; angl. Multiple Cloning Site) in gen *bla* za rezistenco proti ampicilinu (Invitrogen).

Figure 18: Vector pUC19 a high copy number *E. coli* plasmid. Itcontains the *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 19: Vektor pAB03 vsebuje gen *acc(3)IV*, za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu, multiplo mesto za kloniranje, mesto začetka podvojevanja (*oriT*), bakteriofagno integrazo in integracijsko mesto (Acies Bio d.o.o.).

Figure 19: Vector pAB03 contains gene acc(3)IV for a pramycin resistance, multicloning site, origin of transfer (*oriT*), bacteriophage integrase and attachment site (Acies Bio d.o.o.).

Kot konjugativni plazmid za prenos genov v genom *S. erythraea* smo uporabili vektor za izražanje pSet152 z dodanim močnim konstitutivnim promotorjem *PermE**. Za konstrukcijo vektorja za izražanje smo PCR produkte po izolaciji iz reakcijske zmesi rezali z restrikcijskima endonukleazama NdeI in XbaI in ligirali v vektor za izražanje pSet152+*PermE**, ki smo ga prej linearizirali z istima encimoma (poglavje 3.2.3). Za prekinitev genov smo uporabili vektor pKC1132. Za ta vektor smo PCR produkte in vektor rezali glede na potrebe z restrikcijskima encimoma EcoRI in HindIII ali BamHI in XbaI.

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

Table 3: Plasmids prepared in this study.

IME	GEN	DOLŽINA	ANTIBIOTIK	ORGANIZEM
pUC19+eryG	eryG	3694 bp	Ampicilin	E. coli
pABE4	<i>eryKeryG</i>	8407 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE5	eryKeryG eryG	9375 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE6	eryGeryKeryK	9642 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE9	SACE_6479	7169 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE10	SACE_6480	7235 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE11	eryGeryK	8407 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE14	eryG	7166 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE15	eryK	7439 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE19	eryCII	7331 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE20	eryCVI	6959 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE21	BldD	6734 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE23	SACE_6479+6480	8195 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE24	eryKeryGeryK	9642 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE26	eryKeryKeryG	9642 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE37	eryG eryGeryK	9375 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE38	eryGeryKeryG	9375 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE41	eryGeryKeryG	9375 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE43	eryKeryG	8455 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE44	eryG eryGeryK	9375 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE45	eryKeryG eryG	9470 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE104	SACE_5599	6463 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE106	SACE_5599	6490 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE110	ΔSACE_5599	3940 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE112	SACE_5599	7312 bp	Apramicin / Tiostrepton	E. coli/S. erythraea
pABE113	$\Delta SACE_{0044}$	6179 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE115	SACE_2890	4559 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea
pABE116	SACE_3978	4313 bp	Apramicin	E. coli/S. erythraea

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri tej študiji. Informacije v vrstici so: ime oligonukleotidnega začetnika, katero restrikcijsko mesto je vgrajeno in zaporedje.

Table 4: Primers used in this study. Query contain: primer name, which restriction site is integrated and sequence

IME	RESTRIKCL	JSKO ZAPOREDJE
	MESTO	
ChlBup	EcoRI-F	5'-GAA CGG GCA GTC CAG GCG TGT CC-3'
ChlBup	XbaI-R	5'-GGC ACC TGC TGA CTG AGG ACC CTC C-3'
ChlBdn	BamHI-F	5'-AAA AAG CTT TCC TCC TCG GAG CTG GCC GC-3'
ChlBdn	HindIII-R	5'-TCG CCA CGG CCT TGC TGC GAC CG-3'
eryCVI	NdeI-F	5'-AAA AAA GCA TAT GTA CGA GGG CGG GTT CGC CGA-3'
eryCVI	XbaI-R	5'-AAA TCT AGA GTC ATC CGC GCA CAC CGA CGA ACA AC-3'
eryBIV	NdeI-F	5'-GAA ATC GAT CGA GAT GTG CAC GCA ATT -3'
eryBIV	XbaI-R	5'- AAA TCT AGA GCT AGT GCT CCT CGG TGG GGG TCA-3'
eryCII	NdeI-F	5'-AAA AAA GCA TAT GAC CAC GAC CGA TCG CGC CGG-3'
eryCII	XbaI-R	5'-AAA TCT AGA CTC AGA GCT CGA CGG GGC AGC GGT-3'
6480	NdeI-F	5'-AAC ATA TGC GGG TCT TGG TCA CTG GGG G-3'
6480	XbaI-R	5'-AAT CTA GAC CCG GCA CCA GCA CCG CGA G-3'
6479	NdeI-F	5'-GAC GGG GGG AAC ATA TGA CCC GCA GCC GG-3'
6479	XbaI-R	5'-AAT CTA GAC AGC AGT CGG GCC GGA TCG C-3'
eryK	NdeI-F	5'-CGA GGA GAC ATA TGA CCA CCA TCG AC-3'
eryK	XbaI-R	5'-CGT CTA GAG ATG CTG CCC GAC TA-3'
eryG1	XbaI-F	5'-GTC TAG ATC TTC CCC GCG GTG GC-3'
eryG2	NdeI-F	5'- GGA TAC GGC ATA TGA GCG TGA AGC AGA AGT C-3'
eryGrbs	XbaI-F1	5'-GTC TAG ATC TTC CCC GCG GTG GC-3'
eryG	XbaI-R	5'-CGG TGC CGT GCG TCT AGA CCT GCT-3'
5599	NdeI-F	5'-AAA AAC ATA TGG AAC GCT CCG GTG AGG TGC TGG CG-3'
5599	XbaI-R	5'-AAA AAT CTA GAA TTA TGC CCG GGC GAC CAG TTG CCG GTG CT-3'
5599HA	XbaI-R	5'-AAA AAT CTA GAA TTA GGC GTA GTC CGG GAC GTC GTA CGG GTA
		TGC CCG GGC GAC CAG TTG CCG GTG CT-3'
5599stop	EcoRI-F	5'- AAA GAA TTC GTC GGC CTG GTT CCT CGG TGA C-3'
5599stop	HindIII-R	5'- AAA AAA GCT TTG GTC ACC TGG ATG GCG GGC ATC-3'
BldD	NdeI-F	5'-AAA AAA ACA TAT GGG CGA CTA CGC CAA GGC GCT GGG-3'
BldD	XbaI-R	5'-AAA TCT AGA CTC ACT CCT CCC GGG CCG GGC GC-3'
0044	EcoRI-F	5'- AAA GAA TTC TGG AAG GCC ACC GAC GTC CG-3'
0044	<i>Hind</i> III-R	5'- AAA AAG CTT AGG TGT TCT GCA TGG GTG GCA TG-3'
2890	EcoRI-F	5'- AAA GAA TTC GAT CTG GCG TCG GAG CAC GC-3'
2890	HindIII-R	5'- AAA AAG CTT CTC GTG CAT GAC GTC GCA GAA C-3'
3978	EcoRI-F	5'- AAA GAA TTC ACC AGC ACC GGC ACC GAG-3'
3978	HindIII-R	5'- AAA AAG CTT GAG GTC GGC GTT GTG CAG CAG-3'

3.1.3.5 Uporaba protiteles

Za detekcijo proteinov pri prenosu western smo uporabili:

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

3.2 METODE

3.2.1 Shranjevanje sevov S. erythraea in E. coli

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

3.2.2 Vnos plazmidne dna v E. coli in S. erythraea

3.2.2.1 Priprava elektrokompetentnih celic sevov *E. coli*

Za pripravo elektrokompetentnih celic smo določen sev *E.coli*, shranjen pri temperaturi –80 °C, nacepili do posameznih kolonij na agarne plošče 2TY in inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C v inkubatorju. Naslednji dan smo s posameznimi kolonijami inokulirali 7 mL tekočega gojišča 2TY in inkubirali na stresalniku preko noči pri temperaturi 37 °C in 200 rpm. S tako pripravljenim inokulumom smo inokulirali 2 litrske Erlenmajerjeve steklenice s 4 mL inokuluma v 400 mL tekočega gojišča 2TY. Gojili smo jih 2-3 ure na stresalniku pri 37 °C in 220 rpm. Celice so bile pripravljene, ko je OD₆₀₀ dosegla 0,9. Celice smo v kivetah postavili na led za 20 minut in jih centrifugirali v ohlajeni centrifugi (4 °C) pri 4000 rpm, 10 min. Po centrifugiranju smo celice spirali dvakrat, z 200 mL in 100 mL dH₂O z 1 mM HEPES pH 7,0 in enkrat z 97,5 mL 10 % glicerolom z 1mM HEPES pH 7,0. Pri vsakem spiranju smo po resuspendiranju centrifugirali pri 4000 rpm, 10 min in 4 °C. Po zadnjem centrifugiranju so bile celice resuspendirane v 2,5 mL 10 % glicerola/1 mM HEPES pH 7,0. Suspenzijo celic smo razdelili v alikvote po 40 μ L in jih shranili pri temperaturi -80 °C.

3.2.2.2 Transformacija sevov *E. coli*

V 40 μ L elektrokompetentnih celic seva *E. coli* smo dodali plazmidno DNA, nežno premešali in prenesli v sterilno elektroporacijsko kiveto. Celice smo z Micro Pulser Bio-Rad izpostavili električni napetosti 2,5 kV z električno kapaciteto 25 μ F in upornostjo 200 Ω . Celotni volumen elektroporiranih celic smo dodali v 0,96 mL gojišča 2TY in jih inkubirali 45 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo celice razmazali na plošče s trdnim gojiščem 2TY z ustreznim antibiotikom.

3.2.2.3 Konjugacija sevov S. erythraea

Bakterije *E. coli* ET12567 pUZ8002, transformirane z izbranim konstruktom, smo inokulirali v 5 mL gojišča 2TY z ustreznim antibiotikom in jih gojili preko noči na

stresalniku pri temperaturi 37 °C ter 220 rpm. Z 1 mL prekonočne kulture smo inokulirali 20 mL gojišča 2TY in jih gojili do optične gostote 0,4 pri 600 nm. Za konjugacijo smo pripravili celice tako, da smo kulturo celic (E. coli ET12567/pUZ8002) najprej centrifugirali 10 min pri 4500 rpm in nato še 2x spirali s 15 mL gojišča 2TY z vmesnimi centrifugiranji. Na koncu smo jih resuspendirali v 1 mL 2TY brez antibiotikov. Med spiranjem E. coli, smo na ledu odtajali 1 mL spor bakterije S. erthraea, ki smo jih nato 2x spirali s 1 mL 2TY gojišča in vmesnim centrifugiranjem pri 5000 rpm za 5 min. Na koncu smo spore resuspendirali v 1 mL 2TY in jih 10 min inkubirali pri temperaturi 52 °C ter jih takoj za tem ohladili na ledu. Temu je sledila združitev celic in spor v volumskem razmerju 2,5:2 ter razmaz 350 µL suspenzije na plošče s trdnim gojiščem SM s 10 mM MgCl₂. Konjugante smo preko noči inkubirali pri temperaturi 28 °C. Zjutraj smo plošče stehtali in jih prelili z raztopino nalidinske kisline do končne koncentracije 25 µg/g gojišča, za zaviranje rasti E. coli. Plošče smo ponovno inkubirali preko noči pri temperaturi 28 °C. Za selekcijski pritisk smo naslednje jutro plošče prelili še z raztopino apramicina do končne koncentracije 50 mg/g gojišča. Konjugante smo inkubirali še nadaljnjih 12 dni pri temperaturi 28 °C.

3.2.2.4 Subkultivacija konjugantov

Subkultivacijo konjugantov smo uporabljali pri sevih s prekinjenim genom. Konjugante smo inokulirali v kivete s 6 mL ABVM1 gojišča, brez dodanih antibiotikov in inkubirali na stresalniku pri 220 rpm in 30 °C. Po 48 urah smo 5 % inokuluma precepili v nove kivete s 6 mL gojišča ABVM1 in zopet inkubirali na stresalniku pri enakih pogojih. Postopek smo ponovili 4 do 5 krat. Pri tretji, četrti in peti subkultivaciji smo po 48 urah 100 µL brozge nacepili na plošče s trdnim gojiščem ABSM4. Plošče smo inkubirali v inkubatorju pri 30 °C 14 dni. Zrele spore smo pobrali s plošč, naredili redčitve in jih zopet nacepili na plošče s trdnim gojiščem ABSM4. Po 14 dnevih inkubacije na 30 °C, smo osamljene kolonije napikali na plošče z in brez antibiotika. Vsako kolonijo smo napikali na obe plošči na enako mesto, da smo po inkubaciji lahko določili katere kolonije so izgubile plazmid z rezistenco in katere ne. Kolonija, ki je zrasla samo na plošči brez antibiotika, je brez plazmida. Potrditev spremembe v genomu smo preverili s PCR metodo.

3.2.3 Molekularne tehnike

3.2.3.1 Izolacija plazmidne DNA iz E. coli

S celicami posamezne kolonije *E. coli* smo inokulirali 5 mL gojišča 2TY z ustreznim antibiotikom za selekcijo plazmida. Kulturo smo inkubirali preko noči (12 - 20 h) pri 37 °C in 220 rpm. Plazmidno DNA iz *E. coli* smo izolirali s pomočjo izolacijskega kompleta GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma).

3.2.3.2 Pomnoževanje DNA *in vitro* s PCR

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uporabljali za pomnoževanje določenih odsekov DNA.

Reakcijska zmes s končnim volumnom 50 µL je vsebovala:

polimerazni pufer	10 µL
dNTP	5 µL
templetna DNA	1 μL
oligonukleotidni začetniki 1	2,5 μL
oligonukleotidni začetniki 2	2,5 μL
DMSO	1,5 μL
Phusion polimeraza	0.5 µL
ddH2O do končnega volumna	50 µL

Reakcija je potekala v aparatu Professional thermocycler od proizvajalca Biometra. Program pomnoževanja je običajno obsegal 2-minutno začetno denaturacijo DNA pri 98 °C, ki ji sledi 30 ciklov (denaturacija 30 sek pri 98 °C, prileganje oligonukleotidnih začetnikov 15 sek pri 3 °C višji temperaturi od najnižje Tm in podaljševanje verige DNA 30 sek/1kb pri 72 °C). Sledi še končno podaljševnje, 10 min pri 72 °C.

3.2.3.3 Rezanje DNA z restrikcijskimi encimi

Rezanje DNA je običajno potekalo v 10 μ L reakcijske zmesi z DNA in restrikcijskimi encimi (FastDigest encimi od Thermo scientific) (Preglednica 2) v primernem pufru. Reakcija je potekala 1 do 2 uri pri temperaturi 37 °C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom nanašalnega pufra.

3.2.3.4 Ligacija fragmentov DNA

Ligacija fragmentov je običajno potekala v molekularnem razmerju 3:1 (insert:vektor). Ligacije smo običajno izvajali v 15 µl ligacijske mešanice v katero smo dodali 1X T4 ligacijski pufer (Thermo scientific) (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 pri 25 °C)) in 1U T4 ligaze (Thermo scientific) na µg DNA. Reakcijsko zmes smo inkubirali 4 ure pri sobni temperaturi ali preko noči pri 16 °C.

3.2.3.5 Defosforilacija linearnih DNA fragmentov

Kadar smo želeli preprečiti ponovno zlepljanje lineariziranih plazmidov smo s 5'-koncev odstranili fosfatno skupino. V ta namen smo uporabljali alkalno fosfatazo FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) po navodilih proizvajalca Thermo scientific.

3.2.3.6 Fosforilacija DNA fragmentov

Fosforilacija 5'-koncev DNA fragmentov, ki so nastali pri PCR, je omogočila ligacijo s primernim vektorjem. Pri tem smo uporabljali encim T4 DNA kinazo, ki katalizira prenos Pi z ATP na 5'-hidroksilni konec fragmenta. Reakcije smo pripravljali v skladu z navodili proizvajalca New England Biolabs, v 1× pufru za encim T4 DNA kinazo (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol (pH 7.5). V klasično 50 µL reakcijo s 300 pmol 5'-koncev smo dodali 10 U T4 DNA kinaze. Reakcijsko zmes smo inkubirali 30 min pri 37 °C, inaktivacija pa je potekala 20 minut na 65 °C. Fragmente DNA smo naprej uporabili brez dodatnega čiščenja.

3.2.3.7 Agarozna gelska elektroforeza

Za ločevanje DNA fragmentov po velikosti smo uporabljali agarozno gelsko elektroforezo (Sambrook in Russell, 2001). Uporabljali smo elektroforezne kadičke Mini-Sub® Cell GT in Sub-Cell® GT od proizvajalca BioRad. Pripravljali smo od 0,7 do 1,2 % agarozne gele. Agarozo (Sigma, electrophoresis grade) smo zatehtali v 1× pufer TAE in jo raztopili v mikrovalovni pečici. Na 100 mL gela smo pred vlivanjem dodali 1 μ L SyberSafe (Invitrogen) barvila. Vzorce DNA smo nanašali z 1× nanašalnim gelom za DNA (6× Loading Dye, Fermentas). Za določanje velikosti in koncentracije DNA smo uporabljali standarda $\lambda/Hind$ III in GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas).

3.2.3.8 Izolacija DNA iz agaroznega gela

DNA smo po izrezovanju iz agaroznega gela očistili s pomočjo komercialnega kompleta Wizard®SV Gel and PCR clean-up Sysem (Promega) po navodilih proizvajalca.

3.2.3.9 Priprava vzorcev za sekvenciranje

Vzorce za sekvenciranje smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma) in pošiljali 10 µL plazmida v koncentraciji 70 ng/µL) pri sobni temperaturi podjetju Macrogen (Seoul, Korea).

3.2.3.10 Izvedba prenosa po westernu

Izolacija proteinov

Za izolacijo proteinov smo pobrali 2 mL brozge, centrifugirali (3000 g, 5 min), odlili supernatant in s kapalko resuspendirali v 2 mL pufra za čiščenje proteinov. Temu je sledilo ponovno centrifugiranje (3000 g, 5 min). Pri gojiščih, bogatejših s proteini (ABPM8

gojišče), smo čiščenje ponovili 4x. Po čiščenju smo odlili supernatant in resuspendirali usedlino v 0,5 mL pufra za proteinske vzorce. Pri večji količini biomase smo dodali 1 mL pufra. Nadaljevali smo z razbijanjem celic z ultrazvokom (4x 15 sec. s 30 sec. prekinitvami; v primeru 1 mL pufra 5 x 15 sec. s 30 sec. prekinitvami). Celični lizat smo 10 min centrifugirali pri 14000 rpm na 4 °C in supernatant prenesli v novo mikrokiveto. Za zaviranje neželene proteolize so bili vzorci ves čas na ledu.

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Za analizo proteinov smo najprej pripravili vzorce. K 50 μ g proteinov smo dodali ustrezen volumen 6x nanašalnega pufra in 10 minut segrevali pri temperaturi 95 °C. Po tem smo centrifugirali pri 14000 rpm 5 min.

SESTAVINA	LOČEVALNI GEL	KONCENTRACIJSKI GEL
30 % bis-akrilamid	2,82 mL	0,625 mL
1M Tris pH 8,8	1,875 mL	/
1M Tris pH 6,8	/	1,25 mL
10 % SDS	75 μL	50 μL
APS	22,5 μL	15 μL
TEMED*	11,25 μL	7,5 μL
dH2O	2,135 mL	3,075 mL

Preglednica 5: Recepture za pripravo raztopin gelov za ločitev in kopičenje za elektroforezo SDS-PAGE. Table 5: Recipes for preparing Running and Stacking gel solutions for SDS-PAGE.

*TEMED smo v zmes dodali neposredno pred vlitjem, s puhalko premešali in zmes vlili med stekelca. Najprej smo vlili ločevalni gel, nanj vlili dH₂O in počakali, da se je strdil (20-30 min). Temu je sledilo še vlivanje koncentracijskega dela.

Za ločitev proteinov po velikosti, smo pripravili poliakriamidni ločevalni in koncentracijski gel z različno zamreženostjo (Preglednica 5). Gelska elektroforeza je potekala približno 45 min pri 25 mA na gel (uporabili smo elektroforezni pufer za SDS-PAGE). Za določanje molekulske mase proteinov smo poleg vzorcev na gel nanesli tudi 7 µL standarda (Laemmli, 1970).

Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano

Po končani gelski elektroforezi je sledil prenos na nitrocelulozno membrano. Izrezali smo kos membrane enakih dimenzij, kot je bila velikost gela in sestavili sistem za mokri prenos na membrano »Mini Trans-Blot Cell«. Prenos je tekel pri 140-170 mA 75 min.

Po prenosu smo preverili uspešnost prenosa z raztopino Ponceau S za detekcijo proteinov na membranah. Označili smo položaj lestvice molekulske mase proteinov in nato sprali barvilo z dH₂O (2-3 spiranja po nekaj minut). Temu je sledila 40 min blokada v TBSM in hibridizacija primarnih protiteles (protitelo + TBSM; 1:500, 5 ml). Hibridizacija je potekala čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo nadaljevali s spiranjem v 1x TBS (3x 10 min) in hibridizacijo sekundarnih protiteles (protitelo + TBSM; 1:1000, 5 mL). Hibridizacija je potekala 75 min na sobni temperaturi in za tem še 4x spiranje v 1x TBS. Za detekcijo vezanih protiteles smo uporabili raztopino diaminobenzidina (DAB). DAB je v prisotnosti peroksida reagiral s HRP, tako da smo dobili netopno rjavo liso na lokacijah, kjer so bila s peroksidazo konjugirana protitelesa vezana na vzorce proteinov.

3.2.4 Bioinformacijska analiza genov

Za primerjavo zaporedij z zaporedji iz javno dostopnih baz podatkov smo uporabljali programski paket BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), dostopen na spletni strani NCBI (National Center for Biotechnology Information) (BLAST, 2013). Za pregled biosintezne poti in encimov, ki pri tem sodelujejo smo uporabili programski paket in javno dostopno bazo podatkov KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY (KEGG, 2013). Za poravnavo zaporedij smo uporabili javno dostopen program Clustal Omega (EMBL-EBI, 2013).



Slika 20: Potek osveževanja in urejanja baze podatkov (Kanehisa in Goto, 2000: 29). Figure 20: Procedures used to organize and annotate the database (Kanehisa and Goto, 2000: 29).

Bioinformacijska analiza

Preko NCBI je omogočen dostop do programa BLAST, ki je algoritem za primerjavo nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij z zaporedji v javno dostopnih bazah, kot so nukleotidne baze GenBank, EMBL, DDBJ in PDB ter proteinske baze GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR in PRF. Rezultat vsake primerjave je podan v obliki zadetkov, ki so razvrščeni glede na odstotek identičnosti in glede na E-vrednost. E-vrednost ali pričakovana vrednost je parameter, ki nam opiše število zadetkov, ki jih lahko pričakujemo, če bi naključno iskali zaporedje enake velikosti. Višja kot je torej vrednost E, večja je verjetnost, da so zadetki rezultat naključja in da niso homologni iskanemu zaporedju. Torej, nižja kot je E-vrednost, bolj signifikantni so dobljeni rezultati. Kjer rezultati analize niso bili dovolj zanesljivi smo naredili še poravnavo aktivnih mest v aminokislinskem zaporedju s programom BLAST iz baze podatkov "Conserved domains". S poravnavo smo lahko primerjali aktivna mesta v aminokislinskem zaporedju z aktivnimi mesti iz baz podatkov NCBI. Rezultat analize je podan grafično, kjer so izpisane poravnana zaporedja na katerih so označena aktivna mesta (Altschul in sod., 1990).

KEGG je baza podatkov za sistematično analizo funkcij genov. Genomske informacije so shranjene v bazi podatkov "GENES", ki je zbirka genskih katalogov za vse popolnoma sekvencirane in nekatere delno sekvencirane genome z anotacijami genskih funkcij. Višja stopnja funkcionalnih informacij je baza podatkov "PATHWAY", ki vsebuje grafično predstavitev celičnih procesov kot so metabolizem, membranski transport, signalna transdukcija in celični cikel. Baza podatkov se avtomatsko osvežuje in nato ročno pregleda

in uredi (Slika 20). Z uporabo anotacijskega orodja in drugih računalniških orodij se določajo EC številke (numerična klasifikacijska shema za encime, angl. enzyme commission number), določajo se identifikatorji ortologov (angl. ortholog identifiers), vnašajo se novi dokazi iz literature in postavljajo se napovedi glede na strukturo poti (Kanehisa in Goto, 2000).

Analizo smo izvedli tako (Slika 21), da smo glede na podatke, objavljene v literaturi, poiskali v bazi podatkov KEGG – PATHWAY (reference pathway) (KEGG, 2013) ključne encime (tudi EC številke) in referenčno aminokislinsko zaporedje za vsak encim. Referenčno zaporedje smo poimenovali aminokislinsko zaporedje proteina, ki je biokemijsko karakteriziran in je objavljen v bazi podatkov ter je iz seva, ki je taksonomsko najbližje *S. erythraea*. Referenčno aminokislinsko zaporedje smo kopirali v bazo podatkov NCBI in z orodjem BLAST primerjali naše zaporedje z bazo podatkov aminokislinskih zaporedij "non-redundant" (nr) "BLASTP" (Pruitt in sod., 2005).



Slika 21: Shematski prikaz poteka dela za izdelavo sheme domnevnih metabolnih poti.

Figure 21: Schematic reprezentation of aproach to make sheme of putative metabolic pathway.

V prvem koraku smo izbrali možnost primerjave samo z bazo podatkov genoma *S. erythraea* NRRL 23338. Kot rezultat smo dobili zadetke, ki kažejo največje ujemanje z referenčnim zaporedjem. Iz rezultatov smo izbrali zadetek z najvišjim odstotkom identičnosti ter najnižjo E-vrednostjo ter ga s programom "BLASTP" ponovno primerjali z bazo podatkov nr, iz vseh organizmov. V tem koraku smo podprli domnevo, da imajo najbližji homologi identificiranega zaporedje iz *S. erythraea*, identificirani v drugih organizmih, anotirano oziroma biokemijsko potrjeno enako predvideno encimsko aktivnost. Za poravnavo več aminokislinskih zaporedij smo uporabljali program Clustal Omega (Sievers in sod., 2011). Poleg našega vnosa smo izbrali še štiri zaporedja z najvišjim ujemanjem in jih s programom Clustal Omega poravnali. Rezultati poravnav so prikazani grafično in označeni (poglavje Priloge):

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

3.2.5 Kultivacijski pogoji za gojenje različnih sevov

3.2.5.1 Gojenje E. coli

Za gojenje *E. coli* smo uporabljali gojišče 2TY (opis priprave gojišča poglavje 3.1.1.2), ki je po potrebi vsebovalo primeren antibiotik za selekcijo. *E. coli* smo gojili na stresalniku pri 37 °C in 220 rpm. Seve *E. coli* smo gojili tudi na ploščah s 2TY trdnim agarnim gojiščem in po potrebi, s primernim dodatkom antibiotika. Gojili smo jih preko noči v inkubatorju pri 37 °C.

3.2.5.2 Gojenje S. erythraea

Po konjugaciji smo *S. erythraea* za pripravo spor gojili na trdnem agarnem gojišču ABSM4, ki je po potrebi vsebovalo primeren antibiotik. Plošče s trdnim gojiščem smo 14 dni gojili na 30 °C v inkubatorju. Pri pripravi kulture za izolacijo DNA smo *S. erythraea* gojili v tekočem gojišču TSB, ob prisotnosti primernega antibiotika, na stresalniku pri 30 °C in 220 rpm, 2 dni.

Pri določanju produktivnosti, smo za pripravo inokuluma v tekoče vegetativno gojišče ABVM1, inokulirali spore *S. erythraea*, ki so rasle na ploščah ABSM4 (s prisotnim primernim antibiotikom, po potrebi), 14 dni pri 30 °C v stacionarnem inkubatorju. Gojenje kulture v ABVM1 gojišču je potekalo na stresalniku pri 30 °C in 220 rpm. Po dveh dneh

smo inokulum prenesli v tekoče produkcijsko gojišče ABPM8 in gojili kulturo 7 dni na stresalniku pri 30 °C in 220 rpm.

3.2.5.3 Merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaze

Za merjenje aktivnosti reporterskega gena katehol 2,3-dioksigenaze smo seve inokulirali v 5 mL gojišča ABVM1 (s prisotnim primernim antibiotikom, po potrebi) in jih gojili 48 do 72 ur na stresalniku pri 30 °C in 220 rpm. Za merjenje encimske aktivnosti smo 1 mL vzorca centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm, dodali še 1 mL pufra za izpiranje in zopet centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm. Supernatant smo odlili in dodali 0,5 mL pufra za katehol test. Vzorce smo sonificirali pri amplitudi 100 %, 4 x 15 sekund z intervali 30 sek. Po končanem sonificiranju smo dodali 5 μ L 10 % Triton X-100 (da smo dosegli 0,1 % koncentracijo Triton X-100 npr.: 0,5 mL vzorec/5 μ L) jih za 15 min pustili na ledu in centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm. V mikrotitersko ploščo smo odpipetirali 50 μ L supernatanta in dodali 150 μ L pufra za merjenje, temperiranega na 37 °C. Mikrotitersko ploščo smo postavili v inkubator na 37 °C in merili absorbanco pri 375 nm po 10, 20 in 30 minutah.

3.2.6 Analitske metode

3.2.6.1 Ekstrakcija eritromicina iz produkcijske brozge za merjenje z mikrobiološkim testom in LC-MS

Po kultivaciji seva *S. erythraea* divjega tipa (NRRL23338) in iz njega pridobljenih gensko spremenjenih sevov smo v produkcijsko brozgo dodali acetonitril v razmerju 1:1. Po dodatku acetonitrila smo ekstrakcijsko zmes stresali na stresalniku 60 minut pri 220 rpm. Zmes smo centrifugirali 3 minute pri 4500 rpm, prenesli 1,5 mL supernatanta v eppendorf kiveto in jo centrifugirali 10 minut pri 16000 rpm. Za mikrobiološki test smo potem z acetonitrilom pripravili 10-kratne in 20-kratne razredčitve, za analizo z LC-MS smo pripravili 2000-kratno razredčitev.

3.2.6.2 Ekstrakcija eritromicina iz produkcijske brozge za merjenje s HPLC

Pri ekstrakciji produkcijske brozge industrijskega seva ABE1441 in iz njega pridobljenih gensko spremenjenih sevov smo najprej uravnali pH brozge na 9,5 z 1M NaOH. Nato smo v brozgo dodali acetonitril v razmerju 1:1 in stresali na stresalniku 45 minut pri 220 rpm, dodali 1 g NaCl in stresali še 15 minut. Po stresanju smo zmes centrifugirali 3 minute pri 4500 rpm, prenesli 1,5 mL zgornje faze supernatanta v eppendorf kiveto in jo centrifugirali 10 minut pri 16000 rpm. 600 µL supernatanta smo prenesli v stekleno vialo, za merjenje s
HPLC.

3.2.6.3 Mikrobiološki test za določnje koncentracije eritromicina v ekstraktu produkcijske brozge

Za ugotavljanje donosa eritromicina sevov *S. erythraea* NRRL 23338 smo kot testni organizem uporabljali *B. subtilis*. Inokulirali smo 50 mL gojišča 2TY s 100 μ L prekonočne kulture *B. subtilis* in približno 11 h stresali pri temperaturi 30 °C. Ko je optična gostota OD₅₄₀ dosegla vrednost med 1,2 in 1,3 smo brozgo prenesli v kiveto in centrifugirali 11 min pri 3000 rpm. Supernatant smo odstranili, usedlino pa smo resuspendirali v 25 mL 2TY in dodali 2 % suspenzije v gojišče ABA, pred razlivanjem plošč. Plošče smo potem 2 uri hladili pri 4 °C, potem pa z luknjačem naredili v agarni plošči luknje v katere smo dodali 60 μ L ekstrakta produkcijske brozge. Nato smo plošče zopet hladili 2 uri pri 4 °C in inkubirali 18 ur pri 37 °C. Po zaključeni inkubaciji smo izmerili cone inhibicije rasti test organizma. Koncentracijo eritromicina v vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, pripravljene s primerjavo con standarda z znanimi koncentracijami eritromicina.

3.2.6.4 Merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih z visoko zmogljivo metodo tekočinsko kromatografijo (HPLC)

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

Kemikalije in reagenti

Pri kromatografskih analizah smo uporabljali vodo MiliQ (HPLC-grade), acetonitril (J.T. Baker, HPLC-grade, čistost 99 %), metanol (Merck, HPLC-grade, čistost 99 %), 25 % raztopina 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 pH smo nastavili na 9,8 z razredčeno amonijevo raztopino) in komponente B (acetonitril).

Eksterni standard za kvantifikacijo: eritromicin A od European Pharmacopoeia, čistost 98,4 %.

Naprave in pogoji analize za merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih

Pri HPLC analizah smo uporabljali 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).

Uporabljali smo kolono Thermo Hypersil Gold 10x4,6 mm, 5 μ m in predkolono Phenomenex security guard KJ0-4282. 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 μ L.

3.2.6.5 Merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih z metodo tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom (LC-MS)

Za določanje koncentracije eritromicina in deleža eritromicina A ter nečistoč eritromicin B in eritromicin C v ekstraktu produkcijske brozge, smo poleg standardne metode HPLC uporabljali tekočinsko kromatografijo sklopljeno z UV in MS detekcijo. Meritve je izvajal analitski oddelek podjetja Acies Bio d.o.o.

Kemikalije in reagenti

Uporabljali smo vodo MiliQ (HPLC-grade), acetonitril (J.T. Baker, HPLC-grade, čistost 99 %), metanol (Merck, HPLC-grade, čistost 99 %), 25 % raztopina amonijaka (Kemika, HPLC-grade, čistost 98 %), amonijev acetat (Sigma, HPLC-grade, čistost 99 %) in natrijev klorid (Kemika, čistost 98 %). Vse kemikalije so bile uporabljene brez dodatnega čiščenja. Mobilna faza pri gradientni ločbi je bila sestavljena iz komponente A (10 mM amonijev acetat pH smo nastavili na 9,8 z razredčeno amonijevo raztopino) in komponente B (acetonitril).

Eksterni standardi za kvantifikacijo: eritromicin A, B in C, European Pharmacopoeia, čistost 98,4 %.

LC-MS naprava in pogoji analize za merjenje koncentracije eritromicina v vzorcih

Sistem Thermo Finnigan Surveyor+ sestavljajo črpalka z vakuumskim razplinjevalcem, avtomatski vorčevalnik z 10 μ L zanko (metanol se uporablja kot injektorsko topilo), UV detektor, masni detektor Thermo Finnigan TSQ in osebni računalnik s programom ChromQuest za obdelavo UV signala in programom Thermo Excalibur za obdelavo podatkov MS detekcije.

Uporabljali smo kolono Nucleodur HTec C18, 3 μ m (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Dueren, Nemčija). Pogoji gradienta so bili:

- začetni pogoji, čas 0 min: 40 % A in 60 % B,
- gradientno eluiranje od začetnih pogojev narašča komponenta B do 95 % in 5 % komponente A, 20 minut,

 po 20 minutah se kolona 10 min rekondicionira nazaj na začetne pogoje, skupni čas metode je 30 min.

Sistem je deloval pri pretoku 0,5 mL / min, temperatura kolone 30 °C in valovna dolžina detekcije je bila 206 nm. Volumen injektiranega vzorca je bil 10 μ L.

Masni spektrometer je deloval v načinu ESI, pozitivna ionizacija. V načinu SIR (single ion resolution) so bile spremljane mase: eritromcin A: 734, eritromcin B: 718 in eritromcin C 720 g/mol.

3.2.7 Statistična obdelava podatkov

Pri poizkusih z eno spremeljivko (preverjanje vpliva manipulacije genov na produkcijo eritromicina) smo rezultate obdelali s program SAS za statistično obdelavo podatkov po postopku GLM . Pri poizkusih z večimi spremenljivkami (preverjanje vpliva dodajanja različnih nutrientov v gojišče, pri gojenju različnih sevov) smo rezultate prikazali kot povprečne vrednosti koncentracij s standardno deviacijo.

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ GENSKIH ORODIJ ZA TRANSFORMACIJO IN IZRAŽANJE PROTEINOV V S. erythraea

V okviru te doktorske naloge smo želeli s pristopi metabolnega inženirstva vplivati na biosintezo eritromicina v *S. erythraea.* V začetnih korakih smo najprej razvili oziroma optimizirali genska orodja, ki omogočajo učinkovito gensko spreminjanje *S. erythraea.* Osredotočili smo se zlasti na testiranje različnih promotorjev, ki smo jih potrebovali za učinkovito čezmerno izražanje izbranih genov in pa vnos mest za integracijo konstruktov, ki vsebujejo bakteriofagni gen za integracijo v genom bakterije, kar bistveno poveča učinkovitost konjugacije *S. erythraea.*

4.1.1 Testiranje delovanja promotorjev v visokodonosnem sevu ABE1441

Za močno čezmerno izražanje ciljnih genov je potreben močan promotor, ki omogoča relativno intenzivno prepisovanja gena. Testirali smo tri izbrane konstitutivne promotorje za izražanje genov v S. erythraea: PermE nativni promotor gena ermE za rezistenco na eritromicin, PermE* bodisi z ali brez mesta za vezavo ribosoma (Bibb in sod., 1985) in actII-ORF4/PactI promotor iz organizma Streptomyces coelicolor (Fernandez-Moreno in sod., 1991). PermE* promotor je le delno spremenjen PermE promotor, pridobljen z delecijo treh baznih parov v področju -35 regiji (Bibb in sod., 1985). Primernost promotorjev za izražanje genov v S. erythraea smo testirali tako, da smo promotorje ločeno vnesli v vektor pSet152, ki je vseboval poročevalski gen xylE iz Pseudomonas sp. Produkt poročevalskega gena je katehol 2,3-dioksigenaza, encim, ki spreminja brezbarvni katehol v rumeno obarvani produkt 2-hidroksimukonski semialdehid, ki absorbira svetlobo pri 375 nm. Merili smo s pomočjo spektrofotometra pri 375 nm (Zukowski in sod., 1983). Plazmid pUC19+PermE*/xylE je bil pripravljen v okviru doktorske naloge Vasilke Magdevska (Magdevska, 2011). Promotor in gen smo prenesli v plazmid pSet152 z restrikcijo z encimoma EcoRI in XbaI in ligacijo v vektor pSet152, lineariziran z istima encimoma. V plazmidu pSet152 smo nato zamenjali promotor PermE* z različnimi promotorji preko restrikcijskih mest za encima EcoRI in NdeI.

Najprej smo izvedli delno restrikcijo plazmida pSet152+*PermE*/xylE* z restrikcijskim encimom NdeI (parcialno restrikcijo plazmida je bilo potrebno izvesti, ker vsebuje gen *xylE* znotraj zaporedja še eno restrikcijsko mesto *Nde*I, nato pa še rezanje z EcoRI. Slika 22 prikazuje primer tako pripravljenega plazmida, ki vsebuje promotor *PermE**. Pridobljene plazmide smo s transformacijo vnesli v celice *E.coli* sev ET12567/pUZ8002 in jih nato s konjugacijo prenesli v *S. erythraea*. Kolonije, ki so v času 10 - 14 dneh zrasle na

trdnem gojišču SM s 10 mM MgCl₂, prelitim z določenim antibiotikom, smo potem gojili na trdnem sporulacijskem gojišču ABSM4 z istim antibiotikom in jih po 14 dneh uporabili za inokulacijo v 5 mL gojišča ABVM1, prav tako z dodanim ustreznim antibiotikom.



Slika 22: Plazmid pSet152+Perm*xylE za testiranje učinkovitosti promotorjev, vsebuje poročevalski gen xylE, gen acc(3)IV za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu, multiplo mesto za kloniranje, att (phiC31) mesto za integracijo, *int* gen za integrazo, mesto za začetek podvajanja iz pUC18, mesto začetka podvojevanja (*oriT*) in promotor (na sliki, *PermE** z mestom vezave ribosoma).

Figure 22: Plasmid pSet152+Perm*xylE for analyzing promotor strenght, containing reporter gene xylE, gene acc(3)IV for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site, att (phiC31) site for integration, *int* gene for integrase, origin of replication from pUC18 vector, origin of transfer (*oriT*) and promotor (this figure, *PermE** with ribosome binding site).



Slika 23: Vpliv promotorjev *act*II-ORF4/P*act*I (actI - oranžen stolpec), P*ermE* (bordo rdeč stolpec), P*ermE** z mestom vezave ribosoma (rumen stolpec) in *PermE** brez mesta vezave ribosoma (zelen stolpec) na izražanje gena xylE v S. *erythraea* ABE1441. Kontrola (moder stolpec) je sev s plazmidom brez promotorja in gena xylE. Absorbanca (pri 375 nm) vzorcev je bila izmerjena po 10, 20 in 30 minutah encimske reakcije. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 17.

Figure 23: Expression of the *xylE* gene in *S. erythraea* ABE1441 under the regulation of different promoters: *act*II-ORF4/PactI (actI - orange column), *PermE* (bordo red column) and *PermE** with (yellow column) or without (green column) ribosome binding site. Strain containing plasmid without promotor and gene was used as control (blue column). Absorbance at 375 nm was mesured after 10, 20 and 30 minutes of enzymatic reaction. Bars represent median values \pm SD, n = 17.

Po 48 urah gojenja smo vzeli vzorce kultivacijske brozge, jih obdelali in pripravili reakcijsko zmes v kateri je potekala encimska reakcija (podroben opis postopka poglavje 3.2.5.3). Po 10, 20 in 30 minutah encimske reakcije smo reakcijski zmesi z merjenjem absorbance pri 375 nm določili vsebnost rumeno obarvanega produkta (Slika 23), ki je odvisna od aktivnosti katehol 2,3 dioksigenaze, ta pa je odvisna od tega, kako močno je bilo izražanje poročevalskega gena pod določenim promotorjem. Kot kontrolo smo uporabili plazmid brez promotorja in brez gena *xylE*. Najmočnejše izražanje gena je omogočal promotor *PermE** brez mesta vezave ribosoma. Izražanje poročevalskega gena je bilo za 49,7 % močnejše v primerjavi z varianto promotorja *PermE**, ki je imel dodano mesto za vezavo ribosoma. Izražanje gena pod promotorjem *act*II-ORF4/PactI je bilo za 38,5 % in pod promotorjem *PermE* za 90 % šibkejše od *PermE** brez mesta vezave ribosoma. Pri nadaljnjem delu smo zato uporabljali promotor *PermE** brez mesta vezave ribosoma.

4.1.2 Konstrukcija integracijskih mest att v genom *S. erythraea* za vgradnjo vektorjev

Pri analizi genoma bakterije *S. erythraea* smo ugotovili, da att mesti za integracijo bakteriofagov ϕ C31 in ϕ BT ter integracijsko mesto iz plazmida pSAM2 niso prisotna. Prisotno je le t. i. psevdointegracijsko mesto, podobno integracijskemu mestu ϕ C31, ki ima glede na literaturne podatke (Kieser in sod., 2000) in izkušnje v našem laboratoriju bistveno slabšo učinkovitost integracije kot originalno integracijsko mesto. Da bi povečali možnosti za izražanje genov, smo v industrijski visokodonosni sev ABE1441 vnesli dodatna integracijska mesta.



Slika 24: Lokus genske skupine *ChlB* na kromosomu z geni in njihovimi anotacijami. Oznake lokusov so prikazane nad puščicami. Shematsko je prikazana pozicija genske skupine *ChlB* v genomu *S. erythraea*. Centralna regija je prikazana z odebeljeno črto in ne-centralna regija s tanko črto.

Figure 24: Chromosomal locus of *ChlB* cluster with genes and their annotation. Locus tags are indicated above the arrows. The position of *ChlB* cluster in *S. erythraea* genome is schematically represented. The »core« region is marked with bold line and the »non-core« region with thin line.

S primerjavo genomov sevov NRRL 23338 in ABE1441, smo kot ustrezno mesto za vnos integracijskih mest, za katerega nismo pričakovali negativnih posledic na donos eritromicina, izbrali skupino genov *ChlB* (Slika 24). Po podatkih iz literature smo pripravili zaporedja integracijskih mest ϕ C31 (Gupta in sod., 2007), ϕ BT (Gregory in sod., 2003) ter pSAM2 (Alegre in sod., 1994) po katerih so nam jih v podjetju Eurofins (Nemčija) sintetizirali in jih hkrati vgradili v plazmid *E. coli* pUC57. Za vnos integracijskih mest v genom smo pripravili plazmid iz osnovnega ne-replikativnega vektorja pKC1132 za homologno integracijo (Slika 26).



Slika 25: Shematski prikaz integracijskih mest Φ C31, Φ BT1 in pSAM2, ki smo jih vnesli v plazmid pABE57.

Figure 25: Schematic diagram of attachment sites Φ C31, Φ BT1 and pSAM2, which we inserted in plasmid pABE57.



Slika 26: Plazmid pABE57. Vsebuje zapis za α -podenoto gena *lacZ*, gen *acc(3)IV* za rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu, multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka podvojevanja (*oriT*), zapis za *ChlB*Dn in *ChlB*Up, integracijska mesta attB za Φ C31, Φ BT1 in pSAM2.

Figure 26: Plasmid pABE57. Contains transcript for α -subunit of *lacZ* gene, gene *acc(3)IV* for bacterial resistance to antibiotic apramycin, multicloning site and origin of transfer (*oriT*), transkript for *ChlB*Dn and *ChlB*Up, attB attachment sites for Φ C31, Φ BT1 and pSAM2.

Za pripravo plazmida smo najprej namnožili nukleotidni zaporedji *ChlBUp* in *ChlBDn* z oligonukleotidnimi začetniki **ChlBup**-*EcoR*I-F, **ChlBup**-*Xba*I-R, **ChlBdn**-*BamH*I-F in **ChlBdn**-*Hind*III-R. Homologne regije navzgor in navzdol od mesta vstavitve smo namnožili s PCR reakcijo. PCR produkta smo rezali z EcoRI in XbaI (*ChlB*Up) ter BamHI in HindIII (*ChlB*Dn). Z encimi EcoRI in HindIII smo fragment z vsemi tremi integracijskimi mesti izrezali iz plamida pUC57. Po restrikcijski reakciji smo vse fragmente vgradili v vektor pCR2.1, rezan z BamHI in XbaI. Sestavljen fragment (*ChlB*Up-integracijska mesta-*ChlB*Dn) smo izrezali z BamHI in XbaI in vstavili v plazmid pKC1132, ki omogoča konjugativni prenos iz *E. coli* v *S. erythraea*. Pravilnost dobljenega plazmidnega konstrukta (pABE57) (Slika 27) smo preverili z različnimi restrikcijskimi encimi. Konstrukt pABE57 smo vnesli v sev *E. coli* ET12567 s dodatnim plazmidom pUZ8002. Vgradnja restrikcijskih mest v genom (Slika 28) je potekala s homologno rekombinacijo.



Slika 27: Restrikcijska analiza plazmida pABE57 rezanega z restrikcijskim encimoma PstI (vrstica 1) in BgIII (vrstica 2). Velikost DNA fragmentov (bp) označevalcev (vrstica L) in njihova pozicija je prikazana shematsko na levi strani slike. Lisa iz vrstice 1 (PstI) z velikostjo 479 bp se ujema s fragmenti gena *ChlBDn*, lisa z velikostjo 2,0 kb se ujema s fragmenti gena *ChlBUp* in lisa z velikostjo 4,7 kb se ujema s preostanki plazmida pABE57. Lisa iz vrstice 2 (BgIII) z velikostjo 2,4 kb se ujema s fragmenti gena *ChlBUp* in lisa z velikostjo 4,8 kb se ujema s preostanki plazmida pABE57.

Figure 27: The retriction analysis of plasmid pABE57 digested with PstI (Lane 1) and BgIII (lane 2) restriction enzymes. Markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel. Band in lane 1 (PstI) with size 479 bp correspond to *ChlBDn* gen fragments, with size 2,0 kb correspond to *ChlBUp* gen fragments and with size 4,7 kb correspond to plasmid remains pABE57. Band in lane 2 (BgIII) with size 2,4 kb correspond to *ChlBUp* gen fragments and with size 4,8 kb correspond to plasmid remains pABE57.

Plazmid pABE57 ima ORI-mesto za replikacijo v *E. coli* in gen za rezistenco na apramicin, nima pa ORI-mesta za replikacijo v *S. erythraea*, zato je integracija v genom možna samo z rekombinacijo v homologno mesto genske skupine *ChlB*. S subkultivacijo pridobljenih rekombinant, odpornih na apramicin, v tekočem gojišču brez apramicina (podroben opis

poglavje 3.2.2.4) smo dobili t.i. sekundarne rekombinante, ki so v genomu še vedno vsebovali integracijska mesta, preostanek plazmida pABE57 pa je izpadel iz genoma. Tako smo pridobili sev *S. erythraea* ABE11996.

Učinkovitost vstavljenih integracijskih mest smo preverili tako, da smo s konjugacijo vnesli vektorje z geni za različne integraze, ki se integrirajo v različna integracijska mesta. Uporabili smo tri vektorje: pSet152 (z vgrajenim Φ C31), pTS55 (z vgrajenim pSAM2) in pAB03 (z vgrajenim Φ BT1). Vektorje smo z običajnimi postopki konjugacije vnesli v sev ABE11996, ki vsebuje vsa tri integracijska mesta. Po konjugaciji smo reakcijsko zmes redčili in nacepili na plošče s trdnim gojiščem SM s 10 mM MgCl₂. Plošče smo prelilvali z določenimi antibiotiki po enakem postopku kot pri konjugaciji (podroben opis poglavje 3.2.2.3).



Slika 28: Način vgradnje integracijskih mest Φ C31, Φ BT1 in pSAM2 v gensko skupino *ChlB*.

Figure 28: Integration of attachment sites Φ C31, Φ BT1 and pSAM2 in *ChlB* cluster.

Po 14 dneh smo prešteli število zraslih kolonij pri določeni redčitvi (Preglednica 6). V vseh primerih je bila učinkovitost konjugacije večja kot pri izhodnem sevu ABE1441, ki ne vsebuje integracijskih mest in je na plošči s gojiščem zrastlo največ 18 kolonij, brez redčenja mešanice. Konjugacija seva ABE11996 je bila najbolj učinkovita s plazmidom, ki vsebuje integrazo in att mesto faga Φ C31, kjer je pri redčitvi mešanice 4^{-10} zrastlo $7*10^5$ kolonij. Malenkost manjšo učinkovitost integracije omogoča plazmid, ki vsebuje integrazo in att mesto faga Φ BT1, kjer je pri redčitvi mešanice 4^{-10} zrastlo $4*10^4$ kolonij. Precej manjšo učinkovitost integracije smo opazili pri plazmidu, ki vsebuje integrazo in att mesto faga pSAM2, kjer sta zrastli samo dve koloniji, medtem ko konjugacija enakega plazmida v sev ABE1441 ni bila uspešna in tako nismo uspeli dobiti nobenih konjugant.

Preglednica 6: Učinkovitost integracije plazmidov pSet152 (Φ C31), pTS55 (pSAM2) in pAB03 (Φ BT1) v sevih : **A**) ABE11996 z dodanimi integracijskimi mesti Φ C31, pSAM2 in Φ BT1. Število spor uporabljenih v konjugaciji je bilo 5*10⁹ na mL. **B**) ABE1441 brez dodanih integracijskih mest. Število spor uporabljenih v konjugaciji je bilo 2,8*10⁹ na mL.

Table 6: Integration effitiency of plasmids pSet152 (Φ C31), pTS55 (pSAM2) and pAB03 (Φ BT1) in strains: **A**) ABE11996 with added attachment sites Φ C31, pSAM2 in Φ BT1. Number of spores used for conjugation was 5*10⁹ per mL. **B**) ABE1441 without added attachment sites. Number of spores used for conjugation was 2,8 *10⁹ per mL

A)	konstrukt	R 0	R -1	R -2	R -3	R -4	B)	konstrukt	R 0	R -1
	ABE11996 + pSet152	neštevno	neštevno	neštevno	4*10 ⁶	7*10 ⁵		ABE1441 + pSet152	18	0
	ABE11996 + pTS55	2	0	0	0	0		ABE1441 + pTS55	0	0
	ABE11996 + pAB03	neštevno	neštevno	neštevno	5,7*10 ⁶	4*10 ⁴		ABE1441 + pAB03	13	0

4.2 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA GENOV POZNIH STOPENJ BIOSINTEZE ERITROMICINA IN REGULATORNIH GENOV, KI BI LAHKO SODELOVALI PRI REGULACIJI BIOSINTEZE ERITROMICINA

Kljub temu da je bil genom divjega tipa *S. erythraea* (NRRL23338) v celoti sekvenciran že leta 2007, do sedaj še ni bila objavljena celostna bioinformatska analiza genov, ki so udeleženi v pozne stopnje biosinteze eritromicina. Medtem ko je vloga večine genov, ki se nahajajo v eritromicinski genski skupini relativno dobro pojasnjena, je oskrba s substrati, ki so potrebni za pozne stopnje biosinteze eritromicina, slabo raziskana. S pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *S. erythraea*, smo zato v okviru te naloge identificirali verjetne metabolne poti in potencialne regulatorne gene, ki so posredno ali neposredno vpletene v biosintezo gradbenih enot, potrebnih za pozne stopnje biosinteze eritromicina. Na podlagi predvidenih metabolnih poti smo nato primerjali nukleotidni zaporedji javno dostopnega genoma seva divjega tipa NRRL23338 in genoma industrijskega visokodonosnega seva ABE1441 (Acies Bio) v regijah/genih, ki so najverjetneje udeleženi v poznih fazah biosinteze eritromicina in nekaj ključnih razlik tudi potrdili s sekvenciranjem.

Na podlagi rezultatov genomske in proteomske analize, ki smo jo izvedli v Acies Bio v okviru širšega raziskovalnega projekta skupaj z več institucijami kompetenčnega centra BRIN, smo identificirali tudi nekaj domnevnih regulatornih genov, ki bi potencialno lahko vplivali na regulacijo biosinteze eritromicina.

4.2.1 Analiza metabolnih poti za oskrbo s substrati za biosintezo eritromicina

Dve ključni izhodni spojini, ki izhajata iz metabolnih poti primarnega metabolizma in sta vključeni v pozne stopnje biosinteze eritromicina, sta izhodni spojini deoksisladkorjev timidin difosfat-4-keto-6-deoksiglukoza (poglavje 2.4.3.2) in donor metilne skupine Sadenozil metionin SAM (poglavje 2.4.3.3.). Z uporabo algoritma BLAST (postopek je podrobneje opisan v poglavju 3.2.4) smo na podlagi metabolnih poti iz baze podatkov KEGG iskali verjetne funkcijske homologe v genomu S. erythraea (baza podatkov NCBI). Iskanje je temeljilo na predvidenih funkcijskih homologih (v bazi KEGG) oziroma na aminokislinskih zaporedjih encimov iz organizmov, ki so taksonomsko čim bližje S. erythraea in so bili v preteklosti že podrobno analizirani (referenčno zaporedje). Identificirane genske homologe v S. erythraea, ki so bili najbolj ohranjeni, smo s programom Clustal Omega primerjali s homologi iz sorodnih bakterijskih vrst oziroma z zaporedjem podrobno analiziranega encima (slike v prilogi). Pri poravnavi dveh aminokislinskih zaporedji predstavlja identiteta nad 40 % dovolj veliko verjetnost, da so encimske funkcije ohranjene (Tian in Skolnick, 2003; Edgar, 2010). Na podlagi rezultatov analiz smo tako določili gene oziroma proteine, ki najverjetneje sodelujejo pri metabolnih poteh pri S. erythraea in glede na njihove predvidene vloge sestavili verjetne biosintezne poti obeh omenjenih izhodnih spojinah.

4.2.1.1 Biosinteza TDP-4-keto-6-deoksiglukoze pri S. erythraea

Izhodna spojina biosinteze mikaroze in desozamina je TDP-4-keto-6-deoksiglukoza (poglavje 2.4.3.2) (Takahashi in sod., 2006). Primarni metaboliti, ki so vključeni v metabolno pot biosinteze te izhodne spojine, so glukoza in nukleotidi. Metabolne poti, ki so opisane pri drugih bakterijah (White-Phillip in sod., 2009), smo uporabili pri analizi in predložili domnevno biosintezno pot TDP-4-keto-6-deoksiglukoze v *S. erythraea*. V nadaljevanju so opisane posamezne encimske reakcije predvidene metabolne poti (Slika 29) in geni/proteini, ki najverjetneje sodelujejo pri teh reakcijah v *S. erythraea*.

Konverzija glukoze v glukozo-6-fosfat

Prva reakcija v biosintezi TDP-4-keto-6-deoksiglukoze je konverzija glukoze v glukoza-6fosfat (Andersson in Rådström, 2002; White-Phillip in sod., 2009). Na podlagi sheme metabolne poti glikoliza iz baze podatkov KEGG PATHWAY (Glycolysis..., 2013) v metabolizmu to reakcijo katalizirajo potencialno štirje encimi. Heksokinaza (EC:2.7.1.1), polifosfat glukokinaza (EC:2.7.1.63), glukokinaza (EC:2.7.1.2) in od ADP odvisna glukokinaza (EC:2.7.1.147). S programom BLASTP smo v genomu *S. erythraea* našli bližnja homologa za encima glukokinazo in polifosfat glukokinazo, ki najverjetneje



katalizirata fosforilacijo glukoze pri *S. erythraea*. Bližnjih homologov heksokinaze in od ADP odvisne glukokinaze v genomu *S. erythraea* nismo identificirali.

Slika 29: Domnevna biosintezna pot TDP-4-keto-6-deoksiglukoze in verjetni encimi, produkti genov identificirani v genomu *S. erythraea*.

Figure 29: Putative TDP-4-keto-6-deoxyglucose biosynthetic pathway and probable enzimes, products of genes identified in *S. erythraea* genom.

Rezultati analize:

Analiza encima glukokinaza

Baza podatkov KEGG že vsebuje dva anotirana homologa glukokinaz iz S. erythraea. Eden homolog je produkt gena glk s sistematično oznako SACE_1700, drugi pa produkt gena nagC4 s sistematično oznako SACE_7183 (Oliynyk in sod., 2007). BLASTP analiza primerjavo aminokislinskega zaporedja glk glukokinaze iz S. erythraea in S aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov ter poravnav Clustal (priloga A) sta pokazali, da so bližnji homologi tega proteina prisotni tudi v sorodnih vrstah: Saccharothrix espanaensis, Saccharopolyspora spinosa in Actinosynnema mirum in so jih anotirali kot glukokinaze. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je glukokinaza iz bakterije S. coelicolor (Angell in sod., 1994), ki s produktom gena SACE 1700 kaže 45 % identičnost aminokislinskega zaporedja. BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja nagC4 glukokinaze in aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov pokazala, da so homologi tega proteina prisotni tudi v sorodnih vrstah: Saccharopolyspora spinosa, Saccharothrix espanaensis in Actinosynnema mirum in so jih anotirali kot transkripcijski regulator iz družine "represor, odprti bralni okvir, kinaza" (ROK). Primerjava proteina nagC4 z glukokinazo iz bakterije S. coelicolor kaže manjšo 32 % identičnost. Primerjava produka genov SACE 1700 in SACE 7183 kaže 34 % identičnost.

V slabo karakterizirani družini ROK so funkcionalno raznoliki genski produkti med katere spadajo od ogljikovih hidratov odvisni transkripcijski represorji, glikozil-kinaze in še drugi hipotetični proteini. ROK kinaze vsebujejo na N-terminalnem mestu ohranjeno ATP-vezavno mesto. Strukturna podobnost med ROK kinazami in kinazami kaže na zelo verjetno evolucijsko povezanost. ROK kinaze fosforilirajo številne heksoze vključno z glukozo, različne epimere glukoz ter številne acetilirane heksozamine. Strukturno so še slabo ovrednoteni (Conejo in sod., 2010).

E.coli B.subtilis SACE_1700 SACE_7183	44	KVEVKDGCIAIACPITGDWVAMTNHTWAFSIAEMKKNLGFSHLEII <mark>ND</mark> FTAVS 1 SKLDELQKPKHIIKYIGMGAPGPVDMAAGVVYETVNLGWKNYALKNHLE-TE RG-LALRHPVAAVGLAVAGFVSEDRRVVRFAPHLAWRHVAVADRIA-AR AE-LRADADADAIGVVVPGIVDEQRGMGVYSANLGWREEPLR <mark>D</mark> KLA-AR	L05
E.coli B.subtilis SACE_1700 SACE_7183	106	MAIPMLKKEHLIQFGGAEPVEGKPIAVYGAGTGLGVAHLVHVDKRWVSLPG 1 TGIPAVIENDANIAALGEMWKGAGDGAKDVILVTLGTGVGGGIIANGEIVHGINGAGG VELPVVLEHDANAAAIAEQRFGAAAGARVAALVALGTGIGGALVIDGEVFRGAYGVAP FDLPLAFGHDVRAGGLAEARLGAARGMRDVIVMPIGTGIAAALVFNGQIYSA-GGHAG	156
E.coli B.subtilis SACE_1700 SACE_7183	157	EGGHVDFAPNSEEEAIILEILRAEIGHVSAERVLSGPGLVNLYRAIVKADNRLPEN-LK-2 EIGHICSIPEGGAPCNCGKTGCIETIASATGIVRIAKEKIANAKKTTR-LKA ELGHLRLVPD-GRPCPCGKRGCWERYCSGTALVSTVRELQERGDGTAGPLLDE EIGHVD-IGH-GEPCPCGGTGCVEAVASSAAVARRYTARVG	204

Slika 30: Poravnava aminokislinskega zaporedja glukokinaze iz *E. coli, B. subtilis* in *S. erythrae* (SACE_1700 in SACE_7183) z rumeno barvo so označeni aminokilsinski preostanki aktivnega mesta (Lunin in sod., 2004).

Figure 30: Alignment of the aminoacid sequence of the *E. coli*, *B. subtilis* and *S. erythrae* (SACE_1700 and SACE_7183) glucokinase, active site residues are marked with yellow color (Lunin et al., 2004).

Da lahko z večjo gotovostjo trdimo da sta produkta genov SACE_1700 in SACE_7183 glukokinazi, smo poravnali njuni aminokislinski zaporedji z aminokislinskim zaporedjem glukokinaze iz *E. coli* (Slika 30), za katero je bila določena kristalna struktura in identificirani aminokislinski preostanki v aktivnem mestu (Lunin in sod., 2004). Iz poravnave je razvidno, da je večina aminokislinskih preostankov aktivnega mesta ohranjenih.

• Analiza encima polifosfat-glukokinaza

Baza podatkov KEGG že vsebuje anotiran homolog polifosfat-glukokinaze iz S. erythraea, ki je produkt gena ppgK s sistematično oznako SACE_1802 (Olivnyk in sod., 2007). BLASTP analiza s primerjavo aminokislinskega zaporedja polifosfat-glukokinaze iz S. erythraea in aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov ter poravnava Clustal, (priloga B) sta pokazali, da so vsi bližnji homologi tega gena prisotni tudi v vrstah: Saccharopolyspora spinosa, Actinopolyspora mortivallis sorodnih in Actinopolyspora halophila in so jih anotirali kot polifosfat-glukokinaze. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je polifosfat-glukokinaza iz bakterije Arthrobacter sp. (Mukai in sod., 2004), ki s produktom gena SACE 1802 kaže 54 % identičnost.

Konverzija glukoza-6-fosfata v glukoza-1-fosfat

Druga reakcija v biosintezi TDP-4-keto-6-deoksiglukoze je konverzija glukoza-6-fosfata v glukoza-1-fosfat (Slika 29) (Andersson in Rådström, 2002; White-Phillip in sod., 2009). Na podlagi sheme metabolne poti glikoliza iz baze podatkov KEGG PATHWAY (Glycolysis..., 2013) v metabolizmu to reakcijo katalizira encim fosfoglukomutaza (EC: 5.4.2.2). Izbrali smo referenčno aminokislinsko zaporedje biokemijsko karakterizirane fosfoglukomutaze iz *Bacillus subtilis* (Maino in Young, 1974).

Rezultat BLASTP analize tega zaporedja z bazo podatkov genoma *S. erythraea* je prikazal eno zaporedje s stopnjo identičnosti 37 %. Protein je anotiran kot fosfo-sladkor-mutaza in je produkt gena *pmmB* s sistematično oznako SACE_6548 (Oliynyk in sod., 2007). Zadetki BLASTP analize je s primerjavo aminokislinskega zaporedja fosfoglukomutaze iz *S. erythraea* (SACE_6548) z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov idenificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga C) iz sorodnih vrst *Amycolatopsis methanolica*, *Amycolatopsis* sp. in *Amycolatopsis benzoatilytica*, ki so anotirana kot fosfomanomutaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je fosfoglukomutaza iz bakterije *Lactobacillus casei* (Sanfélix-Haywood in sod., 2011), ki s produktom gena SACE_6548 kaže 45 % identičnost.

Domnevo, da je produkt gena SACE_6548, fosfoglukomutaza, smo preverili še z podrobno poravnavo aminokislinskih preostankov v aktivnem mestu. Poravnali smo aminokislinska zaporedja fosfoglukomutaz različnih organizmov z aminokislinskim zaporedjem iz *S. erythraea* (gen SACE_6548) (Slika 31). Analiza je pokazala, da so glede na zaporedja iz ostalih organizmov, prisotni vsi aminokislinski preostanki v aktivnem mestu SACE_6548.

s.	erythraea	53.[2].TF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GL <mark>R</mark> GP	VRAG.	121	. [20]. IQITA <mark>SHN</mark> PPQDNGY <mark>K</mark> LYL.
в.	linens	58.[2].AF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRGE	IAAG.	126	. [20]. VMVTA <mark>SHN</mark> PPDDNGY <mark>K</mark> VYL.
Р.	acnes	58.[2].TF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRAA	LGPG.	126	. [20]. VMVTA <mark>SHN</mark> PPADNGY <mark>K</mark> VYL.
F.	alni	60.[2].RF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRGP	LRAG.	157	.[20].VMVTA <mark>SHN</mark> PATDNGY <mark>K</mark> VYL.
s.	tropica	57.[2].TF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRGP	LRAG.	124	.[20].VMVTA <mark>SHN</mark> PPQDNGY <mark>K</mark> VYL.
м.	turbekulosis	34 .[2].AF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRGH	LRGG.	102	.[20].IQITA <mark>SHN</mark> PATDNGY <mark>K</mark> VYV.
R.	jostii	36.[2].SF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GLRGP	VRAG.	104	.[20].VQITA <mark>SHN</mark> PAADNGY <mark>K</mark> VYL.
c.	efficiens	31 .[2].SF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GMRAP	VGPA.	122	.[20].VQITA <mark>SHN</mark> GAADNGY <mark>K</mark> VFL.
s.	cerevisiae	52 .[2].QF <mark>G</mark> T <mark>A</mark>	GL <mark>R</mark> SQ	MQAG.	120	. [20]. VMITA <mark>SHN</mark> PKMDNGY <mark>K</mark> VYY.
s.	erythraea	269 .[22].IAL <mark>E</mark>	PDADR	CALGI.	351	VSSTMLRSIAQ. [5]. YDETLTGFKWLVRA
в.	linens	293 .[22].IAN <mark>E</mark>	PDADR	FSAAI.	400	VSSRGLAAAAC. [5].VISTLTGFKWISRV
Р.	acnes	276 .[22].IAS <mark>E</mark>	PDADR	CAVAA.	353	VSSTCLGRMAK. [5]. HHMTLTGFKWIGRV
F.	alni	335 .[22].LAT <mark>e</mark>	PDADR	CAVAV.	407	VSSSGLRALAR. [5]. YRETLTGFKWIMRA
s.	tropica	282 .[22].IAN <mark>E</mark>	PDADR	CAVVI.	368	VSSALLRAMCT. [5]. YDETLTGFKWIVRA
М.	turbekulosis	252 .[22].IAL <mark>E</mark>	PDADR	CAVGI.	336	VSSRMLAAIAA. [5]. HVETLTGFKWLARA
R.	jostii	252 .[22].LAL <mark>E</mark>	PDADR	CAVGV.	330	VSSDLLGKLAE. [5]. FARTLTGFKWLVRA
c.	efficiens	279 .[2	22].FAL <mark>C</mark>	PDADR	CAVGI.	361	VSSQLLRVIAE. [5]. YQETLTGFKHLSRA
s.	cerevisiae	294 .[22].VAN <mark>E</mark>	PDADR	FSVAV.	383	VSSQMIKKMAE.[5].YEDTLTGFKWIGNR
s.	erythraea	381 .[7].LVYA	Y <mark>E</mark> E <mark>A</mark> L	GHCVD.	424	.[76].LRVVI <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> C 515
в.	linens	430 .[2].LVFG	GY <mark>E</mark> EAL	GYCVD.	468	.[83].SRVIV <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> C 566
Р.	acnes	383 .[2].LVFG	SY <mark>E</mark> EAI	GYCCD.	421	.[83].VHVVT <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> C 519
F.	alni	437 .[3].LVFG	SY <mark>E</mark> EAL	GYALV.	476	.[93].DRVTF <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> V 584
s.	tropica	398 .[6].LVYG	SY <mark>E</mark> EAL	GYCVA.	440	.[76].ARVVI <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> A 531
м.	turbekulosis	366 .[7].LVYA	Y <mark>E</mark> EAI	GHCVD.	409	.[76].VRVAV <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> C 500
R.	jostii	360 .[3].LVYA	Y <mark>E</mark> EAI	GHCVD .	399	.[80].VRMVV <mark>R</mark> P <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> C 494
c.	efficiens	391 .[7].LAFA	Y <mark>E</mark> EAV	GTCPA.	434	.[75].LRVIV <mark>R</mark> V <mark>SGT</mark> EAKA <mark>K</mark> I 524
s.	cerevisiae	413 . [10].VPFG	F <mark>E</mark> EAI	GYMFP.	458	.[110].IRFTI <mark>R</mark> G <mark>SGT</mark> EPKL <mark>K</mark> V 583

Slika 31: Poravnava aminokislinskega zaporedja fosfo-sladkor-mutaza (SACE_6548), z rumeno barvo so označeni aminokislinski preostanki aktivnega mesta (Chhabra in sod., 2012).

Figure 31: Alignment of the aminoacid sequence of the phospho-sugar mutase (SACE_6548), active site residues are marked with yellow color (Chhabra et al, 2012).

Konverzija glukoza-1-fosfata v TDP-D-glukozo

Tretja reakcija (Slika 29) je konverzija glukoza-1-fosfata v TDP-D-glukozo (Sivaraman in sod., 2002; Han in sod., 2006). Na podlagi sheme metabolne poti deoksisladkorjev iz baze podatkov KEGG PATHWAY (Polyketide..., 2013) v metabolizmu to reakcijo katalizira encim glukoza-1-fosfat-timidilil-transferaza (EC:2.7.7.24). Kot referenčno aminokislinsko zaporedje smo izbrali encim schS6 iz *Streptomyces* sp. SCC-2136 (Han in sod., 2006). En zadetek BLASTP analize tega zaporedja z bazo podatkov genoma *S. erythraea* je zaporedje s stopnjo identičnosti 41 %. Protein je anotiran kot glukoza-1-fosfat-timidilil-transferaza in je produkt gena *rfbA* s sistematično oznako SACE_6883 (Oliynyk in sod., 2007). BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja glukoza-1-fosfat-

timidilil-transferaza iz *S. erythraea* (SACE_6883) z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga D) iz sorodnih vrst *Saccharomonospora saliphila*, *Amycolatopsis balhimycina* in *Streptomyces venezuelae*, ki so anotirana kot glukoza-1-fosfat-timidilil-transferaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je glukoza-1-fosfat-timidilil-transferaza iz bakterije *Mycobacterium smegmatis* (Qu in sod., 2007), ki s produktom gena SACE_6883 kaže 60 % identičnost.

Konverzija TDP-D-glukoze v TDP-D-4-keto-6-deoksiglukozo

Zadnja stopnja v predvideni metabolni poti (Slika 29) je konverzija TDP-D-glukoze v TDP-D-4-keto-6-deoksiglukozo (Lombo in sod., 1997; Doumith in sod., 2000). Na podlagi sheme metabolne poti deoksisladkorjev iz baze podatkov KEGG PATHWAY (Polyketide..., 2013) v metabolizmu to reakcijo katalizira encim TDP-D-glukoza-4,6-dehidrataza (EC:4.2.1.46). Encim je bil v *S. erythraea* že identificiran (Vara in Hutchinson, 1988; Linton in sod., 1995). Protein je določen kot TDP-D-glukoza-4,6-dehidrataza in je produkt gena *aveBII* s sistematično oznako SACE_6480 (Oliynyk in sod., 2007).

4.2.1.2 Biosinteza S-adenozil-L-metionina pri S. erythraea

Pri biosintezi eritromicina predstavlja *S*-adenozil-L-metionin (SAM) neposredni vir metilne skupine za metilacijo biosinteznih intermediatov (Fontecave in sod., 2004). Za razumevanje oskrbe z metilno skupino, pa je ključna biosintezna pot nastanka SAM oziroma cikel reakcij (Slika 32), ki vodijo do recikliranja z metilno skupino »nabitega« SAM. Kot prvo stopnjo v ciklu sinteze SAM smo izbrali nastanek S-adenozil-L-homocistein, ki sovpada s prehodom metilne skupine s SAM na akceptor (Lu, 2000).

Konverzija S-adenozil-L-homocisteina v L-homocistein

Pri metilaciji se donor metilne skupine SAM pretvori v S-adenozil-L-homocistein, ta pa se pri naslednji reakciji pretvori v L-homocistein (Lu, 2000). V bazi podatkov KEGG PATHWAY (Cysteine..., 2013) je na podlagi sheme metabolne poti cisteina razvidno, da to reakcijo katalizira encim adenozilhomocisteinaza (EC: 3.3.1.1). Izbrali smo referenčno aminokislinsko zaporedje encima iz *M. tuberculosis* (Reddy in sod., 2008). BLASTP analiza tega zaporedja z genomom *S. erythraea* je prikazala dva zadetka s stopnjo identičnosti 75 in 71 %. Oba proteina sta anotirana kot S-adenozil-homocistein-hidrolaza in sta produkta genov *sahH* s sistematičnima oznakama SACE_3897 in SACE_6450 (Oliynyk in sod., 2007). Poravnava aminokislinskih zaporedij SACE_ 3897 in SACE_6450 je pokazala, da imata zaporedji stopnjo identičnosti 73 %. BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskih zaporedij S-adenozil-homocistein-hidrolaz SACE_6450 in SACE_3897 z



aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja,

Kirm B. Pozne stopnje biosinteze eritromicina pri aktinobakteriji Saccharopolyspora erythraea.

Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2014

Slika 32: Domnevna biosintezna pot SAM. Figure 32: Putative SAM biosynthetic pathway

med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga E) iz sorodnih vrst *Rhodococcus erythropolis, Amycolatopsis nigrescens* in *Streptomyces* sp., ki so anotirana kot S-adenozil-homocistein-hidrolaza.

Konverzija L-homocisteina v L-metionin

Druga reakcija je konverzija L-homocisteina v L-metionin. Pri tej reakciji se na Lhomocistein veže metilna skupina s 5-metiltetrafolata (Lu, 2000). V metabolizmu ta konverzija lahko poteka z enim od štirih encimov: betain-homocistein S-metiltransferaza (EC:2.1.1.5), homocistein S-metiltransferaza (EC:2.1.1.10), metionin sintaza (EC:2.1.1.13) in 5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-S-metiltransferaza (EC: 2.1.1.14). V genomu *S. erythraea* smo z analizo BLASTP identificirali homologe homocistein Smetiltransferaze, metionin-sintaze in 5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-Smetiltransferaze:

• homocistein S-metiltransferaza

Homocistein-metil transferaza katalizira vezavo metilne skupine na L-homocistein, pri čemer je donor metilne skupine SAM. Produkta reakcije sta L-metionin in S-adenozil-Lhomocistein (Balish in Shapiro, 1967). Za referenčno zaporedje smo izbrali aminokislinsko zaporedje encima iz *E. coli* (Hayashi in sod., 2006). V genomu *S. erythraea* smo identificirali eno zaporedje s stopnjo identičnosti 64 %. Protein je anotiran kot homocistein metiltransferaza in je produkt gena *mmuM* s sistematično oznako SACE_3890 (Oliynyk in sod., 2007). Seveda pa ta reakcija ne omogoča oskrbe s prosto metilno skupino za biosintezo eritromicina, saj je vir metilne skupine molekula SAM, ki je hkrati tudi substrat za metilazo EryG, ki pretvarja eritromicin C v eritromicin A.

BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja homocistein metiltransferaze iz *S. erythraea.* (SACE_3890) z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga F) iz sorodnih vrst *Mycobacterium avium, Saccharopolyspora spinosa, Streptomyces chartreusis* in *Streptomyces hygroscopicus*, ki so anotirana kot homocistein metiltransferaza.

• metionin sintaza

Metionin sintaza (od kobalamina odvisna sintaza) katalizira vezavo metilne skupine na Lhomocistein. Donor metilne skupine je 5-metiltetrahidrofolat, ki se pri reakciji pretvori v tetrahidrofolat (Matthews in sod., 2003; Ubhi in sod., 2011). Za referenčno zaporedje smo izbrali aminokislinsko zaporedje encima iz *E. coli* (Old in sod., 1990, Hayashi in sod., 2006). V genomu *S. erythraea* smo s programom BLASTP identificirali eno zaporedje s stopnjo identičnosti 32 %. Protein je anotiran kot metionin sintaza in je produkt gena *metH* s sistematično oznako SACE_3898 (Oliynyk in sod., 2007). BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja metionin sintaza iz *S. erythraea* (SACE_3898) z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga G) iz sorodnih vrst *Actinopolyspora halophila*, *Actinoalloteichus spitiensis, Mycobacterium tuberculosis* in *Pseudonocardia dioxanivorans*, ki so anotirana kot metionin sintaza. Biokemijsko karakteriziran je samo homolog iz *E. coli*.

• 5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-S-metiltransferaza

5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-S-metiltransferaza (od kobalamina neodvisna metionin sintaza) katalizira vezavo metilne skupine na L-homocistein. Enako kot pri metionin sintazi je donor metilne skupine 5-metiltetrahidrofolat, ki se pri reakciji pretvori v tetrahidrofolat (Matthews in sod., 2003; Suliman in sod., 2005). Za referenčno zaporedje smo izbrali aminokislinsko zaporedje encima iz E. coli (Hayashi in sod., 2006). V genomu S. erythraea smo s programom BLASTP identificirali dve zaporedji s stopnjo identičnosti 48 %. Oba proteina sta anotirana kot 5-metiltetrahidropteroiltriglutamathomocistein S-metiltransferaza in sta produkta genov metE s sistematičnima oznakama SACE_4744 in SACE_6349 (Oliynyk in sod., 2007). Poravnava aminokislinskih zaporedij SACE_4744 in SACE_6349 je pokazala (poravnava Clustal, priloga H), da imata aminokislinski zaporedji stopnjo identičnosti 76 %. BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskih 5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-Szaporedij metiltransferaza SACE_6349 in SACE_4744 z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga H) iz sorodnih vrst Mycobacterium tuberculosis in Amycolatopsis orientalis, ki so anotirana kot 5-metiltetrahidropteroiltriglutamathomocistein-S-metiltransferaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je iz bakterije Streptococcus mutans (Fu in sod., 2011), ki s produktom gena SACE_4744 kaže 45 % indentičnost, s produktom gena SACE_6349 pa 43 % identičnost.

Konverzija L-metionina v S-adenozil-L-metionin

Tretja reakcija je konverzija L-metionina v S-adenozil-L-metionin (Lu, 2000), ki jo katalizira encim metionin adenoziltransferaza (EC: 2.5.1.6). Za referenčno zaporedje smo izbrali aminokislinsko zaporedje encima iz *S. coelicolor* (Bentley in sod., 2002). V genomu *S. erythraea* smo s programom BLASTP identificirali dve zaporedji s stopnjo identičnosti 78 in 75 %. Oba proteina sta anotirana kot metionin adenoziltransferaza in sta produkta *metK* genov s sistematičnima oznakama SACE_2103 in SACE_3900 (Oliynyk in sod., 2007). Poravnava aminokislinskih zaporedij SACE_2103 in SACE_3900 je pokazala (poravnava Clustal, priloga I), da imata zaporedji stopnjo identičnosti 87 %. BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja metionin adenoziltransferaze

SACE_2103 in SACE_3900 z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja, med katerimi so zelo ohranjena zaporedja (poravnava Clustal, priloga I) iz sorodnih vrst *Pseudonocardia dioxanivorans* in *Saccharomonospora cyanea*, ki so anotirana kot metionin adenoziltransferaza. Najbližji homolog, ki je že bil biokemijsko karakteriziran, je iz bakterije *Mycobacterium smegmatis* (Berger in Knodel, 2003), ki s produktom genov SACE_2103 in SACE_3900 kaže 80 % identičnost.



Slika 33: Genska skupina genov, ki domnevno sodeluje pri biosintezi SAM. Figure 33: Gene cluster, putatively involved in SAM biosynthetic pathway

4.2.2 Identifikacija potencialnih regulatornih genov na podlagi rezultatov primerjalne transkriptomske in proteomske analize

Regulacija biosinteze eritromicina v *S. erythraea* je še vedno slabo raziskana, saj eritromicinska genska skupina ne vsebuje regulatornih genov (poglavje 2.5). V času izvajanja te doktorske naloge je v okviru Kompetenčnega centra Brin potekala tudi celostna primerjava divjega (NRRL23338) in visokodonosnega (ABE1441) seva *S. erythraea*, v okviru katere so Acies Bio, Nacionalni institut za biologijo, Institut Jožef Stefan in Biotehniška fakulteta z metodami sistemske biologije analizirali ključne razlike med obema sevoma. V sklopu primerjalne transkriptomske in proteomske analize (doktorska naloga Katarine Karničar v pripravi) smo identificirali več verjetnih genskih homologov, ki so bili v visokodonosnem sevu močneje izraženi kot v divjem sevu. Največjo razliko v izražanju smo opazili pri verjetnem genu SACE_5599, zato smo ta verjetni gen preučili najbolj podrobno (poglavje 4.3.4.1). Znatno povečanje izražanja v visokodonosnem sevu smo opazili tudi pri verjetnih genih SACE_0044, SACE_2890 in SACE_3978.

4.2.2.1 Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_5599

Poravnava aminokislinskega zaporedja SACE_5599 in njegovih homologov iz drugih

Slin W007 Sery Shim Stsu Faln K744 Sniv Sgri Scla	MVRSNLSVADRCGTSAVNGRVKTGEDGVLVTRVGLRIPAVLNF MLATRVGLRISAGLDY MERSGEVLATQVGLQFPHSLFF MMNQSSDLDRPKVVLFGKRPD-AERQRRTGPADTRG-QVLTTNVGLRIPVGLTF MMNQIEGRENSDVLTSRAEPEGVPRARRPGQQGPRLPQVLTTKVGLHIPPGLAF MGRGMTVSNSVSYSASAMVRDRHAGARPPQQRHPSDERILTTKNGLHIPEGLSF MVASGRTASKGRGNGATPVRPTAGDATPVDSQQPSDTTYGGLE-VSAERTRLRIPRDLSL MHNAMTAGDGARVLSGGGGPEALGEVERTSLRLPRDMTI MERYGQYRSARRTGAAPHGPPGGPNGVERGGARSLQNRLGITDGVYAGQVELRIPAGLPF	43 16 22 52 16 55 54 59 39 60
Slin	DTMERAGRHIARVADSSANCLGDWIIYGQTRYSDRYRRAVEAAGLDYQTIRNYANVARRF	103
W007	EVWERAGQRIARVADSSAWCLGDWIIYGESRYTDRYRRAVKAAGLDYQTIRNYAWVARSF	/6
Sery Shim	DDWERAGROLSSTVNSSSWU.GDWLVYGKHHYTDRYORGTRTAGLOYOTLRNYAWVSRF	112
Stsu	DEWERSGROLAGVLDSSSWULGDWLVYGKDHYTDRYORGIRAVGLSYOTLRNYAWVARRF	76
Faln	EDWERAGRQLSGLIDSSSWWLGDWLIYGKDQYVDRYERGIRAAGLQYQTLRNYSWVCRRF	115
K744	SE <mark>W</mark> KVAGRRLSGILDSSC <mark>W</mark> WLGD <mark>W</mark> LVFGKEQYSD <mark>R</mark> YQ <mark>R</mark> GVEAVNLSYQTL <mark>R</mark> NYA <mark>W</mark> VARRF	114
Sniv	EA <mark>W</mark> CRLGGRILAVCDSSV <mark>W</mark> WIGD <mark>W</mark> LVFGQNQYGD <mark>R</mark> YRRAMKETKLDYQTLRNYAWVARKF	119
Sgri	AAWQRLGERIAGLSDSSAWWIGDWLVFGQERFPDRYKRAMAETTLDYQTLRNYAWVARRF	99
Scla	DS <mark>M</mark> CRLGSQIKRVSESSV <mark>M</mark> WLAD <mark>W</mark> LVFGEEEYPDRYQVVIKRTSLSYQTL <mark>R</mark> NYA N VARKF	120
Slin	DLS <mark>RRR</mark> EALSFQHHAEVAALPEEQQDH <mark>W</mark> LEQAERHE <mark>W</mark> SRNEL <mark>R</mark> RNV <mark>R</mark> GARGQKKSDTRRD	163
W007	DQS <mark>RRR</mark> SSLSFQHHAEVAALAPEQQDY <mark>W</mark> LDQSKRFG <mark>W</mark> SRNEL <mark>R</mark> KNV <mark>R</mark> GAQ-RGKPAPAAV	135
Sery	ELS <mark>RRR</mark> DKLSFQHHAEVAALPVDQQDR <mark>W</mark> LDRAEEAG <mark>W</mark> SRNQL <mark>R</mark> QHIRNSR-LAVQGAGSV	141
Shim	ELHRRRPALTFQHHAELASLSIEEQDQ <mark>W</mark> LDRAEQMGWTTKQLRHALRLAR-EDDINHGRA	171
Stsu	DLTRRRSALSFQHHAELASMPVEEQDFWLDRAEQRQWTTKQLRGALRAAR-RGEEPPKAP	135
Faln	DMPRRRSALSFOHHAELASLPVDEQDAWLDRAEHLKWTTKQLRNAVRAGR-QRVAGPTST	172
K/44 Spiv	PLEKKRAQLSFQHHSEIASLPDDEQEQWLDEAEARSWITKQLKSAVRMAQ-HNGLSEGDA	177
Sari	VPDBBCAGLTFOHHMEVAALTEEEODHWLDFASRLSWSRNELRKOVBASRESADEKDE	157
Scla	PVARRRDALSLQHHAETAALPADEQDRWLERAERERWSARRLRRELRG-HHAVDGGAA	177
Slin	ADVLSRTTPEAERVERWRTAAERSGASLEEWTCARLDFAASLVLOTOAEDAR	215
W007	PEAVPQIKASPERVQRWRLAAERSGNTLEGWISARLDAAAAVMLG-LAQDAP	186
Sery	ERAMPAIQVTSE <mark>R</mark> LER <mark>W</mark> QRAAERAGSSIES <mark>W</mark> IVANLDSAAGRVLEEADQPPRQVE	196
Shim	TEPTRQLAVPGN <mark>R</mark> LQW <mark>W</mark> HKAAELSGTDLEQ <mark>W</mark> VLATLDRAAERALEEVVEEPQEIS	226
Stsu	AGPSRRLEVPGNRLQWWHRAAEQSGIAFDQWVMTTLDSAAAHALEEPGGPQEPREPREIP	195
Faln	AIAPRALVLPDHRLQRWHTAAIQVGSELSAWVTTTLDAAASQVLKDRKAEPELPR	229
K744	SMKQLAVPGSRVKCWRQAAERAGVAFEQWVLSTLDHAAELELDSESGPPDTQL	226
Sniv		21/
Scla	ARVOVTLNLDSERGRUTOAAEAAHVPLMEUIVRTVDDAAAP	219
Slin	REAGEAVGGA 225	
W007	ANR 189	
Sery	Arkyibnppkyubyyhkyivaka 219 C 227	
Stan	GRGETGGPAGPDGGVPDTAVAGADAPDAGGYGVSARTAGLAGOAPPAVVGA 246	
Faln	A 2.30	
K744	GNGGEEDGYADRTG 240	
Sniv		
Sgri		
Scla		

Slika 34: Poravnava zaporedja SACE_5599 in njegovih homologov iz drugih aktinomicetnih vrst (Clustal Omega). Ohranjeni ostanki triptofana so označeni z rdečo in ohranjeni ostanki arginina so označeni modro. Pri osrednji regiji proteinov je prikazana visoka podobnost zaporedij med vsemi homologi, označeno s sivo barvo. Prikazani izbrani homologi so vrste Actinomycetales: Slin – LmbU from *S. lincolnensis*; W007 – LmbU from *Streptomyces* sp. W007; Sery – SACE_5599 from *S. erythraea*; Shim – HmtD from *Streptomyces himastatinicus* ATCC53653 ; Stsu – *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488; Faln – *Frankia alni* ACN14a; K744 – Orf10 from *Kutzneria* sp. 744; Sniv – NovE from *Streptomyces niveus*; Sgri – HrmB from *Streptomyces griseoflavus*; Scla – *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064.

Figure 34: Protein sequence alignment SACE_5599 homologous proteins from related actinomycete species (Clustal Omega). Conserved tryptophan residues are marked in red and conserved arginine residues are marked in blue. Central region of the protein, showing particularly high sequence similarity among all homologues, is marked in grey. Homologues from selected Actinomycetales species are presented: Slin – LmbU from *S. lincolnensis*; W007 – LmbU from *Streptomyces* sp. W007; Sery – SACE_5599 from *S. erythraea*; Shim – HmtD from *Streptomyces himastatinicus* ATCC53653 ; Stsu – *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488; Faln – *Frankia alni* ACN14a; K744 – Orf10 from *Kutzneria* sp. 744; Sniv – NovE from *Streptomyces niveus*; Sgri – HrmB from *Streptomyces griseoflavus*; Scla – *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064.

aktinomicetnih sevov s programom Clustal Omega (Slika 34) je pokazala zelo ohranjene ostanke triptofana kot tudi številne ostanke arginina v N-terminalnem in osrednjem delu zaporedja. V aminokislinskem zaporedju SACE_5599 je delež arginina kar 14.2 % vseh aminokislinskih ostankov. SACE_5599 spada v družino neraziskanih regulatornih genov, ki se nahajajo v številnih biosinteznih genskih skupinah aktinomicet. Z bioinformacijsko analizo smo opazili, da je poleg anotiranega zaporedja (184 ak) (Oliynyk in sod. 2007) možna tudi daljša varianta odprtega bralnega okvirja SACE_5599 (219 ak). Obe varianti sta prikazani na sliki 35.

MERSGEVLATQVGLQFPHSLPFEDWERAGKKITRIVNSSAWFLGDWVVYGQARYSDRYRRAIETARLDYQTIR NYAWVARRFELSRRRDKLSFQHHAEVAALPVDQQDRWLDRAEEAGWSRNQLRQHIRNSRLAVQGAGSVERAMP AIQVTSERLERWQRAAERAGSSIESWIVANLDSAAGRVLEEADQPPRQVEAPRQTEHPPRQVEQQHRQLVARA

Slika 35: Zaporedje 219 aminokislin identificiranega proteina, ohranjeni ostanki triptofana so odebeljeni in mesto začetka tranaslacije pri krajši 184 ak varianti je označen s sivo barvo.

Figure 35: Sequence of the 219 amino acid conserved tryptophan residues marked in bold and the position of translation start in short 184 aa variant is shaded in grey.

4.2.2.2 Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_0044

S primerjalno transkriptomsko analizo smo kot povečano izražen identificirali tudi gen SACE_0044. Produkt tega gena je podoben serin/treonin kinazi PknB (Oliynyk in sod., 2007). Homologen encim so biokemijsko karakterizirali pri bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* kjer transmembranska signalna kinaza PknB regulira celično rast in morfologijo (Young in sod., 2003). BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja PknB kinaze SACE_0044 z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja (poravnava Clustal, priloga J), med katerimi so zelo ohranjena zaporedja iz sorodnih vrst *Saccharopolyspora spynosa* in *Amycolatopsis orientalis*, ki so anotirana kot serin/treonin kinaze. BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja produkta SACE_0044 pokazala, da ima 49 % identičnost glede na zaporedje iz *M. tuberculosis*. Potencialen vpliv gena SACE_0044 na rast *S. erythraea* in donos eritromicina smo v nadaljevanju tudi eksperimentalno preverili, kot je opisano v poglavju 4.3.4.3.

4.2.2.3 Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_2890

S primerjalno transkriptomsko analizo smo identificirali tudi gen SACE_2890. Produkt je podoben transkripcijskemu regulatorju iz družine LuxR (Oliynyk in sod., 2007). Geni iz družine LuxR pri bakterijah regulirajo izražanje genov kot odziv na spremembo gostote populacije v okolju (angl. quorum-sensing) (Fuqua in sod., 1994). BLASTP analiza je s

primerjavo aminokislinskega zaporedja regulatorja iz družine LuxR SACE_2890 z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja (poravnava Clustal, priloga K), med katerimi so zelo ohranjena zaporedja iz sorodnih vrst *Streptomyces* sp. in so anotirana kot transkripcijski regulator iz družine LuxR. Med njimi je tudi produkt gena Strvi_4059 iz *Streptomyces violaceusniger* sev Tu4113 (Lucas in sod., 2011), njegovo aminokislinsko zaporedje ima 40 % identičnost s produktom gena SACE_2890. Potencialen vpliv produkta gena SACE_2890 na rast *S. erythraea* in donos eritromicina smo v nadaljevanju tudi eksperimentalno preverili, kot je opisano v poglavju 4.3.4.3.

4.2.2.4 Analiza potencialnega regulatornega gena SACE_3978

Povečano izražanje v visokodonosnem sevu smo z analizo transkriptoma ugotovili tudi pri genu SACE_3978. Produkt je podoben proteinu z vezavno domeno za ciklične nukleotide (Oliynyk in sod., 2007). Proteini, ki vsebujejo domeno za vezavo cikličnih nukleotidov, so alosterično regulirani s cikličnimi nukleotidi, katerih znotrajcelična koncentracija je odvisna od fiziološkega stanja celice (poglavje 2.5) (Nambi in sod., 2012). BLASTP analiza je s primerjavo aminokislinskega zaporedja produkta gena SACE_3978 z aminokislinskimi zaporedji iz baze podatkov vseh organizmov identificirala zaporedja (poravnava Clustal, priloga L), med katerimi so zelo ohranjena zaporedja iz sorodnih vrst *Streptomyces rimosus* in *Amycolatopsis orientalis* in so anotirana kot protein z vezavno domeno za ciklične nukleotide. Med njimi je tudi produkt gena Strvi_4098 iz *Streptomyces violaceusniger* sev Tu4113 (Lucas in sod., 2011), s katerim ima aminokislinsko zaporedje produkta gena SACE_3978 69 % identičnost. Potencialen vpliv gena SACE_3978 na rast *S. erythraea* in donos eritromicina smo v nadaljevanju tudi eksperimentalno preverili, kot je opisano v poglavju 4.3.4.3

4.2.3 Identifikacija mutacij v metabolnih poteh, pomembnih za pozne stopnje biosinteze

V sklopu širšega raziskovalnega projekta smo v podjetju Acies Bio d.o.o. sekvencirali tudi genom visokodonosnega seva ABE1441, ki je bil razvit s pomočjo večkratnih postopkov klasične mutageneze in selekcije. V sklopu te doktorske disertacije smo z bioinformacijskimi metodami primerjali gensko skupino *ery* iz seva NRRL 23338 z zaporedjem seva ABE1441, da ugotovimo ali so pri genih pomembnih za pozne stopnje biosinteze eitromicina pri sevu ABE1441 prisotne mutacije.

V genomu seva *S. erythraea* NRRL23338, dostopnega v NCBI (NCBI Reference Sequence: NC_009142.1), smo izbrali regijo nukleotidnega zaporedja od 778.214 do 832.825 nukleotida, ki ustreza genski skupini *ery.* Zaporedje smo primerjali z

odgovarjajočim zaporedjem iz genoma ABE1441. Pregledali smo tudi zaporedja metabolnih in regulatornih genov, navedenih v poglavjih 4.2.1 in 4.2.2. ter ugotovili da geni ne vsebujejo mutacij.

V genomu seva ABE1441 smo tako identificirali štiri mutacije, ki bi potencialno lahko vplivale na aktivnost teh encimov in tako tudi vplivale na potek poznih stopenj biosinteze eritromicina. Identificirane mutacije se nahajajo v genih: *eryCVI, eryBIV, eryCII* ter *eryBI* (Slika 36). V nadaljevanju smo izvedli tudi potrditev mutacij, ki je podrobneje opisana v poglavju 4.3.1.

V genu *eryCVI*, je posledica mutacije zamenjava timina s citozinom. Mutacija je povzročila spremembo kodona (iz ACC v GCC) in posledično povzročila zamenjavo aminokislin treonina z alaninom. Mutacija v genu *eryBIV* je zamenjava citozina s timinom. Mutacija je povzročila spremembo kodona (iz GGG v GTG) in posledično povzročila zamenjavo aminokislin glicin z glutaminsko kislino. Mutacija v genu *eryCII* je prav tako zamenjava timina s citozinom. Mutacija je povzročila spremembo kodona (iz GCA v GTA) in posledično povzročila zamenjavo alaninskega preostanka z valinom. Četrta mutacija je zamenjava dveh in insercija šestih nukleotidov v genu *eryBI*. Mutacija je zunaj odprtega bralnega okvirja in se nahaja dvanajst nukleotidov za genom. Glede na smer prepisovanja sosednjega gena *ermE* sklepamo, da je mutacija na terminatorju. Položaj mutacij smo določili glede na nukleotidno zaporedje genoma NRRL23338 (NCBI Reference Sequence: NC_009142.1; Oliynyk in sod. 2007).

Table 7: Mutations in genes, involved in erythromycin post-PKS biosynthetic pathway in the strain ABE1441. Position of mutations are defined according to the nomenclature of genome NRRL23338 strain (NCBI Reference Sequence: NC_009142.1).

Ime gena	Položaj v genomu	Ali je v odprtem bralnem okvirju	Vrsta mutacije	Sprememba AK	Ime encima
eryCVI	785262	DA	T→C	T→A	TDP-desozamine-N-dimethyl transferase
eryBIV	787712	DA	C→T	G→E	dDTP-4keto-6-deoxy-L-hexose-4- reductase
eryCII	821212	DA	C→T	A→V	TDP-4-keto-6-deoxyglucose-3,4- isomerase
eryBI	830350	NE	CAA→ AGAACGGGG	terminator	beta-D-glucosidase

Preglednica 7: Mutacije v genih, vpletenih v biosintezno pot poznih stopenj biositeze eritromicina pri sevu ABE1441. Položaj mutacij je definiran v skladu z nomenklaturo genoma seva NRRL23338 (NCBI Reference Sequence: NC_009142.1).

<u>eryCVI:</u> NRRL2338 ABE1441	785244	CCGACAGCTCCAGCCCGG T CACGTCGTCGAAGAGGTCGGCGAACCGGCGC CCGACAGCTCCAGCCCGG C CACGTCGTCGAAGAGGTCGGCGAACCGGCGC	785293
<u>eryBIV:</u> NRRL2338 ABE1441	787695	GCGGGGAATCACTGATCCCATTCACCGGAGCATTTGCTCGCTTTCCAGGT GCGGGGAATCACTGATCTCATTCACCGGAGCATTTGCTCGCTTTCCAGGT	787744
<u>eryCII:</u> NRRL2338 ABE1441	821203	CCACCGCCG <mark>C</mark> ACTGCGGGCCGCGGCCAAGGCGCTGCCCGGACTCACGCCC CCACCGCCGTACTGCGGGCCGCGGGCCAAGGCGCTGCCCGGACTCACGCCC	821252
<u>eryBI:</u> NRRL2338 ABE1441	830323	CGACATCAACCTCTGATTCCTCTCGACCAACAGGCCGCTCGACG CGACATCAACCTCTGATTCCTCTCGACAGAACGGGGGCAGGCCGCTCGACG	830336

Slika 36: Poravnava odsekov nukleotidnih zaporedij sevov NRRL23338 (divji tip) in ABE1441 (visoko produktivni). Iz poravnave so razvidne mutacije genov *eryCVI*, *eryBIV*, *eryCII* in *eryBI*.

Figure 36: Alignment of nucleotide sequence sections from NRRL 23338 (wild type) and ABE1441 (high producer) strains. Alignment shows mutations on *eryCVI*, *eryBIV*, *eryCII* and *eryBI* genes.

4.3 UPORABA PRISTOPOV METABOLNEGA INŽENIRSTVA ZA IZBOLJŠEVANJE PRODUKCIJSKEGA SEVA *S.erythraea*

Na podlagi bioinformacijskih analiz izvedenih v sklopu te doktorske disertacije in analiz profila nečistoč pri biosintezi eritromicina izvedenih z LC-MS analizo v sklopu širšega raziskovalnega projekta v podjetju Acies Bio d.o.o., smo v naslednjem koraku izvedli nekaj ciljanih genskih sprememb v genomu *S. erythraea*. S pomočjo metabolnega inženiringa (genska inaktivacija ali povečano izražanje) smo želeli ciljano vplivati na izbrane metabolne poti, v katerih so produkti teh genov udeleženi, posledično pa na biosintezo eritromicina. V ta namen smo pripravili ustrezne vektorje za izražanje ciljnih genov. V vektor pSet152 (Kieser in sod., 2000) smo vstavili ciljni gen navadno skupaj s promotorjem *PermE** brez mesta vezave za ribosom, ki je izmed vseh testiranih promotorjev (poglavje 4.1.1) omogočal relativno močno izražanje genov.

Ciljne gene smo najprej pomnožili s PCR metodo (poglavje 3.2.3.2) in pri tem kot matrico uporabili genomsko DNA seva *S. erythraea* ABE1441. Uporabili smo sintetične oligonukleotidne začetnike, ki so vsebovali tudi restrikcijska mesta za enostavno kloniranje v vektor za izražanje, na primer *NdeI* ali *XbaI*. *NdeI* smo uporabili, ker vsebuje v svojem zaporedju start-kodon, *XbaI* pa v svojem zaporedju vsebuje stop-kodon, kar omogoča konstrukcijo krajših plazmidov. Nukleotidno zaporedje pomnoženih genov smo preverili s sekvenciranjem. Konstruirane plazmide smo najprej s transformacijo vnesli v sev *E.coli* ET12567, ki vsebuje dodatni plazmid pUZ8002, ki omogoča nadaljnji konjugativni prenos plazmidov v aktinomicete. S konjugacijo smo nato plazmide prenesli v sev divjega tipa *S*.

erythraea NRRL 23338 oziroma v industrijski visokodonosni sev ABE1441, razvit v podjetju Acies Bio. Konjugante *S. erythraea*, ki so zrasli na selekcijskem trdnem gojišču, smo najprej namnožili na ploščah s trdim gojiščem ABSM4 in dodatkom ustreznega antibiotika (opis postopka poglavje 3.2.2.3). Za testiranje produkcije eritromicina v spremenjenih sevih smo spore z ABSM4 plošč inokulirali v vegetativno gojišče ABVM1, inkubirali na stresalniku in po 48 urah inokulirali produktivno gojišče ABPM8 (poglavje 3.2.5.2). Po sedmih dneh kultivacije smo vzorce ekstrahirali z acetonitrilom in jih analizirali za donos eritromicina (podroben opis, poglavje 3.2.6).

4.3.1 Potrjevanje mutacij in čezmerno izražanje mutiranih genov v sev NRRL 23338

Verjetne mutacije, ki smo jih identificirali z bioinformacijskimi metodami (poglavje 4.2.3), smo potrdili tako, da smo gene *eryCVI, eryBIV* ter *eryCII* iz seva NRRL23338 in ABE1441 namnožili z reakcijo PCR in produkte PCR reakcije sekvencirali. Pri PCR metodi smo uporabili sintetične oligonukleotidne začetnike **eryCVI-**F-*Nde*I, **eryCVI-**R-*Xba*I, **eryBIV**-*Nde*I-F, **eryBIV-**R-*Xba*I, **eryCII-**F-*Nde*I in **eryCII-**R-*Xba*I. PCR produkte smo klonirali v vektor pSet152 s promotorjem *PermE** ter poslali na sekvenciranje podjetju Macrogen (Seoul, Korea). Rezultati sekvenciranja so pokazali, da je v industrijskem visokodonosnem sevu ABE1441 mutacija dejansko prisotna v vseh treh testiranih genih *eryBIV, eryCVI* in *eryCII*.

Za gena eryCII in eryCVI smo v naslednjem koraku preverili, ali ima opažena sprememba v njunem aminokislinskem zaporedju vlogo pri povečani produkciji eritromicina v sevu ABE1441. V ta namen smo vnesli dodatno kopijo vsakega mutiranega gena v divji sev NRRL 23338. Proteina EryCII in EryCVI sodelujeta pri biosintezi L-desozamina (Slika 10) (Summers in sod., 1997; Salah-Bey in sod., 1998). Pripravili smo dva vektorja za izražanje z vstavljenim genom eryCII (oznaka plazmida pABE19) oziroma eryCVI (oznaka plazmida pABE20). S konjugacijo smo plazmida pABE19 in pABE20 vnesli v sev divjega tipa NRRL 23338. Konjugante smo inokulirali v tekoče vegetativno gojišče ABVM1, po dveh dneh pa v produkcijsko gojišče ABPM8 ter po sedmih dneh kultivacije ekstrahirali eritromicin iz brozge (poglavje 3.2.6.1). Z mikrobiološko metodo (poglavje 3.2.6.3) smo analizirali vsebnost eritromicina v vzorcih. Rezultati analize so pokazali, da vnos dodatnih kopij genov eryCII in eryCIV v NRRL23338 ni imel vpliva na produkcijo eritromicina (Slika 37). Za kontrolo smo poleg divjega tipa seva NRRL23338 uporabili tudi sev NRRL23338, ki je vseboval vektor pSet152 brez vključka. Produkcija seva NRRL23338 je bila v povprečju 71 mg/L, sevov NRRL23338+pSet152 73 mg/L, sevov NRRL23338+ eryCII 72 mg/L in sevov NRRL23338+ eryCVI 71 mg/L (Slika 37).



Slika 37: Vpliv prekomernega izražanja genov *eryCII* (WT+pABE19), n = 22; in *eryCVI* (WT+pABE20), n = 15; na produkcijo eritromicina v primerjavi s kontrolami NRRL23338 (WT), n = 20; in NRRL23338 n = 20; z vektorjem pSet125 brez gena (WT+pSet125). Polja pravokotnikov zajema 95 % podatkov iste populacije. Horinzotalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ektreme (min, max).

Figure 37: Production of erythromycin. Strains with overexpressed genes *eryCII* (WT+pABE19), n = 22; and *eryCVI* (WT+pABE20), n = 15. Control is NRRL23338 (WT), n = 20; and NRRL23338 n = 20; with vector pSet125 without gene (WT+pSet125). Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal lines represent the median values and perpendicular lines indicate extreme values (min, max).



Slika 38: Vpliv prekomernega izražanja genov *eryCII* (ABE1441+pABE19), n = 20; in *eryCVI* (ABE1441+pABE20), n = 20; na produkcijo eritromicina v primerjavi z izhodnim sevom ABE1441, n = 10; in ABE1441 n = 10; z vektorjem pSet125 brez vključka (ABE1441+pSet125). Polja pravokotnikov zajemajo 95 % podatkov iste populacije. Horinzotalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ekstreme (min, max).

Figure 38: Production of erythromycin. Strains with overexpressed genes *eryCII* (ABE1441+pABE19), n = 20; and *eryCVI* (ABE1441+pABE20), n = 20. Control is ABE1441, n = 10; and ABE1441 with vector without gene (ABE1441+pSet125), n = 10. Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal lines represent the median values and perpendicular lines indicate extreme values (min, max).

Vpliv čezmernega izražanja genov *eryCII* in *eryCIV* na produkcijo eritromicina smo nato preverili tudi v visokodonosnem sevu ABE1441. Plazmida pABE19 in pABE20 smo konjugirali v sev ABE1441 na enak način kot v sev NRRL23338. Po kultivaciji, ki je bila izvedena na enak način kot za spremenjene seve NRRL23338, smo določili koncentracijo eritromicina s HPLC (poglavje 3.2.6 .4). Rezultati so pokazali, da povečano izražanje genov *eryCII* in *eryCIV* v sevu ABE1441 ni imelo vpliva na produkcijo eritromicina (Slika 38). Kontrole ABE1441 in ABE1441+pSet152 so imele povprečen donos 2,1 g/L, sevi ABE1441+ *eryCII* 2,2 g/L in sevi ABE1441+ *eryCVI* 1,9 g/L.

4.3.2 Vpliv čezmernega izražanja SACE_6479 in SACE_6480

Skupna izhodna spojina za biosintezo treh deoksisladkorjev desozamina, mikaroze in ramnoze je TDP-4-keto-6-deoksiglukoza (poglavje 2.4.3.2). Glede na to, da za biosintezo te izhodne spojine obstaja samo ena pot in je pri industrijskem sevu biosinteza eritromicina povečana, posledično pa tudi poraba mikaroze in desozamina, smo z vnosom dodatne kopije gena za TDP-D-glukoza-4,6-dehidratazo - SACE_6480 poskusili ugotoviti, ali ta encimska konverzija morda predstavlja ozko grlo pri produkciji eritromicina. Dodatno kopijo gena smo vnesli v industrijski sev ABE1441. Za ta namen smo pripravili plazmid pABE10. Z metodo PCR smo z oligonukletidnima začetnikoma **6480**-*Nde*I-F in **6480**-*Xba*I-R pomnožili gen. DNA fragment gena SACE_6480 smo transformirali v vektor pSet152 s promotorjem *PermE** brez mesta vezave za ribosom in izvedli konjugacijo plazmida v divji in visokodonosni sev *S. erythraea*. Konjugante, ki so zrasli na gojišču SM s 10 mM MgCl₂ s primernim antibiotikom, smo testirali na stresalniku v falkonovih kivetah v produkcijskem gojišču ABPM8 sedem dni. Pri sevih z dodatno kopijo gena SACE_6480 nismo ugotovili opaznega povečanja produkcije eritromicina, glede na kontrolni sev (Slika 39).



Slika 39: Prikaz odprtih bralnih okvirjev verjetnih genov SACE_6479 in SACE_6480 v istem operonu. Figure 39: Scheme of open reading frames of genes SACE_6479 and SACE_6480 in the same operon.

Predvidevamo, da je gen SACE_6480 postavljen v istem operonu, pred genom SACE_6479 (Slika 39), zato je možno, da oba genska produkta sodelujeta v isti metabolni poti. Glede na bioinformacijsko analizo s pomočjo baze podatkov KEGG,

produkt gena SACE_6479 katalizira zadnjo reakcijo pri biosintezi L-ramnoze, pretvorbo dTDP-4-dehidro-beta-L-ramnoze v dTDP-L-ramnozo. Najprej smo konstruirali plazmid pABE9, ki omogoča čezmerno izražanje gena SACE_6479 in vnesli v industrijski sev ABE1441. Pri tem smo uporabili oligonukleotidna začetnika **6479**-*Nde*I-F in **6479**-*Xba*I-R, za pomnoževanje gena s PCR metodo. Gen smo vnesli v plazmid pSet152 s promotorjem *PermE** brez mesta vezave za ribosom in tako dobili plazmid pABE9. Plazmid pABE9 smo transformirali v *E. coli* ET12567/pUZ8002 in nato konjugirali v sev ABE1441. Izbrane konjugante smo nato ovrednotili glede produkcije eritromicina. Testiranje smo izvedli po metodi opisani v poglavju 3.6.2 na stresalniku v falkonovih kivetah. Vnos dodatnega gena SACE_6479 ni imel vpliva na produkcijo eritromicina (Slika 40). Povprečna produkcija izhodnega seva ABE1441 in ABE1441+pSet152 s plazmidom, ki ne vsebuje gena je bila 2,1 g/L. Povprečna produkcija sevov ABE1441+SACE_6480 2,1g/L (Slika 40).



Slika 40: Vpliv prekomernega izražanja genov SACE_6479 (ABE1441+pABE9), n = 36; in SACE_6480 (ABE1441+pABE10), n = 29; na produkcijo eritromicina v primerjavi z izhodnim sevom ABE1441, n = 33; in ABE1441 z vektorjem pSet152 brez inserta (ABE1441 + pSet152), n = 36. Polja pravokotnikov zajema 95 % podatkov iste populacije. Horinzotalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ektreme (min, max).

Figure 40: Influence overexpression of SACE_6479 (ABE1441+pABE9), n = 36; and SACE_6480 (ABE1441+pABE10), n = 29; genes on erythromycin production in comparison with control strains ABE1441, n = 33; and ABE1441 containing the empty vector pSet152 (ABE1441 + pSet152), n = 36. Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal lines represent the median values and perpendicular lines indicate extreme values (min, max).



Slika 41: Shema konstrukcije plazmida pABE23 z genom SACE_6479 in SACE_6480. Figure 41: Constutions scheme for plasmid pABE23 with genes SACE_6479 in SACE_6480.

V naslednjem koraku smo pripravili tudi plazmid pABE23, ki je hkrati vseboval oba gena SACE_6480 in SACE_6479. Plazmid pABE23 smo pripravili tako, da smo najprej rezali plazmid pABE10 z restrikcijskim encimom *Xba*I, navzdol od gena SACE_6480 in potem

5'-konce odprtega plazmida defosforilirali z encimom FastAP po navodilih proizvajalca Thermo scientific, da smo preprečili ponovno ligacijo koncev lizirane plazmidne DNA. Iz plazmida pABE9 smo nato izrezali gen SACE_6479 z restrikcijskima encimoma XbaI in NdeI. Ta fragment smo potem vnesli v plazmid pAB07, ki smo ga linearizirali z restrikcijskima encimoma XbaI in NdeI (Slika 41). Ta plazmid vsebuje mesto vezave ribosoma pred start-kodonom oziroma pred *NdeI* restrikcijskim mestom in še eno dodatno restrikcijsko mesto za *Xba*I pred mestom za vezavo ribosoma, ki pa ga encim XbaI ne prepozna, če je DNA modificirana z *dam* metilacijo. Zato smo konstruirani plazmid transformirali v *E. coli* ET12567, ki ima prekinjena gena za metilazi *dam* in *dcm*. Iz izoliralnega plazmida smo z restrikcijskim encimom XbaI izrezali gen SACE_6479, ki je vseboval na obeh koncih restrikcijsko mesto *Xba*I in mesto vezave ribosoma. Ta gen smo potem z ligacijo vnesli v prej pripravljeni, z XbaI odprti plazmid pABE10 in s tem dobili plazmid pABE23 (Slika 41). Plazmid pABE23 smo potem s postopki transformacije vnesli v *E. coli* ET12567 z dodatnim plazmidom pUZ8002 in nato s konjugacijo v seva *S. erythraea* NRRL23338 in ABE1441.



Slika 42: Restrikcijska analiza plazmida pABE23 rezanega z restrikcijskim encimom NdeI (vrstice 1, 2 in 3). Velikost DNA fragmentov (bp) (vrstica L) in njihova pozicija je prikazana shematsko na levi strani slike. Lise iz vrstic 1, 2 in 3 z velikostjo 1034 bp se ujema s fragmenti gena SACE_6480 in lisa z velikostjo 7,2 kb se ujema s preostanki plazmida pABE23 z genom SACE_6479.

Figure 42: The restriction analysis of plasmid pABE23 digested with NdeI restriction enzyme (lane 1, 2 and 3). Markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel. Bands in lanes 1, 2 and 3 with size 1034 bp correspond to SACE_6480 gen fragments and with size 7,2 kb correspond to plasmid remains pABE23 with gen SACE_6479.

Dobljene konjugante smo testirali v falkonovih kivetah s produktivnim gojiščem ABPM8. Po sedmih dneh smo vzorce ekstrahirali z acetonitrilom in izmerili vsebnost eritromicina v vzorcih. Vnos dodatnih kopij obeh genov v ABE1441 je imel pozitiven vpliv na produkcijo eritromicina, ki se je v povprečju povečala za 24 %. Povprečna produkcija seva ABE1441 je bila 2,5 g/L, sevov ABE1441+pSet152 s plazmidom, ki ne vsebuje gena 2,4 g/L, sevov ABE1441+pABE23 pa je bila 3,3 g/L (Slika 43/I). Pri testiranju sevov ABE1441+pABE23 smo v produkcijskem gojišču opazili tudi pojav rjavo-rdečega pigmenta (Slika 44).

V nasprotju s sevom ABE1441, pa vnos plazmida pABE23 v sev NRRL23338 ni imel bistvenega vpliva na produkcijo eritromicina. Donos je bil v primerjavi z NRRL23338 višji za 6,4 %, kar je v okviru eksperimentalne napake (Slika 43/II). Povprečna produkcija seva NRRL23338 je bila 71 mg/L, sevov NRRL23338+pSet152 je bila 73 mg/L in sevov NRRL23338+SACE_6479_ 6480 75 mg/L.



Slika 43: Vpliv prekomernega izražanja genov SACE_6479 in SACE_6480, na donos eritromicina. Polja pravokotnikov zajemajo 95 % podatkov iste populacije. Horinzotalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ekstreme (min, max): **I**): sev ABE1441 z dodatnima genoma (ABE1441+pABE23) v primerjavi s kontrolama ABE1441 in ABE1441 z vektorjem brez gena (ABE1441 + pSet152). **II**): sev NRRL23338 z dodatnima genoma (WT+pABE23), n = 67; v primerjavi s kontrolami NRRL23338 (WT), n = 27; in NRRL23338 z vektorjem brez gena (WT+pSet125), n = 25.

Figure 43: Influence of SACE_6479 and SACE_6480 overexpression, on erythromycin production. Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal lines represent the median values and perpendicular lines indicate extreme values (min, max): **I**): strain ABE1441 with overexpressed genes (ABE1441+pABE23), n = 67; control strain ABE1441, n = 33; and strain ABE1441 containing empty vector (ABE1441 + pSet152), n = 36. **II**): strain NRRL23338 with overexpressed genes (WT+pABE23) n = 67; control strain NRRL23338 (WT), n = 27; and NRRL23338 containing empty vector without gene (WT+pSet125), n = 25.



Slika 44: Pojav rjavo-rdečega pigmenta pri sevih ABE1441+pABE23 s prekomerno izraženimi geni SACE_6479 in SACE_6480.

Figure 44: Brown-reddish pigmentation of ABE1441+pABE23 strains with overexpressed genes SACE_6479 and SACE_6480.

<u>Optimizacija gojišča in pogojev gojenja za produkcijo eritromicina pri sevih z dodatno</u> <u>kopijo genov SACE 6479 in SACE 6480</u>

Z vnosom dodatnih kopij genov SACE_6479 in SACE_6480 v sev ABE1441 smo demonstrirali povečano produkcijo eritromicina. Produkta teh dveh genov sta del biosintezne poti pri biosintezi deoksisladkorjev. Pri izboljšanem sevu ABE12170 smo z optimizacijo pogojev gojenja in sestavo gojišča poskusili še dodatno povečati produkcijo eritromicina na industrijskem gojišču ABPM8. Z namenom povečanja oskrbe metilmalonil-CoA smo v gojišče dodajali aminokislini izolevcin in valin ter vinil propionat. Kot vir kofaktorjev smo v gojišče dodajali različne kompleksne minerale, za izboljšanje rasti pa smo dodali fosfate. Prav tako smo testirali produkcijsko gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika. Vse omenjene sestavine gojišč smo dodajali v različnih koncentracijah in ob različnih časih biosinteze (Preglednica 9). Za izvedbo teh eksperimentov smo uporabili štiri seve; dva izhodna seva, divji tip NRRL23338 in visokodonosni sev ABE1441, ter dva izboljšana seva ABE135 (sev NRRL23338 z dodatnima genoma SACE_6479 in SACE_6480) in ABE12170 (sev ABE1441 z dodatnima genoma SACE_6479 in SACE_6480). Postopek je potekal tako, da smo v falkonovih kivetah testirali več različnih variant po štiri paralelke. Da smo zagotovili enak inokulum za vse eksperimente, smo v štiri Erlenmajerjeve steklenice volumna 1 L s po 200 mL vegetativnega gojišča ABVM1 (z dodatkom 50 µg/L antibiotika apramicina po potrebi) inokulirali testne seve (NRRL23338, ABE135, ABE1441 in ABE12170). Po 48 urah inkubacije smo iz Erlenmajerjeve steklenice z gojiščem ABVM1 inokulirali falkonove kivete s po 5 mL produktivnega gojišča ABPM8. Inokulirali smo s 15 % inokuluma. Ob inokulaciji smo v gojišče dodali 20 g/L glukoze (v obliki 40 % raztopine) in 8 mL/L n-propanola.

Preglednica 8: Nutrienti in končne koncentracije vsakega nutrienta (mg/L gojišča, izjema je zmes mineralov, ki je μ L/5 mL gojišča), ki smo jih testirali.

	(mg/I)	(mg/I)				
DODATEK	DODAJANJE PO 24 URAH	DODAJANJE PO 96 URAH				
is $\mu L/5$ mL medium), which we	tested.					
Table 8: Nutrients and final concentrations of each nutrient (mg/L medium, exception is minerals mix which						

DODATEK	DODAJANJE PO 24 URAH (mg/L)	DODAJANJE PO 96 URAH (mg/L)
Izolevcin	260	260
Valin	230	230
Vinil propionat	1000	1000
$C_0C_1 \cdot 6H_2O$	74	74
MnCl	12	12
ϺϭϨϴϞ·ϽΗͽϴ	1200	1200
KaSO4	12	12
K ₂ HPO ₄	860	860
Zmes mineralov*	180 µL/5mL	180 μL/5mL

*Zmes mineralov: ZnCl₂ 6,4 mg/L, FeCl₂·6H₂O 32 mg/L, CuCl₂·2H₂O 1,6 mg/L, MnCl₂·4H₂O 1,6 mg/L, Na₂B₄O₇·10H₂O 1,6 mg/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 1,6 mg/L, CoCl₂·6H₂O 103,6 103,6 mg/L, MgSO₄·7H₂O 16,8 g/L, K₂SO₄ 186 mg/L.

Po 24 urah inkubacije in 96 urah kultivacije smo v gojišče dodali še 10 g/L glukoze (v obliki 40 % raztopine) in 4 mL/L n-propanola ter ostale nutriente. Ostale nutriente smo dodajali z dvema pristopoma. Pri prvem pristopu smo nutriente dodali enkrat po 24 urah kultivacije, pri drugem pristopu smo nutrient dodajali dvakrat, prvič po 24 urah in drugič po 96 urah kultivacije (Preglednica 8).

Preglednica 9:	Gojišče z	oljem l	kot glavnim	virom ogljika.
----------------	-----------	---------	-------------	----------------

SESTAVINAKONCENTRACIJA (g/L)Sojina moka36Koruzni škrob12(NH4)2SO42,4CaCO37,2Sojino olje50pH gojišča 6,350 g/L sojinega olja

Table 9: Medium whith oil as main carbon sourse.



Slika 45: Vpliv nutrientov z različnimi koncentracijami na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE1441. **1441:** kontrola brez nutrientov, **a:** izolevcin 260 mg/L, **b:** 2 x izolevcin 260 mg/L, **c:** valin 230 mg/L, **d:** 2 x valin 230 mg/L, **e:** vinil propionat 1000 mg/L, **f:** 2 x vinil propionat 1000 mg/L, **g:** $CoCl_2$ 7.5 mg/L, **h:** 2 x $CoCl_2$ 7.5 mg/L, **i:** MnCl_2 12 mg/L, **j:** 2 x MnCl_2 12 mg/L, **k:** MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **l:** 2 x MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **m:** K₂SO₄ 12 mg/L, **n:** 2 x K₂SO₄ 12 mg/L, **o:** 2 x zmes mineralov 180 μ L/5mL **p:** 2 x K₂HPO₄ 860 mg/L, **r:** gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 45: Influence of different nutrients with different concetration on erythromycin production during cultivation of ABE1441 strain. **1441:** control without feeding, **a:** isoleucine 260 mg/L, **b:** 2 x isoleucine 260 mg/L, **c:** valine 230 mg/L, **d:** 2 x valine 230 mg/L, **e:** vinyl propionate 1000 mg/L, **f:** 2 x vinyl propionate 1000 mg/L, **g:** $CoCl_2$ 7.5 mg/L, **h:** 2 x $CoCl_2$ 7.5 mg/L, **i:** MnCl₂ 12 mg/L, **j:** 2 x MnCl₂ 12 mg/L, **k:** MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **l:** 2 x MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **l:** 2 x K₂HPO₄ 860 mg/L, **r:** medium with oil as main carbon sourse. Bars represent median values ±SD, n = 4.

Po sedmih dneh kultivacije smo vzorce brozge ekstrahirali z acetonitrilom in določili koncentracijo eritromicina z mikrobiološkim testom (za seva NRRL23338 in ABE135) (poglavje 3.2.6.3) oziroma s HPLC analizo (za seva ABE1441 in ABE12170) (poglavje 3.2.6.4). Ugotovili smo, da pri sevih NRRL23338 in ABE135 z eksperimenti nismo vplivali na produkcijo eritromicina (Priloge J in K). Vpliv eksperimentov je opazen pri sevih ABE1441 (Slika 45) in ABE12170 (Slika 46). V celoti je bil vpliv eksperimentov večji pri sevu ABE1441 kot pri sevu ABE12170. Produkcija eritromicina se je največ povečala z enkratnim dodajanjem MgSO₄*7H₂O, ki je izboljšal produkcijo za 39 % v primerjavi s kontrolo ABE1441. V podobnem velikostnem območju 29,6 do 36,7 % so produkcijo eritromicina povečali tudi enkratno dodajanje valina, enkratno in dvakratno dodajanje CoCl₂, enkratno in dvakratno dodajanje MnCl₂ dvakratno dodajanje MgSO₄*7H₂O, enkratno in dvakratno dodajanje K₂SO₄ ter dvakratno dodajanje zmesi mineralov. Manjše 10 do 26,9 % povečanje produkcije eritromicina smo opazili pri enkratnem in dvakratnem dodajanju izolevcina ter enkratnem in dvakratnem dodajanju vinil propionata. Negativen vpliv na produkcijo eritromicina smo opazili pri dvakratnem dodajanju K₂HPO₄ ter pri gojišču z oljem kot glavnim virom ogljika. Povprečna produkcija



eritromicina pri kontroli je bila 1,9 g/L.

Slika 46: Vpliv nutrientov z različnimi koncentracijami na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE12170. **12170**: kontrola brez nutrientov, **A**: izolevcin 260 mg/L, **B**: 2 x izolevcin 260 mg/L, **C**: valin 230 mg/L, **D**: 2 x valin 230 mg/L, **E**: vinil propionat 1000 mg/L, **F**: 2 x vinil propionat 1000 mg/L, **G**: CoCl₂ 7.5 mg/L, **H**: 2 x CoCl₂ 7.5 mg/L, **I**: MnCl₂ 12 mg/L, **J**: 2 x MnCl₂ 12 mg/L, **K**: MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **G**: L: 2 x Mg_SO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **M**: K₂SO₄ 12 mg/L, **N**: 2 x K₂SO₄ 12 mg/L, **O**: 2 x zmes mineralov 180 μ L/5mL **P**: 2 x K₂HPO₄ 860 mg/L, **R**: gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij ±SD, n = 4.

Figure 46: Influence of different nutrients with different concetration on erythromycin production during cultivation of ABE12170 strain. **12170**: control without feeding, **A**: isoleucine 260 mg/L, **B**: **2** x isoleucine 260 mg/L, **C**: valine 230 mg/L, **D**: 2 x valine 230 mg/L, **E**: vinyl propionate 1000 mg/L, **F**: 2 x vinyl propionate 1000 mg/L, **G**: CoCl₂ 7.5 mg/L, **H**: 2 x CoCl₂ 7.5 mg/L, **I**: MnCl₂ 12 mg/L, **J**: 2 x MnCl₂ 12 mg/L, **K**: MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **L**: 2 x MgSO₄ * 7 H₂O 1200 mg/L, **N**: 2 x K₂SO₄ 12 mg/L, **N**: 2 x K₂SO₄ 12 mg/L, **O**: 2 x minerals mix 180 μ L/5mL **P**: 2 x K₂HPO₄ 860 mg/L, **R**: medium with oil as main carbon sourse. Bars represent median values ±SD, n = 4.

Kot že omenjeno, je bil vpliv variacij na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE12170 manjši. Največji pozitiven vpliv sta imela enkraten in dvakraten dodatek K_2SO_4 , 27,6 in 22,2 % (v enakem vrstnem redu). Očiten negativen vpliv na produkcijo sta imela: dvakraten dodatek K_2HPO_4 33,3 % ter pri gojišču z oljem kot glavnim virom ogljika 33,3 %. V povprečju je bila produkcija eritromicina pri kontroli 2,1 g/L.

4.3.3 Vpliv čezmernega izražanja *eryK* in *eryG* na biosintezo eritromicina

Konjugante z različnimi kombinacijami genov, ki smo jih testirali in so opisani v tem poglavju, so pripravili raziskovalci podjetja Acies Bio d.o.o., oddelek za molekularno biologijo.

Poleg povečanja donosa eritromicina je pri optimizaciji bioprocesa eden ključnih ciljev
tudi zmanjšati delež nečistoč, v tem primeru medproduktov eritromicina B in eritromicina C. Zaradi relativno nizkega donosa eritromicina v divjem sevu S. erythraea NRRL23338 je natančno določanje koncentracije teh dveh medproduktov v brozgi izredno težavno, zato smo eksperimente izvajali le v industrijskem sevu ABE1441. Z vnosom dodatnih kopij genov eryK in eryG smo želeli ovrednotiti vpliv čezmernega izražanja teh dveh genov na razmerje med eritromicinom B in C ter želenim končnim produktom biosinteze, eritromicinom A. Pripravili smo osnovne plazmide, ki so vsebovali po eno kopijo genov eryG (pABE14), eryK (pABE15) in eryG z nativnim mestom vezave ribosoma (pUC19+*eryG*). Za pripravo plazmidov pABE14 in pABE15 smo uporabili vektor pSet152 s promotorjem *PermE** brez mesta vezave za ribosom. Za kloniranje gena *eryG* z nativnim mestom vezave ribosoma smo uporabili komercialni vektor pUC19. Pri pomnoževanju s PCR smo uporabili oligonukleotidne začetnike eryK-NdeI-F, eryK-XbaI-R, eryG1-XbaI-F, eryG2-NdeI-F, eryG rbs-XbaI-F in eryG-XbaI-R. Pomnoženo DNA smo ligilari v plazmid pSet152 s promotorjem PermE* brez mesta vezave za ribosom. Vektor smo najprej linearizirali z restrikcijskima encimoma (NdeI in XbaI). S PCR-namnožene DNA fragmente smo izrezali z istimi encimi in jih z ligacijo vnesli v pripravljeni vektor. Vektor pUC19 smo za vnos PCR produkta eryG z nativnim mestom vezave ribosoma linearizirali z restrikcijskim encimom SmaI in s fosforilazo defosforilirali 5'-konce. PCR produktom smo dodali fosfatne skupine z encimom T4 DNA kinaza in jih ligirali v pripravljeni pUC19 vektor. Tako pripravljene plazmide smo v nadaljnjem poteku dela uporabili za sestavljanje večjega števila plazmidov na osnovi pSet152, ki so vsebovali različno število kopij genov eryG in eryK v različnem vrstnem redu (Preglednica 10).

Na podlagi konstrukcije osnovnih plazmidov pABE14 in pABE15 smo nato pripravili plazmide, ki so vsebovali različne umetne operone z različnim številom kopij in vrstnim redom genov eryK in eryG. Plazmide smo pripravili po naslednjem osnovnem principu (Slika 47):

- Prvi gen v umetnem operonu je iz osnovnega plazmida pABE14 ali pABE15. Z restrikcijskim encimom XbaI smo linearizirali vektorja pABE14 oziroma pABE15 in ga defosforilirali z encimom FastAP po navodilih proizvajalca, da smo preprečili ponovno zlepljanje koncev.
- Drugi in/ali tretji gen smo v plazmid vstavili na dva načina. Prvi način smo uporabili, ko smo drugemu genu (*eryK* ali *eryG*) želeli dodati mesto vezave ribosoma iz plazmida pAB07. Iz plazmida pABE14 ali pABE15 smo izrezali gen (*eryK* ali *eryG*) z restrikcijskima encimoma XbaI in NdeI. Gen smo nato vnesli v plazmid pAB07, ki smo ga linearizirali z restrikcijskima encimoma XbaI in NdeI. Konstruirani plazmid smo potem transformirali v *E. coli* ET12567, ki ne vsebuje *dam* in *dcm* metilaze. Iz dobljenih kolonij smo izolirali plazmid in iz njega z restrikcijskim encimom XbaI izrezali gen, ki je vseboval na obeh konceh restrikcijsko mesto *XbaI* in mesto vezave ribosoma. Ta gen smo potem z ligacijo

vnesli v prej pripravljen odprti plazmid za izražanje pABE14 oziroma pABE15. Drugi pristop konstrukcije umetnega operona (za gen na drugem in/ali tretjem mestu) smo uporabljali za vstavitev gena *eryG* z nativnim mestom vezave ribosoma. V tem primeru smo gen, ki vsebuje nativno mesto vezave ribosoma in ima na obeh straneh restrikcijsko mesto *Xba*I, izrezali iz plazmida pUC19+*eryG* z restrikcijskim encimom XbaI. Ta gen smo potem z ligacijo vnesli v prej pripravljen odprti plazmid pABE14 oziroma pABE15 (Slika 47).

Preglednica 10: Plazmidi z različnimi razmerji kopij genov *eryK/eryG* in prisotnost mesta vezave ribosoma *eryG* nativnega (nat) ali iz plazmida pAB07.

Table 10: Plasmids with eryK/eryG different copy ratios v	with ribosome binding sites from <i>eryG</i> native (nat) or
from plasmid pAB07.	

IME PLAZMIDA	DA RAZMERJE eryK/eryG IN MESTO VEZAVE RIBOSOMA		
pABE4	eryK eryG - pAB07		
pABE5	eryK eryG - pAB07 eryG - pAB07		
pABE6	eryG eryK – pAB07 eryK – pAB07		
pABE11	eryG eryK – pAB07		
pABE24	eryK eryG – pAB07 eryK – pAB07		
pABE26	eryK eryK - pAB07 eryG - pAB07		
pABE37	eryG eryG – pAB07 eryK – pAB07		
pABE38	eryG eryK – pAB07 eryG – pAB07		
pABE41	eryG eryK - pAB07 eryG - nat		
pABE43	eryK eryG – nat		
pABE44	eryG eryG – nat $eryK$ – pAB07		
pABE45	eryK eryG – nat $eryG$ – nat		

• Pri dodajanju tretjega zaporednega gena smo plazmid, ki že vsebuje dva gena ponovno linearizirali z restrikcijskim encimom XbaI in z ligacijo vnesli tretji ciljni gen, pri tem restrikcijski encim linearizira plazmid na enem restrikcijskem mestu ker sta drugi dve restrikcijski mesti *Xba*I metilirani. Metilirano restrikcijsko mesto *Xba*I izhaja iz plazmida pAB07 in pUC19.

Tako pripravljene plazmide smo nato transformirali v sev za konjugacijo *E. coli* ET12567 s dodatnim plazmidom pUZ8002 in nato s konjugacijo vnesli v sev *S. erythraea* ABE1441. Izbrane kolonije smo inkubirali na ploščah ABSM4 z dodatkom antibiotika apramicina.





Figure 47: The general scheme of the construction of plasmids containing artificial operons with different numbers of eryK and eryG genes with different lineup.



Slika 48: Restrikcijska analiza plazmidov pABE41 (vrstice 1, 4, 7, 10), pABE44 (vrstice 2, 5, 8, 11) in pABE45 (vrstice 3, 6, 9, 12) rezani z restrikcijskimi encimi XhoI (vrstice 1, 2, 3), BamHI (vrstice 4, 5, 6), NdeI/BamHI (vrstice 7, 8, 9) in NdeI/ XhoI (vrstice 10, 11, 12 Velikost DNA fragmentov (bp) (vrstica L) in njihova pozicija je prikazana shematsko na levi strani slike. Lise iz vrstice 1 so z velikostjo 4,5 kb, 2,6 kb in 2,2 kb, vrstice 2 so z velikostjo 5,8 kb, 2,6 kb in 1kb, vrstice 3 so z velikostjo 4,5 kb, 3,9 kb in 1 kb, vrstice 4 so z velikostjo 7,7 kb in 1,7 kb, vrstice 5 so z velikostjo 6,6kb in 2,8, vrstice 6 so z velikostjo 8,7 kb in 0,8 kb, vrstice 7 so z velikostjo 7,7kb, 1 kb in 0,8 kb, vrstice 8 so z velikostjo 6,7 kb, 2 kb in 0,8 kb (zaradi parcialne restrikcije se je pojavila lisa z velikostjo 3 kb), vrstice 9 so z velikostjo 8,7 kb in 0,8 kb, vrstice 10 so z velikostjo 4,5 kb, 2,3 kb, 1,6kb, 0,7 kb in 0,3 kb, vrstice 11 so z velikostjo 5,1 kb, 2,3 kb, 1 kb, 0,7 kb in 0,3 kb, 1,7 kb in 1 kb.

Figure 48: The restriction analysis of plasmids pABE41 (lanes 1, 4, 7, 10), pABE44 (lanes 2, 5, 8, 11) and pABE45 (lanes 3, 6, 9, 12), digested with restriction enzymes XhoI (lanes 1, 2, 3), BamHI (lanes 4, 5, 6), NdeI/BamHI (lanes 7, 8, 9) in NdeI/ XhoI (lanes 10, 11, 12). Markers for DNA fragment size (bp) (lane L) and their positions are schematically presented on the left side of the gel. Bands in lane 1 with size 4,5 kb, 2,6 kb and 2,2 kb, lane 2 with size 5,8 kb, 2,6 kb and 1kb, lane 3 with size 4,5 kb, 3,9 kb and 1 kb, lane 4 with size 7,7 kb and 1,7 kb, lane 5 with size 6,6kb in 2,8, lane 6 with size 8,7 kb and 0,8 kb, lane 7 with size 7,7kb, 1 kb and 0,8 kb, lane 8 with size 6,7 kb, 2 kb and 0,8 kb (due to partial restriction appeared band with size 3 kb) lane 9 with size 8,7 kb and 0,8 kb, lane 10 with size 4,5 kb, 2,3 kb, 1,6kb, 0,7 kb and 0,3 kb, lane 11 with size 5,1 kb, 2,3 kb, 1 kb, 0,7 kb and 0,3 kb lane 12 with size 4,5 kb, 2,3kb, 1,7 kb and 1 kb.



 $-2 \times eryG$ (Perm*)

- 1 x *eryK* (Perm*)
- 1 x eryK (PeryK)

Slika 49: Shematski prikaz možnih zaporedij genov pri integraciji plazmida pABE38 v genom *S. erythraea*. Sheme I., II., in III. prikazujejo različne možnosti v primeru integracije s homologno rekombinacijo. Shema IV. prikazuje zaporedje pri integraciji plazmida v psevdointegracijsko mesto integraze ϕ C31. Pod vsako shemo je navedeno število kopij vsakega gena pod določenim promotorjem, *PermE**, *PeryAI* in *PeryK*.

Figure 49: Schemes of possible gene organization by integration of plasmid pABE38 in *S. erythraea* genom. Schemes I., II. and III. shows possibilities of homologous recombination that differ due to different start site of recombination. Scheme IV. shows integration with pseudo attachment site of ϕ C31 integrase. Under every scheme is balance of genes expressed under different promoters, *PermE**, *PeryAI* and *PeryK* Preglednica 11: Možna zaporedja genov pri integraciji plazmidov pABE44 in pABE45 v genom *S. erythraea*. Integracija s homologno rekombinacijo in integracija v psevdointegracijsko mesto integraze ϕ C31. V oklepaju je promotor pod katerega naveden gen spada.

Table 11: Possible gene organization by integration of plasmid pABE44 and pABE45 in *S. erythraea* genom. Integration with homologous recombination (differ due to different start site of recombination) and integration with pseudo attachment site of ϕ C31 integrase. In brackets is stated which is gene promoter.

PLAZMID	TEORETIČNA BILANCA	NAČIN VGRADNJE
pABE44	2 x eryG (PeryAI), 1 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PeryAI)	Homologna rekombinacija
	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PeryAI)	Homologna rekombinacija
	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Homologna rekombinacija
	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Integracijsko mesto (ΦC31)
pABE45	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PeryK), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Homologna rekombinacija
	2 x eryG (PeryAI), 1 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Homologna rekombinacija
	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Homologna rekombinacija
	1 x eryG (PeryAI), 2 x eryG (PermE*), 1 x eryK (PeryK), 1 x eryK (PermE*)	Integracijsko mesto (ΦC31)

Pri vnosu ene kombinacije genov eryK in eryG se je lahko plazmid v genom vgradil v psevdointegracijsko mesto seva ABE1441 za bakteriofagno integrazo ϕ C31 ali pa tudi s pomočjo homologne rekombinacije. Učinkovitost integracije je v primeru psevdointegracijskega mesta za bakteriofagno integrazo ϕ C31 v sevu ABE1441 relativno nizka, zato se lahko plazmid vgradi v genom tudi s homologno rekombinacijo v nativno kopijo gena eryK oziroma eryG. Ker lahko do homologne rekombinacije pride na vsakem izmed genov v plazmidu, smo skupaj z vgradnjo v psevdointegracijsko mesto za bakteriofagno integrazo ϕ C31 predvideli štiri možne vzorce (pri vgradnji plazmida s tremi geni) vgradnje plazmidov v genom (Slika 49). Način vgradnje pripravljenih plazmidov je pomemben zato, ker je od načina vgradnje odvisno tudi, koliko genov se prepisuje pred določenim promotorjem. Pri vgradnji plazmidov, ki vsebujejo gene ervK: ervG, so vključeni promotorji PeryAI in PeryK, ki sta nativna promotorja teh genov. Razen nativnih promotorjev smo uporabili tudi promotor PermE*, ki je prisoten na vseh pripravljenih plazmidih. Ker se promotorji med seboj razlikujejo v intenziteti transkripcije in regulacije, se posledično gena eryG in eryK različno izražata. Različne kombinacije genov smo pripravili zato, da bi ugotovili, s katero kombinacijo lahko dosežemo takšno razmerje encimskih aktivnosti eryK : eryG, ki omogoča čim bolj učinkovito zmanjšanje nečistoč ErB in ErC. Preglednica 11 prikazuje število kopij eryK in eryG reguliran z različnimi promotorji ob različnih načinih vgradnje plazmidov pABE44 oziroma pABE45 (bilanca za plazmid pABE38 je prikazana na sliki 49).

Vse konjugante seva *S. erythraea* ABE1441 smo testirali za produkcijo eritromicina na stresalniku v falkonovih kivetah s 5 mL produktivnega gojišča ABPM8. Po sedmih dneh smo v vzorcih bioprocesnih brozg z metodo LC-MS (poglavje 3.2.6.5) določili koncentracijo eritromicina A, B in C. Vnos dodatnih genov je vplival na produkcijo eritromicina pri sevih, ki vsebujejo plazmide pABE38, pABE44 in pABE45 (Slika 50). V primerjavi z izhodnim sevom ABE1441 in izhodnim sevom ABE1441 s plazmidom pSet152 brez gena (kontroli) se pri spremenjenih sevih pozitiven vpliv odraža z zmanjšanjem deleža nečistoče eritromicin B za 25 % in na ta račun povečanim deležem eritromicina A. Iz preglednice 12 je razvidno, da je v produkcijski brozgi še vedno prisoten relativno visok delež nečistoče eritromicin C.



Slika 50: Koncentracije eritromicina A, B in C v vzorcih bioprocesnih brozg sevov s prekomernim izražanjem genov eryK in eryG v različnih kombinacijah. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 25.

Figure 50: Erythromycin A, B and C concentrations in samples of fermentation broth of strains with overexpressed genes eryG and eryK with different gene combination. Bars represent median values \pm SD, n = 25.

Preglednica 12: Povprečna produkcija eritromicina A, B in C pri kultivaciji kontrolnih sevov ABE1441 in ABE1441+pSet152 s plazmidom, ki ne vsebuje gena ter gensko manipuliranih sevov s plazmidi pABE38 (*eryG eryK*-pAB07 *eryG*-pAB07), pABE44 (*eryG eryG*-nat *eryK*-pAB07) in pABE45 (*eryK eryG*-nat. *eryG*-nat).

Table 12: Average produktion of erythromycin A, B and C in fermentation of control strains ABE1441 and ABE1441+pSet152 with pasmid without gen compared to transformants with plasmid pABE38 (*eryG eryK*-pAB07) *eryG*-pAB07), pABE44 (*eryG eryG*-nat *eryK*-pAB07) and pABE45 (*eryK eryG*-nat. *eryG*-nat).

Sev	ErSUM(g/L)	ErA(g/L)	ErB(g/L)	ErC(g/L)
ABE1441	2,452	1,982	0,207	0,262
pSet152	2,554	1,950	0,261	0,321
pABE38	1,927	1,635	0,072	0,172
pABE44	2,581	2,199	0,055	0,373
pABE45	2,295	1,819	0,055	0,376

<u>Vpliv spojin, ki so lahko donorji metilnih skupin pri sevih z dodatnima genoma *eryK* in <u>eryG</u></u>

Z namenom zmanjšanja deleža nečistoče ErC v brozgi smo med kultivacijo sevov z dodatnimi kopijami genov eryK in eryG testirali vpliv metanola, metionina in folne kisline kot morebitne donorje metilnih skupin v biosintezi eritromicina. Pri testiranju smo uporabili seva ABE1441 in ABE1441+pSet152 s plazmidom, ki ne vsebuje gena kot kontroli ter gensko modificirane seve ABE10124 (pABE38), ABE10291 (pABE44) in ABE10311 (pABE45). Da smo zagotovili enak inokulum za vse eksperimente, smo v pet Erlenmajerjevih steklenic volumna 1 L s po 200 mL vegetativnega gojišča ABVM1 (z dodatkom 50 µg/L antibiotika apramicina po potrebi) inokulirali testne seve. Po 48 urah inkubacije smo iz Erlenmajerjeve steklenice z gojiščem ABVM1 inokulirali Erlenmajerjeve steklenice s po 25 mL produktivnega gojišča ABPM8. Inokulirali smo s 15 % inokuluma. Pred inokulacijo smo v gojišče dodali še 20 g/L glukoze (sterilna 40 % raztopina glukoze) in 8 mL/L n-propanola ter po 24 urah dohranili še z 10 g/L glukoze (sterilna 40 % raztopina glukoze) in 4 mL/L n-propanola. Po 24 urah smo kot donorje metilnih skupin v gojišče dodali metionin 0,5 g/L, metanol 1 g/L ali pa folno kislino 100 mg/L. Nutriente smo dodajali ločeno v paralelkah. Po 7 dneh kultivacije smo vzorce brozge ekstrahirali z acetonitrilom. Dobljene vzorce smo redčili in koncentracijo in delež eritromicina in medproduktov merili s pomočjo metode LC-MS, ki omogoča kvantitativno analizo ErA, ErB in ErC na masnem detektorju (poglavje 3.2.6.5). Dohranjevanje z metanolom, metioninom in folno kislino ni imelo vpliva na zmanjšanje deleža ErC v končni brozgi (Slika 51-55).



Slika 51: Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC v biosinteznem procesu s sevom ABE1441 z dodajanjem donorjev metilne skupine. Kontrola je biosintezni proces brez dodajanja donorjev metilnih skupin. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 51: Production of erythromycin and content of ErA, ErB and ErC in biosynthesis process of ABE1441 strain with feeding of different donors of methyl groups. Control is in biosynthesis process without feeding of donors. Bars represent median values \pm SD, n = 4.



Slika 52: Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC v biosinteznem procesu s sevom ABE1441+pSet152 z dodajanjem donorjev metilne skupine. Kontrola je biosintezni proces brez dodajanja donorjev metilnih skupin. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 52: Production of erythromycin and content of ErA, ErB and ErC in biosynthesis process of ABE1441+pSet152 strain with feeding of different donors of methyl groups. Control is in biosynthesis process without feeding of donors. Bars represent median values \pm SD, n = 4.



Slika 53: Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC v biosinteznem procesu s sevom ABE10291 z dodajanjem donorjev metilne skupine. Kontrola je biosintezni proces brez dodajanja donorjev metilnih skupin. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 53: Production of erythromycin and content of ErA, ErB and ErC in biosynthesis process of ABE10291 strain with feeding of different donors of methyl groups. Control is in biosynthesis process without feeding of donors. Bars represent median values \pm SD, n = 4.



Slika 54: Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC v biosinteznem procesu s sevom ABE10124 z dodajanjem donorjev metilne skupine. Kontrola je biosintezni proces brez dodajanja donorjev metilnih skupin. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 54: Production of erythromycin and content of ErA, ErB and ErC in biosynthesis process of ABE10124 strain with feeding of different donors of methyl groups. Control is in biosynthesis process without feeding of donors. Bars represent median values \pm SD, n = 4.



Slika 55: Produkcija eritromicina in deleži ErA, ErB in ErC v biosinteznem procesu s sevom ABE10311 z dodajanjem donorjev metilne skupine. Kontrola je biosintezni proces brez dodajanja donorjev metilnih skupin. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti koncentracij \pm SD, n = 4.

Figure 55: Production of erythromycin and content of ErA, ErB and ErC in biosynthesis process of ABE10311 strain with feeding of different donors of methyl groups. Control is in biosynthesis process without feeding of donors. Control is cultivation without feeding of donors. Bars represent median values \pm SD, n = 4.

4.3.4 Vloga izbranih regulatornih genov pri regulaciji biosinteze eritromicina in morfologiji *S. erythraea*

Rezultati primerjalne proteomske in transkriptomske analize, ki smo ju opravili v sodelovanju z raziskovalci Nacionalnega instituta za biologijo, Instituta Jožef Stefan in Biotehniške fakultete, so pokazali veliko razliko v nivoju izražanja gena SACE_5599 med divjim in visokodonosnim sevom *S. erythraea* (Kirm in sod., 2013), kar nakazuje na možen vpliv tega potencialnega regulatornega gena na povečano produkcijo eritromicina pri sevu ABE1441. Po identifikaciji in bioinformacijski analizi gena SACE_5599 (poglavje 4.2.2.1) smo želeli bolj podrobno določiti njegovo vlogo pri biosintezi eritromicina. Da bi potrdili vzročno-posledično povezavo med ravnijo izražanja SACE_5599 in produkcijo eritromicina, smo pripravili več rekombinantnih sevov *S. erythraea*. V seva NRRL23338 in ABE1441 smo s plazmidom pSet152 – *PermE** vnesli dodatno kopijo SACE_5599 pod močnim konstitutivnim promotorjem, brez (pABE104) oziroma s HA-epitopom (pABE106) na karboksiterminalu, ki je omogočil analizo izražanja gena s prenosom western. Pri tem smo za pomnoževanje gena s PCR metodo uporabili oligonukleotidne

začetnike **5599**-*Nde*I-F, **5599**-*Xba*I-R in **5599HA**-*Xba*I-R ter pridobljene PCR-produkte vnesli v vektor pSet152 s *PermE** promotorjem. Pri sevu ABE1441 smo gen SACE_5599 tudi inaktivirali. Prekinitev smo izvedli tako, da smo s PCR pomnožili centralno regijo gena SACE_5599 z oligonukleotidnimi začetniki **5599stop**-*EcoR*I-F in **5599stop**-*Hind*III-R. S PCR-om pomnožen in očiščen DNA fragment smo rezali z encimoma EcoRI in HindIII in z istima encimoma tudi linearizirali vektor pKC1132, ter z ligacijo pripravili plazmid pABE110. Po vnosu plazmida v sev ABE1441 s konjugacijo (poglavje 3.2.2.3) je do prekinitve gena prišlo s homologno rekombinacijo. Inaktivacijo gena smo potrdili s PCR analizo in sekvenciranjem pri dvajsetih konjugantih, rezistentnih na apramicin. Pri enem od mutiranih sevov v katerem je SACE_5599 inaktiviran (Δ SACE_5599) smo izvedli komplementacijo gena SACE_5599 in trans. Pripravili smo plazmid pABE112 tako, da smo na restrikcijsko mesto *Msc*I plazmida pABE106 vnesli še rezistenco na tiostrepton. Plazmid pABE112 smo transformirali v *E. coli* in s konjugacijo integrirali plazmid v mutiran sev Δ SACE_5599.

Pri gojenju na ploščah, smo pri rekombinantnih sevih s prekinjenim genom SACE_5599 opazili tudi vpliv gena na morfologijo seva *S. erythraea*. Za primerjavo smo na eni plošči s trdnim gojiščem ABSM4 gojili skupaj vse rekombinantne seve ter izhodne (kontrolne) seve NRRL23338 in ABE1441 (Slika 56). Opazili smo velike razlike v hitrosti in intenzivnosti sporulacije. Pri kontrolnem sevu NRRL23338 je bila sporulacija na gojišču ABSM4 šibka, spore pa so se pojavile le v času podaljšane inkubacije.



Slika 56: Primerjava fenotipov rekombinantnih sevov *S. erythraea* na plošči **A**) ABSM4 in **B**) R5 agarnem gojišču z apramicinom: a) NRRL23338+pSet152; b) ABE1441+pSet152; c) komplementacija Δ SACE_5599 seva; d) Δ SACE_5599 sev; e) ABE1441 z dodatno kopijo SACE_5599 f) NRRL23338 z dodatno kopijo SACE_5599.

Figure 56: Phenotypes of recombinant strains *S. erythraea* on **A**) ABSM4 and **B**) R5 agar plates with apramycin: a) NRRL23338+pSet152; b) ABE1441+pSet152; c) complemented Δ SACE_5599 strain; d) Δ SACE_5599 strain; e) ABE1441 overexpression SACE_5599 f) NRRL23338 overexpression SACE_5599.

V sevih s konstitutivnim čezmernim izražanjem SACE_5599 je v krajšem času prišlo do intenzivne sporulacije. Kontrolni sev ABE1441 je na ploščah ABSM4 dobro sporuliral, pri sevu s konstitutivnim čezmernim izražanjem SACE_5599 pa je bila sporulacija še bolj

izrazita. Prekinitev gena SACE_5599 je povzročila, tudi skoraj povsem ustavljeno sporulacijo, s komplementacijo gena pa se je sporulacija povrnila (Slka 56).

Vpliv čezmernega izražanja oziroma inaktivacije gena SACE_5599 na produkcijo eritromicina smo testirali v produkcijskem gojišču ABPM8. Po sedmih dneh kultivacije smo v vzorcih bioprocesnih brozg določili donos eritromicina. Za seve, ki smo jih pridobili na osnovi divjega seva NRRL23338, smo količino eritromicina določili z mikrobiloškim testom (poglavje 3.2.6.3). Za seve, ki smo jih pridobili na osnovi ABE1441, pa smo uporabili metodo analize s HPLC (poglavje 3.2.6.4).



Slika 57: Produkcija eritromicina v sevih *S. erythraea* s čezmerno izraženim oziroma inaktiviranim genom SACE_5599 ali *BldD*. Polja pravokotnikov zajema 95 % podatkov iste populacije. Horinzotalne črte predstavljajo vrednost mediane in navpične črte predstavljajo ekstreme (min, max). Zvezdice označujejo statistično pomembne razlike med eksperimentalno skupino v primerjavi s kontrolnimi vzorci. **I**): Produkcija eritromicina spremenjenih sevov NRRL23338; WT: kontrola NRRL23338, n = 27; A: NRRL23338+pSET152, n = 29; B: NRRL23338+SACE_5599, n = 57; C: NRRL23338+SACE_5599-HA, n = 53; D: NRRL+*BldD*, n = 59. **II**): Produkcija eritromicina spremenjenih sevov ABE1441; ABE1441: kontrola ABE1441, n = 33; E: ABE1441+pSET152, n = 36; F: ABE1441 Δ SACE_5599, n = 46; G: ABE1441 Δ SACE_5599, n = 65; I: ABE1441+*BldD*, n = 55.

Figure 57: Yield of erythromycin of strains *S. erythraea* with overexpressed or inactivated gen SACE_5599 or *BldD*. Bars encompass 95 % of the sample population. Horizontal lines represent the median values and perpendicular lines indicate extreme values (min, max). Asterisks denote statistically significant differences between experimental group samples compared to control samples. **I**): Erythromycin production of NRRL23338 transformants; WT: control NRRL23338, n = 27; A: NRRL23338+pSET152, n = 29; B: NRRL23338+SACE_5599, n = 57; C: NRRL23338+SACE_5599-HA, n = 53; D: NRRL+*BldD*, n = 59. **II**): Erythromycin production of ABE1441 transformants; ABE1441: control ABE1441, n = 33; E: ABE1441+pSET152, n = 36; F: ABE1441 Δ SACE_5599, n = 46; G: ABE1441 Δ SACE_5599+SACE_5599, n = 10; H: ABE1441+SACE_5599, n = 65; I: ABE1441+*BldD*, n = 55.

Rezultati analiz so pokazali, da je vnos dodatne kopije gena SACE_5599 v NRRL23338 imel pozitiven vpliv na produkcijo eritromicina (32 % povečanje), podoben fenotip, ki smo ga opazili pri prekomernem izražanju gena BldD v sevu NRRL23338 (poglavje 4.3.4.2). Prisotnost HA-epitopa v čezmerno izraženi kopiji gena SACE 5599 ni imela bistvenega vpliva na produkcijo eritromicina. Povprečna produkcija izhodnega seva divjega tipa NRRL23338 je bila 71 mg/L, pri rekombinantnih sevih divjega tipa NRRL23338+pSet152 (s plazmidom pSet152 brez gena) je bila 73 mg/L, NRRL23338+SACE_5599 (s prekomerno izraženim genom SACE 5599) 94 mg/L in NRRL23338+SACE_5599-HA (s prekomerno izraženim genom SACE 5599 s prisotnim HA-epitop) je bila 93 mg/L (Slika 57/I). Vnos dodatne kopije SACE_5599 v visokodonosni sev ABE1441 ni imel učinka na produkcijo, medtem ko je prekinitev gena zmanjšala produkcijo eritromicina za 37 %. Komplementacija je sevu s prekinjenim genom povrnila produkcijo. Povprečna produkcija izhodnega visokodonosnega seva ABE1441 je bila 2,1 g/L, rekombinantni visokodonosni sev ABE1441+pSet152 (s plazmidom pSet152 brez gena) 2,1 g/L, rekombinantnih visokodonosnih sevov ABE1441+SACE 5599 (s prekomerno izraženim genom SACE 5599) 2,1 g/L, ABE1441 Δ SACE 5599 (z inaktiviranim genom SACE 5599) 1,3 g/L, ABE1441 △SACE 5599+SACE 5599 (in trans komplementacija inaktiviranega gena SACE_5599) 1,9 g/L in ABE1441+BldD (prekomerno izražanje gena BldD) 1,8 g/L (Slika 57/II).



Slika 58: Analiza izražanja dodane kopije gena SACE_5599-HA s prenosom western, 219 ak (vrste2-5) in 184 ak (vrste 7-10), SACE_5599-HA kontrolni sev NRRL23338 s pSet152 (vrsta 1). Molekulska masa označevalcev je v vrsti šest in njihova pozicija je prikazana shematsko na desni strani slike. Pri štirih transformantih z 219 ak so opazne lise z molekulsko maso 33 kDa. Zelo šibke lise z molekulsko maso 22 kDa pa so se pojavile pri transformatih z krajšo varianto 184 ak.

Figure 58: Western blot analysis 219 aa (lanes 2-5) and 184 aa (lanes 7-10) SACE_5599-HA and the control NRRL23338 strain with pSet152 (lane 1). Molecular mass markers were loaded in lane 6 and their positions are schematically presented on the right side of the blot. Bands of apparent molecular mass of 33 kDa are observed in four 219 aa transformants of the NRRL23338. A very weak band of apparent molecular mass of 25 kDa was observed when shorter variant (184 aa) of SACE_5599 was expressed.

Z metodo prenosa western smo dokazali izražanje dodatne kopije gena SACE_5599-HA. Vzporedno smo preverili še izražanje krajše variante proteina (poglavje 3.2.3.10). Iz izbranih sevov z dodatno kopijo gena, smo izolirali proteine in jih ločili na poliakrilamidnem gelu ob prisotnosti SDS. Za tem smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano in vezali primarna in sekundarna protitelesa. Detekcijo specifično vezanih protiteles smo opravili z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti (Slika 58). Na gelu smo detektirali močno izražanje gena daljše variante med tem pa je kratka varianta komaj zaznavna, kar dodatno potrjuje prvotno hipotezo, da je dejanska dolžina proteina SACE_5599 219 aminokislinskih preostankov.

4.3.4.2 Vpliv regulatornega gena *BldD* na donos eritromicina

Po potrditvni pozitivnega vpliva čezmernega izražanja gena SACE 5599 na donos eritromicina smo v sev NRRL23338 vnesli še dodatno kopijo gena *BldD*, za katerega so že dokazali pozitivno regulatorno vlogo pri biosintezi eritromicina (Chng in sod., 2008). Za pomnoževanje gena BldD z reakcijo PCR smo uporabili oligonukleotidna začetnika BldD-NdeI-F in BldD-XbaI-R. Pomnožen gen smo vnesli v vektor pSet152 s promotorjem *PermE** in pridobili plazmid pABE21. Plazmid (pABE21) smo vnesli v sev divjega tipa NRRL 23338 in industrijski sev ABE1441. Produkcijo eritromicina pri pridobljenih rekombinantnih sevih smo testirali, kot je opisano zgoraj (poglavje 4.3.4.1.). Podobno, kot smo opazili pri NRRL sevih z dodatno kopijo SACE_5599, je bila produkcija eritromicina pri sevih NRRL23338 z dodatno kopijo BldD višja za 30 % v primerjavi s kontrolnim sevom. Povprečna produkcija izhodnega seva divjega tipa NRRL23338 je bila 71 mg/L, rekombinantih sevov divjega tipa NRRL23338+pSet152 (s plazmidom pSet152 brez gena) je bila 73 mg/L in NRRL23338+BldD (s prekomerno izraženim genom BldD) je bila 92 mg/L (Slika 57/I). Zanimivo pa je, da smo pri sevih ABE1441 z dodatno kopijo BldD opazili malenkost manjšo produkcijo v primerjavi s kontrolnim sevom. Povprečna produkcija izhodnega visokodonosnega seva ABE1441 je bila 2,1 g/L, rekombinantnih visokodonosnih sevov ABE1441+pSet152 (s plazmidom pSet152 brez gena) 2,1 g/L in sevov ABE1441+BldD (s prekomerno izraženim genom BldD) 1,8 g/L (Slika 57/II).

4.3.4.3 Določanje vpliva s transkriptomsko analizo identificiranih potencialnih regulatornih genov na produkcijo eritromicina

V sklopu primerjalne transkriptomske analize (doktorska naloga Katarine Karničar v pripravi) in bioinformacijske analize v sklopu te doktorske naloge (poglavje 4.2.2), smo identificirali gene SACE_0044, SACE_2980 in SACE_3978, katerih homologi pri drugih bakterijskih vrstah sodelujejo pri regulatornih procesih. Z manipulacijo teh genov smo želeli preveriti, ali imajo tudi ti geni vlogo pri regulaciji biosinteze eritromicina. Potencialni vpliv na biosintezo eritromicina smo preverjali tako, da smo pripravili tri



različne plazmide za prekinitev teh genov v sevu NRRL23338.

Slika 59: Restrikcijska analiza plazmidov, pABE116 (vrstice 1, 2, 3), pABE115 (vrstice 4, 5, 6, 7) in pABE113 (vrstice 8, 9, 10, 11) rezani z restrikcijskim encimoma EcoRI/HindIII. Velikost DNA fragmentov (bp) in njihova pozicija je shematsko prikazana v vrsticah L. Lise iz vrstic 1, 2 in 3 z velikostjo 731 bp se ujema s fragmenti gena SACE_3978, lisa iz vrstic 4, 5, 6, in 7 z velikostjo 981 bp se ujema s fragmenti gena SACE_2890 in lise iz vrstic 8, 9, 10, 11 z velikostjo 895 bp se ujemajo z genom SACE_0044.

Figure 59: The restriction analysis of plasmids pABE116 (lanes 1, 2, 3), pABE115 (lanes 4, 5, 6, 7) and pABE113 (lanes 8, 9, 10, 11) digested with EcoRI/HindIII restriction enzymes. Markers for DNA fragment size (bp) and their positions are schematically presented in lanes L. Bands in lanes 1, 2 and 3 with size 731 bp correspond to SACE_3978 gen fragments, bands in lanes 4, 5, 6 and 7 with size 981 bp correspond to SACE_2890 gen fragments and bands in lanes 8, 9, 10 and 11 with size 895 bp correspond to SACE_0044 gene fragments.



Slika 60: Produkcija eritromicina pri sevih, ki izhajajo iz seva NRRL23338 in imajo prekinjene izbrane regulatorne gene. WT: NRRL23338, n = 13; pSet152: NRRL23338+pSet152 n = 6; pABE113: NRRL23338 + SACE_0044, n = 45; pABE115: NRRL23338 + SACE2890, n = 37; in pABE116: NRRL23338 + SACE_3978, n = 13.

Figure 60: Eritromycin production of NRRL23338 strains with regulator gene deletion. WT NRRL23338, n = 13; pSet152: NRRL23338+pSet152 n = 6; pABE113: NRRL23338 + SACE_0044, n = 45; pABE115: NRRL23338 + SACE2890, n = 37; in pABE116: NRRL23338 + SACE_3978, n = 13.

Za pripravo plazmidov smo s PCR pomnožili centralno regijo genov z oligonukleotidnimi začetniki SACE_0044-EcoRI-F, SACE_0044-HindIII-R, SACE_2890-EcoRI-F, SACE_2890-HindIIIR, SACE_3978-EcoRI-F in SACE_ 2890-HindIII-R. Z encimoma EcoRI in HindIII smo rezali očiščene DNA fragmente namnožene s PCR in z istima encimoma linearizirali vektor pKC1132. Z ligacijo obeh fragmentov smo nato pripravili plazmide pABE113 (SACE_0044), pABE115 (SACE_2890) in pABE116 (SACE_3978). Po vnosu plazmidov v sev NRRL23338 s konjugacijo je do prekinitve genov prišlo s homologno rekombinacijo. Pridobljene seve smo nato testirali za produkcijo eritromicina v falkonovih kivetah s produktivnim gojiščem ABPM8. Po sedmih dneh smo v vzorcih bioprocesnih brozg določili količino eritromicina z mikrobiološko metodo (poglavje 3.2.6.3). Rezultati analize so pokazali, da prekinitev izbranih regulatornih genov ni imela vpliva na produkcijo eritromicina (Slika 60). Povprečni donos seva divjega tipa NRRL23338 je bil 62 mg/L ob tem pa so imeli povprečen donos sevi s prekinjenim genom SACE_0044 65 mg/L, SACE_2890 58 mg/L in SACE_3978 57mg/L eritromicina. Opažene razlike v donosih so bile v okviru eksperimentalne napake, zato smo sklepali, da geni SACE_0044, SACE_2980 in SACE_3978 pri divjem tipu NRRL23338 nimajo bistvene vloge pri regulaciji biosinteze eritromicina.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 IZBOLJŠEVANJE INDUSTRIJSKIH MIKRORGANIZMOV

Mikroorganizmi so vir mnogih biološko aktivnih spojin, ki se uporabljajo kot antimikrobne učinkovine, imunosupresivi, zdravila proti raku, kot protivirusna in protiparazitska zdravila, insekticidi in podobno. Komercialno pomembne biološko aktivne spojine se pridobivajo z biotehnološkimi procesi, ki pogosto temeljijo na industrijskih mikroorganizmih z izboljšano sposobnostjo proizvodnje želenega produkta (Olano in sod., 2008). Pri optimizaciji biotehnoloških procesov je izboljševanje industrijskih sevov ključnega pomena in je hkrati tudi tesno povezano z ostalimi pristopi, kot so optimizacija sestave gojišča, vodenje bioprocesa in optimizacija zaključnih procesov. Za dosego postavljenih ciljev so industrijske produkcijske seve običajno razvijali s pomočjo klasičnih metod izboljšave z večkratnimi cikli naključne mutageneze in selekcije (Ikeda in Nakagawa 2003; Ikeda in sod., 2006). Pri tem načinu izboljšave sevov se za spodbujanje nastanka mutacij uporabljajo različni kemični mutageni agensi (npr. nitrozogvanidin, etil metansulfonat, metil metansulfonat) ali fizikalni dejavniki (npr. UV svetloba). Slabost takšnega pristopa je v tem, da proces ni selektiven in se tako ni mogoče izogniti vnosu mutacij v genom, med katerimi so tudi t.i. negativne oziroma neželene mutacije. Tako so industrijski mikroorganizmi, ki proizvajajo za človeka pomembne metabolite, že več desetletij podvrženi mutagenezi in selekciji (Parekh in sod., 2000). Na primer, bakterijska seva Penicillium chrysogenum, ki proizvaja penicilin in Saccharopolyspora erythraea, ki proizvaja eritromicin, industrijski proizvajalci konstantno manipulirajo že več kot petdeset let (Demain in Adrio, 2008). V tem času so se v teh sevih nakopičile tudi številne neželene mutacije. Takšni industrijski sevi imajo posledično šibko konstitucijo, ki se kaže v počasni rasti in slabi izrabi sladkorjev ter pojavu morfoloških nepravilnostih, kot je npr. izguba sporulacije kakor tudi genska in fiziološka nestabilnost (Zhang in sod, 2002).

Kljub temu, da so metode klasične mutageneze in selekcije omogočile razvoj velikega števila zelo učinkovitih bioprocesov, pa na podlagi razvitih industrijskih sevov, brez kompleksnih analiz ne moremo razumeti mehanizmov, ki so omogočili tako velike dvige donosov želenih učinkovin. Šele pred kratkim razviti pristopi genomike, transkriptomike in proteomike nam zdaj omogočajo izvedbo primerjalnih analiz s pristopi sistemske biologije, ki omogočajo identifikacijo ključnih razlik med divjimi sevi in visokodonsonimi industrijskimi sevi na nivoju nastalih mutacij v genomu in na nivoju diferencialnega izražanja različnih genov/proteinov. Ti pristopi omogočajo tudi postavitev hipotez o tem, katere od opaženih mutacij najverjetneje pozitivno vplivajo na donos želene biološko aktivne spojine in katere mutacije imajo zelo verjetno negativen vpliv na fiziologijo, robustnost in morfologijo visokodonosnega seva, čeprav ta proces ni tako enostaven kot smo predpostavljali. Poleg tega nam rezultati pridobljeni s temi metodami omogočajo boljše razumevanje metabolnih poti regulatornih mehanizmov kompleksnih biosinteznih procesov in nam pomagajo pri optimizaciji produkcijskih procesov (npr. pri optimizaciji gojišč in bioprocesnih parametrov) (Wang in sod., 2009).

Poleg metod klasične mutageneze in selekcije se za izboljševanje vse bolj uporablja tudi racionalni pristop metabolnega inženirstva, pri katerem glede na predvidevanja o ključnih metabolnih in biosinteznih poteh z genskim inženirstvom vplivamo na raven izražanja ključnih genov/encimov ter tako izboljšamo donos želene spojine. Primeri izboljšanja seva S. erythraea, ki so v preteklosti že omogočili povečan donos eritromicina, so podrobneje opisani v poglavju 2.7. Poleg čim boljšega poznavanja metabolnih poti in regulatornih mehanizmov, kjer v zadnjem času prihaja do velikega napredka zaradi uporabe metod sistemske biologije, pa za metabolno inženirstvo potrebujemo tudi razvita genska orodja in postopke za transformacijo posameznega seva. Zaradi velike raznolikosti bakterij iz skupine aktinomicet je potrebno za vsak posamezni sev pred začetkom razviti oziroma optimizirati ustrezne postopke transformacije, izbrati optimalne selekcijske markerje, po potrebi vstaviti v genom mesta za učinkovito integracijo heterologne DNA in ovrednotiti različne promotorje za zagotovitev učinkovitega čezmernega izražanja izbranih genov. Ena od prednosti metabolnega inžnirstva pred izboljševanjem sevov z naključno mutagenezo in selekcijo je tudi, da poleg izboljšanega seva na podlagi eksperimentalnih rezultatov pridemo tudi do bistveno izboljšanega razumevanja metabolnih poti in regulatornih mehanizmov, ki sodelujejo pri procesu biosinteze ciljne spojine. To nam omogoča, da smo pri nadaljnjem razvoju sevov in bioprocesov še bolj učinkoviti.

Po nam dostopnih podatkih ugotavljamo, da je trenutni donos eritromicina v industrijskem bioprocesnem postopku še vedno razmeroma nizek (od 7-9 g/L (Zou in sod., 2011; Tan in sod., 2013)) v primerjavi z nekaterimi drugimi biosinteznimi postopki, npr. ind. biosinteznimi postopki za produkcijo tetraciklinskih antibiotikov in penicilina, ki pri praktično enakih stroških proizvodnje dosegajo nekaj 10 g produkta na liter ob koncu biosinteznega postopka (Brunker in sod., 1998). Potreba po boljšem razumevanju biosinteze eritromicina ter njene regulacije je zato danes še vedno izjemno aktualna.

5.2 DOLOČANJE METABOLNIH POTI IN UPORABA PRISTOPOV METABOLNEGA INŽENIRSTVA ZA BOLJŠE RAZUMEVANJE POZNIH STOPENJ BIOSINTEZE ERITROMICINA V *S. erythraea*

V genski skupini za biosintezo eritromicina v *S. erythraea* so odkrili prvo modularno poliketid sintazo tipa I, ki je nato postala modelni sistem za preučevanje biosinteze poliketidov (Rawlings, 2001). Znana nukleotidna sekvenca genske skupine za biosintezo eritromicina (Weber in sod., 1990; Caffrey in sod., 1992; Summers in sod., 1997; Reeves in sod., 1999) je omogočila bistveno izboljšano razumevanje (zgodnjih stopenj) biosinteze poliketidne verige eritromicina, medtem ko pozne stopnje, t.i. post-PKS reakcije in pa regulacija biosinteze eritromicina ostajajo slabše raziskane. Veliko priložnost na tem

področju predstavlja sekvenciranje celotnega genoma divjega seva *S. erythraea* NRRL23338 (Oliynyk in sod., 2007) in pa zlasti pristopi primerjalne genomike, transkriptomike in proteomike, s katerimi primerjamo divji sev z visokodonosnimi sevi (Brunker in sod., 1998; Reeves in sod., 2006; Reeves in sod., 2007; Peano in sod., 2012; Li in sod., 2013; aktivnosti Acies Bio, d.o.o. in KC Brin).

Nukleotidna sekvenca celotnega genoma divjega seva *S. erythraea* NRRL23338 je že znana in objavljena v javni zbirki podatkov NCBI (Oliynyk in sod., 2007). V Acies Bio, d.o.o. smo razvili visokodonosni sev *S. erythraea* ABE1441, ki temelji na postopkih naključne mutageneze in selekcije. Da bi dobili čim več informacij o svojem visokodonosnem sevu, so sodelavci Acies Bio iz njega izolirali genomsko DNA in sekvencirali njegov genom. S primerjalno analizo obeh genomov smo nato v okviru te doktorske naloge določili potencialne spremembe v nukleotidnem zaporedju določenih genov, ki bi lahko vplivale na produkcijo eritromicina. Osredotočili smo se na potencialne regulatorne gene in gene vključene v pozne stopnje produkcije eritromicina. Po eni strani smo lahko na podlagi podatkov teh sistemskih analiz v okviru doktorske naloge zasnovali eksperimente, ki so omogočili boljše razumevanje poznih stopenj in regulacije biosinteze eritromicina, po drugi strani pa smo z manipulacijo genov vključenih v pozne stopnje biosinteze (post-PKS) eritromicina lahko dosegli višje donose tega poliketida.

V prvih korakih smo z bioinformatsko analizo genomov *S. erythraea* NRRL23338 in ABE1441 identificirali ključne gene, ki potencialno sodelujejo v poznih fazah biosinteze eritromicina. Namen teh bioinformatskih analiz je bil izbrati ključne gene, katerih vpliv na pozne stopnje biosinteze in donos eritromicina smo nato ovrednotili s pristopi metabolnega inženirstva (poglavje 4.3). Zanimive gene smo identificirali glede na: **a**) analizo genoma, usmerjeno na metabolne poti, ki zagotavljajo oskrbo s substrati v poznih stopnjah biosinteze (poglavje 5.2.2), **b**) prisotnost mutacij v genomu visokodonosnega seva v primerjavi z divjim sevom (pogalvje 5.2.4.) in **c**) njihovo predvideno funkcijo v poznih stopnjah biosinteze in položaj v genski skupini za biosintezo eritromicina (poglavje 5.2.5). Kot je opisano v naslednjem poglavju, je dodaten temelj uporabljenim pristopom metabolnega inženirstva predstavljal tudi razvoj specifičnih genskih orodij, ki omogočajo učinkovito gensko manipulacijo *S. erythraea*.

5.2.1 Razvoj postopkov in orodij za gensko manipulacijo *S. erythraea*

Sevi *S. erythraea* predstavljajo precejšen izziv za gensko manipulacijo, saj jih težko transformiramo z obstoječimi plazmidi, ki se uporabljajo pri aktinomicetah in katerih mehanizem integracije v genom temelji na aktivnosti bakteriofagnih integraz (Kieser in sod., 2000). Težava je v odsotnosti integracijskih mest (att) v njenem genomu, v katera bi se taki plazmidi, skupaj z želenimi genskimi konstrukti, lahko učinkovito in stabilno integrirali (Brünker in sod., 1998; Voeĭkova in sod., 2003). Analiza genoma seva NRRL

23338 (Oliynyk in sod., 2007) je pokazala, da so v genomu prisotna t.i. »psevdointegracijska« mesta kamor se plazmid sicer lahko integrira, vendar je učinkovitost zelo majhna. Naše ugotovitve potrjujejo tudi rezultati drugih skupin, ki so se ukvarjale s transformacijo S. erythraea (Wu in sod., 2011). Zato je bil eden od ciljev našega dela izboljševanje učinkovitosti transformacije z vnosom treh integracijskih mest v genom S. *erythraea.* Vnesli smo att mesta za integraze iz bakteriofagov Φ C31 in Φ BT1 ter iz plazmida pSAM2, konstrukte pa smo v genom vnesli s pomočjo homologne rekombinacije (poglavje 3.2.2, poglavje 4.1.2). Kot primerno regijo genoma S. eryhtraea za vnos integracijskih mest smo izbrali gensko skupino ChlB, ki po predvidevanjih nima pomembne funkcije za rast bakterije in produkcijo eritromicina. Učinkovitost tranformacije novo pripravljenega seva smo določili z ločenim vnašanjem plazmidov, ki vsebujejo posamezno integracijsko mesto ter ustrezni integrazni gen. Rezultati so pokazali, da je Φ C31 najbolj učinkovito integracijsko mesto, ki je imelo za približno 6 % večjo učinkovitost od integracijskega mesta ØBT1 (Preglednica 6). Podobno strategijo za izboljševanje učinkovitosti transformacije so uporabili tudi Rodriguez in sod., ki so v genom S. erythraea vnesli Φ C31 integracijsko mesto in prav tako pokazali, da se je povečala učinkovitost transformacije (Rodriguez in sod., 2003). Tako smo pri kasnejših kloniranjih uporabljali integracijsko mesto Φ C31.

Pomemben dejavnik pri testiranju vpliva čezmernega izražanja določenega gena je, da izberemo učinkovit promotor, ki poganja transkripcijo izbranega gena. Najpogosteje pri prvem koraku uporabimo močne konstitutivne promotorje, saj tako lahko hitro preverimo dejanski vpliv gena na donos ciljnega produkta oziroma na vpletene metabolne poti. V začetni fazi smo testirali več promotorjev, ki se pogosto uporabljajo za čezmerno konstitutivno izražanje v aktinomicetah in identificirali najprimernejši promotor. Za testiranje promotorjev smo uporabili reporterski gen xylE, ki kodira encim katehol 2,3deoksigenazo, ki katalizira pretvorbo brezbarvnega katehola v rumen produkt. Z merjenjem absorbance obdelanih vzorcev (opis postopka 3.6.3) smo lahko določili kateri promotor ima močnejše delovanje. Sicer se kot reporterski sistem, gen xylE pogosto uporablja pri delu s številnimi sevi aktinomicet (Ingram in sod., 1989). Rezultati so pokazali opazne razlike v moči delovanja promotorjev. Največjo moč izražanja in robustnost v različnih neodvisnih transformantah je pokazal promotor PermE* brez mesta vezave ribosoma, katerega jakost je bila od ostalih treh testiranih promotorjev močnejša za več kot 38 %. Na podlagi teh rezultatov smo za nadaljnje delo izbrali promotor PermE* brez mesta vezave ribosoma. Za rutinsko čezmerno izražanje večine genov v okviru te doktorske naloge smo nato pripravili plazmid pSet152-PermE*, ki vsebuje gen za integrazo iz bakteriofaga Φ C31 in promotor *PermE** brez mesta za vezavo ribosoma.

5.2.2 Identifikacija metabolnih poti in genov, ki zagotavljajo oskrbo substrati za pozne stopnje biosinteze eritromicina v *S. erythraea*

Analiza genov za biosintezo TDP-4-keto-6-deoksiglukoze pri S. erythraea

Ena od ključnih faz v poznih stopnjah biosinteze eritromicina je glikozilacija eritromicinskega aglikona z dvema deoksisladkorjema mikarozo in desozaminom. Izhodna spojina za biosintezo obeh sladkorjev je TDP-4-keto-6-deoksiglukoza (Takahashi in sod., 2006). Medtem ko se geni za pretvorbo TDP-4-keto-6-deoksiglukoza nahajajo v genski skupini za biosintezo eritromicina, pa biosintezna pot od glukoze do TDP-4-keto-6-deoksiglukoze pri *S. erythraea* še ni bila karakterizirana. Na podlagi sorodnih biosinteznih poti pri drugih bakterijah, opisanih v literaturi, smo s pomočjo bioinformacijske analize sestavili domnevno biosintezno pot pri *S. erythraea*, ki je shematsko prikazana na sliki 29 (poglavje 4.2.1.1).

Biosintezna pot se začne s pretvorbo glukoze v glukoza-6-fosfat. Pri tej reakciji lahko sodelujeta encima glukokinaza, ki jo v genomu S.erythraea najverjetneje kodirata dva gena SACE_1700 in SACE_7183 ter polifosfat glukokinaza, ki je produkt gena SACE_1802. Raziskave, ki so bile osredotočene na delovanje homologov glukokinaze, opravljene na drugih bakterijah kažejo, da je za potek reakcije potreben donor fosfatne skupine (najpogosteje ATP) in dvovalentni kovinski ion (npr. Mg²⁺) (Meyer in sod., 1997). Podobno velja tudi za polifosfat glukokinazo, ki sicer v osnovi porablja anorgaski polifosfat, lahko pa tudi ATP, CTP, GTP in UTP (Tanaka in sod., 2003). Pri bakteriji Streptomyces aureofaciens, ki sintetizira klortetraciklin, so raziskovali delovanje obeh encimov in ugotovili, da je glukokinaza aktivna samo v času logaritmske faze, medtem ko se polifosfat glukokinaza aktivira na koncu logaritmske faze in njena aktivnost narašča vzporedno z biosintezo klortetraciklina v času stacionarne faze (Hošťálek in sod., 1976). Glede na objavljeno literaturo pri S. erythraea, podrobne raziskave na omenjenih glukokinazah še niso bile opravljene. Na podlagi omenjene raziskave pa obstaja možnost, da je mehanizem delovanja glukokinaz podoben tudi za S. erythraea pri biosintezi eritromicina.

Naslednja reakcija v predvideni metabolni poti do TDP-4-keto-6-deoksiglukoza je konverzija glukoza-6-fosfata v glukoza-1-fosfat. To reakcijo katalizira encim fosfosladkormutaza. Na podlagi BLAST analize, pri kateri smo kot referenčno zaporedje izbrali fosfogluko-mutazo iz *Bacillus subtilis* (Maino in Young, 1974), smo v *S. erythraea* identificirali zaporedje predvidene fosfo-sladkor-mutaze SACE_6548, ki z aminokislinskim zaporedjem iz *B. subtilis* kaže 37 % identičnost. Dodatne BLAST analize zaporedja SACE_6548 so pokazale, da bi pri tem genu lahko šlo tudi za fosfomanomutazo. Ta encim sicer katalizira pretvorbo manoza-6-fosfata prav tako pa tudi glukoza-6-fosfata v ustrezna sladkor-1-fosfata (Videira in sod., 2000; Ye in sod., 2004). Na podlagi poravnave aminokislinskega zaporedja SACE_6548 in zaporedij fosfo-sladkor-mutaz iz drugih organizmov (Slika 30) smo tudi potrdili, da so v SACE_6548 ohranjeni vsi ključni preostanki, ki tvorijo aktivno mesto encima, zato predvidevamo, da produkt gena SACE_6548 katalizira pretvorbo glukoze-6-fosfat v glukozo-1-fosfat.

Naslednja reakcija v tej metabolni poti je konverzija glukoze-1-fosfat v TDP-D-glukozo (Slika 29). Reakcijo katalizira encim glukoza-1-fosfat timidilil transferaza. Na podlagi BLAST analize referenčnega zaporedja iz *Streptomyces* sp. (Han in sod., 2006) smo v *S. erythraea* identificirali gen SACE_6883. Glede na veliko podobnost zaporedja SACE_6883 z glukoza-1-fosfat timidilil transferazami iz drugih organizmov lahko trdimo, da produkt gena SACE_6883 katalizira pretvorbo glukoze-1-fosfat v TDP-D-glukozo. Da lahko reakcija poteče sta potrebna še TTP in Mg²⁺ (Sivaraman in sod., 2002).

Zadnja reakcija je konverzija TDP-D-glukoze v TDP-D-4-keto-6-deoksiglukozo. Reakcijo katalizira encim TDP-D-glukoza-4,6-dehidrataza, ki je produkt gena SACE_6480 (Vara in Hutchinson, 1988; Linton in sod., 1995). Enako je njegova funkcija določena tudi v bazi podatkov KEGG. TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoza vstopa potem v biosintezne poti desozamina, mikaroze in ramnoze, ki je gradnik celičnih sten Gram-pozitivnih in Gramnegativnih bakterij (Shibaev, 1987, Madduri in sod., 2001).

Analiza genov za biosintezo S-adenozil-L-metionina pri S. erythraea

Poleg deoksisladkorjev je pri poznih (post-PKS) stopnjah biosinteze pomembna tudi oskrba z metilno skupino, ki jo metiltransferazi eryG in eryF uporabita za metilacijo biosinteznih intermediatov eritromicina. Vir oziroma donor metilne skupine za metilacije je molekula *S*-adenozil-L-metionin (SAM) (Fontecave in sod., 2004). Po odcepitvi metilne skupine s SAM nastane molekula *S*-adenozil-L-homocistein, ki se preko cikla encimskih reakcij ponovno metilira, da spet nastane SAM. S pomočjo bioinformacijskih orodji smo analizirali, kateri geni najverjetneje sodelujejo pri ciklu regeneracije SAM v *S. erythraea* in predvideli domnevno biosintezno pot, ki je shematsko prikazana na sliki 32 (poglavje 4.2.1.2).

Po odcepitvi metilne skupine s SAM nastane molekula *S*-adenozil-L-homocistein, ki se pretvori v L-homocistein. Na podlagi referenčnega aminokislinskega zaporedja adenozilhomocisteinaze iz *M. tuberculosis* (Reddy in sod., 2008) smo kot najverjetnejša funkcijska homologa v *S. erythraea* identificirali gena SACE_3897 in SACE_6450. Glede na veliko podobnost teh genov s karakteriziranimi homologi v drugih organizmih smo sklepali, da produkta teh dveh genov najverjetneje sodelujeta pri pretvorbi *S*-adenozil-L-homocistein v L-homocistein. Pri reakciji se porabi še ena molekula H₂O in nastane stranski produkt adenozin (Lu, 2000).

Pri naslednji reakciji se na L-homocistein veže metilna skupina, tako da se L-homocistein pretvori v L-metionin (Slika 32). V genomu S. erythraea smo identificirali tri gene oziroma encime, ki potencialno lahko sodelujejo pri tej reakciji. Eden je homocistein Smetiltransferaza. Na podlagi referenčnega zaporedja iz bakterije E. coli (Hayashi in sod., 2006) smo kot homocistein S-metiltransferazo identificirali produkt gena SACE_3890. Ta encim pri reakciji prenese metilno skupino na L-homocistein s SAM. Encim zadovoljuje potrebe po metioninu (Balish in Shapiro, 1967), zaradi porabe molekule SAM pa ne more sodelovati pri regeneraciji te izhodne spojine. Drugi encim je metionin sintaza (od kobalamina odvisna sintaza). Tudi za ta encim smo za referenčno zaporedje izbrali gen iz E. coli (Hayashi in sod., 2006) najverjetnejši funkcijski homolog v S. erythraea pa smo identificirali gen SACE_3898. Metionin sintaza pri reakciji za donor metilne skupine porablja 5-metiltetrafolat, ki se ob reakciji pretvori v tetrahidrofolat (Matthews in sod., 2003; Ubhi in sod., 2011). Tretji encim, ki lahko katalizira pretvorbo L-homocisteina v 5-metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-S-metiltransferaza metionin je (od kobalamina neodvisna metionin sintaza). Na podlagi referenčnega zaporedja iz E. coli (Hayashi in sod., 2006) smo v S. erythraea identificirali dve zaporedji, homolgoni 5metiltetrahidropteroiltriglutamat-homocistein-S-metiltransferazi. Zaporedji sta produkta genov SACE_4744 in SACE_6349. Tudi ta encim pri reakciji kot vir metilne skupine porablja 5-metiltetrafolat, ki se pretvori v tetrahidrofolat (Matthews in sod., 2003; Suliman in sod., 2005).

Reakcija, ki zaključi cikel regeneracije SAM (Slika 32) je konverzija L-metionina v SAM, ki jo katalizira encim metionin adenoziltransferaza. Na podlagi referenčnega zaporedja encima iz *S. coelicolor* (Bentley in sod., 2002) smo v *S. erythraea* identificirali dve homologni zaporedji, produkta genov SACE_2103 in SACE_3900. Za potek reakcije je potreben še ATP ter Mg²⁺ in K⁺ (Mato in sod., 1997; González in sod., 2000; Lu, 2000). Metilna skupina iz regenerirane molekule SAM potem vstopa v reakciji metilacije za biosintezo eritromicina.

5.2.3 Vpliv čezmernega izražanja genov za oskrbo s substrati za pozne stopnje biosinteze SACE_6480 in SACE_6479 na donos eritromicina

Na podlagi podatkov objavljenih v znanstvenih člankih in bioinformatske analize genov, ki potencialno sodelujejo pri oskrbi s substrati za pozne stopnje biosinteze eritromicina (poglavje 5.2.2.) smo kot najbolj zanimiva za pristop metabolnega inženirstva izbrali gena SACE_6479 in SACE_6480, ki sodelujeta pri biosintezi deoksisladkorjev. Gen SACE_6480 sodeluje pri zadnji reakciji sinteze TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoze, izhodne spojine deoksisladkorjev in kodira encim TDP-D-glukoza-4,6-dehidrataza. Gen

SACE_6479 se nahaja na istem operonu s SACE_6480 (Linton in sod., 1995), glede na bazo podatkov KEGG pa bi lahko sodeloval pri biosintezi deoksisladkorja ramnoze. Gen SACE_6480 smo izbrali zato, ker v času biosinteze eritromicina izhodna spojina TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoza predstavlja substrat za tri biosintezne poti deoksisladkorjev: za desozamin, mikarozo ter ramnozo in zato bi lahko bila oskrba z izhodno spojino ozko grlo pri biosintezi vseh treh deoksisladkorjev, kar vpliva na biosintezo eritromicina in ramonze. L-ramnoza je eden izmed deoksisladkorjev v *S. erythraea*, ki je ključen gradnik celične stene (Shibaev, 1987, Madduri in sod., 2001).

Na podlagi pripravljenega vektorja za izražanje (poglavje 5.2.1) smo pripravili tri plazmide, dva plazmida za vsak gen posebej in en plazmid z obema genoma. Vse tri plazmide smo ločeno vnesli v sev ABE1441, plazmid z obema genoma pa še v sev NRRL23338. Rezultati testiranj so pokazali, da čezmerno izražanje posameznih genov SACE_6479 in SACE_6480 ni imelo vpliva na produkcijo eritromicina, čezmerno izražanje obeh genov skupaj pa je imelo pozitiven vpliv. Povečanje produkcije eritromicina pri divjem sevu NRRL23338 ni bilo statistično značilno. Pri divjem sevu je produkcija eritromicina majhna in domnevamo, da zato oskrba z deoksisladkorji ni limitirajoči dejavnik biosinteze. Pri visokodonosnem sevu ABE1441 pa je vnos dodatnih genov imel občuten vpliv na produkcijo eritromicina (24,2 %) (poglavje 4.3.2). Pri visokodonosnem sevu je produkcija eritromicina nekajkrat večja, zato je bistveno večja tudi poraba izhodne spojine deoksisladkorjev. Poleg tega ima na povečan donos eritromicina lahko vpliv tudi povečana biosinteza ramnoze, saj pomanjkanje ramnoze v celični steni pri sorodni vrsti S. spinosa lahko negativno vpliva na rast v primeru povečanega osmotskega tlaka (Madduri in sod., 2001). Celica z večjo količino ramnoze v steni bi lahko torej ostala dalj časa funkcionalna in bi lahko sintetizirala več eritromicina. Opaženi rezultat nakazuje, da ima biosinteza eritromicina pri sevu ABE1441 morda ozko grlo pri biosintezi izhodne spojine deoksisladkorjev TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoze.

V prihodnje bi lahko za čezmerno izražanje izbrali tudi gen SACE_6883, ki kodira glukoza-1-timidilil-transferazo. Čezmerno izražanje SACE_6883 skupaj z genom SACE_6480 bi lahko še bolj pozitivno vplivalo na povečanje metabolnega pretoka od glukoza-6-fosfata do TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoze (Slika 29).

Optimizacija kultivacijskih pogojev pri sevih z dodatnima kopijama genov SACE_6479 in SACE_6480

Pridobljene seve z dodatnima kopijama genov SACE_6479 in SACE_6480 smo testirali

tudi v gojiščih z dodanimi izbranimi izhodnimi spojinami za biosintezo in mineralov (poglavje 4.3.2). Pri optimizaciji gojišča smo uporabili izhodna seva divji tip NRRL23338 in visokodonosni ABE14411 ter rekombinantna seva, ki sta imela najbolj opazno povečanje produkcije eritromicina. Z vnosom dodatnih kopij genov SACE_6479 in SACE 6480 se je domnevno povečala oskrba z deoksisladkorji, kar pomeni, da je lahko novo potencialno ozko grlo oskrba izhodne spojine za biosintezo makrolidnega obroča. Zato smo v produkcijsko gojišče ABMP8 dodajali aminokislini izolevcin in valin. V metabolizmu se valin in izolevcin razgradita do metilmalonil-CoA (Tang in sod., 1994), ki je ključen gradnik za biosintezo makrolidnega obroča. Za oskrbo gradnikov makrolidnega obroča smo dodajali tudi vinil propionat. Ta se pretvori najprej v propionat in nato v propionil-CoA, ki je tudi pomemben pri biosintezi makrolidnega obroča (Chen in sod., 2013a). Za izboljšanje rasti smo v gojišče dodali fosfate. Poizkusi na drugih organizmih so pokazali, da dodatek fosfata v pravih koncentracijah poveča začetno rast in pozitivno vpliva na produkcijo sekundarnih metabolitov (Cheng in sod., 1995). V gojišče smo dodajali tudi različne minerale kot vir najbolj pogostih kofaktorjev (Mg²⁺, K⁺, Mn²⁺ in Co²⁺), ki jih potrebujejo encimi post-PKS reakcij in encimi metabolnih poti za oskrbo izhodne spojine. Testirali smo tudi gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika, za katerega je bilo ugotovljeno, da lahko vpliva na povečanje produkcije eritromicina (Hamedi in sod., 2002).

Vpliv različnih komponent gojišča smo testirali v štirh paralelkah za vsak testirani parameter in zagotovili enak inokulum za vse variacije in paralelke. Dodatke smo dodajali v različnih časovnih obdobjih in v različnih koncentracijah (glej poglavje 4.3.2). Rezultati so pokazali, da pri sevu divjega tipa dodatki niso imeli vpliva na produkcijo. Glede na ta rezultat lahko zaključimo, da so zaradi manjše produkcije eritromicina potrebe po metabolitih manjše in zato uspe organizmu samem zagotoviti potrebe. Drugače pa je pri visokodonosnih sevih (ABE1441 in ABE12170). V celoti je bil vpliv dodatkov večji pri nespremenjenem visokodonosnem sevu (ABE1441) tako relativne kot tudi absolutne vrednosti. Največji vpliv na produkcijo je imel dodatek MgSO₄ (poglavje 4.3.2). Mg²⁺ ioni so kofaktorji, ki vplivajo na številne encime celotnega celičnega metabolizma (ne samo za biosintezo eritromicina) in zato sklepamo, da ima njihova povečana koncentracija tako velik vpliv na produkcijo eritromicina. Tudi ostali minerali so imeli pozitiven vpliv na manjši.

Pričakovan pozitiven vpliv na produkcijo smo opazili pri dodajanju izhodnih spojin za biosintezo makrolidnega obroča (vinil propionat, valin in izolevcin). Manj pričakovano je bilo, da ima dodatek vinil propionata manjši vpliv kot dodatek aminokislin, saj je pot razgradnje vinil propionata do izhodnih spojin krajša. Potencialen razlog za to je, da vinil propionat za celico ni primarni vir ogljika in ga celica zato manj asimilira iz gojišča,

medtem ko so aminokisline perferiran vir dušika in jih celica zato tudi raje asimilira. Drugi potencialen razlog za manjši vpliv vinil propionata na produkcijo je (pre)majhna aktivnost esteraz, ki vinilpropionat pretvorijo v propionil-CoA oziroma karboksilaze za pretvorbo propionil-CoA v [S]-metilmalonil-CoA. Propionil-CoA je začetna enota za biosintezo makrolidnega obroča na PKS, pri čemer se pri sintezi ene molekule eritromicina porabi samo ena molekula propionil-CoA. Za nadaljevanje biosinteze makrolidnega obroča pa je potrebnih še šest molekul [S]-metilmalonil-CoA. Ker je potreba po [S]-metilmalonil-CoA večja kot po propionil-CoA, je lahko reakcija propionil-CoA karboksilaze ozko grlo na metabolni poti od vinilpropionata do eritromicina. Aminokislini valin in izolevcin se razgradita v [S]-metilmalonil-CoA iz katerega lahko z dekarboksilacijo nastane tudi propionil-CoA.

Pri dodatku K₂HPO₄ se je produkcija zmanjšala za 11 %. Najverjetnejši razlog za to je, da pri previsokih koncentracijah fosfatov med bioprocesom pride do pospešene rasti, ustavi, oziroma upočasni pa se biosinteza sekundarnih metabolitov (Cheng in sod., 1995). Ustrezna začetna koncentracija fosfatov v gojišču naj bi pozitivno vplivala na produkcijo sekundarnih metabolitov. Produkcija se je zmanjšala tudi pri gojišču z oljem kot glavnim virom ogljika, kar pomeni, da visokodonosna seva nista primerna za to gojišče, saj na dobro produkcijo v gojišču z oljem vpliva veliko dejavnikov (Hamedi in sod., 2004).

5.2.4 Vrednotenje vpliva mutacij v genih za pozne stopnje biosinteze eritromicina v visokodonosnem sevu ABE1441 na donos eritromicina

S primerjavo genov, ki najverjetneje sodelujejo v poznih stopnjah biosinteze (primerjali smo gene znotraj genske skupine za biosintezo eritromicina in gene, ki so najverjetneje udeleženi v oskrbo s substrati za pozne stopnje biosineze – poglavje 5.2.2) v genomih divjega seva NRRL23338 in visokoproduktivnega seva ABE1441, smo identificirali potencialne mutacije, do katerih je prišlo v sevu ABE1441 tekom izboljševanja seva z naključno mutagenezo in selekcijo. V sevu ABE1441 smo identificirali mutacije v treh genih, ki sodelujejo pri post-PKS reakcijah: *eryCVI, eryBIV, eryCII* ter pri genu *eryBI,* katerega funkcija še ni znana. Mutacija v genu *eryBI* se nahaja na terminatorskem zaporedju, kar ne vpliva na aminokislinsko zaporedje proteina EryBI. Domnevne mutacije pri genih *eryCVI, eryBIV* in *eryCII* se nahajajo znotraj bralnega okvirja in pri vseh treh primerih je prišlo do zamenjave nukleotida, kar se pri vseh treh tudi odraža v zamenjavi aminokisline. Samo na podlagi spremembe aminokislinskega zaporedja nismo mogli sklepati ali sprememba aminokisline vpliva tudi na funkcionalnost proteina in ali je vpliv na biosintezo eritromicina pozitiven, negativen ali nevtralen.

Prisotnost mutacij smo najprej potrdili s ponovnim sekvenciranjem izbranih regij z dideoksinukleotidno metodo, nato pa preverili vpliv čezmernega izražanja mutiranih genov

v divjem sevu NRRL23338. Rezultati (poglavje 4.3.1.) so pokazali, da čezmerno izražanje teh genov ni imelo bistvenega vpliva na donos eritromicina v divjem sevu S. erythraea. Tak rezultat lahko razložimo na več načinov: a) spremembe aminokislinskega zaporedja proteinov, do katerih je prišlo zaradi mutacije, nimajo pomembnega vpliva na lastnosti encimov, v katerih se pojavljajo (gre za nevtralne mutacije); b) encimi, v katerih je prišlo do mutacij, ne predstavljajo ozkega grla biosinteze v divjem sevu S. erythraea, pozitivne lastnosti teh mutacij pa bi lahko opazili, če bi imeli na voljo sev s srednje dobrim donosom, v katerem ti encimi dejansko predstavljajo ozko grlo pri biointezi, ki bi ga čezmerno izražanje mutiranih encimov odpravilo. Pri tem je zanimivo, da smo čezmerno izražanje mutiranih variant genov izvedli tudi v visokodonosnem sevu ABE1441, kjer prav tako nismo opazili vpliva na donos eritromicina. c) glede na to, da smo testiranje izvedli v merilu stresalnika, bi se lahko pozitivne lastnosti teh mutacij morda odrazile šele ob testiranju v pravih industrijskih pogojih v bioreaktorju; d) čezmerno konstitutivno izražanje mutiranih variant genov ni pravi način za dokazovanje vpliva mutacij v genih eryCVI in eryCII, zato bi za dodatno ovrednotenje vpliva morali točkaste mutacije vnesti v divji sev NRRL23338 na njihovem dejanskem mestu v genomu.

Opaženi rezultat ponazarja tudi omejitve pristopa primerjalne genomike, saj ob velikem številu opaženih mutacij težko predvidimo, katere mutacije so ključne za želene lastnosti industrijskega seva. Dokončno lahko pozitivni vpliv mutacij potrdimo ali ovržemo le z laboratorijskimi eksperimenti, ki pa so izredno dolgotrajni in kompleksni.

5.2.5 Čezmerno izražanje genov *eryG* in *eryK* za zmanjšanje nečistoč eritromicina B in eritromicina C v bioprocesni brozgi

Pri kultivaciji visokodonosnega seva vsebuje bioprocesna brozga v povprečju skupaj od 7 do 9 % nečistoč eritromicina B (ErB) in eritromicina C (ErC). ErB in ErC sta biointezna intermediata pri nastanku eritromicina A (ErA), k povečanju koncetracij ErB in ErC pa ima pomembno vlogo delovanje zadnjih dveh encimov v biosintezi eritromicina, P450 hidroksilaze EryK in metilaze EryG. EryK katalizira pretvorbo ErD v ErC, z manjšo učinkovitostjo pa tudi ErB v ErA. EryG katalizira pretvorbo ErC v ErA oziroma alternativno ErD v ErB (Slika 11, poglavje 2.4.2.4). Za razumevanje pojava nečistoč ErB in ErC je pomembno, da ima encim eritromicin EryK od 1200 do 1900 krat večjo preferenco do ErD v primerjavi z ErB (Lambalot and Cane, 1995). Zato je možno, da prevelika aktivnost encima EryG (od S-adenozilmetionina odvisne metiltransferaze) lahko poveča količine nečistoče ErB, ki je eritromicin C-12 hidroksilaza EryK ne more več učinkovito pretovoriti v končni produkt ErA.

Pri načrtovanju pristopov metabolnega inženirstva za zmanjševanje količine nečistoč ErB in ErC je zato ustrezno razmerje med encimskima aktivnostma EryG in EryK ključnega pomena, saj mora biti konverzija ErD v ErC z EryK bistveno hitrejša od pretvorbe ErD v

ErB z EryG. Glede na raziskave, objavljene v literaturi, je pri *S. erythraea* čezmerno izražanje genov *eryK* in *eryG* v razmerju 3:2 najbolj učinkovito zmanjšalo količino nečistoče ErB in ErC (Chen in sod., 2008). Ker pa ima vsak sev *S. erythraea* različno nativno aktivnost obeh encimov in tudi različno oskrbo z izhodno spojino metilne skupine S-adenozilmetioninom, je treba pri pristopu čezmernega izražanja ugotoviti, kakšno razmerje števila kopij *eryK/eryG* je optimalno za konkreten sev. Prav tako je pomembno, da lahko relevantne informacije o vplivu čezmernega izražanja *eryK* in *eryG* na količino nečistoč pridobimo le v visokodonosnem sevu, kjer je količina nečistoč dovolj velika, da jo lahko zanesljivo kvantificiramo.

V ovkiru te doktorske naloge smo tako v visokodonosni sev S. erythraea ABE1441 vnesli dodatne kopije genov eryK in eryG v različnih razmerjih. V ta namen smo pripravili dvanajst plazmidov za izražanje na osnovi vektorja pSet152-PermE* z različnim številom kopij in vrstnim redom obeh genov (Preglednica 10, podroben opis poglavje 4.3.3). Na dejansko razmerje med nivojema transkriptov eryG in eryK pa vpliva tudi, ali se pri vnosu v genom plazmid vgrajuje preko integracijskega mesta att ali pa s homologno rekombinacijo. V genomu S. erythraea je prisotno le psevdointegracijsko mesto, za integrazo iz ϕ C31, zato obstaja verjetnost, da se plazmid za izražanje vgradi v enega od nativnih genov *eryK* oziroma *eryG* s homologno rekombinacijo. Od mesta vgradnje je nato odvisna tudi raven izražanja dodatnih kopij genov, ki se lahko prepisujejo pod kontrolo različnih promotorjev. Pri vgradnji genov eryK : eryG sta vključena promotorja PeryAI in PeryK, ki sta nativna promotorja teh genov v genomu ter promotor PermE* s plazmida pSet152-PermE*. Ker se promotorji med seboj razlikujejo v jakosti in časovni regulaciji transkripcije, se posledično gena eryK in eryG različno izražata glede na mesto integracije plazmidov v genom. Ker vnaprej nismo mogli predvideti optimlanega razmerja izražanja eryG in eryK, smo pripravili različne plazmide za izražanje, le-te smo ločeno vnesli v sev ABE1441 in pri vsakem plazmidu testirali veliko število neodvisnih konjugant S. erythraea. Vsebnost nečistoč v ekstraktih smo merili z metodo LC-MS. Zmanjšanje količine nečistoč smo opazili pri sevih s plazmidi pABE38 (2 kopij eryG, 1 kopija eryK), pABE44 (2 kopij eryG, 1 kopija eryK) in pABE45 (2 kopij eryG, 1 kopija eryK). V primerjavi s kontrolo se je delež nečistoče ErB zmanjšal za 25 % in se je na ta račun povečala vsebnost ErA. Kljub povečanemu izražanju eryG pa je v vseh primerih v brozgi ostalo še relativno veliko nečistoče ErC (približno 10 %). Sklepali smo, da je razlog za to morda premajhna oskrba z izhodno spojino SAM, ki predstavlja donor metilne skupine pri metilaciji eritromicina C z EryG (poglavje 2.4.2.4, poglavje 2.4.3.3).

Pri sevih, ki je vnos dodatnih kopij genov eryK in eryG zmanjšalo nečistočo ErB smo z dodajanjem različnih donorjev metilnih skupin poizkusil zmanjšati delež nečistoče ErC v brozgi. Kot že prej omenjeno, encim EryK veže na molekulo hidroksilno skupino, encim EryG pa metilno skupino, ki je potrebna za zmanjšanje ErC. Pri metilaciji je naravni donor

metilne skupine molekula SAM. Z dodajanjem donorjev metilne skupine smo preverili ali lahko na ta način povečamo koncetracijo SAM v celici in s tem metilacijo ErC v ErA. Med kultivacijo v Erlenmajerjevih seklenicah smo po 24 urah dodali folno kislino, metionin in metanol. LC-MS analiza je pokazala, da dodatki niso imeli vpliva na zmanjšanje ErC, zato predvidevamo, da koncentracije SAM z dodajanjem teh spojin nismo uspeli povečati oziroma, da je morda za hitrost metilacije ErC v ErA bolj pomembna aktivnost encima EryG.

Kot že prej omenjeno, je vgradnja genov iz vektorja v genom potekala s homologno rekombinacijo, zato obstajajo štirje možni načini vgradnje genov pod različnimi promotorji z različno močjo (poglavje 4.3.3).

5.3 VPLIV IZBRANIH VERJETNIH REGULATORNIH GENOV NA BIOSINTEZO ERITROMICINA

5.3.1 Identifikacija verjetnih regulatornih genov, ki bi lahko sodelovali pri biosintezi eritromicina

Kljub velikemu kliničnemu in komercialnemu pomenu eritromicina in njegovih polsinteznih derivatov ter vlogi eritromicina kot modelnega poliketida, ki ga proizvaja modularna PKS tipa I, je regulacija biosinteze doslej ostala slabo pojasnjena. Ker v genski skupini za biosintezo eritromicina v *S. erythraea* ni regulatornih genov, so prvi regulator, globalni regualtorni gen *bldD*, (SACE_2077) identificirali še potem, ko so že objavili zaporedje celotnega genoma *S. erythraea* (Oliynyk in sod., 2007; Chng in sod., 2008). V genomu *S. erythraea* pa se nahaja kar 1118 genov, za katere lahko predvidimo vlogo pri regulaciji različnih procesov v celici (Oliynyk in sod., 2007). Poleg *BldD* so potencialno vlogo regulatornih genov karakterizirali še pri dveh genih iz družine TetR, SACE_0012 (Yin in sod., 2013) in SACE_7040 (Han in sod., 2011). Za ta dva gena so pokazali vpliv na morfološko diferenciacijo, vpliva na biosintezo eritromicina pa niso opazili. Naš namen je bil, da s pomočjo bioinformacijskih orodji identificiramo dodatne zanimive gene, ki sodelujejo pri regulaciji in z gensko manipulacijo preverimo ali imajo vpliv na biosintezo eritromicina.

S primerjalno transkriptomsko analizo naravnega in visokodonosnega seva smo identificirali tri homologe, katerih vlogo pri biostintezi eritromicina smo nato želeli potrditi tudi z eksperimenti inaktivacije in čezmernega izražanja teh genov. Prvi izbrani gen je bil SACE_0044, homolog serin/treonin kinaze. Serin/treonin kinaze so v mnogih bakterijah vključene v nadzor poznih faz rasti, sporulacije ali produkcije sekundarnih metabolitov (Av-Gay in sod., 1999). Drugi regulatorni protein je transkripcijski regulator iz družine LuxR, produkt gena SACE_2890. Transkripcijski regulatorji iz družine LuxR pri bakterijah regulirajo izražanje genov glede na gostoto celic v okolju (angl. quorum-sensing) (Fuqua in sod., 1994). Tretji regulatorni protein je protein, ki vsebuje vezavno domeno cikličnih nukleotidov SACE_3978. Proteini, ki vsebujejo domeno za vezavo cikličnih nukleotidov cAMP in cGMP so alosterično regulirani proteini (z cAMP in cGMP). Ta vrsta proteinov je navadno povezana z eno ali več efektorskih domen z različnimi funkcijami (Harman, 2001; Nambi in sod., 2012).

V nadaljevanju smo vlogo treh identificiranih regulatornih proteinov preverili s prekinitvijo genov v sevu NRRL 23338 in testiranjem v produkcijskem gojišču (poglavje 4.3.4.3). Rezultati s pokazali, da regulatorni geni nimajo vpliva na produkcijo eritromicina pri *S. erythraea*.

5.3.2 Vloga novo identificiranega proteina SACE_5599 v biosintezi eritromicina in morfološki diferenciaciji *S. erythraea*

Poleg genomike in transkriptomike smo kot osnovo za identifikacijo potencialno zanimivih regualtornih genov uporabili tudi rezultate primerjalnega proteomskega pristopa, ki so ga izvedli raziskovalci Acies Bio, Biotehniške fakultete in Instituta Jožef Stefan v okviru Kompetenčnega centra Brin. V okviru te naloge smo identificirali verjetne regualtorne proteine, ki v določeni fazi bioporcesa v 5 l bioreaktorju kažejo povečano raven izražanja v industrijskem sevu ABE1441 v primerjavi z divjim sevom NRRL23338. Eden od identificiranih verjetnih regulatornih proteinov, ki se je bistveno močneje izražal v sevu ABE1441 in še zlasti v času biosinteze eritromicina je gen SACE 5599. Da ima produkt gena SACE_5599 pomembno vlogo pri produkciji eritromicina, so raziskovalci Nacionalnega instituta za biologijo potrdili tudi s qPCR analizo, ki je jasno pokazala, da je bilo izražanje produkta v sevu ABE1441 najmočnejše v času produkcije eritromicina, medtem ko je bil v sevu NRRL23338 transkript SACE_5599 komaj zaznaven. Primerjava aminokislinskega zaporedja SACE_5599 z bazami podatkov drugih aktinomicet je pokazala najboljše ujemanje s slabo karakterizirano družino regulatornih proteinov LmbU. Poravnava zaporedij s programom Clustal Omega (Slika 34) je pokazala, da imajo zaporedja proteinov iz te družine številne dobro ohranjene ostanke triptofana in arginina, visoka teoretična pI vrednost pa nakazuje, da gre za protein, ki se lahko veže na negativno nabite nukleinske kisline.

Manipulacijo gena SACE_5599 smo izvedli v sevih NRRL23338 in ABE1441 (poglavje 4.3.4.1). Da bi dokazali vpliv SACE_5599 na produkcijo eritromicina smo gen inaktivirali v sevu ABE1441, testirali dobljene seve na produkcijo antibiotika in pri izbranem sevu gen s komplementacijo ponovno aktivirali. Rezultati manipulacije gena kažejo, da gen SACE_5599 vpliva tako na produkcijo eritromicina kot na morfološko diferenciacijo. Prekinitev gena SACE_5599 v ABE1441 je občutno zmanjšala produkcijo eritromicina (37

%) in intenzivnost sporulacije pri gojenju na ABSM4 agarni plošči (Slika 56/A). Nasprotni učinek je imelo čezmerno konstitutivno izražanje gena SACE_5599 v NRRL23338, kjer je bila produkcija eritromicina višja za 32 % in bujna sporulacija na R5 agarni plošči (Slika 56/B). Podobno povečnanje produkcije pri NRRL23338 smo opazili pri čezmernem izražanju regulatornega gena *BldD* (poglavje 4.3.4.2).

Že pri inaktivaciji regulatornega proteina BldD so opazili močan vpliv na morfološki razvoj *S. erythraea* (Chng in sod., 2008). Tudi naši rezultati kažejo, da je regulatorna mreža, ki regulira morfološke spremembe povezana tudi s biosintezo eritromicina. Enako povezavo med biosintezo eritromicina in morfologijo so opazili pri mutantih *S. erythraea* NRRL23338 rezistentnih na rifampicin (Carata in sod., 2009). Ti podatki nakazujejo, da sta z regulatornega vidika morfološka diferenciacija in biosinteza eritromicina tesno povezana pojava. Da ta povezava ni pravilo sta pokazali dve raziskavi kjer je inaktivacija genov vplivala na morfologijo ne pa tudi na produkcijo eritromicina (Han in sod., 2011; Yin in sod., 2013). Zato regulatorni mehanizmi ostajajo še nerazjasnjeni in odpirajo možnosti za nadaljne raziskave.

Na podlagi opravljenih raziskav lahko trdimo, da smo uspeli razviti učinkovita orodja in metodologijo za transformacijo in gensko manipulacijo divjega seva, kot tudi visokodonosnega seva *S. erythraea.* Z namenom razvoja primernih genskih orodji smo testirali različne integracijske vektorje, in aktivne promotorje in pripravili potrebne plazmidne vektorje (potrjena hipoteza št. 1). Da smo s pomočjo metod bioinformacijske analize genoma *S. erythraea*, identificirali verjetne metabolne poti in regulatorne gene, tako ključne primarne poti, kot tudi metabolne poti neposredno vpletene v biosintezo gradbenih enot potrebnih za pozne stopnje biosinteze eritromicina (potrjena hipoteza št. 2). Da smo na osnovi bioinformatskih analiz določili verjetne ključne genske homologe oziroma metabolne poti v katerih so ti geni udeleženi, in s pomočjo metabolnega inženiringa (genska inaktivacija ali povečano izražanje) ciljano vplivali na njihovo delovanje, ki je v nekaterih primerih posledično tudi vplivalo na biosintezo eritromicina (potrjena hioteza št. 3). Vpliv genskih sprememb na biosintezo eritromicina ni vedno odvisen od fizioloških parametrov (hipoteza št. 4 ni potrjena).

5.4 SKLEPI

Z namenom, da poglobimo razumevanje o biosintezi eritromicina pri *S. erythraea*, smo se v sklopu te doktorske naloge osredotočili na post-PKS in regulacijo biosinteze eritromicina. Glede na opravljeno delo lahko sklepamo:

• Na podlagi več testiranih promotorjev smo kot optimalen kostituivni promotor za čezmerno izražanje genov v *S. erythraea* identificirali *PermE** brez mesta vezave za ribosom. Genom *S. erythraea* vsebuje psevdointegracijsko mesto za integrazo iz

bakteriofaga Φ C31, ki smo ga uporabili za vnos plazmidov v genom. Bistveno večjo učinkovitost transformacije smo dosegli, ko smo v nevtralno regijo genoma vnesli prava integracijska mesta za integraze različnih bakteriofagov.

- S pomočjo bioinformacijskih orodij smo določili domnevno biosintezno pot TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoze in domnevno metabolno pot za obnovo molekule SAM pri *S. erythraea*. Anotirali smo produkt gena SACE_5599 kot domnevni regulatorni protein. Na podalgi komparativne analize genomov smo identificirali štiri domnevne mutacije v genski skupini za biosintezo eritormicina pri *S. erythraea*.
- Potrdili smo mutacije znotraj bralnega okvirja pri genu *eryBIV*, *eryCII* in *eryCVI*. S čezmernim izražanjem mutiranih variant genov *eryCII* in *eryCVI* nismo mogli potrditi vpliva opaženih mutacij na produkcijo eritromicina.
- Istočasno čezmerno izražanje genov SACE_6479 in SACE_6480, ki sodelujeta pri metabolizmu deoksisladkorjev pozitivno vpliva na donos eritromicina pri visokodonosnem sevu ABE1441.
- Z vnosom različnih kombinacij genov *eryK* in *eryG* nam je uspelo pripraviti sev z zmanjšano vsebnostjo nečistoče ErB v končni produkcijski brozgi. Nečistoča ErC je še vedno prisotna in njena vsebnost se je za malenkost povečala.
- S čezmernim izražanjem in prekinitvijo gena SACE_5599 ter s komplementacijo prekinjenega gena, nam je uspelo dokazati, da ima produkt gena SACE_5599 vpliv na biosintezo eritromicina. Protein SACE_5599 vpliva tudi na morfološki razvoj *S. erythraea*. Inaktivacija gena SACE_5599 je občutno zmanjšala produkcijo eritromicina.
- Pri optimizaciji kultivacijskih pogojev smo pokazali pozitiven vpliv dodanih komponent gojišča na produkcijo eritromicina pri visokodonosnih sevih ABE1441 in ABE12170. Največji vpliv so imeli dodatki mineralov.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Aktinomicete, med katere spada tudi *Saccharopolyspora erythraea*, so Gram-pozitivne bakterije z visoko vsebnostjo nukleotidov G + C v genomu, ki živijo pretežno v zemlji. *S. erythraea* proizvaja eritromicin, makrolidni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Deluje proti Gram-pozitivnim bakterijam, njegovo delovanje pa temelji na vezavi na podenoto bakterijskega ribosoma 50S, s čimer inhibira sintezo proteinov. Molekula eritromicina je sestavljena iz 14-členskega makrolaktonskega obroča, na katerega sta pripeta dva deoksisladkorja, D-desozamin in L-kladinoza.

Biosinteza eritromicina se začne na modularni PKS tipa I. Za PKS tipa I je značilno, da so encimske domene med seboj kovalentno povezane v module, pri čemer vsak modul katalizira eno stopnjo podaljševanja poliketidne verige za dva ogljikova atoma. Rastoča veriga z vsakim modulom interagira samo enkrat, zato je število ogljikovih atomov v verigi določeno s številom modulov. Biosinteza eritromicina se začne z začetno enoto propionil-CoA, pri prenašanju verige po PKS pa na vsakem modulu poteče dekarboksilativna kondenzacija med vstopajočo podaljševalno enoto metilmalonil-CoA in rastočo verigo. Koraku podaljševanja na nekaterih modulih sledi redukcija nastale β-keto skupine, ki je lahko popolna ali delna. Po ciklizaciji na zadnji terminalni domeni se sprosti makrolaktonski obroč 6-dEB. V nadaljevanju biosinteze se v seriji post-PKS reakcij neaktivna molekula 6-dEB pretvori v eritromicin A, molekulo z antibiotično aktivnostjo. V poznih stopnjah biosinteze sodelujejo encimi hidroksilaze, glikoziltransferaze in metiltransferaze, ki omogočijo vezavo sladkorjev D-desozamina in L-mikaroze ter metilacijo in hidroksilacijo molekule. Za uspešen potek poznih stopenj so pomembne tudi metabolne poti, ki oskrbujejo potrebne izhodne spojine, na primer biosinteza deoksisladkorjev D-desozamina in L-mikaroze in regeneracija donorja metilne skupine, SAM.

Za biosintezo eritromicina so odgovorni geni, ki se nahajajo v genski skupini *ery*. Eritromicinska genska skupina vsebuje 20 genov. Geni za PKS, ki sodelujejo pri biosintezi poliketidnega obroča, imajo oznako *eryA*, geni iz skupine genov *eryB* sodelujejo pri biosintezi in vezavi mikaroze na makrolidni obroč. Pri biosintezi in vezavi desozamina na makrolidni obroč sodeluje geni iz skupine genov *eryC*, za ostale post-PKS modifikacije pa so odgovorni geni *eryF*, *eryG* in *eryK*. Regulacija biosinteze eritromicina je slabo preučena in so do sedaj odkrili samo en globalni regulatorni gen, ki ima vpliv na biosintezo eritromicina. Nekoliko bolje pojasnjen je vpliv različnih sestavin gojišča, pri čemer so ugotovili, da imajo previsoke koncentracije fosfatov ter enostavnih virov ogljika in dušika (npr. amonijev sulfat, glukoza) negativen vpliv na biosintezo eritromicina. Pri pripravi gojišča za biosintezo eritromicina so zato zelo pomembni parametri vrsta, razmerje in

koncentracija hranil v gojišču, zlasti pravo razmerje med enostavnimi in kompleksnimi viri ogljika in dušika.

Namen našega dela je bil identificirati in preučiti gene, ki sodelujejo pri post-PKS reakcijah in regulatorne gene, ki bi imeli vpliv na produkcijo eritromicina. Pri raziskovanju vplivov na biosintezo eritromicina smo uporabili različne pristope. Z bioinformacijskimi metodami smo najprej identificirali gene v genomu, ki najverjetneje sodelujejo pri biosintezi. S pomočjo molekularno-bioloških metod smo nato gensko manipulirali tako divji tip NRRL23338 kot tudi visokodonosni sev *S. erythraea* ABE1441. Za ta namen smo razvili tudi učinkovita orodja in metodologijo za transformacijo in gensko manipulacijo sevov. Tako pridobljene manipulirane seve smo primerjali z izhodnima sevoma NRRL23338 in ABE1441, ter preverjali vpliv različnih fizioloških parametrov gojenja.

Z bioinformacijskimi metodami smo identificirali gene v genomu *S. erythraea*, ki najverjetneje sodelujejo pri biosintezi izhodne spojine deoksisladkorjev. Ta se začne s pretvorbo glukoze v glukoza-6-fosfat, ki pa se preko glukoza-1-fosfata in TDP-D-glukoze pretvori v izhodno spojino TDP-D-4-keto-6-deoksiglukozo. Identificirali smo tudi gene, ki so domnevno udeleženi pri oskrbi z metilno skupino, ki jo prenaša molekula SAM do tarčnih molekul. Metilna skupina, ki se veže na L-homocistein zelo verjetno izvira iz metabolizma folata.

Identificirali smo tudi novi domnevni regulatorni gen SACE_5599, ki sodeluje pri regulaciji biosinteze eritromicina. Razliko v izražanju tega proteina med naravnim in visokodonosnim sevom *S. erythraea* smo najprej identificirali s komparativno proteomsko analizo v sklopu raziskovalnega projekta podjetja Acies Bio d.o.o. Z genom SACE_5599 smo manipulirali divji tip in visokodonosni sev. Pridobljeni rezultati so pokazali, da ima gen pomemben vpliv na morfologijo in produkcijo eritromicina. Pri sevu NRRL 23338 je čezmerno izražanje tega gena povečalo produkcijo eritromicina za 32 %, medtem ko je prekinitev gena pri visokodonosnem sevu ABE1441 zmanjšala produkcijo eritromicina za 37 %. Inaktivacija gena v visokodonosnem sevu ABE1441 je povzročila tudi spremembe v morfološki diferenciaciji. Morebitno vlogo pri regulaciji biosinteze eritromicina smo preverili tudi z inaktivacijo homologov regulatornih genov SACE_0044, SACE_2890 in SACE_3978, vendar inaktivacija nobenega od njih nima opaznega vpliva na produkcijo eritromicina.

Primerjali smo tudi nukleotidni zaporedji genskih skupin *ery* v genomih naravnega seva NRRL23338 in visokodonosnega seva ABE1441. Na podlagi genomskih analiz in sekvenciranja odgovarjajočih PCR produktov smo identificirali mutacije v genih *eryBIV*, *eryCII* in *eryCVI*, ki sodelujejo pri biosintezi eritromicina, do katerih je prišlo med večletnim izboljševanjem seva z naključno mutagenezo in selekcijo. Varianti genov *eryCII* in *eryCVI* iz visokodnosnega seva smo tudi čezmerno izrazili v naravnem sevu

NRRL23338, vendar to ni imelo opaznega vpliva na produkcijo eritromicina.

Pri biosintezi TDP-D-4-keto-6-deoksiglukoze, prekurzoja deoksisladkorjev, ima pomembno vlogo tudi gen SACE_6479. Gen SACE_6479 smo čezmerno izrazili v obeh sevih NRRL23338 in ABE1441 in ugotovili, da čezmerno izražanje nima pozitivnega vpliva na produkcijo eritromicina. Opazili smo tudi, da je gen SACE_6480 pod istim promotorjem kot SACE_6479, zato smo ju čezmerno izrazili tudi skupaj v obeh sevih. Pri visokodonosnem sevu ABE1441 je čezmerno izražanje obeh genov skupaj povzročilo povečanje produkcije eritromicina za 24 %.

Pri biosintezi eritromicina nastajajo medprodukti, med katerimi sta najpomembnejša ErB in ErC, ki se pri zaključnih procesih obravnavata kot nečistoči. Z vnosom dodatnih kopij genov *eryK* in *eryG* smo želeli zmanjšati delež teh nečistoč. Pripravili smo plazmide z različnimi kombinacijami genov. S tremi konstrukti nam je uspelo zmanjšati delež nečistoče ErB za 25 %, ni pa nam uspelo zmanjšati deleža ErC.

Testirali smo tudi vpliv dodatka različnih izhodnih spojin v gojišče med kultivacijo kontrolnih sevov NRRL23338 in ABE1441 ter sevov z dodatno kopijo genov SACE_6479 in SACE_6480. Največji vpliv smo opazili pri dodatku 1200 mg/L MgSO₄*7 H₂O, ki je pri visokodonosnem sevu ABE1441 izboljšal produkcijo eritromicina za 39 %.

Z dodajanjem različnih donorjev metilne skupine v gojišče smo želeli dodatno zmanjšati delež nečistoče ErC pri sevih z dodatnimi kopijami genov eryK in eryG. Ker je za pretvorbo ErC v ErA potrebna metilna skupina smo z dodajanjem različnih donorjev želeli ugotoviti ali je poleg ravni izražanja gena eryG hitrost metilacije eritromicina C odvisna tudi od oskrbe z metilno skupino z zunanjimi viri. Rezultati so pokazali, da noben od izbranih dodatkov (metanol, metionin in folna kislina) ni imel pozitivnega vpliva na zmanjšanje deleža nečistoče ErC.

6.2 SUMMARY

Saccharopolyspora erythraea belongs to actionomycetes, Gram-positive ground bacteria with high content of G and C nucleotides in genome. *S.erythraea* produces antibiotic erythromycin, a macrolide antibiotic with broad spectrum activity. It is used against Grampositive bacteria for the treatment of respiratory problems. The mechanism of activity is related to their capacity for binding to bacteria 50S ribosome subunits with the resulting inhibition of translation in the protein biosynthesis. Erythromycin is composed of 14-member macrolide ring and two deoxysugars D-desosamine and L-cladinose.

Erythromycin biosynthesis is initiated on modular type I PKS, which contain domains,
covalently bound in moduls. During biosynthesis each module catalysis one step of chain elongation so subsequently, number of modules determine number of carbons in chain. The starting unit for biosynthesis of macrolide ring is propionyl-CoA and during chain elongation on every module a new methylmalonyl-CoA undergoes decarboxylation. On some modules a formed β -keto group undergoes complete or partial reduction. After cyclization on last terminal domain macrolactone ring 6-dEB is released. In next step with series of post-PKS reactions 6-dEB is transformed in a molecule with antibiotic activity, erythromycin A. Enzymes in post-PKS reactions are hydroxylases, glycosyltransferases and methyltransferases that catalyze addition of D-desosamine and L-micarose on macrolactone, methylation and hydroxylation. In post-PKS reactions we also include two pathways for biosynthesis of D-desosamine and L-mycarose.

Genes required for erythromycin biosynthesis are located in *ery* cluster which contains 20 genes. Genes *eryA* are required for 6-dEB biosynthesis, genes *eryB* are required for biosynthesis and attachment of mycarose on macrolide ring, genes *eryC* are required for biosynthesis and attachment of desosamine on macrolide ring and genes *eryF*, *eryG* and *eryK* are required for remain reactions. Regulation of erythromycin biosynthesis its poorly understood. Only one regulatory gene that has influence on erythromycin biosynthesis was investigated. More elucidated is regulation with nutrients. It was found that high concentration of phosphates, simple carbon and nitrogen source (e.g. glucose, ammonium sulphate) have negative effect on erythromycin production. In order to achieve high production an ideal ratio of simple and complex nutrients are necessary. For that reason the type, ratio and concentration are important for ideal medium.

When evaluating metabolic pathways and particular genes, involved in the biosynthesis of erythromycin, we applied different approaches. Using bioinformatic methods we have determined important genes, which were further manipulated in both *S. erythraea* strains, wild-type as well as high-producing strain. To this end, we have developed effective tools and methodology for transformation and genetic manipulation of strains. We also compared the responses of control and manipulated strains to the change of physiological parameters.

Applying bioinformatic methods we have managed to identify genes putatively involved in the biosynthesis of precursor for deoxysugars biosynthesis. Biosynthesis starts with glucose which is converted to glucose-6-phosphate which is then converted thru glucose-1phosphate and TDP-D-glucose into a precursor TDP-D-4-keto-6-deoxyglucose. We managed to identify the putative source of the methyl group carried by molecule SAM to a target molecule. Methyl group, which binds to the L-homocysteine is derived from "one carbon pool by folate". L-homocysteine is then converted to L-methionine which is then converted to SAM. Bioinformatic methods have enabled us to identify the regulatory gene SACE_5599. The protein was first identified by proteomics in the context of a research project of Acies Bio Ltd. With gene SACE_5599 we manipulated wild-type and high-producing strain. The results showed that the gene affects the morphology and the production of erythromycin. Overexpression of this gene in strain NRRL 23338 has increased production of erythromycin by 32 % while the Inactivation of SACE_5599 in the high-producing strain reduced erythromycin yield by 37 %, in addition to drastically decreasing sporulation intensity of the SACE_5599-inactivated strains when cultivated on ABSM4 agar medium. Complemented strains restored production and morphology at the level of control.

By applying bioinformatic methods, we compared the regulatory genes from other organisms and try to identify potential regulatory genes that have influence on the production of erythromycin. We have identified three genes SACE_0044, SACE_2890 and SACE_3978. We inactivated genes in strain NRRL23338 and found that genes have no noticeable effect on the production of erythromycin.

We also compared the *ery* group of wild-type and high-producing strains. We have located mutation in genes *eryBIV*, *eryCII* and *eryCVI*. Mutations were identified with bioinformatic method and confirmed by PCR. We also overexpressed genes *eryCII* and *eryCVI* in strain NRRL23338, but it had no noticeable effect on the production of erythromycin.

The product of gene SACE_6479 is involved in the biosynthesis of TDP-D-4-keto-6deoxyglucose, precursor for deoxysugars. We hypothesized that the biosynthesis of three deoxysugars (desosamin, mycarose and rhamnose) in high-producing strain runs on higher rate and for that reason the biosynthesis of this precursor is the bottleneck. Therefore, we overexpressed gene SACE_6479 in strain NRRL23338 and ABE1441 and found that has no positive effect on production. It was observed that the gene SACE_6480 is under the same promoter as SACE_6479, so we jointly overexpressed in both strains. In strain NRRL23338 was small 4 % increase while in the high-producing strain was a 24 % increase in production.

During the biosynthesis of erythromycin, a number of intermediates of erythromycin, such as erythromycin B (ErB) and erythromycin C (ErC) acumulate, which are an issue during the downstream processes procedures. With the introduction of additional genes eryK and eryG we aimed to reduce the proportion of these impurities. We constructed plasmids with different ratios of genes eryK and eryG in a different order. With three constructs, we managed to reduce the proportion of impurities ErB to 25 %, but we haven't managed to reduce the proportion of ErB has increased ErA.

We have also evaluated the effects of various substrates during cultivation of control strains NRRL23338 and ABE1441 and strains with an extra copy of the genes SACE_6479 and SACE_6480. We have found that the positive effect on erythromycin production was only observed at the high-producing strains ABE1441 and ABE12170 and that the addition of minerals had the greatest impact on the production. Overall, the effect of nutrients is greater in the control strain ABE1441 as in the modified strain ABE12170. The greatest impact was observed with the addition of 1200 mg/L MgSO₄*7H₂O, which has improved production by 39 % in strain ABE1441.

By adding different sources of potential methyl group precursor to the culture medium, we aimed to further reduce the proportion of impurities ErC in strains with extra copies of genes eryK and eryG. Since the conversion of ErC in ErA requires a methyl group, we fed a variety of sources to determine whether the supply of methyl group, is a new bottleneck. The results showed no effect of precursor sources on the reduction of impurities ErC.

By applying this approaches, we managed to identify genes that affect the production of erythromycin, however, many parameters that would allow us to show us more broad picture of the production mechanisms are still not sufficiently clear. We have also shown, that omics approaches are valuable tools to identify industrially relevant regulatory genes, however, it is of key importance that samples for omics analysis are collected in conditions which simulate real industrial setting.

7 VIRI

- Adegboye M. F., Babalola O.O. 2013. Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. Mmabatho, Department of Biological Sciences, Faculty of Agriculture, Science and Technology, North-West University: 10 str. http://www.formatex.info/microbiology4/proofs/82.pdf (december, 2013)
- Adhya S., Schwartz M. 1971. Phosphoglucomutase mutants of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 108, 2: 621-626

Alegre M. T., Cournoyer B., Mesas J. M., Guerineau M., Normand P., Pernodet J. L. 1994. Cloning of *Frankia* species putative tRNA (Pro) genes and their efficacy for pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces lividans*. Applied and Environmental Microbiology, 60, 12: 4279-4283

- 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

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

- Angell S., Lewis C. G., Buttner M. J., Bibb M. J. 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a likely regulatory role for glucose kinase. Molecular and General Genetics, 244, 2: 135-143
- 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

Archer D. B., Peberdy J. F. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. Critical Reviews in Biotechnology, 17, 4: 273-306

- Atkins A., Baumberg S. 1998. Expression in *Streptomyces lividans* and *Saccharopolyspora erythraea* of gene fusions between the *eryA* promoter region and *aph* as reporter gene. Biotechnology Letters, 20, 6: 579-584
- Av-Gay Y., Jamil S., Drews S. J. 1999. Expression and characterization of the Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinase PknB. Infection and Immunity, 67, 11: 5676-5682
- Balish E., Shapiro S. K. 1967. Methionine biosynthesis in *Escherichia coli*: Induction and repression of methylmethionine (or adenosylmethionine): Homocysteine methyltransferase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 119: 62-68

- Bapat P. M., Das D., Dave N. N., Wangikar P. P. 2006. Phase shifts in the stoichiometry of rifamycin B fermentation and correlation with the trends in the parameters measured online. Journal of Biotechnology, 127: 115–128
- Bate N., Butler A. R., Smith I. P., Cundliffe E. 2000. The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. Microbiology, 146, 1: 139-146
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D.E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K.,, Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Nature, 417, 6885: 141-147
- Beppu T. 1992. Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. Gene, 115,1: 159-165
- Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. The Journal of Antibiotics, 58,1: 1-26
- Berger B. J., Knodel M. H. 2003. Characterisation of methionine adenosyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. BioMed Central Microbiology, 3, 1: 12-25
- Bermúdez O., Padilla P., Huitrón C., Flores M. E. 1998. Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP+-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. FEMS Microbiology Letters, 164, 1: 77-82
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E. T., Nagaraja Rao R., Schoner B. E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene, 116, 1: 43-49
- 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
- Bibb M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Current Opinion in Microbiology, 8, 2: 208-215
- Blast. 2013. Blast home. Bethesda, NCBI-National Center for Biotechnology Information: 2 str. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (junij, 2013)
- Boos W., Shuman H. 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 1: 204-229
- Bott M., Pfister K., Burda P., Kalbermatter O., Woehlke G., Dimroth P. 1997. Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Propionigenium modestum*. European Journal of Biochemistry, 250, 2: 590-599
- 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

- Brünker P., Minas W., Kallio P. T., Baile J. E. 1998b Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the Vitreoscilla haemoglobin gene (*vhb*). Microbiology, 144, 9: 2441-2448
- 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
- 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*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 304, 2: 225-228
- Cane D. E., Liang T. C., Taylor P. B., Chang C., Yang C. C. 1986. Macrolide biosynthesis. 3. Stereochemistry of the chain-elongation steps of erythromycin biosynthesis. Journal of the American Chemical Society, 108, 16: 4957-4964
- 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 Lmethionine and adenosinetriphosphate. Journal of Biological Chemistry, 204,1: 403-416
- 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
- Chakraburtty R., Bibb M. 1997. The ppGpp synthetase gene (relA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. Journal of Bacteriology, 179, 18: 5854-5861
- 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 Y. T., Stiffelman O. B., Loew G. H. 1996. Computer modeling of 3D structures of cytochrome P450s. Biochimie, 78, 8: 771-779
- Chater K. F., Horinouchi S. 2003. Signalling early developmental events in two highly diverged Streptomyces species. Molecular Microbiology, 48, 1: 9-15
- Chen W. C., Liu C. H. 1996. Production of β-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme and Microbial Technology, 18, 2: 153-160
- Chen H., Zhao Z., Hallis T. M., Guo Z., Liu H. W. 2001. Insights into the branched-chain formation of mycarose: methylation catalyzed by an (S)-adenosylmethionine-dependent methyltransferase. Angewandte Chemie, 113, 3: 627-630
- Chen Y., Deng W., Wu J., Qian J., Chu J., Zhuang Y., Zhan S., Liu W. 2008. Genetic modulation of the overexpression of tailoring genes eryK and eryG leading to the improvement of erythromycin A purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation. Applied

and Environmental Microbiology, 74, 6: 1820-1828

Chen Y., Huang M., Wang Z., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. 2013a. Controlling the feed rate of glucose and propanol for the enhancement of erythromycin production and exploration of propanol metabolism fate by quantitative metabolic flux analysis. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1-9 DOI: 10.1007/s00449-013-0883-9 (maj, 2013)

Chen Y., Wang Z., Chu J., Zhuang Y., Zhang S., Yu X. 2013b. Significant decrease of broth viscosity and glucose consumption in erythromycin fermentation by dynamic regulation of ammonium sulfate and phosphate. Bioresource Technology, 134: 173-179

Cheng Y. R., Hauck L., Demain A. L. 1995. Phosphate, ammonium, magnesium and iron nutrition of *Streptomyces hygroscopicus* with respect to rapamycin biosynthesis. Journal of Industrial Microbiology, 14: 424-427

Chhabra G., Mathur D., Dixit A., Garg L. C. 2012. Heterologous expression and biochemical characterization of recombinant alpha phosphoglucomutase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Protein Expression and Purification, 85, 1: 117-124

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

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

Clustal Omega. 2013. Cambridgeshire, European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute. [programska oprema] <u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u> (julij, 2013)

- Conejo M. S., Thompson S. M., Miller B. G. 2010. Evolutionary bases of carbohydrate recognition and substrate discrimination in the ROK protein family. Journal of Molecular Evolution, 70, 6: 545-556
- 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
- Corum C. J., Stark W. M., Wild G. M., Bird Jr H. L. 1954. Biochemical changes in a chemically defined medium by submerged cultures of Streptomyces erythreus. Applied Microbiology, 2, 6: 326-329

Coutinho P. M., Deleury E., Davies G. J., Henrissat B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. Journal of Molecular Biology, 328, 2: 307-317

Csete M., Doyle J. 2004. Bow ties, metabolism and disease. Trends in Biotechnology, 22, 9: 446-450

Cundliffe E. 2006. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. Journal of

Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 7: 500-506

- Cundliffe E. 2008. Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 9: 1485-1491
- Cysteine and methionine metabolism reference pathway. 2013. Kyoto, Kanehisa Laboratories: 1 str. http://www.genome.in/kegg_hin/chow_pethway2men_men00270 %show_description_show_

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00270&show_description=show (julij, 2013)

- Dahl J. L. 2004. Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 240, 1: 15-20
- Davidsen J. M., Townsend C. A. 2009. Identification and Characterization of NocR as a Positive Transcriptional Regulator of the β -Lactam Nocardicin A in *Nocardia uniformis*. Journal of Bacteriology, 191, 3: 1066-1077
- Demain A. L., Adrio J. L. 2008. Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. V: Natural Compounds as Drugs Volume I. Demain A. L., Adrio J. L. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 251-289
- 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: 675-679
- Donadio S., Katz L. 1992. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. Gene, 111, 1: 51-60
- Donadio S., McAlpine J. B., Sheldon P. J., Jackson M., Katz L. 1993. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 15: 7119-7123
- 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., Legrand R., Lang C., Salas J. A., Raynal M. C. 1999. Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea*: elucidation of the function of *oleP1*, *oleG1* and *oleG2* from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* and generation of new erythromycin derivatives. Molecular Microbiology, 34, 5: 1039-1048
- 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
- Edgar R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 26, 19: 2460-2461
- Edwards C. 1993. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 42, 2-3: 161-179

- 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: 4263–4268
- El-Tayeb O.M., Salama A.A., Hussein M.M.M., El-Sedawy, H.F. 2004a. Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* I. The role of colony morphology and nitrogen sources in productivity African Journal of Biotechnology, 3: 266–272
- El-Tayeb O.M., Hussein M. M. M., Salama A.A., El-Sedawy H.F. 2004b. Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. II. The role of gene amplification and physiological factors in productivity in shake flasks. African Journal of Biotechnology 3: 273-280
- 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
- Fernandez-Moreno M. A., Caballero J. L., Hopwood D. A., Malpartida F. 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of Streptomyces. Cell, 66, 4: 769-780
- Fontecave M., Atta M., Mulliez E. 2004. *S*-adenosylmethionine: nothing goes to waste. Trends in Biochemical Sciences, 29, 5: 243-249
- Friedman S. M., Kaneda T., Corcoran J. W. 1964. Antibiotic Glycosides V. A comparison of 2methylmalonate and propionate as precursors of the C₂₁ branched chain lactone in erythromycin. Journal of Biological Chemistry, 239, 7: 2386-2391
- Fu T. M., Almqvist J., Liang Y. H., Li L., Huang Y., Su X. D. 2011. Crystal ctructures of cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from *Streptococcus mutans*: a dynamic zinc-inversion model. Journal of Molecular Biology, 412, 4: 688-697
- Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of Bacteriology, 176, 2: 269-275
- Gaisser S., Böhm G. A., Cortes 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
- Gaisser S., Böhm G. A., Doumith M., Raynal M. C., Dhillon N., Cortes J., Leadlay P. F. 1998. Analysis of eryBI, eryBIII and eryBVII from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. Molecular and General Genetics, 258, 1-2: 78-88
- Garg R. P., Parry R. J. 2010. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VlmI as a Streptomyces antibiotic regulatory protein (SARP). Microbiology, 156, 2: 472-483
- Geib N., Woithe K., Zerbe K., Li B.D., Robinson A.J. 2007. New insights into the first oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 18: 3081–3084

- 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
- Glycolysis / gluconeogenesis reference pathway. 2013. Kyoto, Kanehisa Laboratories: 1 str. <u>http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00010&show_description=show</u> (julij, 2013)
- 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
- 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
- Gregory M. A., Till R., Smith M. C. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage ϕ BT1 and development of site-specific integrating vectors. Journal of Bacteriology, 185, 17: 5320-5323
- Gupta M., Till R., Smith M. C. 2007. Sequences in *attB* that affect the ability of ϕ C31 integrase to synapse and to activate DNA cleavage. Nucleic Acids Research, 35, 10: 3407-3419
- Hamedi J., Malekzadeh F., Niknam V. 2002. Improved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by various plant oils. Biotechnology Letters, 24: 697–700
- 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: 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
- Han S.O., Inui M., Yukawa H. 2007. Expression of *Corynebacterium glutamicum* glycolytic genes varies with carbon source and growth phase. Microbiology, 153: 2190–2202
- Han S., Song P., Ren T., Huang X., Cao C., Zhang B. 2011. Identification of SACE_7040, a member of TetR family related to the morphological differentiation of *Saccharopolyspora erythraea*. Current Microbiology, 63, 2: 121-125
- 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

- Harman J. G. 2001. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1547, 1: 1-17
- Hayashi K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita K., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B.L., Mori H., Horiuchi T. 2006. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. Molecular Systems Biology, 2: 1-5
- Hertweck C. 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. Angewandte Chemie International Edition, 48, 26: 4688-4716
- Ho D. K., Wu J. C., Santi D. V., Floss H. G. 1991. Stereochemical studies of the C-methylation of deoxycytidine catalyzed by *Hha I* methylase and the N-methylation of deoxyadenosine catalyzed by *EcoRI*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 284, 2: 264-269
- Horinouchi S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Front Biosci, 7: 2045-2057
- Hošťálek Z., Tobek I., Bobyk M. A., Kulayev I. S. 1976. Role of ATP-Glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. Folia Microbiologica, 21, 2: 131-138
- Howarth G.B., Jones J.K.N. 1967. The synthesis of 1-mycarose and 1-cladinose. Canadian Journal of Chemistry, 45, 19: 2253-2256
- Huang K-X., Zahn J., Han L. 2008. SpnH from Saccharopolyspora spinosa encodes a rhamnosyl 4_-O-methyltransferase for biosynthesis of the insecticidal macrolide, spinosyn A. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35: 1669–1676
- Hunaiti A. R., Kolattukudy P. E. 1982. Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 216, 1: 362-371
- Hunaiti A. R., Kolattukudy P. E. 1984. Malonyl-CoA Decarboxylase from *Streptomyces erythreus* purification, properties, and possible role in the production of erythromycin. Archives of Biochemistry and Bophysics, 229, 1: 426-439
- Ikeda M., Nakagawa S. 2003. The Corynebacterium glutamicum genome: features and impacts on biotechnological processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 2-3: 99-109
- Ikeda M., Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S. 2006. A genome-based approach to create a minimally mutated Corynebacterium glutamicum strain for efficient L-lysine production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 7: 610-615
- Ingram C., Brawner M., Youngman P., Westpheling J. 1989. *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of galP1, a catabolite-controlled promoter. Journal of Bacteriology, 171, 12: 6617-6624

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

- Jeon H. G., Seo J., Lee M. J., Han K., Kim E. S. 2011. Analysis and functional expression of NPP pathway-specific regulatory genes in *Pseudonocardia autotrophica*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38, 4: 573-579
- Jin W., Kim H. K., Kim J. Y., Kang S. G., Lee S. H., Lee K. J. 2004. Cephamycin C production is regulated by *relA* and *rsh* genes in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064. Journal of Biotechnology, 114, 1: 81-87
- Jishage M., Kvint K., Shingler, V., Nyström T. 2002. Regulation of ς factor competition by the alarmone ppGpp. Genes and Development, 16, 10: 1260-1270
- 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., Yoo Y. J., Park J. W., Park S. R., Han A. R., Ban Y. H., Kim E.J., Kim E., Yoon Y. J. 2011. A combined approach of classical mutagenesis and rational metabolic engineering improves rapamycin biosynthesis and provides insights into methylmalonyl-CoA precursor supply pathway in *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 5: 1389-1397
- Kalakoutskii L. V., Agre N. S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. Bacteriological Reviews, 40, 2: 469-524
- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Research: 28, 1: 27-30
- Kato J. Y., Funa N., Watanabe H., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2007. Biosynthesis of γ-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 7: 2378-2383
- Katz L., Donadio S. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Annual Reviews in Microbiology, 47, 1: 875-912
- KEGG. 2013. Kegg pathway [baza podatkov]. Kyoto, Kanehisa Laboratories. http://www.genome.jp/kegg/pathway.html (junij, 2013)
- Kellermeyer R.W., Allen S.H., Stjernholm R., Wood H.G. 1964. Methylmalonyl Isomerase IV. Purification and properties of the enzyme from *Propionibacteria*. The Journal of Biological Chemistry 239: 2562-2569
- Kibwage I.O., Hoogmartens J., Roets E., Vanderhaeghe H., Verbist L., Dubost M., Pascal C., Petitjean P., Levol G. 1985. Antibacterial activities of erythromycins A, B, C, and D and some of their derivatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 28, 5: 630-633
- 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.
- Kitani S., Ikeda H., Sakamoto T., Noguchi S., Nihira T. 2009. Characterization of a regulatory

gene, aveR, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 82, 6: 1089-1096

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

Knapp G. S., Hu J. C. 2010. Specificity of the E. coli LysR-type transcriptional regulators. Plos One, 5, 12: e15189: 4 str. DOI: 10.1371/journal.pone.0015189

- Kornberg H. L. 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. Biochemical Journal, 99, 1: 1-11
- Kotb M., Geller A. M. 1993. Methionine adenosyltransferase: structure and function. Pharmacology and Therapeutics, 59, 2: 125-143
- Kuščer E., Coates N., Challis I., Gregory M., Wilkinson B., Sheridan R., Petković H. 2007. Roles of rapH and rapG in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Bacteriology, 189, 13: 4756-4763
- Labeda D. P. 1987. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman1923) 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
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 5259: 680-685
- Lambalot R. H., Cane D. E., Aparicio J. J., Katz L. 1995. Overproduction and characterization of the erythromycin C-12 hydroxylase, EryK. Biochemistry, 34, 6: 1858-1866
- Lechevalier M. P., Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. International Journal of Systematic Bacteriology, 20, 4: 435-443
- Lechevalier H. A., Lechevalier M. P. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. The Prokaryotes, 2: 1915-1922
- Lee H. Y., Chung H. S., Hang C., Khosla C., Walsh C. T., Kahne D., Walker S. 2004. Reconstitution and characterization of a new desosaminyl transferase, EryCIII, from the erythromycin biosynthetic pathway. Journal of the American Chemical Society, 126, 32: 9924-9925
- Lee S. Y., Lee D. Y., Kim T. Y. 2005. Systems biotechnology for strain improvement. Trends in Biotechnology, 23, 7: 349-358
- Linton K. J., Jarvis B. W., Hutchinson C. R. 1995. Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4, 6-dehydratase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3, 5-epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea*. Gene, 153, 1: 33-40

Liu H. W., Thorson J. S. 1994. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars

by bacteria. Annual Reviews in Microbiology, 48, 1: 223-256

- Lombardini J. B., Chou T. C., Talalay P. 1973. Regulatory properties of adenosine triphosphate-Lmethionine 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
- Lozada-Ramírez J. D., Martínez-Martínez I., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer A. 2008. Cloning, Overexpression, Purification, and Characterization of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase from *Corynebacterium efficiens* YS-314. Biotechnology Progress, 24, 1: 120-127
- Lu J., Huang X., Li K., Li S., Zhang M., Wang Y., Jiang H., Xu Y. 2009. LysR family transcriptional regulator PqsR as repressor of pyoluteorin biosynthesis and activator of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. Journal of Biotechnology, 143, 1: 1-9
- Lu S. C. 2000. S-Adenosylmethionine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 32, 4: 391-395
- Lu Z., Liu Z., Wang L., Zhang Y., Qi W., Goodfellow M. 2001. *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 2: 319-325
- Lucas S., Han J., Lapidus A., Cheng J.-F., Goodwin L., Pitluck S., Peters L., Ivanova N., Daligault H., Detter J.C., Han C., Tapia R., Land M., Hauser L., Kyrpides N., Ivanova N., Pagani I., Hagen A., Katz L., Fiedler H.-P., Keasling J., Fortman J., Woyke T. 2011. Complete sequence of chromosome of *Streptomyces violaceusniger* Tu4113. Walnut Creek, US DOE Joint Genome Institute: 4 str. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_015957.1? report=genbank&from=4412552&to=4416322 (november, 2013)
- Lunin V. V., Li Y., Schrag J. D., Iannuzzi P., Cygler M., Matte A. 2004. Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. Journal of Bacteriology, 186, 20: 6915-6927
- 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
- Maddocks S. E., Oyston P. C. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiology, 154, 12: 3609-3623

Madduri K., Waldron C., Merlo D. J. 2001. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors

for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. Journal of Bacteriology, 183, 19: 5632-5638

- Magdevska V. 2011. *Streptomyces rimosus* kot potencialni gostitelj za izražanje heterolognih proteinov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 150 str.
- Maino V. C., Young F. E. 1974. Regulation of glucosylation of teichoic acid I. Isolation of phosphoglucomutase in *Bacillus subtilis* 168. Journal of Biological Chemistry, 249, 16: 5169-5175
- Maitra P.K., Bhosale S.B., Kshirsagar D.C., Yeole T.E. 2001. Metabolite and enzyme profiles of glycogen metabolism in methanococcoides methylutens, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 198: 23–29
- Majer, J., Martin, J.R., Egan, R.S., Corcoran, J.W. 1977. Antibiotic glycosides. 8. Erythromycin D, a new macrolide antibiotic. Journal of the American Chemical Society, 99, 5: 1620-1622
- Majumdar S., Prabhagaran S.R., Shivaji S., Lal R. 2006. Reclassification of *Amycolatopsis* orientalis DSM 43387 as *Amycolatopsis benzoatilytica* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 199–204
- 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 highorder transcriptional regions mediated by targeted degradation at the metabolic switch. Biomed Central Genomics, 14, 15: 1-9
- Martín J. F., Demain A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiological Reviews, 44, 2: 230-251
- Martin J. F. 2004. Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. Journal of Bacteriology, 186: 5197–5201
- Martinez-Antonio A., Collado-Vides J. 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. Current Opinion in Microbiology, 6, 5: 482-489
- 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
- Matthews R. G., Smith A. E., Zhou Z. S., Taurog R. E., Bandarian V., Evans J. C., Ludwig M. 2003. Cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthases: are there two solutions to the same chemical problem. Helvetica Chimica Acta, 86, 12: 3939-3954
- Mejía A., Viniegra-Gonzales G., Barrios-Gonzelz J. 2002. Biochemical Mechanism of the Effect of Barbital on Rifamycin B Biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei* (M18 Strain). Journal of Bioscience and Bioengineering, 95: 288-292
- 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

- Mirjalili N., Zormpaidis V., Leadlay P.F., Ison A.P. 1999. The effect of rapeseed oil uptake on the production of erythromycin and triketide lactone by *Saccharopolyspora erythraea*. Biotechnology Progress, 15: 911-918
- Mironov V. A., Sergienko O. V., Nastasyak I. N., Danilenko V. N. 2004. Biogenesis and Regulation of Biosynthesis of Erythromycins In *Saccharopolyspora erythraea*. Applied Biochemistry and Microbiology, 40: 531–541
- Miyatake H., Taki F., Taniguchi H., Suzuki R., Takagi K., Satake T. 1991. Erythromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in asthma. Chest Journal, 99: 670-673 DOI: 10.1378/chest.99.3.670
- Mohd Sauid S., Krishnan J., Huey Ling T., Veluri M. V. 2013. Enhancement of oxygen mass transfer and gas holdup using palm oil in stirred tank bioreactors with xanthan solutions as simulated viscous fermentation broths. BioMed Research International, 2013: 9 str. DOI: 10.1155/2013/409675
- Moncrieffe M. C., Fernandez M. J., Spiteller D., Matsumura H., Gay N. J., Luisi B. F., Leadlay P. F. 2012. Structure of the glycosyltransferase EryCIII in complex with its activating P450 homologue EryCII. Journal of Molecular Biology, 415, 1: 92-101

Morris E. O. 1951. The life cycle of Actinomyces bovis. Journal of Hygiene, 49, 1: 46-51

- Mukai T., Kawai S., Mori S., Mikami B., Murata K. 2004. Crystal Structure of Bacterial Inorganic Polyphosphate/ATP-glucomannokinase Insights Into Kinase Evolution. Journal of Biological Chemistry, 279, 48: 50591-50600
- Muñoz-Elías E. J., McKinney J. D. 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. Cellular Microbiology, 8, 1: 10-22
- Nagano S., Cupp-Vickery J. R., Poulos T. L. 2005. Crystal Structures of the Ferrous Dioxygen Complex of Wild-type Cytochrome P450eryF and Its Mutants, A245S and A245T Investigation of the Proton Transfer System in P450eryF. Journal of Biological Chemistry, 280, 23: 22102-22107
- Nambi S., Badireddy S., Visweswariah S. S., Anand G. S. 2012. Cyclic AMP-induced conformational changes in mycobacterial protein acetyltransferases. Journal of Biological Chemistry, 287, 22: 18115-18129
- Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science, 289, 5481: 920-930
- Novakova R., Rehakova A., Kutas P., Feckova L., Kormanec J. 2011. The role of two SARP family transcriptional regulators in regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. Microbiology, 157, 6: 1629-1639
- Ochi K. 1995. Amino Acid Sequence Analysis of Ribosomal Protein AT-L30 from Members of the Family *Pseudonocardiaceae*. International Journal of Systematic Bacteriologi, 45: 110-115
- Oda Y., Nakamura K. 2009. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. Federation of

European Microbiological Societies Yeast Research, 9, 5: 742-748

- Old I. G., Margarita D., Glass R. E., Saint Girons I. 1990. Nucleotide sequence of the *metH* gene of *Escherichia coli* K-12 and comparison with that of *Salmonella typhimurium* LT2. Gene, 87, 1: 15-21
- 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
- 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 erythromycinproducing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. Nature Biotechnology, 25: 447-453 DOI:10.1038/nbt1297
- Owen O. E., Kalhan S. C., Hanson R. W. 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. Journal of Biological Chemistry, 277, 34: 30409-30412
- Papagianni M. 2012. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. Microbial Cell Factories, 11, 1: 50-63
- 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
- Parekh S., Vinci V. A., Strobel R. J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 3: 287-301
- 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: 1-25
- Pereda A., Summers R. G., Stass 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
- Pérez-Redondo R., Rodríguez-García A., Martín J. F., Liras P. 1998. The *cla*R 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
- Polyketide sugar unit biosynthesis reference pathway. 2013. Kyoto, Kanehisa Laboratories: 1 str. <u>http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00523&show_description=show</u> (julij, 2013)
- Potrykus K., Cashel M. 2008. (p) ppGpp: Still Magical? Annual Review of Microbiology, 62: 35-51
- Pronk J. T., Steensma H. Y., Van Dijken J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 12, 16: 1607-1633

Pruitt K. D., Tatusova T., Maglott D. R. 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-

redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. Nucleic Acids Research, 33, 1: 501-504

- Qu H., Xin Y., Dong X., Ma Y. 2007. An rmlA gene encoding d-glucose-1-phosphate thymidylyltransferase is essential for mycobacterial growth. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 275, 2: 237-243
- Rawlings B. J. 2001. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A—erythromycin biosynthesis). Natural Product Reports, 18, 2: 190-227
- Reddy M., Kuppan G., Shetty N. D., Owen J. L., Ioerger T. R., Sacchettini J. C. 2008. Crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in ternary complex with substrate and inhibitors. Protein Science, 17, 12: 2134-2144
- 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., 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 carbohydratebased 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
- Reeves A.R., Seshadri R., Brikun I.A., Cernota W.H., Gonzalez M.C., Weber J.M. 2008. Knockout of the erythromycin biosynthetic cluster gene, *eryBI*, blocks isoflavone glucoside bioconversion during erythromycin fermentations in *Aeromicrobium erythreum* but not in *Saccharopolyspora erythraea*. Applied and Environmental Microbiology 74, 23: 7383–7390
- Ribeiro M.H.L., Ribeiro I.A.C. 2005. Recovery of erythromycin from fermentation broth by adsorption onto neutral and ion-exchange resins. Separation and Purification Technology, 45: 232–239
- Rimmele M., Boos W. 1994. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 176, 18: 5654-5664
- Rodriguez E., Hu Z., Ou S., Volchegursky Y., Hutchinson C. R., McDaniel R. 2003. Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30, 8: 480-488
- Rodríguez M., Núñez L. E., Braña A. F., Méndez C., Salas J. A., Blanco G. 2008. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. Molecular Microbiology, 69, 3: 633-645

Rodríguez-García A., Sola-Landa A., Apel K., Santos-Beneit F., Martín J. F. 2009. Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of glnR, glnA, glnII and amtB expression by the response regulator PhoP. Nucleic Acids Research, 37: 3230–3242

Salah-Bey K., Doumith M., Michel J. M., Haydock S., Cortes J., Leadlay P. F., Raynal M. C. 1998. Targeted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. Molecular and General Genetics, 257, 5: 542-553

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1: 6-39 http://www.google.si/url?

<u>sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fmededuc</u> <u>ation.bjmu.edu.cn%2Freportreference%2Fmc3%2Fall%2520chapter%25206.doc&ei=lwOxUqn3M</u> <u>4aftAb0o4GIBQ&usg=AFQjCNF115v4S53jqPUb-</u> h3Qfd6J_hLoyg&sig2=TYrJWwpbUP0MrrN5sIxfag&bvm=bv.58187178,d.Yms (november, 2013)

- Sanchez S., Demain, A. L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme and Microbial Technology, 31, 7: 895-906
- Sánchez S., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Ávalos M., Guzma'n-Trame S. Rodri'guez-Sanoja R., Langley E., Ruiz, B. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. The Journal of Antibiotics, 63, 8: 442-459
- Sanfélix-Haywood N., Coll-Marqués J. M., Yebra M. J. 2011. Role of α-phosphoglucomutase and phosphoglucose isomerase activities at the branching point between sugar catabolism and anabolism in *Lactobacillus casei*. Journal of Applied Microbiology, 111, 2: 433-442
- Santos-Beneit F., Rodríguez-García A., Franco-Domínguez E., Martín J. F. 2008. Phosphatedependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. Microbiology, 154: 2356–2370
- Sarra M., Ison A.P., Lilly M.D. 1996. The relationships between biomass concentration, determined by a capacitance-based probe, rheology and morphology of *Saccharopolyspora erythraea* cultures. Journal of Biotechnology, 51: 157-165
- Savino C., Montemiglio L. C., Sciara G., Miele A. E., Kendrew S. G., Jemth P., Gianni S., Vallone B. 2009. Investigating the structural plasticity of a cytochrome p450 three-dimensional structures of p450 eryK and binding to its physiological substrate. Journal of Biological Chemistry, 284, 42: 29170-29179
- Schell, U., Haydock, S. F., Kaja, A. L., Carletti, I., Lill, R. E., Read, E., Sheehan L.S., Low L., Fernandez M. J., Grolle F., McArtur H. A. I., Sheridan R. M., Leadlay P. F., Wilkinson B., Gaisser S. 2008. Engineered biosynthesis of hybrid macrolide polyketides containing Dangolosamine and D-mycaminose moieties. Organic and Biomolecular Chemistry, 6, 18: 3315-3327
- 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

- Smith E., Morowitz H. J. 2004. Universality in intermediary metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 36: 13168-13173
- Smokvina T., Boccard F., Guerineau M. 1997. Cloning and expression vectors in an actinomycetes strain, process for transformation of this strain, actinomycetes strain obtained and preparation of proteins. US patent US 5 688 689: 19 str.
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Current Opinion in Chemical Biology, 7, 2: 285-295
- Shibaev V. N. 1987. Biosynthesis of bacterial polysaccharide chains composed of repeating units. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 44: 277-339
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWiliam 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: 1-6
- Sivaraman J., Sauvé V., Matte A., Cygler M. 2002. Crystal structure of *Escherichia coli* glucose-1phosphate thymidylyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg2⁺. Journal of Biological Chemistry, 277, 46: 44214-44219
- Skepper J., 2008. Electron micrograph of *S. erythraea* mycelium growing on 2TY medium agar. Cambridge, University of Cambridge, Department of Biochemistry, DNA Sequencing Facility. <u>http://jblseqdat.bioc.cam.ac.uk/gnmweb/</u> (julij, 2013)
- Sola-Landa A., Rodríguez-García A., Franco-Domínguez E., Martín J. F. 2005. Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. Molecular Microbiology, 56, 5: 1373-1385
- 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., Wilkinson B. 1997. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. Chemical Reviews, 97, 7: 2611-2630
- Staunton J. 1998. Combinatorial biosynthesis of erythromycin and complex polyketides. Current Opinion in Chemical Biology, 2, 3: 339-345
- 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
- Suliman H. S., Sawyer G. M., Appling D. R., Robertus J. D. 2005. Purification and properties of cobalamin-independent methionine synthase from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 441, 1: 56-63

Summers R. G., Donadio S., Staver M. J., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R., Katz L. 1997.

Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. Microbiology, 143, 10: 3251-3262

- Szu P. H., He X., Zhao L., Liu H. W. 2005. Biosynthesis of TDP-D-desosamine: identification of a strategy for C4 deoxygenation. Angewandte Chemie, 117, 41: 6900-6904
- Tabor H., Tabor C. W. 1964. Spermidine, spermine, and related amines. Pharmacological Reviews, 16, 3: 245-300
- Takahashi H., Liu Y. N., Liu H. W. 2006. A two-stage one-pot enzymatic synthesis of TDP-Lmycarose from thymidine and glucose-1-phosphate. Journal of the American Chemical Society, 128, 5: 1432-1433
- Takano E. 2006. γ-Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Current Opinion in Microbiology, 9, 3: 287-294
- 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
- Tanaka S., Lee S. O., Hamaoka K., Kato J., Takiguchi N., Nakamura K., Ohtake H., Kuroda A. 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, Microlunatus phosphovorus. Journal of Bacteriology, 185, 18: 5654-5656
- Tang L., Zhang Y. X., Hutchinson C. R. 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and 3 *Streptomyces fradiae*. Journal of Bacteriology, 176, 19: 6107-6119
- Tang L., McDaniel R. 2001. Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity. Chemistry and Biology, 8, 6: 547-555
- 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
- Technikova-Dobrova Z., Damiano F., Tredici S. M., Vigliotta G., Summa R., Palese L., Abbrescia A., Labonia N., Gnoni G. V., Alifano P. 2004. Design of mineral medium for growth of *Actinomadura sp.* ATCC 39727, producer of the glycopeptide A40926: effects of calcium ions and nitrogen sources. Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 671–677
- Thibodeaux C. J., Melançon C. E., Liu H. W. 2008. Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification. Angewandte Chemie International Edition, 47, 51: 9814-9859
- Thompson M. W., Strohl W. R., Floss H. G. 1992. Purification and characterization of TDP-Dglucose 4, 6-dehydratase from anthracycline-producing streptomycetes. Journal of General Microbiology, 138, 4: 779-786

- 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
- Tsai S. C., Miercke L. J., Krucinski J., Gokhale R., Chen J. C. H., Foster P. G., David E. C., Chaitan K., Stroud R. M. 2001. Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: versatility from a unique substrate channel. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 26: 14808-14813
- Ubhi D., Kavanagh K. L., Monzingo A. F., Robertus J. D. 2011. Structure of *Candida albicans* methionine synthase determined by employing surface residue mutagenesis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 513, 1: 19-26
- van der Werf M. J., Jellema R. H., Hankemeier T. 2005. Microbial metabolomics: replacing trialand-error by the unbiased selection and ranking of targets. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32, 6: 234-252
- Vara J. A., in Hutchinson C. R. 1988. Purification of thymidine-diphospho-D-glucose 4, 6dehydratase from an erythromycin-producing strain of *Saccharopolyspora erythraea* by high resolution liquid chromatography. Journal of Biological Chemistry, 263, 29: 14992-14995
- Verstrepen K. J., Iserentant D., Malcorps P., Derdelinckx G., Van Dijck P., Winderickx J., Pretorius S., Thevelein J. M., Delvaux, F. R. 2004. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? Trends in Biotechnology, 22, 10: 531-537
- Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. Antimikrobial Agents and Chemotherapy, 45: 1-12
- Videira P. A., Cortes L. L., Fialho A. M., Sá-Correia I. 2000. Identification of the pgmG gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities, in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. Applied and Environmental Microbiology, 66, 5: 2252-2258
- Vining L. C. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity—a review. Gene, 115, 1: 135-140
- Vlasie M. D., Banerjee R. 2003. Tyrosine 89 accelerates Co-carbon bond homolysis in methylmalonyl-CoA mutase. Journal of the American Chemical Society, 125, 18: 5431-5435
- Voeĭkova T. A., Emel'ianova L. K., Kudriavtseva E. A. 2003. Development of a system of plasmid transfer in the strains Streptomyces avermitilis ATCC 31272 and *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 by the method of intergeneric conjugation. Genetika, 39, 5: 664-674
- 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 L., Ridgway D, Gu T., Moo-Young M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. Biotechnology Advances, 23: 115–129

- Wang Y., Chu J., Zhuang Y., Wang Y., Xia J., Zhang S. 2009. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. Biotechnology Advances, 27, 6: 989-995
- Weber J. M., Leung J. O., Maine G. T., Potenz R. H., Paulus T. J., DeWitt J. P. 1990. Organization of a cluster of erythromycin genes in *Saccharopolyspora erythraea*. Journal of Bacteriology, 172, 5: 2372-2383
- Weber J. M., Leung J. O., Swanson S. J., Idler K. B., McAlpine J. B. 1991. An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. Science, 252, 5002: 114-117
- Weidner S., Kittelmann M., Goeke K., Ghisalba O., Zähner H. 1998. 3'-Demethoxy-3'hydroxystaurosporine-O-methyltransferase from *Streptomyces longisporoflavus* catalyzing the last step in the biosynthesis of staurosporine. Journal of Antibiotics, 51, 7: 679-682
- Weissman K. J., Leadlay P. F. 2005. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. Nature Reviews Microbiology, 3, 12: 925-936
- Weymouth-Wilson A. C. 1997. The role of carbohydrates in biologically active natural products. Natural Product Reports, 14, 2: 99-110
- White-Phillip J., Thibodeaux C. J., Liu H. W. 2009. Enzymatic synthesis of TDP-deoxysugars. Methods in Enzymology, 459: 521-544
- Wiesmann K. E., Cortés J., Brown M. J., Cutter A. L., Staunton J., Leadlay P. F. 1995. Polyketide synthesis *in vitro* on a modular polyketide synthase. Chemistry and Biology, 2, 9: 583-589
- Wiley P. F., Gerzon K., Flynn E.H., Sigal M.V. Jr., Weaver O., Quarck C.U., Chauvette R.R., Monahan R. 1957a. Erythromycin. X. structure of erythromycin. Journal of the American Chemical Society, 79, 22: 6062–6070
- Wiley P. F., Sigal M.V. Jr., Weaver O., Monahan R., Gerzon K. 1957b. Erythromycin. XI. structure of erythromycin B. Journal of the American Chemical Society, 79, 22: 6070–6074
- Wiley P. F., Gale R., Pettinga C.W., Gerzon K. 1957c. Erythromycin. XII. the isolation, properties and partial structure of erythromycin C. Journal of the American Chemical Society, 79, 22: 6074–6077
- Woodard R. W., Tsai M. D., Floss H. G., Crooks P. A., Coward J. K. 1980. Stereochemical course of the transmethylation catalyzed by catechol O-methyltransferase. Journal of Biological Chemistry, 255, 19: 9124-9127
- Wu N., Cane D. E., Khosla C. 2002. Quantitative analysis of the relative contributions of donor acyl carrier proteins, acceptor ketosynthases, and linker regions to intermodular transfer of intermediates in hybrid polyketide synthases. Biochemistry, 41, 15: 5056-5066
- Wu J., Zhang Q., Deng W., Qian J., Zhang S., Liu W. 2011. Toward improvement of erythromycin A production in an industrial Saccharopolyspora erythraea strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial attB site for specific recombination. Applied and Environmental

Microbiology, 77, 21: 7508-7516

- 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
- Ye R. W., Zielinski N. A., Chakrabarty A. M. 1994. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. Journal of Bacteriology, 176, 16: 4851-4857
- Yin X., Xu X., Wu H., Yuan L., Huang X., Zhang B. 2013. SACE_0012, a TetR-Family Transcriptional Regulator, Affects the Morphogenesis of *Saccharopolyspora erythraea*. Current Microbiology, 67, 6: 647-651
- Yonath A., Leonard K. R., Wittmann H. G. 1987. A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. Science, 236, 4803: 813-815
- Young T. A., Delagoutte B., Endrizzi J. A., Falick A. M., Alber T. 2003. Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. Nature Structural and Molecular Biology, 10: 3 168-174
- Yu D., Xu F., Zeng J., Zhan J. 2012. Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 64, 4: 285-295
- Yuan T., Yin C., Zhu C., Zhu B., Hu Y. 2011. Improvement of antibiotic productivity by knock-out of *dauW* in *Streptomyces coeruleobidus*. Microbiological Research, 166, 7: 539-547
- Yuan Y., Chung H.S., Leimkuhler C., Walsh C.T., Kahne D., Walker S. 2005. In Vitro Reconstitution of EryCIII Activity for the Preparation of Unnatural Macrolides. Journal of the American Chemical Society, 127, 14128–14129
- 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 C., Fu Q., Albermann C., Li L., Thorson J. S. 2007. The in vitro characterization of the erythronolide mycarosyltransferase EryBV and its utility in macrolide diversification. ChemBioChem, 8, 4: 385-390
- 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 and Biology, 17, 11: 1232-1240
- Zhang S., Cao X., Chu J., Qian J., Zhuang Y. 2010. Bioreactors and Bioseparation. Biotechnology in China II, 122: 105-150
- Zhang Y. X., Perry K., Vinci V. A., Powell K., Stemmer W. P., del Cardayré S. B. 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. Nature, 415, 6872: 644-646

Zhao L., Borisova S., Yeung S. M., Liu H. W. 2001. Study of C-4 deoxygenation in the

biosynthesis of desosamine: evidence implicating a novel mechanism. Journal of the American Chemical Society, 123, 32: 7909-7910

- Zheng L., Bai Z., Xu T., He B. 2012. Glucokinase contributes to glucose phosphorylation in dlactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39, 11: 1685-1692
- Zou X., Hang H-F., Chu J., Zhuang Y-P., Zhang S-L. 2009a. Enhancement of erythromycin A production with feeding available nitrogen sources in erythromycin biosynthesis phase. Bioresource Technology, 100: 3358–3365
- 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

Prof. dr. Hrvoju Petkoviću se zahvaljujem za mentorstvo in dano priložnost, ki mi je omogočila delo v podjetju Acies Bio.

Zelo sem hvaležen Vasilki za dragoceno pomoč in nasvete pri delu.

Zahvaljujem se Gregorju, Štefanu in Markotu za pomoč pri oblikovanju teksta.

Hvala Katarini Karničar, Marinki, Nini Kolenc, Katarini Cirnski in ostali "Acies bandi" za pomoč in podporo.

Hvala Ani, Emi in Aljažu za razumevanje in potrpežljivost.

PRILOGE

Priloga A: Poravnava aminokislinskih zaporedij glukokinaz (S. erythraea SACE_1700).

Supplement A: Alignment aminoacid sequences of glucokinase (S. erythraea SACE_1700).

S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	MGLTIGVDIGGTKIAAGVVDEEGNILSTHKVPTPTTPEAIVDAIASAVEGARVGHEIVAV -MLTVGVDVGGTSVRASVVDPRGAVLDTLRVPTPDTGEELDSAIADVVRGLALRHPVAAV -MLTIGVDVGGTRVRAGVVDQHGEILETHRVPTPATSAELNAAIADTVRALSDRYAVAGV -MLTVGVDVGGTSVRVGVVDADGAVLDTARAATPSGEGALEEAIGAAVAEVASRHRVAAV -MLTIGIDVGGTSVRAGVVDADGAVLDTTRTATPGDERALEEAIGGAVHELAERHEVAAV **:*:*:*** :*** * :*.* :. ** : ***
S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	GIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQEPLKEKVEARVGLPVVVENDANAAAWGEYKFGGGK GLAVAGFVSEDRRVVRFAPHLAWRHVAVADRIAARVELPVVLEHDANAAAIAEQRFGAAA GLAVAGFVSEDRRVVRFAPHLAWRHVVVADELADRLGLPVVLEHDANAAAVAEQRLGAAA GLAVAGFVASDRRTVLFAPHLAWRAPVADRIAERVGLPVVLEHDANAAALAEHRFGAAR GLAVAGFVASDRRTVMFAPHLAWRHAPVAERISERVGMPVVLEHDANAAALAEHRFGAAR *:**:* :* .* ***: *:: ::: *: :***:********
S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	GHRNVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS GARVAALVALGTGIGGALVIDGEVFRGAYGVAPELGHLRLVPDGRPCPCGKRGCWERYCS GARVAALVAIGTGIGGALVINGEVFRGAYGIAPELGHLRVVPDGRPCSCGKRGCWERYCS GAGIAVLVAIGTGIGGALLIDGKVFRGAHGVAPELGHLRLVPDGRPCPCGKNGCWERYCS * . :::***:** :: * :: ** .*:* *:**** * ***. ********
S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	GRALVRYAKQRANATPERAEVLLALGDGTPDGIEGKHISVAARQGCPVAVDSYRELARWA GTALVSTVRELQERGDGTAGPLLDESTPLTGVRVARAAEEGDPLARRAMRELARWL GTALAATAAELRQEEPGAPVEQTGVEVARAAEAGDPVARRAVADLARWL GTALSTAVELLARHPGVSTSLAREALGDSRAVTGRRIAAAARDGDPLAKRAMIDLARWL GTALSSTAVELLAKHPGVSTVLAREARGDARAITGRRVAGAARDGDPLAQRAVADLARWL * ** .: *: *: *: : :****
S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	GAGLADLASLFDPSAFIVGGGLSDEGDLVLDPIRKSYKRWLVGGNWRPVADVIAAQLGNK GEGLALVADVYDPEVVVIAGGVSGSAHLFLGEARKHYAKALTGAGHRPLARIAVAKRGDD GEGLALVADVYDPEVVVIAGGVSDSAHLFIDDAREYYATAITGAGHRPLARIVVAYYGDS GEGLALVADVYDPEVVVIGGGVSESAPLFLDEARERYAAVVTGAGHRPLARIRTAQLGDD GEGLALVADVYDPEVVVVGGGVSESATLFLDDAREHYASVVTGAGHRPLARIRTAQLGDD * *** :*.::**:*:: *: :: *: :: *: :: *: :: *:
S.coelicolor S.erythraea S.spinosa S.espanaensis A.mirum	AGLVGAADLAREPDPIM AGMVGAATLAREHVVAHQVTGR AAMIGSAALAREHALTEAPHLA AGIVGVATLARDLTTTRPAHNGRR AGLVGVATLARDLAVGATQSPGGRLG *.::* * ***:

Priloga B: Poravnava aminokislinskih zaporedij polifosfat glukokinaz (S. erythraea SACE_1802).

Supplement B: Alignment aminoacid sequences of poliphosphate glucokinase (S. erythraea SACE_1802).

Arthrobacter_sp. A.mortivallis A.halophila S.erythraea S.spinosa	MAKKDEKSHKNAPLIGIDIGGTGIKGGIVDLKKGKLLGERFRVPTPQPATPESVAEAVAL MGTARGFGVDIGGSGIKGCPVDVEGGVLAEERLRISTPQPSTPDAVADTVAE MGTARGFGVDVGGSGIKGCPVDVEGGVLADDRLRISTPQPSTPESVADAVAE MATARGFGVDIGGSGIKGSVVDIDAGVLAEERMRIPTPQPSTPAAVADAVAE MATARGFGVDIGGSGIKGCPVDIDGGVLAEERMRIPTPQPSTPSAVADAVAE .* :*:*:***** **:. * ::*:*: ****:*** :**::**
Arthrobacter_sp. A.mortivallis A.halophila S.erythraea S.spinosa	VVAELSARPEAPAAGSPVGVTFPGIIQHGVVHSAANVDKSWLNTDIDALLTARLGRPV IVAKFGWEGPVGITLPCVIKNGTALTAANVDEDWIDTDAQELFAKRLGRVREE IVGKFGWEGPVGITLPCVIKSGTAMTAANIDEDWIDTDAQGLFAKRLGRAREQ IVEKFAWTGPVGVTLPCVVKRGTAHTAANVDKSWIGTDAQALFAERLGKPREE IVEKFSWTGPVGITLPCVIKDGTALTAANIDKGWIGTDAQELFAERLGRTRDD :* ::***:*: ::: * :***:*: *: ** : *:: ***:
Arthrobacter_sp. A.mortivallis A.halophila S.erythraea S.spinosa	-EVINDADAAGLAEARYGAGAGVKGTVLVITLGTGIGSAFIFDGKLVPNAELGHLEIDGH IVMVNDADAAGLAEMRFGAGAERQGLVVVLTFGTGIGSSTFLNGQLVPNTEFGHIEVDGR IVMLNDADAAGIAEMRFGAGADRNGLVVVLTFGTGIGSSTFLNGQLVPNTEFGHIEVDSR VVVLNDADAAGLAEMRSGAGAGHRGLVVLTFGTGIGSAMFVDGKLIPNTEFGHIEVDGH VLVLNDADAAGTAEIRSGAGAGHRGLVVVLTFGTGIGSAMFVDGKLVPNTEFGHIEVDGH ::******* ** * **** .* *:::******: :::*******
Arthrobacter_sp. A.mortivallis A.halophila S.erythraea S.spinosa	DAETKASAVARERDGLSWDEYSVLLQRYFSHVEFLFSPELFIVGGGISKRADEYLPNLRL DAEEEAAASVKDNLELTYEEWAPRVSRYVRTLERFLWPDLIIAGGGVSKKAHKWLPLLQT DAEEEAAASVKDNLELSYEEWAPRVSRYIRTLEKFLWPDLIIAGGGVSKKAHKWLPLLQT DAETQAAASVKDNLELSYPEWAERVGRYLEGLEKFLWPDLIIAGGGVSRKAHKWLPLLEC DAEKQAAASVKDDLELTYEQWAPRVSHYIQALEKFIWPDLIILGGGVSKKGHKWIPLLET *** :*:* .:: *:: ::: ::* ::*:*:*********
Arthrobacter_sp. A.mortivallis A.halophila S.erythraea S.spinosa	RTPIVPAVLRNEAGIVGAAIEIALQHKLAK RTPIVPAKLKNDAGIVGAASAAAQHA RTPIVAADLKNDAGIVGAASAAAQNA RTPIVAAELKNDAGIVGAATAAAGGIEH RTPVVAAALRNDAGIVGAATAAATRHNA ***:* * *:::****** *

Priloga C: Poravnava aminokislinskih zaporedij fosfo-sladkor-mutaza (S. erythraea SACE_6548).

Supplement C: Alignment aminoacid sequences of phosphate-sugar-mutase (S. erythraea SACE_6548).

L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	MSYRDTYQQWVDEPTLDPELKVDLKNMADDETTKEEAFAAPMAFGTA -MSGLDPQVREAAERWVAGDVDARARDELLELLGAADAGSADAATELADRMSGMPTFGTA MSDSLDSRLRDSAYRWIADDPDPASREELTEVLARAIGKVPGAAAEVADRMAGPLEFGTA -MSRLTPELRDRAMRWIADDVDAAARQELQAVLAAAMNGAPDAVTDLDDRMAGPLEFGTA *: :*: * : * : ::: * : ::: :::
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	GMRGVLGAGIGRMNIYTVRQATEGLARFMDTLSDETKARGVAISYDSRYMSQEFAYESAG GLRGPVRAGANGMNRAVVVRTTAGVAEWLRERGHGGGIVVVGRDARHGSEDFAADAAG GLRGPVRAGPNGMNVAVVTRTTAGVAAWLTAHGHAGGVVVVGRDARHGSEAFATAAAE GLRGPVRAGPNGMNTAVVVRTTAGVATWLTAHGKAGGIVVVGRDARHGSEEFATAAAE K:** : ** ** ** .* ::* *:* :: *:: *:* :*
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	VLGAHGIKSYVFDQLRPTPELSFAVRHLKTYAGIMITASHNPKQYNGYKIYGPDGGQMPP VLAAAGFDVRVLPAPLPTPVLAFATRALDAVAGIQITASHNPPQDNGYKLYLRGGVHLVG VLTAAGFAVKVLPQPLPTPVLAFSVLHYDAVAGIQITASHNPPADNGYKLYDATGGQIVP VLHAAGFDVRVLPRPLPTPLVAFATKHLGAAAGIQITASHNPPADNGYKLYDDVAIQIVP VLHAAGFDVRVLPRPLPTPLVAFATKHLGAAAGIQITASHNPPADNGYKLYDDVAIQIVP ** * *: *: *: *** ::*:. : ***
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	EESDKITKYAHSAADLFAIKSLNVHVLRAKKLMQPIGEDVDEAYYAEVATVTINHDLINK PADTEIEEAIARTPDAASVPR-SQDYSVH-HSALEDYLARVAELSKG PSDGEIEQAIQAAPPARSVPR-APGAEVVDPREAYLTKVAELPHG PADAEIEAAIAAAPGAISVPR-KPGATVLGDEILDEYLYRVSQVPRS PADAEIEAAIAAAPGAISVPR-KPGATVLGDEILNEYLYRVSQVPRS . :* : :: * : : * : : * : : : : : : : :
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	VGKNMSLVYSPLHGTGRIPAQMVLRNAGFENFRLVPEQSIADPEFATTPFPNPEFAQVFD SPRPLRVAATALHGVGARPLREALHRAGFDDVHLVASQSEPDPDFPTVGFPNPEEPGATD STRELRIAATALHGVGAETVRAALAQAGFADVHLVAAQSEPDADFPTVSFPNPEEPGATD PHRGLRVAATALHGVGAEVLREALSRAGFADVHLVAEQSAPDADFPTVSFPNPEEPGATD PHRGLRIAATALHGVGAEVLREALSRAGFTDVHLVAEQSAPDADFPTVSFPNPEEPGATD : : : : : ****.* : .* .**** :::** ** * :* *. ***** .**
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	LPIALGKKIGADVLIATDPDADRLGTAVKVG-DHYQLLTGNQIASVLLHYILEARKQAGT ALLALAAEIEADLAIALDPDADRCALGIRED-GRWRMLRGDETGVLLAQHILSALDRQA- LLLTLASEVDADLAVALDPDADRCALGVRGP-DGWRMLRGDETGVLLGAHILSTTD- LLLALAAEVDADLAIALDPDADRCAVGVPDATGQWRMLRGDETGVLLGDYVLSTTS- LLLALAAEVDADLAIALDPDADRCAVGVPDATGEWRMLRGDETGVLLGEYVLSTTS- ::*. :: **: :* ******: :::* *:: :* ::*:
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	LPKNGAVVKSIVSTELATAIAKDYGVDMINVLTGFKFIGDQIKHFQATGEHEFLFGFEES -HPDPLVATTIVSSTMLRSIAQEFRARYDETLTGFKWLVRAGDGAGTGLVYAYEEA -STDPLVATTIVSSSLLGELAKEKGARYAETLTGFKWLVRAGDGLVFAYEEA -NPDPLVATTIVSAAMLGDIARAHGARYAETLTGFKWLTRSGEGLVFAYEEA : *:***:: :::::::::::::::::::::::::::
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	YGYLIKP-FVRDKDAIQSTVLLAEVAAYYQSQGKTLWDGVQELYKKYGYYAEKTVGVDFE LGHCVDPEWVRDKDGISTAVLACDLAAHVAADGRSIAGLLDALAISHGVHQTGQVSVRVT LGLCVNPSFVRDKDGIAAAVAAADLAATLKAEGRTPLDVLDDIAIRHGVHLTDQVSLRVT LGLCVNPDFVRDKDGIAAATLACDVAAKLKAEGRSLLDELDRLAVAHGVYVTDQVSLRVT LGLCVNPDFVRDKDGIAAATLACDLAAKLKAEGRSLLDELDRLAVAHGVYVTDQVSLRVT * :.* :******.* ::::** ::*:: :: :: :*: *::
L.casei S.erythraea A.benzoatilytica A.methanolica Amycolatopsis_sp.	GVDGQKQMANLMTKFREEQPADFAGVKITKVEDFLGQEAKSADGTVEKLTMPSSNVLKYI DLGVIAETMRRLRRQPPAELAGSPVEV-QDLLPETDALVVT DLSVRGRLMAALRSAPPGTLGGVPVTL-EDLLPDADVLRLS DLSVRGQLMARLRKSPPAELAGAAVEV-EDLLPQTDALRIA DLSVRGQLMARLRKSPPTELAGAAVEM-ADLLPETDALRIA :* :* * :.* : * ::*

L.caseiLADGTWIAIRPSGTEPKVKFYVGTKADTEAKA-----QEKLDAFEKALNDFREEAS.erythraeaGAGGLRVVIRPSGTEPKLKCYLQVVEQVTCGTIGTAKR-EAARRLSELSTAVTELVAS-A.benzoatilyticaG-DGVRVVVRPSGTEPKLKAYLQVVTPVTGELAD--ARRTATELLDVVRAEIADLLR--A.methanolicaG-GGSRVVIRPSGTEPKLKCYLQVTRPVPDEAALAEVRVDATSTMAALRADVEALLA--Amycolatopsis_sp.G-GGLRVVIRPSGTEPKLKCYLQVTRPVPDEAALAEVRVDATSTMAALRADVEALLA--* :.:********:* *: .:

Priloga D: Poravnava aminokislinskih zaporedij glukoza-1-fosfat timidilil transferaza (S. erythraea SACE_6883).

Supplement D: Alignment aminoacid sequences of glucose-1-phosphate-thymidylyltransferase (*S. erythraea* SACE_6883).

M.smegmatis	MRGIILAGGSGTRLHPLTIGVSKQLLPVYDKPLVYYPLSTLIMAGIRDILVITTPA
S.venezuelae	MKGIVLAGGHGTRLHPITLGTSKQMLPVYDKPMIYYPLSVLMLAGIRDIQIISSPD
A.balhimycina	METAVKGIVLAGGNGTRLYPITQATSKQLLPVYDKPMVYYPLSVLMLAGITEILLISTPA
S.erythraea	MKGIVLAGGSGTRLHPLTQVVSKQLLPVYDKPMVYYPLSVLMLAGIREVLLISTPD
S.saliphila	MKGIVLAGGSGTRLHPITQAVSKQLLPVYDKPMIYYPLSVLMLAGIREIMVISTPT
	::**:**** ****:*:* .***:******::*****.*::**** :: :*::*
M.smegmatis	DAPAFRRLLGDGSDFGVNLSYAAQNEPEGLAQAFLIGADHIGNDTVALALGDNIFYGPGL
S.venezuelae	DIENFRRLLGDGSPLGISLSYAVQEQPRGLAEAFLISADHIGDDSVALVLGDNIFHGPGF
A.balhimycina	DQPNFRRLLGSGSQWGLELTFATQPQPNGLAEAFVIGRDFVGDDRVALVLGDNIFYGPGF
S.erythraea	DLPLFRRLLGDGSQFGISVEYAEQPEPNGLAEAFVIGADFVGDDSVALVLGDNIFYGQGF
S.saliphila	DLPNFRRLLGDGRQWGLDLRYAEQPSPNGLAEAFVIGADFVGDDDVALILGDNIFHGRGF
	* ******.* *:.: :* * .*.***************
M.smegmatis	GTSLRRF-EHVSGGAIFAYWVANPSAYGVVEFDADGKAVSLEEKPKTPKSHYAVPGLYFY
S.venezuelae	AGILQDKAVDVDGCVLFGYPVRDPERYGVGEVDADGRLVSLEEKPEHPRSDLAITGLYFY
A.balhimycina	SVTLRRAMAQLDGCVLFGYAVKNPEHYGVGEFDAAGRLVSLMEKPVKPRSDKAITGLYLY
S.erythraea	SKLLQQCTRELEGCMLFGYPVRDPQRYGVGEIDGDGRLVSIVEKPERPRSNTAITGLYFY
S.saliphila	SGLLREQASCLDGCALFGYAVKDPQRYGVGEVDGDGTLLSIEEKPKRPRSNLAITGLYFY
	· *: :.* :*.* * :*. *** * .*. * :*: *** *:*. *: ***:*
M.smegmatis	DNTVIDIARSLKKSARGEYEITEVNQIYLNRGQLSVEVLARGTAWLDTGTFDSLLDASDF
S.venezuelae	DNDVIDIAKNLTPSARGELEITDVNRIYLERGKAELVSLGRGFVWLDAGTHDALTEAGQY
A.balhimycina	GNDVLDIAAELTPSVRGELEITDVNREYLRQGRAQVIDLGRGFAWLDTGTHDSLLEASQF
S.erythraea	DNAVVEIARGLRPSARGELEITDVNMEYLRRGSARLTELGRGFAWLDTGTHSSLLDASQF
S.saliphila	DNQVVDIAADLTPSERGELEITEVNMAYVRAGRARLNELSRGFAWLDTGTHDSLLEAGQF
	* *::** * * *** ***:** *:. * : *.** .***:* :*.::
M.smegmatis	VRTIELRQGLKVGAPEEIAWRAGFIDDDQLATRAKELLKSGYGHYLLQLLDRE
S.venezuelae	VQILEHRQGVRLACLEEIAWRMGFIDREACLRLGEELSKSPYGQYVMEIARAG
A.balhimycina	VRVLENRTGVRIACLEEIALRMGFISAGECHALGEKLAKSAYGDYVREVAVAAGGAA
S.erythraea	VQVLENRQGVRIACLEEIALRMGYISPEECFALGAKLAKSGYGEYVMSVARSAGAPG
S.saliphila	VQVLEHRTGVRIACLEEVALDMGFISPDECFRLGAKLAKSGYGDYVMDVARAAGATG
	: : * *::: **:* *:* :* ** **.*: .:

Priloga E: Poravnava aminokislinskih zaporedij S-adenozil-homocistein hidrolaza (*S. erythraea* SACE_6450 in SACE_3897).

Supplement E: Alignment aminoacid sequences of S-adenosy-homocystein hydrolase (S. erythraea SACE_6450 and SACE_3897).

C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	MAKVTDFKVADLSLAEAGRHQIRLAEYEMPGLMQLRREYAEEQPLKGA MSAKLQKVNGIEFAVKDLSLAEAGRHQLRLAEHEMPGLMATRREYADSKPLKGA MTTSVSTTPVAESRNGIDFKVADLSLAEFGRKEIRLAEHEMPGLMALRREYAEVLPLKGA MNDERLQVRNGIEFAIADPGAATAGRHQIRLAEHEMPGLMALRREYAEVYPLRGA -MTPESVVKRHDTRGGIEFAVADLDAAEFGRKEIRLAEHEMPGLMALRREYAEVYPLRGA -MTPESVAKWHDTRNGVEFAVADLELAEFGRKEIRLAEHEMPGLMALRREYAEVNPLRGA :* : * * * *:::****
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	RIAGSIHMTVQTAVLIETLTALGAEVRWASCNIFSTQDEAAAAIVVG-DGTPEDPQGVPV RIAGSLHMTVQTAVLIETLLELGAEVRWVSCNIFSTDDAAAAAVVVGPNGTPEKPEGTSV RVSGSLHMTIQTAVLIETLTALGAEVRWASCNIFSTQDHAAAAIVVGPHGTPEEPKGVPV RVSGSLHMTVQTAVLIETLVALGAEVRWASCNIFSTDDSAAAAVVVGPHGTPDEPRGVPV RIAGSLHMTVQTAVLIETLVALGAEVRWASCNIFSTQDHAAAAVVVGPHGTPEEPKGVPV RVSGSLHMTVQTAVLIETLVSLGAEVRWASCNIFSTQDHAAAAVVVGPHGTPEEPKGVPV *::**:***
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	FAWKGETLDEYWWCINQIFSWEGE-LPNMILDDGGDATMAVIRGREYEKAGVVPQPE-AN FAWKGETLEEYWWCTDQLFQFDGGLSPNMILDDGGDATLLVHKGVEFETAGAVPQAT-DE FAWKGETLEEYWWAAEQMLTWPGE-PANMILDDGGDATMLVLKGAQFEKAGVVPPTDDDQ FAWKGETLEEYWWCTERMLTWPGEAGPNMILDDGGDATLLVHKGVQYERAGVVPPAD-DD FAWKGETLEEYWWCTERMLTWEGE-GPNMILDDGGDATMLVHKGTEYEKAGVVPPAD-DE FAWKGESLEEYWWCTERMLTWDGE-GPNMILDDGGDATLLVHKGTQYEAAGVVPQPD-DN ******:*:****.::::::::::::::::::::::::
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	DSDEYIAFLGMLREVLAEEPDKWTRLADSIKGVTEETTTGVHRLYHFAEEGVLPFPAMNV DPDEYKVVLATLRESLDKDKGRFTRIAKEIRGVTEETTTGVHRLYEFAKTGELLFPAINV DSDEYKVFLALLRQSLAADKGKWTAIAESVQGVTEETTTGVLRLYQVAAAGELTFPAINV DPDEFKVILQTLRASLAADTTKWTRAAERIRGVTEETTTGVLRLYQLAAQGELLFPAINV DEEWKVFLELLRASVAADKGKWTAIGQSVKGVTEETTTGVLRLYQLAAAGELLFPAINV DSDEWKVVLELLRASLAADGQKWTRIGQGVRGVTEETTTGVLRLYQLAAAGELLFPAINV * :*:* ** : : ::*:********** **** * * ***:**
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	NDAVTKSKFDNKYGTRHSLIDGINRATDMLMGGKNVLVCGYGDVGKGCAEAFDGQGARVR NDSVTKSKFDNKYGCRHSLVDGINRGTDVLIGGKTAVICGFGDVGKGSAESLRGQGARVI NDSVTKSKFDNKYGTRHSLLDGINRGTDVLIGGKAALVCGYGDVGKGCAEALRGQGARVA NDSVTKSKFDNKYGIRHSLIDGINRATDVLVGGKVAVVCGYGDVGKGSAESLRGQRARVI NDSVTKSKFDNRYGIRHSLIDGINRGTDVLIGGKVAVVCGYGDVGKGAAESLRGQGARVI NDSVTKSKFDNRYGIRHSLIDGINRGTDVLIGGKVAVVCGYGDVGKGAAESLRGQGARVI **:**********************************
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	VTEADPINALQALMDGYSVVTVDEAIADADIVITATGNKDIISYEQMLKMKDHALLGNIG VTEIDPICALQAAMEGYEVKTIEDVVEQADIFITTTGNFNIITAEHMAKMKHNAIVGNVG VTEVDPINALQALMDGFEVKTVEQAIGWADIVITSTGNKDIITFEHMKAMKHQAILGNIG ITEVDPINALQALLDGYEVARLDSVIGQADIVITATGNKDIVTVDHMRRMKHQAVLGNVG ITEIDPICALQAMMDGYEVKRLESVLDEGDIYVTTTGNKNVVMVEHMARMKHQAIVGNIG VTEIDPICALQAAMDGYQVKTLESALPEADIVITTTGNKDVVMAEHMARMKHQTIVGNIG :** *** **** ::*:.* ::::: .** :*:*** ::: ::* **::**:*
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	HFDNEIDMHSLLHRDDVIRTTIKPQVDEFTFPNGKSIIVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS HFDNEIDMAGLEKVPGIKKVEIKPQVHEYTFPDGHAIIVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS HFDNEIDMAGLEKSGDVTRINIKPQVDEFTFADGHSIIVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS HFDNEIDMAGLERADGVRRINIKPQVDEWAFRDGRSIIVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS HFDNELDMAGLARYPGVRRVNIKPQVDEWVFPDGKSILVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS HFDNEIDMAGLARYPGIRRINIKPQVDEWVFPDGHSVLVLSEGRLLNLGNATGHPSFVMS *****:** .* : : : *****
C.efficiens SACE_3897 R.erythropolis SACE_6450 Streptomyces A.nigrescens	TSFADQTIAQIELFQNEGQYENQVYRLPKILDEKVARIHVEALGGKLTELTKEQAEYIGV NSFTNQTLAQIELWTKPGEYDKQVYVLPKHLDEKVARLHLDALGVKLTKLTKEQAAYIGV NSFSNQVIAQIELWTKPEEYDNEVYRLPKHLDEKVAKIHVEALGGELTKLTKDQAEYIGV NSFSNQVIAQIELFTKREYDREVYRLPKALDEKIARIHVEALGGELTKLTKDQAEYIGV NSFSNQVIAQVELFTKTEEYDKEVYRLPKKLDEKVARIHLEALGGELTKLTKEQAEYIDV NSFSNQVIAQIELFTKHEEYDKEVYRLPKKLDEKVARIHLQALGGELTKLTKEQAEYIDV .**::*.:**:**: :::::**

DVAGPFKPEHYRY
DVEGPYKPDHYRY
DVEGPYKPEHYRY
DVEGPYKPDHYRY
DVEGPFKSEHYRY
DVEGPFKSEHYRY
** **:* :****

Priloga F: Poravnava aminokislinskih zaporedij homocistein metiltransferaza (S. erythraea SACE_3890).

Supplement F: Alignment aminoacid sequences of homocysteine methyltransferase (S. erythraea SACE_3890).

S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	MTSTLTLAEALAAGTVVLDGGMSNQLESAGHDLSDELWSARLLAQRPEAITEAHLA MTMTSHTSPTLADALAAGTVVLDGGMSNQLESAGHDLSDELWSARLLAERPEAVTEAHLA MGSARGFTWPSDPVLLDGGLATELEARGHDLSDPLWSARLLADAPQEIVAVHAA MPFPDLCSSAPLVLDGGLATELEARGHDLSDELWSARLLHDAPEEIVAAHAA MNAFSLSGAPMILDGGLATELEAQGHDLSDALWSARLLADAPEEIVAAHAA . ::*****:::**: ****** ******* : *: :**
S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	YFRAGADVAITASYQATFEGFAKRGIDHDRAAELMALSVELAREAARLARVPRPLWV YYLAGASVAITSSYQATFEGFGKRGIGRDEAARLLGLSVELARDAARKAQGAGVPRPLWV YFRAGAMIATTASYQASFEGFAARGISRSDTAGLLRRSVELAKAARDEAGVAGHV FFRAGAVIATTASYQASFPGFGARGIGRGDAAALMRRSVELARQAAERLEPDRPRWV FFRAGAEIATTASYQASFEGFAERGIERAEAAKLMRRSVELARLAG-EVEPGRHRWV :: *** :* *:****: **. *** : :* *: *****: *
S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	AASAGPYGAMLADGSEYRGRYGLTVDELERFHRPRLEVLAAARPDVLALETVPDADEAAA AASVGPYGAMLADGSEYRGRYGMSVDELERFHRPRMEVLAAAAPDVLALETVPDADEAAA AASVGPYGAALADGSEYRGRYGISVRQLEDWHRPRLEVLAGADADVLAVETIPDVDEAEA AASVGPYGATLADGSEYRGRYGLTVSDLVGFHRPRLEVLAGAGPDVLALETVPDLDEAIA AASIGPYGAMLADGSEYRGRYGLTKRELHDFHRPRLEVLAESRPDIFALETVPDIDEAEA *** ***** *************************
S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	LLRAVRGLGVPAWLTYSVAGGRTRAGQPLEEAFALAADADEVIAVGVNCCAPEDVDTAAA LLRAVRGLGMPAWLSYTVEGLRTRAGQPLEEAFGLAADADEVIAVGVNCCAPEDVRGAVE LVNLVRSLGVPAWLSYTIDGAHTRAGQPLADAFAVAAGVPEIVAVGVNCCAPEDVLPTIE LVEAVDGIGVPAWLSYTVADGRTRAGQPLAEAFEVARDHEDIVAVGVNCCSPAEVAPALA LVDAVADLDVPAWLSFTISGEQTRAGQPLAEAFAVAADSDAIIAVGVNCSAPDDVLTAIE *: * : :****:::: :***** :** :*
S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	TAARVTGKPVVVYPNSGETWNADARAWTGRSTFTAGQVKGWQQSGARLIGGCCRVGPEAI IAARVTGKPVVVYPNSGEAWDARARAWRGRTTFGAEQVKAWREAGARLIGGCCRVGPQAI IAA-AIGKPVIVYPNSGEHWDALRHNWTGPSRFSAPLAARWISAGARIVGGCCQVRPTDI IARQVTGKPVVAYPNSGEDWDAHCRTWTGASRFPGTAASAWAHEGAAVIGGCCRVRPDDI IASATVEKPIVVYPNSGEGWDAQRRAWTGRARLSAEQARSWRAAGAHVIGGCCRVRPEDI * . **::.****** *:* : * * :: * ** ::****:* * *
S.chartreusis S.hygroscopicus M.avium S.erythraea S.spinosa	SGIAGTLGAA TGIAGALAA AAVRRACSDGENSAKKSP ADLAATLP TAVADALTDPAA : : :

Priloga G: Poravnava aminokislinskih zaporedij metionin sintaza (S. erythraea SACE_3898).

Supplement G: Alignment aminoacid sequences of metionine synthase (S. erythraea SACE_3898).

S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	MADRKNDPSGFLAAIGERVLVADGGMGTALQAYDLSLD-DFANLEGCNEILNET MTTQEESGRRDNDPSGFLTAIAERVLVGDGGMGTALQEYDLSLEQDFQNLEGCNEILNET MTAADKHLYDTDLLDVLSQRVMVGDGAMGTQLQAADLTLD-DFRGLEGCNEILNET MSDRAVSPLLAALRDRVVVADGAMGTMLQSWPLTLD-DFAGLEGCNEILNVT MPELNPDGHDTSFLDTLARRVVVADGAMGTMLQAADLTLD-DFAGLDGCNEILNDT . ::* :: **:********
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	RPDVVSSVYRGFLEAGSDAIETNTFGTNLANLGEYGIPERIRDLAEKGTRLAREAADEYS RPDVLRSIYTGFLTNGSDAIESNTFGCNLPNLGEYGIEERIRDLAEKGVALARECCDEYS RPDVLETIHRNYFEAGADAVETNTFGCNLSNLGDYDIADRIRDLSQKGTAIARRVADELG RPDVVRAVHRGYLEAGADAVETNTFGANLANLAEYDITDRIHELALAGARLAREEADAFS RPDVVRRIHTGYLEAGADAVETNSFGANLPNLAEYDIAERIRELAEKGARLAREAADELS ****: :: :: *:**:*:** ** **.:* * :**::*: *. :**::*
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	TPDKPRFVLGSMGPGTKLPTLGHAPYADLRDAYVENVLGMIDGGIDVVLVETSQDLLQTK TPDKPRFVLGSMGPGTRLPTLGHAPYADLRDAYHKQVLGMLDGGVDVVLVETSQDLLQTK SPDRKRYVLGSMGPGTKLPTLGHTEYAVIRDAYTEAALGMLDGGADAILVETCQDLLQLK EAGRPRFVLGSVGPGTKLPTLGHARYEVLREAYQQQAAGMLAGGIDAVLVETCQDLLQTK TPDRPRYVLGSVGPGTKLPTLGHESFARLRDAYTECGIGLLAGGADAFVIETCQDLLQVK : *:****:***** : ::*** : *:: ** *::**
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	AAIVAAKRAMEQTGRWLPIIAQVTVEQTGTMLVGSEIGAALTALEPLGIDMIGMNCATGP AAIVAAKRAMAEQGKWVPIIAHVTVEQTGTMLVGSEIGAALAALEPLGIDMIGMNCATGP AAVLGSRRAMTRAGRHIPVFAHVTVETTGTLGSEIGAALTAVEPLGVDMIGLNCATGP AAIIGAQRAMVAEGITVPVIAQVTVETTGTMLLGTEINAALAALEPLGIDLIGLNCATGP AAVLGVRRAMAAEGRRIPIITQVTVETTGTMLLGSEIGAALTAIEPLGVDLIGLNCATGP **::.::*** * :*::::**** *****:*:**
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	AEMSEHLRVLSQHARVPISVMPNAGLPELGPNGAVYPLKADELAEALAGFVTNFGARLVG AEMSEHLRVLAEHATVPISVMPNAGLPELGDNGAVYPLQPHELAEALVGFANNYGARLVG AEMSEHLRHLSRHARIPVSVMPNAGLPVLGAKGAEYPLLPDELAEALAGFIAEFGLSLVG AEMSEHLRQLARHSRIPLSVMPNAGLPELGPNGAVYPLGPEELAEALAGFVREFGVGLVG AEMSEHLRTLSKHARIPLSVMPNAGLPQLGPNGAVYPLSPDELAEALSTFVRDYGLRLVG ******** *:.*: :*:******** ** :** *** .********
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	GCCGTTGEHVRAVSEAVASLTPPERTPEVIPSVSSMYQTVPFEQDASILNVGERTNANGS GCCGVTGEHVRQVAEAVEGLNPAPREPEVVPSISSMYQAIPFKQDASILNVGERTNANGS GCCGTTPAHIREVAVAVANIKRPERQVSYEPSVSSLYTAIPFAQDASVLVIGERTNANGS GCCGTTGDHISAVVDAVRGLRPVERAPRPEAGVASLYQAVPFRQDASVLMVGERTNANGS GCCGTTPDHVRAVSEAVAAVTPAVRDPRPEPGVSSLYASVPFRQDTSVLMVGERTNANGS ****.* *: * ** : * .::*:*
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	KAFREAMLEERYEDCVEIAKAQTREGAHMLDLCVDYVGRDGTKDMRELASRLATASTLPI KAFREAMLEERYDDCIEIAKGQTREGAHMLDLCVDYVGRDGKYDMRELASRLATSSTLPI KGFREAMIAEDYQKCLDIAKDQTRDGAHLLDLCVDYVGRDGVADMKALASRLATSSTLPI KAFREAMLAEKYEDCVEIARTQTREGAHLIDLCVDYVGRDGVQDMTELAGRLATASTLPI KAFREAMIEERWEDCVAIAREQTRDGAHMLDLNVDYVGRDGVADMAELAGRLATASTLPI *.*****: * ::.*: **: ***:***::** ********
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	MVDSTEPDVIQAGLEHLGGRCAVNSVNYEDGTEPGGRFQRVMEMVREHGATVVVTCIDEEMVDSTEADVIEVGLEHLGGRCAINSINYEDGTEEGGRYDRVMKMAVEHGASVVCTCIDEEMLDSTETAVLQAGLEHLGGRCAINSVNYEDGDGPESRFAKTMALVAEHGAAVVALTIDEEMLDSTEPDVLRAGLECLGGRCAVNSVNYEDGDGPDSRFQRIMRLVSEHGAAVVALCIDEEMIDSTETEVVQAGLEHLGGRCIVNSVNYEDGDGPGSRFQRTMAVVREHGAAVVALCIDEE*:*****:*****:****
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	GQARTRDWKLRVAERMIEDLTTNWGLEKSAIIIDCLVFPITTGQEEVRKDGIETIEAIRE GQARTADWKLRVAERIIEDLTRNWGLDESAIIIDCLVFPITTGQEEVRQDGIETINAIRE GQARTAQKKVEIAERLINDITGNWGVDESSILIDTLTFTIATGQEESRDGIETIEAIRE GQARTAEWKVRVASRLIEDLTTNWGMRVEDIIVDCLTFPISTGQEEVRRDAIETIEAIRE GQARTAEWKVRVADRLIRDLTANHGMRVEDIVVDALTFPITTGQEEVRRDALETIEAIRE ***** : *:.:*.*:*:* * *: . *::* *.* *:*****
S.erythraea	LKKRHPDVQTTLGLSNVSFGLNPAARQVLNSVFLNECREAGLDSAIVNSSKILPMTKIDE
A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	LKKRHPRVQTTLGLSNVSFGLNAAARQVLNSVFLNECSDAGLDSAIVHASKILPMNKIDD LKKRHPDVQTTLGLSNISFGLNPAARQVLNSVFLHECQEAGLDSAIVHASKILPMNRIPE LKRRYPEVQTTLGVSNVSFGLNAAARQVLNSVFLHECVEAGLDTAIVHASKILPMARIPE LKRQYPTVQTTLGISNVSFGLNAAARQVLNSVFLHECVTAGLDTAIVHASKILPMSKIPD **:::* ******:***** ******************
---------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	EPRKVALDLVYDRRSEGYDPLQKLMELFEGQTAKSSSASRAEELAKLPLFERLE EARQVALDLVYDRRSAASEDQAAYDPLQKLMSLFEGKSAESTGSSKAEELAAMPLFDRLQ EQRNVALDLVYDRRREDYDPLQELMRLFEGVSAASSKEDRLAELAGLPLFERLA EHREVALDLVYDRRREGYDPLQRLMALFEGATASSARASRAEELAALPLFERLE EQRSVALDLVYDRRREGYDPLARFMELFEGVTASSAKAGRAEELAALPLFERLE * *.*********
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	KRIVDGERNGLEADLEAAMQEKPPLEIINQNLLGGMKIVGDLFGSGQMQLPFVLQSAEVM QRIIDGEMNGLNVDLEEAMKEKKPLEIVNETLLAGMKVVGDLFGSGQMQLPFVLQSAEAM QRIVDGERNGLDADLDEAMTQKPPLQIINEHLLAGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAEVM RRIVDGERNGLEADLDLALTERPALRIINDTLLAGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAEVM RRIVDGERVGLEADLDAALEERPALEIINDVLLSGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAEVM :**:*** **:.**: *:: *.*:*
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	KAAVAHLEPHMEKDD-SGGKGRLLLATVKGDVHDIGKNLVDIIVSNNGYEVVNIGIKQPI KTAVAQLEPYMEKDD-SGGKGKLLLATVKGDVHDIGKNLVDIIVSNNGYDVVNIGIKQSI KAAVAYLEPHMERSDDDSGKGRIVLATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYEVVNIGIKQPI KTAVAHLEPHMEKAD-EGGKGRIVLATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYEVVNLGIKQPI KTAVAHLEPHMEKTD-AAGKGTIVLATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYTVVNLGIKQPI *:*** ***:**: * .*** ::****************
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	NAILDAAEEHKVDAIGMSGLLVKSTVIMKENLEEMNSRGIAEKYPVMLGGAALTRSYVEN NTILEEAENHNVDAIGMSGLLVKSTVIMKDNLEEMNSRGIAEKYPVMLGGAALTRSYVEN ATILEVAEDKSADVVGMSGLLVKSTVVMKENLEEMNTRGVAEKFPVLLGGAALTRSYVEN TAILDAASEHRADAIGMSGLLVKSTVIMKENLEEMNTRGVASRWPVLLGGAALTRSYVEN STILSAAQEHGAHAVGMSGLLVKSTVIMKENLEEMNSRGVAEQLPVLLGGAALTRSYVEN :**. *.:::*************************
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	DLDEVYQGDVRYAKDAFEGLHLMDRMMAVKRGETPEEDEAEAAKKAERKARRERSL QLEEVFEGDVRYAKDAFEGLTLMDRIMSSKRGDNPEEDEAEKTKKAERKARHERSQ DLAEIYQGEVHYARDAFEGLKLMDTIMSAKRGEAPDENSPEAIKAREKEAERKARHQRSK DLSEVYRGDVRYARDAFEGLRLMDAIMDRKRGGTALVDEAEQARIAERKARHERSR DLAELYRGRVSYARDAFEGLRLMDATMARARGDAPAVDPAEEQKIAERKARHERSK :* *::.* * **:***** *** * ** : * : * : *
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	RIAEKRKAAEGDIPDLYDESTRSDVDADAPVPAPPFWGSKVIKGVPVADYLALLDERATF RIAEKRKAEQGELPGLD-DTTKSDVDENPGVPTPPFWGSKVVKGVPVSDYLSLLDERATF RIAAQRKAAEEPVEVPERSDVAADIEVPAPPFWGSRIVKGLAVADYTGLLDERALF RIAEARRAAAEAE-EAQAPTGRSDVATDVPLPTAPFWGNRIVKGIPLADYSALLDERATF RIAAKRRAA-EAE-AAGPLPERSDVALDNPLPTPFWGTRVVKGIAVAEYSGMIDERALF *** *:* ::*: ::::***::::**
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	FGQWGLRGSKKGEGPTYEELVESEGRPRLRYWIDELATAGILQHAAVVYGYFPVISEGNS FGQWGLRGAKKGQGPSYEELVESDGRPRLRAWMDELATKGILQHAAVVYGYFPCVSEGND LGQWGLRGQRGGEGPSYEDLVETEGRPRLRYWLDRLSTDGILAHAAVVYGYFPAVSEGND FGQWGLRGTRGAAGPSYEELVETEGRPRLRYWLDRLSTENILQHAAVVYGYFPCVAQDED LGQWGLRGAKGGSGPSYEELVETEGRPRLRYWLERLATEGVLANAAVVYGYFPAVAVRDE :******* : . **:**:***** *::.*** :: .
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	LIVLDKEEPDAPERTRFTFPRQQRDRRLCLADFFRSREKAEQTGQVDVLPMQLVTMGQPI LVVLDKDEPDAQERHRFHFPRQQRDRRLCLADFYRSRDKATELGQVDVLPIQLVTMGTPI IVVLTEPKPDAPVRYRFHFPRQQRGRFLCIADFIRSRELAAERGEVDVLPFQLVTMGQPI LVVLSEPDPASPEVCRFTFPRQRRDRRLCLADFFRPRELAASTGQVDVLPLTLVTMGQPI LVVLTEPRADAPERHRFAFPRQRRDRHLCLADFWRPRDLAIAAGEIDVLPLHLVTMGQPI ::** : : ** ****:* * **:*** * : * ::****:
S.erythraea A.halophila M.tuberculosis A.spitiensis P.dioxanivorans	ADYANELFAKNSYRDYLEIHGMGVQLTEALAEYWHRRIRRELQFSGGASAADQDPADVLE ADYANELFAENSYRDYLEIHGLGVQLTEALAEYWHRRVRKELLWSAGRSVSEEDPEDVEQ ADFANELFASNAYRDYLEVHGIGVQLTEALAEYWHRRIREELKFSGDRAMAAEDPEAKED ADFANELFAANAYRDYLEVHGLGVQLTEALAEFWHQRIRQELTWSDGRSVAAEDPSDVTE ADYANELFAKDSYRDYLEVHGLGVQLTEALAEYWHRRVREELTWSTGRTLAEDDPDDVED **:****** ::******:**:****************

FFKLGYRGARFSFGYGACPEIEDRAKIVELLESERIGVVLSEEFQLHPEQSTDAIVCHHP
FFKLGYRGARFSFGYGACPDIEDREKLVNLLGSERIGVVLSEGYQLHPEQSTDAIVSHHP
YFKLGYRGARFAFGYGACPDLEDRAKMMALLEPERIGVTLSEELQLHPEQSTDAFVLHHP
${\tt FFRLGYRGARFSLGYGACPNLEDRAKIAALLEPERVGVTLSEEFQLHPEQSTDALVAHHP}$
${\tt FFKLGYRGARYSLGYGACPNLEDRTKIVEMLEPGRIGVGLSEELQLHPEQSTDALVAHHP}$
·*··******
EAKYFNT-
EAKYFNV-
EAKYFNV-
EAKYFNA-
EAKYFNAG

Priloga H: Poravnava aminokislinskih zaporedij 5-metiltetrahidropteroil-triglutamat-homocistein S-metiltransferaza (*S. erythraea* SACE_4744 in SACE 6349).

Supplement H: Alignment aminoacid sequences of 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase (*S. erythraea* SACE_4744 and SACE 6349).

S.mutans	MTKVSSLGYPRLGENREWKKLIEAYWAEKVSKNDLFAGAKEL
M.tuberculosis	MNHPSIEGQHVTQPVRRQPFTATITGSPRIGPRRELKRATEGYWAGRTSRSELEAVAATL
A.orientalis	MTEIGTTVLGYPRIGPDRELKRSLERFWAGKIDEAELLGTGRAL
SACE_4744	MTTKIGSTVLGYPRIGPNRELKRALESYWASRSGAEDLREVARRL
SACE_6349	MSSRIGSTVLGHPRIGPRRELKRALEGYWASRSTEAELREVARSL
	: * **:* ** *: * :** : :* . *
S.mutans	RLDFLKKOLNAGLDLIPVGDFSLYDHILDLSVOFNIIPKRFAKEP-IDIDLYFAIARGNK
M.tuberculosis	RRDTWSALAAAGLDSVPVNTFSYYDOMLDTAVLLGALPPRVSPVS-DGLDRYFAAARGTD
A.orientalis	RTRTWREI.KDAGI.DSVPSNTFSHYDOVI.DTAEI.FGAI.PERFTTI.GI.SPI.DTYFAAARGVO
SACE 4744	RVDTWRTLODAGLDSVPGNTFSYYDOVLDTAVTFGAVPPRYTELGLNPLDTYFAMARGVD
SACE 6349	RAGTWRELAAAGLDSVPGNTFSYYDOVLDTAATFGAVPRRFAELGLGPLDTYFAMARGVE
	* *** :* ** ** : : :* * : :* *** .
S.mutans	
M. Luberculosis	
A.OFIENLALIS	
SACE_4744	
SACE_6349	STPPLEMTKWFDTNYHYLVPEIGPGTTFSLADKTAVEDYREAA-ADGVGTRPVVVGPLTF
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
S.mutans	VALSTGVEDFTAAVKSLLPLYKQVFTELVKAGASYIQVDEPIFVTDEGKDYLQA
M.tuberculosis	LLLSKAVDGAGAPIERLEELVPVYSELLSLLADGGAQWVQFDEPALVTDLSPDAPAL
A.orientalis	LLLAKPAETAPEGFRPLELLDNLLDGYVELLRRLHDEGVEWVQFDEPAFAADRSERELNA
SACE 4744	LLLSKSAEGAPESFHPLDKLDELLTAYAELLGELKRAGAEWVQLDEPAFAADRSQTELDA
SACE 6349	LLLSKSAEDAPKSFRPLDKLDELVQRYAELLTELHDAGAGWVQLDEPAFAADRTPEELEL
—	: *:: :*: * ::: * *. ::*.*** :.:*
S mutane	YAYAYEYENDYKETEOWYEECIIDS-OUISOIDUDYECIDEUVCIEENIEYIKTCY
M tuborquilogia	
A orientalia	
SACE 4744	
SACE 6349	
brien_0349	.* : . : . ***: ::.::*:* .
S.mutans	FKGKEIFAGVIDGRNIWSSDFVKTSALLETIEEQSAALTIQPSCSLLHVPVTTKNETDLD
M.tuberculosis	LAGKTLVAGVVDGRNVWRTDLEAALGTLATLLGSAATVAVSTSCSTLHVPYSLEPETDLD
A.orientalis	LRDKEVLAGVVDGRNVWRTDPTRALSRAAMVLGTAKSVSVSTSCSLLHVPYDVEREDGLH
SACE_4744	LRNKTLVAGLVDGRNIWRTDLDKALTTGATLLGLAGEVAVSTSCSLLHVPYDVEAEERID
SACE_6349	LRSKTLVSGLVDGRNVWRTDLDAALGTAAALLEVAGEVAVSTSCSLLHVPYDVDAEANLD
	: * :.:*::****:* :* : : : :::. *** **** . * :.
S.mutans	PVLRNGLAFADEKLTEVKRLAEHLDGREDPAYDLHIAHFDALOAADFRNVKL
M.tuberculosis	DALRSWLAFGAEKVREVVVLARALRDGHDAVADEIASSRAAIASRKRDPRLHNGQIRARI
A.orientalis	PRLKSWLAFARQKVDEVVLLGRALQEEGVDLSAARAAATDRATAADLADSGVRARL
SACE 4744	PQVKSWLAFAVQKVREVVVLGRALREGRDAVADELAAAA-AVADRAKADRVRNNHVRARL
SACE 6349	PHVRPWLAFAKOKAAEVVTLGRALREGRDSVADELAAARNAVODRRSSERLRDNRVRGRL
_	:: ***. :* ** * * : : ::
9 mutane	
M tuborqulogia	
A orientalia	
A.OIIEIILAIIS	
SACE_4744	
SACE_0349	: * * * * * ** ********* :* :* :* * * :*
S.mutans	YKQFIQAEIERWIRIQEDLDLDVLVHGEFERVDMVEFFGQKLAGFITTKFGWVQSYGSRA
M.tuberculosis	YVRRMRQEITEVIALQERLGLDVLVHGEPERNDMVQYFAEQLAGFFATQNGWVQSYGSRC
A.orientalis	YEAAMKAEIERVVRLQEDLGLDVLVHGEPERNDMVQYFAERLAGFATTDFGWVQSYGSRC
SACE_4744	YEQRMRDEIQRVIELQEGLGLDVLVHGEPERNDMVQYFSELMEGFVSTHKGWVQSYGSRC
SACE_6349	YDQRMLEEISRVIALQEALGLDVLVHGEPERNDMVQYFAEHLDGFVSTENGWVQSYGSRC
	* : ** . : :** * ****** ** ***::*.: : ** :*. ********

S.mutans	VKPPIIYGDVQHLEPITVEETVYAQSLTDRPVKGMLTGPITITNWSFERTDIPRDQLFNQ
M.tuberculosis	VRPPILYGDVSRPRAMTVEWITYAQSLTDKPVKGMLTGPVTILAWSFVRDDQPLADTANQ
A.orientalis	VRPPILYGDVSRPEPMTVEWARYAQGLTGKPVKGMLTGPVTILAWSFVRDDQPLGETARQ
SACE 4744	VRPPILFGDVSRPDPMTVEWATYAOKLTDKPVKGMLTGPVTILAWSFVRDDOPLADTAGO
SACE 6349	VRPPILFGDVSRPEPITTRWAERAORLTEKPVKGMLTGPITILAWSFVRDDOPLGETAAO
	*:***::***:: :* ** ** :**************
C mutana	
S.IIIucalis	
M.tuberculosis	VALAIRDETVDLQSAGIAVIQVDEPALRELLPLRRADQAEYLRWAVGAFRLATSGVSDAT
A.orientalis	VALAIRDEVHDLQEAGIRVIQVDEPALRELLPLRATAHEAYFAWAVSSFRLATSGIDDAT
SACE_4744	VALAIRDEVRDLESAGIRVVQVDEPALRELLPLRSVRHEEYLDWAVESFRLATSGVADST
SACE_6349	VALAIRDEVRDLEAAGIRVIQVDEPALRELLPLRAEQHEDYLDWAVGSFRLATSGVADRT
	··*** ** ** *** ::**** **** **** : *: ** :*:*** : * *
S.mutans	QIHTHMCYSKFDEIIDAIRALDADVISIETSRSHGDIIESFETAVYPLGIGLGVYDIHSP
M.tuberculosis	QIHTHLCYSEFGEVIGAIADLDADVTSIEAARSHMEVLDDLNAIGFANGVGPGVYDIHSP
A.orientalis	OVHTHMCYSEFGDVVKAIDALDADVTSIEAARSKMEVVTDLGAAGFGRGVGPGVYDIHSP
SACE 4744	OIHTHLCYSEFGDVINAIVALDADVTSIEAARSRMEVLADLNAVGFARGVGPGVYDIHSP
SACE 6349	OVHTHLCYSEFGEVIDATVALDADVTSTEAARSRMEVLDDLNAVGFGRGVGPGVYDTHSP
	*:***:**:* ::: ** ***** ***::**: ::: .: : : *: ********
S mutane	οιτοπκετιτιλη τεροίροι σοι αρποεωινίοροοι κπροερεπτηλι κυτ τη λπκευροκί ου
M tuborculocic	
A exientalia	
A.OIIEIILAIIS	
SACE_4/44	KVPETEEVTALLKAALEAVPAQKLWVNPDCGLKTRGYTEVEAALKNVVSATAAVRPTLR-
SACE_6349	RVPSTEEIEGLLAAALRSVPAERLWVNPDCGLKTRGYAEVEPALRSMVEAAARMRADLA-
	*** :*: : : ::*************************

Priloga I: Poravnava aminokislinskih zaporedij metionin adenoziltransferaza (S. erythraea SACE_2103 in SACE 3900).

Supplement I: Alignment aminoacid sequences of methionine adenosyltransferase (*S. erythraea* SACE_2103 and SACE 3900).

M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	MSKGRLFTSESVTEGHPDKICDAISDSVLDALLEQDPKSRVAVETLVTTGQVHVAGEV -MTANRRLFTSESVTEGHPDKMCDAISDTILDALLAADPSSRVAVESLITTGQVHVAGEV MPSSNMRLFTSESVTEGHPDKMCDAISDSVLDALLAQDPRSRVAVETLVTTGQVHVAGEV MFTSESVTEGHPDKICDAISDSILDALLAQDPRSRVAVETLVTTGQVHVAGEV MTEGHPDKMCDAISDSILDELLRQDPRSRVAVETLVTTGQVHVAGEV :*******::******
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	TTTAYADIPKIVRDRILDIGYDSSTKGFDGASCGVNVAIGAQSPDIAQGVDTAHETRVEG TTEAYVDVPTLVRDTILEIGYDSSAKGFDGASCGVNVAIGSQSPDIAQGVDTAYETRLES TTSAYADIPTLVREKILEIGYDSSAKGFDGNSCGVNVAIGAQSADIAQGVDTAYESRVEA TTEAYADIPTIVRDKILEIGYDSSAKGFDGNSCGVNIAIGAQSPDIAQGVDTGYETRVEG TTDAYADIPTIVREKILEIGYDSSVKGFDGSSCGVNVAIGQQSPDIGQGVDTAHESRVEG ** **.*:*::*::*::*::*::*::*::*:
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	KADPLDLQGAGDQGLMFGYAIGDTPELMPLPIALAHRLARRLTEVRKNGVLDYLRPDGKT ALDELDRQGAGDQGLMFGYACSDTPELMPLPIALAHRLSRRLTAVRKDGTVPYLRPDGKT SEDEIARQGAGDQGLMFGYANTDTPELLPLPIALAHRLARRLTEVRKSGVLPYLRPDGKT VIDEIAKQGAGDQGLMFGYACDDTPEYMPLPIALAHRLSRRLTKVRKDGVLPYLRPDGKT VIDEIAKQGAGDQGLMFGYACTDTDELAPLPITLAHRLSRRLTEVRKNGTLPYLRADGKT * : ************ ** * ****:***********
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	QVTIQYDGTTPVRLDTVVLSTQHADGIDLEGTLTPDIREKVVNTVLADLGHETLDTSDYR QVTIEYEGDRPVRLDTVVISSQHAEGIDLDGMLARDLVQHVITPEIESLGLDAAEPR QVTIEYDGDKAVRVDTVVVSSQHAADVDLDALLAPDIREHVVEPELARAGLDAEGAR QVTIEYAGDQAVRLDTVVVSSQHAADIDLDKMLGVDVREQVVGPEVDGLDIDTSDVR QVTIEYAGDQPVRLDTVVLSTQHAEDVDLDATLSKDIQKHVISPELERVGLDTSDLR ****:* * **:****::*** :**: * *:::*: : ::*: *
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	LLVNPTGKFVLGGPMGDAGLTGRKIIVDTYGGWARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYAMRWV TLINPTGRFVVGGPMGDAGLTGRKIIVDTYGGMARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYAMRWV LLVNPTGRFVVGGPMGDAGLTGRKIIVDTYGGFARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYALRWV LLVNPTGRFVVGGPMGDAGLTGRKIIVDTYGGMARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYATRWV LLVNPTGRFVVGGPMGDAGLTGRKIIVDTYGGMARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYATRWV *:****:**
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	AKNVVAAGLAERVEVQVAYAIGKAAPVGLFVETFGSETVDPAKIEKAIGEVFDLRPAAIV AKNIVAAGLAERAEIQVAYAIGKAAPVGLFVETFGTEKVDPAKIQAAITEVFDLRPAAII AKNAVAAGLADRIEVQVAYAIGKAAPVGLFVETFGTEHVDPTRIQSAITEVFDLRPAAII AKNAVAAGLASRIEVQVAYAIGAAPVGLFVETFGTENVDPARIQSAINEVFDLRPAAII AKNAVAAGLASRIEVQVAYAIGKAAPVGLFVETFGTENVDPVKIQAAINEVFDLRPAAII *** ******.* *:******* ****************
M.smegmatis S.cyanea P.dioxanivorans SACE_2103 SACE_3900	RDLDLLRPIYAPTAAYGHFGRTDIELPWEQTNKVDDLKSAI RDLDLLRPIYAPTAAYGHFGRTDLDLPWERTDRAPALKDAARA RDLDLLRPIYAQTAAYGHFGRTDVELPWESTSRADALKSAAGG RDLDLLRPIYAPTAAYGHFGRPDLDLPWERTDRAEALKSAANA RDLDLLRPIYAPTAAYGHFGRSDVDLPWERTDRAEALKSAAGI

Priloga J: Poravnava aminokislinskih zaporedij serin/treonin kinaze (S. erythraea SACE_0044).

Supplement J: Alignment aminoacid sequences of serine/threonine protein kinase (S. erythraea SACE_0044).

S.erythraea	MSSPRLLSNRYEIGDTLGYGGMSEVHRGRDIRLGRDVAVKVLRADLARDPTFQL
S.spinosa S marina	MSSPRLLSNRYELGETLGYGGMSEVHRGRDTRLSRDVAVKILRADLARDPTFQL
A.orientalis	MERHAEMSTPRIJ.SNRYEI.GETI.GYGGMSEVHHGHDVRIGREVAIKII.RADI.ARDPOFOE
Streptomyces_sp.	MTTPRLLSNRYELGDTLGYGGMSEVHHGHDVRLGREVAIKVLRADLARDPQFQE *::**********************************
S.erythraea	RFRREAQNAAALNHPAIVAVYDTGETDSENGPLPYIVMEYVDGRTLRDIVKSEGPLAPRR
S.spinosa	RFRREAQNAAALNHPAIVAVYDTGETESESGPLPYIVMEYVDGRTLRDIVKTEGPLSPRR
S.marina	RFRREAQNAAALNHPAIVAVYDTGEADTEYGPLPYIVMEYVEGRTLRDIVKTEGPMSQKR
Streptomyces_sp.	RFRREAQNAAALNHPAIVAVIDIGEINIEFGPLPIIVMEIVEGRILRDIVKIEGPMSQKR RFRREAQNAAALNHPAIVAVYDIGEANTDVGPLPYIVMEYVEGRILRDIVKIEGPLSQKR ************************************
S.erythraea	${\tt AMEVMADASAALDFSHRHHIIHRDVKPANIMITRSGAVKVMDFGIARALTDGQAAVTQTA}$
S.spinosa	AMEVMADASAALDFSHRHGIIHRDVKPANIMITRGGAVKVMDFGIARALADGQAAVTQTA
S.marina	
Streptomyces_sp.	AMEVMADVCAALDFSHRHGIVHRDVKFANVMIIRNGAVKMDFGIARAMHDGQSAMIQIA AMEVMADVCAALDFSHRHGIVHRDVKPANVMIIKNGAVKVMDFGIARAMHDGQSAMIQIA ***********************************
S.erythraea	AVIGTAQYLSPEQARGESVDARSDVYASGCVLFELLTGEPPFTGDSPVAVAYQHVREDPR
S.spinosa	AVIGTAQYLSPEQARGEAVDARSDVYASGCVLFELLTGEPPFTGDSPVAVAYQHVREEPR
S.marina	AVIGTAQYLSPEQARGEQVDARSDVYAAGCVLYELITGEPPFTGDSPVAVAYQHVREDPR
Streptomyces sp	AVIGIAQILSPEQARGESVDARSDVIAAGCVLIELIIGEPPPIGDSPVAVAIQHVREDPN AVIGTAQILSPEQARGESVDARSDVIAAGCVLYELITGEPPFTGDSPVAVAIQHVREDPN
<u>-</u>	**************************************
S.erythraea	KPSDVNQQVPASLDAVVLKALSKNPANRYQSAAEMRADLVRVLSGQRPKAPMIMSEEERT
S.spinosa	$\tt KPSDVNPTTPASLDAVVLKALSKNPANRYQSAAEMRADLVRVLSGQRPKAPMIMSEDERT$
S.marina	PPSAVNPAVSPELDAVVLKALSKGTANRYQSAAEMRSDLVRTLSGQRPAAPMVMSDDERT
A.orientalis	PPSSVNPAVAPELDAVVLKALAKGPANRYQSSAEMRSDLVRTLSGQRPAAPMVMSEDERT
streptomyces_sp.	** ** ************************************
S.erythraea	SMIAPAPATEVMAPGGRHRSVEPAVEDDLDAEQQRKRRKNWLIALVTLICVAVFALVA
S.spinosa	AMLSQASATEMLPP-GRHRSVDRE-PDEADVERERKKRKHRTIALVTTACVIVFALVA
S.marina	QVLGAGGQQGDPFDDYDPNGYDDEEADRRRRKRGLLI-ALL-TLLGVALVVFVM
A.orientalis	QVMDSDRRVPPRYDQYEEDDED-PAAKKKRRAWLIAGLVVSLAAIVLLIM
streptomyces_sp.	CVMMADRRQPQAIDEIADEPEEDPRARRRRIIFGLIAALLVAGVVLLIF
S.erythraea	WVANALLSGPSGDDKIAVPQLEGMTKSQALSELTAGNWLWQEQIPCP
S.spinosa	WLATWIFNSSPKTEVPPNFVSMTRASAQAEADARGWKLAWCVSP
S.marina	WLAGAFSSEASLATVPDVRDKTVEQAKRELRAAGFSSFAEEKV-VCRDDVSGEPA
A.OFIENLALIS Streptomyces sp	WLMGAFQGAGAESKAVPKVVGQSEVSAKDTLKGAGFTSLETKKI-TCTGE-SVNGQPS WLMGAFRDKAENAOTPOVTNHOLVEAKASLOOAGFSSFAPNKEVVCGPEASNPGGLT
berebeewieeep_eb.	*: : *
S.erythraea	SSREDVGRVINQTPDPGVPIDKKQDRIRVCFGTGPEQVQIPDLRGMSMDQASAKLSEVGL
S.spinosa	SSVDNIDKVVSQKPAPGVAVAKETQKIELCSGTGPASVQVPDLSGLSIAEASQKLEEAGL
S.marina	CSPDQIGKVISTDPQATEQVP-LESQITLRVGTPPAKVAVPDLTGLSRDEAEQKLKQANL
A.orientalis	
screpcomyces_sp.	:*: * : * : *. * . *** * * :* * :* * :*
S.erythraea	MLGYNPKTREVDNDSQVDKILEWDPEGTVAKGTTINVVLGKKAEQRAVPDVRNMPYET
S.spinosa	KLGLTPSYEETSDPKQVDKIIDWDKKGQ-SVTQGTTISVTVGKAIPTVEIKDVRGMPYDT
S.marina	VLDQDIAEVEVEDPNQYGKVVEQDPKPDAKVEQGRTVKITVGVEPELVEVPDFTGESFDA
Streptomyces sp.	KLGNT-TSOPVDNPSDVGKVVSONPTANSOSPEGTPVDIVVGSGLTOREVPNTVGKDVAT
	*: *::.: :* ::* ::

S.erythraea	AERMLSYAGFQVQRSDRDSSEPAGIVVDQTPAADTKLKPGSKVTVYVSNGQQISMPPL
S.spinosa	AKAYLEGAGFKVSRQDRDSDQAPGTVLDQSPSGGSKARPNTEITLVVSNGQQITMPSL
S.marina	AKAGLEAAGFQVSRSDVDSDQPAGTVVNQRPNGGS-VAKGSTITLEVSNGAEQQIQMPDL
A.orientalis	AEAGLRTAGFTPQVTNVDSDQPKGTVIDQTPNGGK-LAVGSVVKLSVSNGNQETFDMPNL
Streptomyces sp.	AKQIIQNAGFKPQRVDQASDQPKDQVIEQQPNGGN-LPPNSPVKLIVSTGPQ-QIQMPDL
_	*: : *** . : *.: *::* * : :.: **.* : ** *
S.erythraea	TGLSPTDAKRQLQQLGWNGQLVEQKESTSDSKLDGKVMRSSPSGGDKISKNQTITIYVGE
S.spinosa	LGMSPSQAEDALRSRGWDGEINEVNQPTSDKSQDGKVVGSSPSSGQKLGKNQAVTLMVGN
S.marina	RGMTQDQALATLRDAGWSGSVKTKTEKVSDSDFVGRVTNTDPSPGSTITKSQTVTLYIGE
A.orientalis	KGMTEEQATRQLQQLGWNGTLDTQADKNGDKDLAGKVSKTNPQAGSKIAKNAPITLFIVE
Streptomyces_sp.	TGMTQDQATRQLQSLGWSGSIQTQSTSSGSGK-PNTVVKQNPQAGSQISPNQTIVLTIKE
	:: : *:. **.* : * .*. *. : : : : :
S.erythraea	YDSSPTTQPDDGFFPPFP
S.spinosa	YSNSNPTTSPPSNGSLFPPFR
S.marina	DEDGSTETSQSRPTFDLPGPGG
A.orientalis	SDETPT-SSSSRLFPPP
Streptomyces_sp.	DDGSGGSPTSSSTGGIFPPGGIRNNNGG
	. *

Priloga K: Poravnava aminokislinskih zaporedij transkripcijskega regulatorja iz družine LuxR (S. erythraea SACE_2890).

Supplement K: Alignment aminoacid sequences of LuxR family transcriptional regulator (S. erythraea SACE_2890).

S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	MSGRTIALAGVVSCLDRVAAGSPAAVVLEGAFGSGKT MLELLAQAGDGQQQSILIEGAAGMGHS MTDGIPTDAFECQRDRLTLVNREEEMASLHALVQDARAGSGGIALLEGVVGIGKS MVDRKTDSGLPGALVGRAAELAALTAHAEAAHGARSGLVVLSGPAGIGKT MVDRKIDSGLPGALVGRAAELAALTAHAEAAHDGRSGLVVLSGPAGIGKT : ::.* * *::
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	RALDLASEHAHRAGLTAVRLPTPS-SFRAGACSAVRDLW TLLRAAVNAAPEYGLRVLTARARAPEQHVEYGVARQLLDQAGVERDPESE VLLHKLVATLPTEGLHVLEARCDALERDFPFGVVRQLFEPLLATLDEPQLTRLLTGSART SLLRAFLDSDACRKMTVLHGACGEVVAGAGYGGVRALFGSLGLSAEDAQDSPLLRGSARR SLLRAFLDSDVCRKMTVLHGTCGEVVAGAGYSGVRALFGGLGLSAEDAQDSPLLRGSARR * :.:
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	AFGPFAGRDDEPFAPEAVARAVLAARRTVLLVDDLHRLDEESLRWL FACPFPGGARQPERTDLHPLVRVLADEAPVLLAIDNLQWMDQPSLQCL AAQALSGETLPGDVMLSSEDMSYAVLHGLYWFTCNLAAEAPLVIVVDDAHCADMASLRFL ALPALSPRPGEEGPPTAASVYPVLHGLYWLAANLMTQGPLVLVLDDVHWCDERSLRWI ALPALSPHPGEEGPPTAASVYPVLHGLYWLAANLMAQGPLVLVLDDVHWCDERSLRWI * : :::::::: * **::
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	GSVLDRLPDSSLGVVATAPRGEGERAGGPPAEVVAR-FSDRRALSYMDLAEVTELAEAQL GYLMARLPSVPMAIVATLARGEAPND-PVTVEVISS-FHHRVTLQPLTSDEAAALAADAL THLARRIEGLPILLVLSQRTGDEATDAALLGDIAGQPLCRVLRPGPLDCHGIGHLVKTVF DFLLRRADQLPLLVVLAQRSEAEPVAPAALADILAQPRSAVIRLDPLTDGEVAEMAHQVF DFLLRRADELPLLVVLAQRTEEEPVAPVTLADILAQPRSSVIRLDPLTDAEVAEMARQVF : * ::*: :: :: :: :: :::
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	GGPPPRGFAEECLHQTGGNPLLLNWLFGELRARAGNASGGRLARIEEIGLRELAEILANR GTPPKERTVQAALTATGGSPYLLDALFRHLRLDHQGPGGITPEVIAAQGPVEVADALLNR GREADDEFHEACLAITGGNPLLVHSLLSVLRLGGRPPTVDGLQYITAQDGAFFHEAVRAV AAPVARSFAKRAAAVCGGNPLTVTRLLRELRAKGVAPDETGIREIAEVGSYVVALSVRAL AAPVAHSFAGRAAAVCGGNPLTVTRLLRELRAKGVSPDESGLREIAEVGQYVVALSVRTL ** * : *: ** *
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	YGSRCSVATEVIEAVALLAPEASTELVAGYCGLAPSTLAEVTDRLEATGVLERSGAGH YERAWPGVAAAAEGTALLDEAATVPTIAQLLEADQLQTADAVEYLVRVGLLTYQNRTV LESQPESAAAAACALAVMGDDALPEVCARLAGLDDATHSAAMRALRSNGLVSEVDDGRRW FDARPDWVRDVATAIAVLGEEDAEHI-GALAGVPAARVAEAVEQLREAEVMAPDRA FDARPDWVRDVATAIAVLGEEDAEHI-GALAGVPAARVAEAVELLRGAEVMAPDRA *::
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	APAAPVIHRAVLAGMSPDRLEAAHVRAAALLHGEGAPAELVASHLLQVRRAEMPAWFCDV RFVQPLVRESVLARMLPSRRNTLHIRAAHILYERGAPYEQIAGQILKSQTDSAQHWTCTV SFNHGLIREVIVADLPPEQLAQAHRRAARLLLDAGARVEQVAGHLLLTTLPATEDWAVTV DLAHDVVRSAMLEAAGAERLAELRARAALLLSDAGRPAEEVANQVLLV-PGTPQPWMGWV DLAHDVVRSAVLEAAGEEPLAELRARAALLLSDAGRPAEEVANQVLLV-PGTPQPWMGWV ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	MHEHARGLVARGEPEQARRYLLRAVDRCTGS-HRAEIFRELATIALRSDPPTARRYLHEA LSEAAREAVDRGAFQPARDYLTRGLRECEGP-CQGKLLRVLGQVELATDPATAARFLRKA LREAAREASFRGTPALAVDLLRRCLPADGQPPEDTSVLVELGLAEAGVDPQASVRHLQAA LREAAAQAEHRGAPEAAARYLYRVLEAEPDSLSAHVPLAKALAEINPAEAIRLLKRA LREAAVQAEHRGAPEAAARYLYRVLEAEPDSLSAHVPLAKALAEINPAEAIRLLRRA : * * * * * * * * : . *. : * : * *: *
S.erythraea Streptomyces_sp. S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger	LRLQADPGIRVRLRIMLANAMVMAGESESAVRTLRAGLDEIGGTDPRGASRLR LSLSRDINERTDIRLSLADALHLLDRRQEARKVLEEGMAEGRETDPAVVPRLR LVHVHEPSLRFRVLSSLASGLVRSGQSLPAVRLLAEQAPSVHDADLQRLL LTLATDIRTKAPIAVQFGLTCLTVQQSPAAVRVLSEVLDELEAELGPDPDPRDHELRTLV LTLATDVRTKAPIAVQFGLTCLTVQQSPAAVRVLSEVLDELEAELGPDPDPRDHELRTLV * : : : : . * : * * * * *

OELRLTCLWG-----DLGEVAGPEANPGPEESGHRSKLVANALRCYWAGEDREOAAAD S.erythraea Streptomyces_sp. GEQLLMGGPGYHTTKVDWLGNVVPFQRASGTT-LDRKILLDLTSMRTTCRGEAREEAVQQ EGQRLMASAEDLQSLAVTLRE-YPFDISRPGKTPGERALIAAGAGLCSVRADRAQESAAA S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger OSTLLISGSDEKATIHTVRER-FTRIPEPAGDTPAOROMLAMMTVLSAMEGRSVRRAVGO QSALLISGSDEKATIHTVRER-FARIPEPSGDTPAQRQMLAMMTVLSAMEGRSVRRTVEQ * .: : : S.erythraea AEEALETGP--DDEHPASLL--LPALVLARSGAFAAASTHVHRMLLEATAVDASAIVVHA AKRSLRSPCTGLNERLASRT--VPVQVLAAADELDAALAECDALAKQSAETGSRILGALT Streptomyces_sp. S.auratus ARRVLESSVPGVDSPFFLTTAATALLYAGLPDEADAAYQRVL---DATRQSQRLLLYGLC S.rapamycinicus ARRALSSA-DRLDNWSLLF----SAFTLGLADEIEEAMETLEHALRHGQDNAAVWSYVIT S.violaceusniger AHRALSSP-DRLDNWSLLF----SAFTLGLADEVEGSMEALDHALRQGQDNAAVWSYVIT *.. * : :. • : ${\tt GSVLAEILL} {\tt HAGDLPACAQMADSAVEATSRRSAGEHPMY-LGTAVASAVAVALATGDHSG}$ S.erythraea Streptomyces_sp. YSVRADVHYRSGDVPRTLADAERALELTPLA-SSEYWLC-TGQAMAARICGLLETGEYEE QALRAEALYRLGALSESLAATRSALNVVPS----SHWGRTLALPVATQVHALIDSGDLPG S.auratus LSYRALLLHGVGAIPDALADAQTAVEIIGE----ERWSANVTMPQTALATILIDRGEPER S.rapamycinicus S.violaceusniger LSYRAMLLHGFGAIPDALADAQTAVEIIGE----ERWSGNVTMPQTALATILIDRGEPER . :: : * * : : *:: : AWRCLDGTGLSAEVPRWSPYNSVLLQRGRLHAAQGELDAALADLRECGRRMTAANVHNPA S.ervthraea Streptomyces sp. AHRLLAEAGLADKLPERNSFGPLLFQRARLHMAEGDTERSLADLLECGERLESAGTFNPA ADAAA-AQPFPSTSMDTWQWNEFLCARGRLRLAHQDPKGALTDLLEAGRRQREWTRTSPA S.auratus S.rapamycinicus S.rapamycinicus S.violaceusniger AEELLAAVTRPNLDGFVMEYHSYLMARARARWALGDSATALRLLLDCGASLEESGFANPV AEELLAAVTRPNLDGFVMEYHWYLMARARARWALGDGATALRLLLDCGASLEDSGFANPA : * *.* : * : :* * :.* AGAWRSESALVHARMGHHDRAMSLVRVELEQARRWGAPAPIGQALRVMGLVSRDEARLAH S.erythraea Streptomyces_sp. VLAWRSEAALACDALGDTREARRLADVEIARARRWGAPHALGRALRAAGLVAQGRKGEGL S.auratus VSSWWSWAGRAHLALGALSPARELAEEAVERAREGRLTDALGAGLRLOATTETGPRKLGM S.rapamycinicus FLPWWTEAACLLAAEKRADEARDLVEHGAELARRWSTPRAFGLAALARGVTTPGEEGIAQ S.violaceusniger ${\tt FLPWWTEAACVLAAEKRADEARDLVEHGAELARRWSTPRAFGLAALARGVTTPGEEGIAH}$ * *. **. :* . * : :. . . LTEAVAVLRDSGARLSYAQALFDLGVTYRKLHRPNEARPRLRAALAHARHCGAQVLVHRA S.erythraea Streptomyces_sp.LRDAVRVLERSPARLDLARALADLGALARRSNRLRDAREHLRRAQALCETCGATELARTVS.auratusLEEALSALDGSPARLELAHTLVDYGSALHACGHTEAARETLRRGLDLAYSLSAARLRVRAS.rapamycinicusLTEAVEHFSGSPARSEHARAEFLLGGALLDAGRPREARERLRSAVDLAQGCGALALARDA LAEAVEHLSGSPARAEHARAEFLLGGALLDIGRPRDARERLRSAVDLAQGCGALALAKDA S.violaceusniger * :*: : * ** . *:: : . ** ** . . SEQLAACRVRPQRTTALGVEALTPAERRVAVLAAEGRTNRQIAADLYVTRRTVELHLSRV S.ervthraea REELMLSGARPRRPTEVGIDALTPMERKVAMLAVAKQTNREIAANLFVAQRTVELHLSQV Streptomyces_sp. S.auratus NDALLATGARPRRVTSSGVESLTPSEAQVARMAAVGGTNREIAEELFVTQRTVEQHLTSV S.auratus S.rapamycinicus S.violaceusniger RNRLVAAGGRMREITASPVDLLTGTERKVAQMASRGAGNREIAESLFVTVRTVETHLTSV RNRLVAAGGRMREITASPVDLLTGTERKVAQMASRGAGNREIAESLFVTVRTVETHLTSV * :. * :: ** * :** :* **:** .*:*: **** **: : * S.erythraea YQKLLIPGRPALGRAMSSS-----Streptomyces_sp. YRKLSIPGRSGLAEYFGHLTEARADGRRPRAENLPDGGSGVRHQSALRADCVS YRKLGVSGRRGLGSFFDPERAAK-----S.auratus YRKLSVSQRGELASVLNTPSLPDPQAP--A---WVFASRGRR------S.rapamycinicus S.violaceusniger YRKLSVGQRGELASVLNTPSLPDPQAP--A---WVFASRGRR------

*:** : * *. :

Priloga L: Poravnava aminokislinskih zaporedij proteina z vezavno domeno za ciklične nukleotide (S. erythraea SACE_3978).

Supplement L: Alignment aminoacid sequences of cyclic nucleotide-binding domain-containing protein (S. erythraea SACE_3978).

A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	TKTATPEADRRLSLGPAARNLATTTKTRPQMQSITPRWLLKMLPWVEAT MTVTEPENAVDGDASLSLGTAAARKLATTTKTAPQMQGISPRWLLRMLPWVQVT MTDSIESNLDVESGQPQLSLSTAAARNLATTTKSAPQMQEITSRWLLKMLPWVQVK MTTSVESGEQPLSLGTAAARNLATTTKSVPQMQAISSRWLLRVLPWVQVS MTTSADPTSGPGATPDTDQARTSLATAAARNLATTTKTVPQMQGISSRWLLRVLPWTQVS : **. ****:***** : **** *: **** : ****::****:
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	GGTFRVNRRLTYAIGDGRVSFTNVGTEVRVVPQELSELALLRGFDDEDTLTALADRFVQH AGTYRVNRRLTFALGDGRVEFTSTGTEVRVIPQKLRELPLLRGFEDDSALGVLADRFVQR GSTYRVNRRLTYTVGDGRLSFSNTGAVVQVIPQALGELPLLRGFDDTEVLLALAGRFVQQ AGTYRVNRRLTYTVGDGRVEFISTGSQVRVIPPELGELPTLRGFGDTAVLESLADGCVQR GGTYRVNRRLTHTLGDGRVEFTSTGSDVRVIPAELRELPPLRDFDDPAALEALAGQFVQE *:********.:************************
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	EYQPGETIVSHGAPLEEVVLVAHGKIAKVVPGEYGAEASVGSMADGDHFGDEMLAGIDRN EYETGDVIVTAGSPADRLHLLAHGKVARIGTTEYGDDSTLGVLADGDHFGADVLGGRAGS EFAPGDIIVQSGQPANQLFLIAHGKVNKIGVGKYDEPTVLGMLADGDYFGDRTLVESQSN EYAPGDVLVEAGRPADQVFLIAHGKVRQVAPGAYDEGTTLAVLADGEYFGDAVLTGPEHA EHAPGDVLVEQGRPADRVVLVAHGKLNRIGTGKYGDETVLGVLADGDHLGETALLSPDAV *. *: :* * * ::: *:****: :: * ::: ****::* *
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	WPFTAKAVTPVIVLTLRAEDFADLNGRSEAMRRHVQDMLSHKGKPQNAKGEAEIGMSSGHWDHSVKALTRCTVLTVDEAAISELTERFHDLRAHIEHIRDGTPRPRNKHGEAAIDIASGHWQFTIQALTQCTVLALPQQVFRELLNQSQALQAHVDRFRTRPQVPQNKYGEVSIEVASGHWEFSVRAVTRTTVLTLPRRVVQEAADRSDALRDHLQGLSERSTPAQNRRGEADIAVASGHWEHTVRAVTRVTVLTLPRTAYEQLADRSPGLRDHLERYRTAQIPPQNKHGEAAIDVASGH* .: :*:** .: :*:*
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	DGEPLLPGTFVDYEISPREYDLAVAQTALRVHTRVTDLYNGPMDQFEEQLRLTISALRER SGEPALPGTFVDYELEPREYELGVAQTILRVHSRVADLYSKPMDQVEQQLRLTVEALRER VGETELPGTFVDYELSPREYQLSVAQTVLRVQTRVADLYNEPMNQTEQQLRLTIEALRER AGEPVLPGTFVDYELAPREYELSVAQTVLRVHTRVADLYNEPMNQVEQQLRLTIEALRER TGEPALPGTFVNYEVAPREYELSVAQTVLKIHTRVADLYNNPMNQLDQQLRLTIEALRER ** *****:**: ****:**** *::::**********
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	QEYDLINNREFGLLHNADLKSRFQTRSGPPTPDDMDELVSRRRKTKFFLAHPRAIAAFGR QENELVNNPDFGLLHNADLKQRIHTRTGPPTPDDMDELLSRRRKTEFFLAHPRAIAAFGR QEYELINNREFGLLHNADLKQRLYTRNGAPTPDDLDELLTRRRKSKFFLAHPRTIAAFSR QEHELVNNREFGLLHNADLSQRIHTRSGPPTPDDLDELLARRRKTQYLLAHPRTIAAFGR QEHEMVNNREFGLLHNADLKQRIHTRSGPPTPDDLDELIARRRKTQYLLAHPRTIAAIGR ** :::** :**********: *****:***::****::****:
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	ECTRRALYPEGTTVDGKVVAAWRGVPLLPCDKIPITDRGTSSILAMRTGVEDNGVIGLHQ QCSKRGLSPQSRTVEGTSAITWRGVPVLPCDKIPISEYGTTSILAMRTGEESQGVVGLHQ ECNRLGIYPQNIDLDGSMVLTWRGVPILPCNKIPITKTQTSSILVLRTGEEDQGVIGLHQ ECSDRGLYPQGIEVAGVAVRAWRGVPLLPCNKIPVSESGTSSILAMRTGEESQGVIGLHQ EWNARGIYPTTAEIGGTPVRAWRGIPLLPCNKIPVNPDQTSSIIAMRVGEENQGVVGLHQ :: * : * .: ***:*******************
A.orientalis S.erythraea C.stagnale S.violaceusniger S.rimosus	TGLPDEYEPGLNVRFDGISDQAVASYLVSTYYSAAVLVPDALGVLENVEVAR TGIPDEYEPSLNVRFMGIDEQAIIRYLVSVYFSAAVLVPDALGVLEHVEITR TGIPDEYQPSLSVRFMGISEKAIISYLVTAYYSTAVLVPDALGILENVEIGR TGIPDEYEPSLNVRFMGISEQAVTSYLVSAYYSAAILVPDAVGVLEDVEIGR TGIPDEYQPGLSVRFMGINDQAVINYLVSAYYSAAVLVPDALGVLEDVEIGH **:****:*.*.*** **.::*: ***::*:*****

Priloga M: Vpliv različnih dodatkov v različnih koncentracijah na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva NRRL 23338. **NRRL:** kontrola brez dodatka, **a:** izolevcin 260 mg/L, **b:** 2 x izolevcin 260 mg/L, **c:** valin 230 mg/L, **d:** 2 x valin 230 mg/L, **e:** vinil propionat 1000 mg/L, **f:** 2 x vinil propionat 1000 mg/L, **g:** CoCl2 7.5 mg/L, **h:** 2 x CoCl2 7.5 mg/L, **i:** MnCl2 12 mg/L, **j:** 2 x MnCl2 12 mg/L, **k:** MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **l:** 2 x MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **m:** K2SO4 12 mg/L, **n:** 2 x K2SO4 12 mg/L, **o:** 2 x zmes mineralov 180 µL/5mL **p:** 2 x K2HPO4 860 mg/L, **r:** gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika.

Supplement M: Influence of different feedings on erythromycin production during cultivation of NRRL 23338 strain. NRRL: control without feeding, **a**: isoleucine 260 mg/L, **b**: 2 x isoleucine 260 mg/L, **c**: valine 230 mg/L, **d**: 2 x valine 230 mg/L, **e**: vinyl propionate 1000 mg/L, **f**: 2 x vinyl propionate 1000 mg/L, **g**: CoCl2 7.5 mg/L, **h**: 2 x CoCl2 7.5 mg/L, **i**: MnCl2 12 mg/L, **j**: 2 x MnCl2 12 mg/L, **k**: MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **l**: 2 x MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **m**: K2SO4 12 mg/L, **n**: 2 x K2SO4 12 mg/L, **o**: 2 x minerals mix 180 µL/5mL **p**: 2 x K2HPO4 860 mg/L, **r**: medium with oil as main carbon sourse.



Priloga N: Vpliv različnih dodatkov v različnih koncentracijah na produkcijo eritromicina pri kultivaciji seva ABE135. **135**: kontrola brez dodatka, **A**: izolevcin 260 mg/L, **B**: 2 x izolevcin 260 mg/L, **C**: valin 230 mg/L, **D**: 2 x valin 230 mg/L, **E**: vinil propionat 1000 mg/L, **F**: 2 x vinil propionat 1000 mg/L, **G**: CoCl2 7.5 mg/L, **H**: 2 x CoCl2 7.5 mg/L, **I**: MnCl2 12 mg/L, **J**: 2 x MnCl2 12 mg/L, **K**: MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **L**: 2 x MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **M**: K2SO4 12 mg/L, **N**: 2 x K2SO4 12 mg/L, **O**: 2 x zmes mineralov 180 µL/5mL **P**: 2 x K2HPO4 860 mg/L, **R**: gojišče z oljem kot glavnim virom ogljika.

Supplement N: Influence of different feedings on erythromycin production during cultivation of ABE135 strain. **135**: control without feeding, **A**: isoleucine 260 mg/L, **B**: **2** x isoleucine 260 mg/L, **C**: valine 230 mg/L, **D**: 2 x valine 230 mg/L, **E**: vinyl propionate 1000 mg/L, **F**: 2 x vinyl propionate 1000 mg/L, **G**: CoCl2 7.5 mg/L, **H**: 2 x CoCl2 7.5 mg/L, **I**: MnCl2 12 mg/L, **J**: 2 x MnCl2 12 mg/L, **K**: MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **L**: 2 x MgSO4 * 7 H2O 1200 mg/L, **M**: K2SO4 12 mg/L, **N**: 2 x K2SO4 12 mg/L, **O**: 2 x minerals mix 180 μL/5mL **P**: 2 x K2HPO4 860 mg/L, **R**: medium with oil as main carbon sourse.

