

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tadeja LUKEŽIČ

**ZAKLJUČNE STOPNJE V BIOSINTEZI
TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tadeja LUKEŽIČ

**ZAKLJUČNE STOPNJE V BIOSINTEZI TETRACIKLINSKIH
ANTIBIOTIKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**LATE STAGES IN THE BIOSYNTHESIS OF TETRACYCLINE
ANTIBIOTICS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

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

Doktorska disertacija je rezultat raziskovalnega dela, ki je bilo opravljeno v podjetju Acies Bio, d.o.o, Ljubljana.

Mentor: prof. dr. Hrvoje Petković

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
Acies Bio d.o.o., Ljubljana

Članica: prof. dr. Dušica VUJAKLIJA
Inštitut Ruđer Bošković, Zagreb

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tadeja Lukežič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 604.4:615.33(043.3)=163.6
KG *Actinomycetales/ Pseudonocardiaceae/ Amycolatopsis sulphurea/ aromatski poliketidi/ tetraciklini/ kelokardin/ oksitetraciklin/ klortetraciklin/ biosinteza/ post-PKS encimi/ pozne stopnje/ razvoj orodij/ protimikrobnne snovi/ sekundarni metaboliti*
AV LUKEŽIČ, Tadeja, univ. dipl. mikrobiol.
SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija
LI 2014
IN ZAKLJUČNE STOPNJE V BIOSINTEZI TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKOV
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 148 str., 7 pregl., 47 sl., 6 pril., 153 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Tetraciklinski antibiotiki so pomembna skupina protibakterijskih učinkovin, ki se jih uporablja predvsem v medicini. Klasični tetraciklini delujejo bakteriostatično: z vezavo na 30S podenoto ribosoma inhibirajo proteinsko sintezo. Nasprotno pa nenavadni tetraciklini, kamor spada kelokardin, delujejo bakteriolitično, verjetno preko interakcije s citoplazemsko membrano. Biosinteza tetraciklinov poteka s poliketidnimi sintazami tipa II, ki katalizirajo iterativno dekarboksilativno kondenzacijo malonil-CoA podaljševalnih enot z malonamilno začetno enoto. Encimi vpleteni v pozne stopnje biosinteze, oziroma t.i. post-PKS encimi, lahko na osnovni tetraciklinski skelet dodajo različne kemijske skupine, kot so npr. hidroksilna, metilna in amino skupina. Predvidevamo, da biosinteza močne protibakterijske učinkovine, kelokardina, poteka na enak način, le da je začetna enota v tem primeru acetat. Kelokardin proizvaja aktinomiceta *Amycolatopsis sulphurea*, za katero pa vse do sedaj ni bilo razvitih orodij za gensko manipulacijo. V sklopu te doktorske naloge nam je uspelo postaviti metodi za vnos in prekinjanje genov v *A. sulphurea* z uporabo transformacije micelija. Tako smo omogočili pristope biosinteznega inženirstva za produkcijo novih tetraciklinskih struktur na osnovi kelokardinske matrice. Z delečijo in kasnejšo komplementacijo genov minimalnega PKS smo potrdili, da smo zares uspeli klonirati gensko skupino za biosintezo kelokardina. S heterolognim izražanjem genov, udeleženih v biosintezi začetne enote in iniciaciji biosinteze oksitetraciklina, v *A. sulphurea*, smo konstruirali nov kelokardinski analog, ki vsebuje karboksiamidno začetno enoto, ga izolirali, njegovo strukturo potrdili z analizo NMR in na koncu še testirali protimikrobnno delovanje. V *A. sulphurea*, producentu kelokardina, smo uspešno izrazili dva heterologna gena, udeležena v pozne stopnje biosinteze: gena za oksigenazo OxyS, udeleženo v biosintezo oksitetraciklina, in gen za halogenazo Chl, udeleženo v biosintezo klortetraciklina. Poleg tega smo v *A. sulphurea* prekinili gen za metiltransferazo *chdMII*, s čimer smo proizvedli še četrti kelokardinski analog - demetylkelokardin, ki smo ga tudi izolirali in ovrednotili njegovo protimikrobnou aktivnost. Dosegli smo poglaviten namen doktorske naloge - poglobili smo razumevanje biosinteznih poti tetraciklinskih antibiotikov in bolj podrobno preučili delovanje encimov poznih stopenj v biosintezi tetraciklinskih antibiotikov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 604.4:615.33(043.3)=163.6
CX *Actinomycetales/ Pseudonocardiaceae/ Amycolatopsis sulphurea/ aromatic polyketides/ tetracyclines/ chelocardin/ oxytetracycline/ chlortetracycline/ biosynthesis/ post-PKS enzymes/ late stages/ tool development/ antimicrobial agents/ secondary metabolites*
AU LUKEŽIČ, Tadeja
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Study Programme in Biosciences, Field: Biotechnology
PY 2014
TI LATE STAGES IN THE BIOSYNTHESIS OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 148 p., 7 tab., 47 fig., 6 ann., 153 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Tetracycline antibiotics are an important group of antibacterial agents, mainly used in medicine as antibacterials. Classical tetracyclines are bacteriostatic: they inhibit protein synthesis by binding to the 30S subunit of the ribosome. In contrast, atypical tetracyclines, including chelocardin, act bacteriolytic, presumably they interact with the cytoplasmic membrane, although no firm proofs are available to date. Tetracycline biosynthesis is carried out by type II polyketide synthases, which catalyze the iterative decarboxylative condensation of malonyl-CoA extender units with malonamyl starter unit. Enzymes, which are involved in the late stages of biosynthesis, i.e. post-PKS enzymes, may add a variety of functional groups, such as hydroxyl, methyl and amino group, to the basic tetracycline skeleton. We assume that the biosynthesis of a potent antibiotic, chelocardin, takes place in the same way, with exception of the choice of starter unit; presumably activated acetate is selected. Chelocardin is produced by an actinomycete *Amycolatopsis sulphurea*, for which until now no tools for genetic manipulation have been developed. Within the frame of this doctoral dissertation a method for introduction and inactivation of genes in *A. sulphurea*, using the transformation procedure of mycelium, has been set up. This way we have enabled biosynthetic engineering approaches for the production of novel tetracycline structures, based on the chelocardin backbone. With the deletion and subsequent complementation of minimal PKS genes, we have confirmed that we have cloned a gene cluster encoding the biosynthesis of chelocardin. By heterologous expression of selected genes, involved in the biosynthesis of the starter unit and in the initiation of biosynthesis of oxytetracycline, in *A. sulphurea*, a new chelocardin analogue was constructed, which contains a carboxamido starter unit. The analogue has been isolated and its structure confirmed by NMR analysis, and finally tested for antimicrobial activity. In *A. sulphurea*, the producer of chelocardin, two heterologous genes, involved into the late stages of biosynthesis, have been successfully expressed: a gene for oxygenase OxyS, and a gene for halogenase Chl, involved in the biosynthesis of oxytetracycline and chlortetracycline from *Streptomyces rimosus* and *Streptomyces aureofaciens*, respectively. In addition, we inactivated the *chdMII* gene for methyltransferase in *A. sulphurea*, which has led to the generation of a fourth chelocardin analogue – demethylchelocardin, which has also been isolated and evaluated for its antimicrobial activity. Thus we have brought further understanding of biosynthetic pathways, particularly we brought further understanding of enzymes, involved in the late stages of the biosynthesis of tetracycline antibiotics.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII

1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 AKTINOMICETE	4
2.1.1 Morfologija aktinomicet.....	4
2.1.2 Rod <i>Amycolatopsis</i>.....	6
2.2 SEKUNDARNI METABOLITI	7
2.2.1 Biosinteza poliketidov.....	8
2.2.2 Gradbene enote za biosintezo poliketidov	13
2.2.3 Biosinteza aromatskih poliketidov	13
2.3 MODIFIKACIJE AROMATSKIH POLIKETIDOV V POZNIH STOPNJAH BIOSINTEZE	15
2.3.1 Metiltransferaze	15
2.3.2 Oksigenaze	16
2.3.3 Glikoziltransferaze.....	17
2.3.4 Halogenaze.....	17
2.3.5 Transaminaze	18
2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE AROMATSKIH POLIKETIDOV	18
2.5 TETRACIKLINI.....	20
2.5.1 Način delovanja tetraciklinov	21
2.5.2 Povezava med strukturo in aktivnostjo tetraciklinov.....	22
2.5.3 Odpornost proti tetraciklinom.....	23
2.5.4 Ostali ne-protibakterijski učinki tetraciklinov.....	24
2.5.5 Naravni tetraciklini.....	25
2.6 BIOSINTEZA TETRACIKLINOV	26
2.6.1 Biosinteza CTC.....	26
2.6.2 Biosinteza OTC	27
2.7 NENAVADNI TETRACIKLINI.....	29
2.7.1 Način delovanja nenavadnih tetraciklinov	30

2.7.2 Povezava med strukturo in aktivnostjo nenavadnih tetraciklinov.....	31
2.8 KELOKARDIN	32
2.8.1 Biosinteza CHD	34
2.9 ORODJA IN METODE ZA GENSKO MANIPULACIJO AKTINOMICET.....	36
2.9.1 Orodja in metode za gensko manipulacijo vrst <i>Amycolatopsis</i> spp.....	37
3 MATERIAL IN METODE.....	38
3.1 KEMIKALIJE.....	38
3.1.1 Raztopine in pufri	38
3.1.2 Antibiotiki in indikatorji	40
3.2 SEVI IN PLAZMIDI	41
3.2.1 Sevi mikroorganizmov	41
3.2.2 Bakterijski vektorji.....	42
3.3 RASTNI POGOJI ZA GOJENJE SEVOV	46
3.3.1 Gojišča za <i>E. coli</i> in <i>B. subtilis</i>	46
3.3.2 Gojišča za aktinomicete	46
3.3.3 Gojišča za kvasovke	48
3.3.4 Shranjevanje sevov <i>E. coli</i> in aktinomicet	48
3.4 VNOS PLAZMIDNE DNA V <i>E. coli</i> IN AKTINOMICETE.....	48
3.4.1 Priprava elektrokompetentnih celic <i>E. coli</i> DH10β in <i>E. coli</i> ET12567	48
3.4.2 Elektroporacija sevov <i>E. coli</i> DH10β in <i>E. coli</i> ET12567	49
3.4.3 Transformacija <i>A. sulphurea</i>.....	49
3.4.4 Priprava elektrokompetentnih celic <i>S. rimosus</i>.....	50
3.4.5 Elektroporacija <i>S. rimosus</i>	50
3.5 BIOTEST ZA VREDNOTENJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	50
3.6 MOLEKULARNE METODE	51
3.6.1 Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i>	51
3.6.2 Izolacija genomske DNA iz aktinomicet.....	51
3.6.3 Pomnoževanje DNA <i>in vitro</i> (reakcija PCR).....	51
3.6.4 Fosforilacija 5'-koncev DNA	52
3.6.5 Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami.....	52
3.6.6 Defosforilacija linearnih DNA fragmentov	53
3.6.7 Ligacija fragmentov DNA	53
3.6.8 Ustvarjanje topih koncev DNA z veliko podenoto polimeraze I (fragment Klenow)	53
3.6.9 Agarozna gelska elektroforeza	53
3.6.10 Izolacija DNA iz agarognega gela in čiščenje DNA po encimskih reakcijah	54
3.6.11 Prenos DNA iz gela na membrano po Southernu.....	54
3.6.12 Hibridizacija po Southernu.....	54
3.7 METODA ZA VREDNOTENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI RppA	55

3.8	ANALITSKE METODE	56
3.8.1	Določanje vsebnosti CHD in kelokardinskih analogov	56
3.8.2	Določanje vsebnosti OTC in oksitetraciklinskih analogov.....	56
3.8.3	HPLC analiza CHD in kelokardinskih analogov	56
3.8.4	LC-MS analiza CHD in kelokardinskih analogov	57
3.8.5	LC-MS analiza OTC in oksitetraciklinskih analogov	58
3.8.6	NMR in HRMS analiza CHD in CDCHD.....	58
3.9	IZOLACIJA CHD IN KELOKARDINSKIH ANALOGOV.....	59
4	REZULTATI.....	60
4.1	PREVERJANJE DELOVANJA ANTIBIOTSKIH MARKERJEV V <i>A. sulphurea</i>	60
4.2	RAZVOJ METODE ZA TRANSFORMACIJO <i>A. sulphurea</i>	61
4.3	VREDNOTENJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV V <i>A. sulphurea</i>	62
4.3.1	Konstrukcija vektorjev s poročevalskim genom <i>rppA</i>	62
4.3.2	Vrednotenje izražanja poročevalskega gena <i>rrpA</i>	63
4.4	PREKINITEV GENOV MINIMALNEGA PKS	65
4.4.1	Konstrukcija vektorjev za prekinitev minimalnega PKS	65
4.4.2	Vrednotenje produkcije CHD pri transformantah <i>A. sulphurea</i> s prekinjenim minimalnim PKS	67
4.5	KOMPLEMENTACIJA SEVOV S PREKINJENIM MINIMALNIM PKS	69
4.5.1	Konstrukcija vektorjev za komplementacijo prekinitve minimalnega PKS.....	69
4.5.2	Vrednotenje produkcije CHD pri komplementiranih sevih <i>A. sulphurea</i> ...	70
4.6	HETEROLOGNO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV IZ BIOSINTEZE DRUGIH TETRACIKLINOV V <i>A. sulphurea</i>	75
4.6.1	Konstrukcija vektorjev za heterologno izražanje genov poznih stopenj biosinteze OTC in CTC iz sevov <i>S. rimosus</i> in <i>S. aureofaciens</i>	76
4.6.2	Konstrukcija vektorjev za heterologno izražanje genov, ki predvidoma sodelujejo pri iniciaciji biosinteze nastajajoče poliketidne verige.....	78
4.6.3	Biosinteza in določanje vsebnosti novih kelokardinskih analogov z metodama HPLC in LC-MS	79
4.6.4	Optimizacija gojišč za produkcijo kelokardinskih analogov	85
4.7	PREKOMERNO IZRAŽANJE GENA ZA VERJETNO GLIKOZILTRANSFERAZO V <i>A. sulphurea</i> POD KONTROLU <i>PactI</i>	86
4.7.1	Konstrukcija vektorja za prekomerno izražanje gena za glikoziltransferazo.....	86
4.7.2	Poskus identifikacije glikoziliranih kelokardinskih analogov z metodo HPLC	87
4.8	HETEROLOGNO IZRAŽANJE GENA <i>chdMII</i> IZ <i>A. sulphurea</i> , KI VERJETNO KODIRA METILTRANSFERAZO, V <i>S. rimosus</i>	88

4.8.1 Konstrukcija vektorja za heterologno izražanje gena <i>chdMII</i> v <i>S. rimosus</i>	88
4.8.2 Poskus identifikacije metiloksitetraciklina z metodo LC-MS	89
4.9 PREKINITEV IZBRANIH GENOV, VPLETENIH V POZNE STOPNJE BIOSINTEZNE POTI CHD V <i>A. sulphurea</i>	90
4.9.1 Konstrukcija vektorjev za prekinitev genov <i>chdMII</i> in <i>chdN</i>, ki kodirata verjetno metiltransferazo in aminotransferazo.....	90
4.9.2 Biosinteza kelokardinskih analogov z rekombinantnimi sevi s prekinjenim genom <i>chdMII</i> oziroma <i>chdN</i>.....	92
4.10 PREKINITEV GENA <i>oxyP</i>, KI KODIRA VERJETNO AT/TIOESTERAZO V <i>S. rimosus</i>	95
4.10.1 Konstrukcija vektorja za prekinitev gena <i>oxyP</i> iz <i>S. rimosus</i>, ki kodira verjetno AT	96
4.10.2 Vpliv inaktivacije <i>oxyP</i> na produkcijo OTC in ADOTC.....	96
4.11 IZOLACIJA CHD IN NOVIH KELOKARDINSKIH ANALOGOV	98
4.12 DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI CHD IN KELOKARDINSKIH ANALOGOV	98
5 RAZPRAVA	101
5.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA	101
5.2 CILJI NALOGE	102
5.3 POSTAVITEV UČINKOVITEGA SISTEMA ZA GENSKO MANIPULACIJO <i>A. sulphurea</i>	103
5.4 POTRDITEV, DA GENSKA SKUPINA <i>chd</i> KODIRA BIOSINTEZO CHD	104
5.5 BIOSINTEZA TETRACIKLINOV	105
5.5.1 Iniciacijska faza.....	105
5.5.2 Gradnja osnovnega skeleta	110
5.5.3 Pozne stopnje biosinteze	110
5.5.4 Nenavadni geni, ki ne spadajo v biosintezo CHD	114
5.6 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST NOVIH KELOKARDINSKIH ANALOGOV	115
5.7 ARHITEKTURA GENSKE SKUPINE ZA BIOSINTEZO CHD	116
5.8 NADALJNJI RAZVOJ TETRACIKLINSKIH ANALOGOV NA OSNOVI KELOKARDINSKE MATRICE	117
6 SKLEPI.....	119
6.1 POTRDITEV OZIROMA ZAVRNITEV HIPOTEZ	120
7 POVZETEK (SUMMARY)	122
7.1 POVZETEK	122
7.2 SUMMARY	123
8 VIRI.....	126
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Antibiotiki in indikatorji	40
Preglednica 2: Bakterijski in kvasni sevi.....	41
Preglednica 3: Bakterijski vektorji, ki smo jih uporabili v tej študiji.....	42
Preglednica 4: Bakterijski vektorji, ki smo jih konstruirali v tej študiji.....	43
Preglednica 5: Primerne koncentracije antibiotikov, ki inhibirajo rast <i>A. sulphurea</i> , za selekциjo transformant <i>A. sulphurea</i> v različnih gojiščih.....	61
Preglednica 6: HRMS mase $[M+H]^+$ CHD in novih kelokardinskih analogov.....	81
Preglednica 7: MIC OTC, CHD in kelokardinskih analogov z uporabo testnih sevov <i>E.</i> <i>coli</i> , <i>B. subtilis</i> in <i>S. cerevisiae</i>	99

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel <i>S. coelicolor</i> (Kieser in sod., 2000).....	5
Slika 2: Zračni micelij <i>Amycolatopsis alba</i> , slikan z vrstičnim elektronskim mikroskopom	7
Slika 3: Strukturi malonil-CoA (levo) in acetil-CoA (desno) (PubChem..., 2013)	9
Slika 4: Biosinteza poliketidov (Hopwood, 2004)	10
Slika 5: Vgradnja kompleksnih podaljševalnih enot, označenih s sivo barvo (Hertweck, 2009).....	11
Slika 6: Modifikacije keto skupin poliketidov (Hopwood, 1997)	11
Slika 7: Modifikacije poliketidov v poznih stopnjah biosinteze so označene s sivo barvo (Pickens in sod., 2009)	11
Slika 8: Primer biosinteze poliketida tipa I (Hertweck, 2009)	12
Slika 9: Biosinteza aromatskih poliketidov (Hertweck in sod., 2007)	15
Slika 10: Strukture alternativnih začetnih enot v biosintezi aromatskih poliketidov (PubChem..., 2013)	15
Slika 11: Strukture tetraciklinskih analogov (PubChem..., 2013)	21
Slika 12: Biosinteзна pot OTC (zgoraj) in oxy genska skupina (spodaj) (Pickens in Tang, 2010)	29
Slika 13: Posledice delovanja nenavadnih tetraciklinov na celice <i>E. coli</i> (Oliva in sod., 1992)	31
Slika 14: Tridimenzionalne strukture OTC (zgoraj levo in spodaj levo) in CHD (zgoraj desno in spodaj desno) (foto: Šala M., Kemijski inštitut).....	32
Slika 15: Strukture CTC, OTC in CHD (PubChem..., 2013)	33
Slika 16: Predvidena biosinteza CHD (zgoraj) in chd genska skupin (spodaj) (Lešnik, 2009; Petković in sod., 2013)	35
Slika 17: Vektor pVM1 (Magdevska, 2011).....	44
Slika 18: Ekspresijski vektor pAB03 (Acies Bio)	45
Slika 19: Vektor pNV18	45
Slika 20: Vektorji pAB03ermE*, pAB03rppA in pAB03ermE*rppA.....	63
Slika 21: Vrednotenje moči promotorjev <i>PactI</i> in <i>PermE*</i> preko izražanja <i>rppA</i>	65
Slika 22: Vektor pNV18chdPKSErm za prekinitev kelokardinskega minimalnega PKS ..	67
Slika 23: Potrditev prekiniteve minimalnega PKS s hibridizacijo po Southernu	68
Slika 24: Analiza metabolitov sevov <i>A. sulphurea</i> z inaktiviranim minimalnim PKS s pomočjo LC-MS	69
Slika 25: Vektorja pAB03:8kb in pAB03chdPKS	70
Slika 26: Analiza sevov <i>A. sulphurea</i> po komplementaciji sevov s prekinjenim minimalnim PKS s pomočjo LC-MS	72
Slika 27: Producija CHD v rekombinantnih sevih <i>A. sulphurea</i> s prekinjenim minimalnim PKS po komplementaciji	73
Slika 28: Rast sevov <i>A. sulphurea</i> s prekinjenim oziroma komplementiranim minimalnim PKS na ploščah SM	74

Slika 29: Vrednotenje protimikrobne aktivnosti sevov <i>A. sulphurea</i> s prekinjenim oziroma komplementiranim minimalnim PKS na SM agarnem gojišču, z uporabo testnih sevov <i>E. coli</i> DH10 β (levo) in <i>E. coli</i> ET12567 (desno)	74
Slika 30: Predvidene strukture kelokardinskih analogov, ki jih producirajo rekombinantni sevi <i>A. sulphurea</i>	76
Slika 31: Vektorji pAB03oxyT, pAB03oxyS in pAB03chl	77
Slika 32: Vektorji pAB03oxyD, pAB03oxyP, pAB03oxyDP in pNV18actIoxyDP	79
Slika 33: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kulture <i>A. sulphurea</i> z vektorjem pAB03oxyS	82
Slika 34: LC-MS butanolnih izvlečkov kulture <i>A. sulphurea</i> z vektorjem pAB03chl	83
Slika 35: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kultur <i>A. sulphurea</i> z vektorji pAB03oxyDP (levo zgoraj in levo spodaj), pAB03oxyD (sredina zgoraj in sredina spodaj) in pAB03oxyP (desno zgoraj in desno spodaj)	84
Slika 36: Biosinteza CHD in CDCHD v transformantah <i>A. sulphurea</i>	85
Slika 37: Vektor pAB03chdGIV	87
Slika 38: Vektorja pBluescriptermE*chdMII in pTS55ermE*chdMII	89
Slika 39: Predvidene strukture kelokardinskih analogov po prekinitvi genov	90
Slika 40: Vektorja pNV18chdMIIerm in pNV18chdNerm za prekinitve genov chdMII in chdN (v tem vrstnem redu)	92
Slika 41: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kulture <i>A. sulphurea</i> s prekinjenim genom chdMII	94
Slika 42: Strukture OTC in ADOTC	95
Slika 43: Vektor pIJ4026oxyPko	96
Slika 44: LC-MS analiza kulture <i>S. rimosus</i> s prekinjenim genom oxyP	97
Slika 45: Test protimikrobne aktivnosti OTC, CHD, CDCHD in DMCHD s testnima organizmoma <i>B. subtilis</i> (zgoraj) in <i>E. coli</i> (spodaj)	100
Slika 46: Predvidena začetna stopnja biosinteze nastajajoče poliketidne verige z vgradnjo malonamatne oziroma acetatne začetne enote v OTC (zgoraj) (Wang in sod., 2011b), CHD (v sredini) in CDCHD (spodaj)	109
Slika 47: Prikaz aminokislinske homologije genske skupine za CHD (chd) z genskima skupinama za biosintezo OTC (oxy) in mitramicina (mtm) (PubChem..., 2013; Pickens in Tang, 2010; Petković in sod., 2013)	117

KAZALO PRILOG

- Priloga A: NMR podatki za CHD in CDCHD
Priloga B: ^1H NMR spekter CHD v DMSO-d₆ pri 800 MHz
Priloga C: ^{13}C NMR spekter CHD v DMSO-d₆ pri 75 MHz
Priloga D: ^1H NMR spekter CDCHD v DMSO-d₆ pri 800 MHz
Priloga E: ^{13}C NMR spekter CDCHD v DMSO-d₆ pri 75 MHz
Priloga F: Aktivnost CHD, CDCHD in DMCHD proti multirezistentnim kliničnim izolatom

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACP	acil prenašalni protein (angl. Acyl carrier protein)
ADOTC	2-acetyl-2-dekarboksiamido-oksitetraciklin (angl. 2-acetyl-2-deacboxamido-oxytetracycline)
AK	aminokislina
Amp	ampicilin
Apr	apramicin
AT	aciltransferaza
ATC	anhidrotetraciklin
ATP	adenozin trifosfat (angl. adenosine triphosphate)
bp	bazni par
CDCHD	2-karboksiamido-2-deacetil-kelokardin (angl. 2-carboxamido-2-deacetyl-chelocardin)
CHD	kelokardin (angl. chelocardin)
CLF	faktor dolžine poliketidne verige (angl. chain lenght factor)
Cm	kloramfenikol
CMT	kemijsko modificiran tetraciklin (angl. chemically modified tetracycline)
CoA	koencim A
CTC	klortetraciklin
ddH ₂ O	dvakrat deionizirana voda
dH ₂ O	deionizirana voda
DMCHD	9-demetylkelokardin
DMCTC	6-demetylklortetraciklin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
E	encim
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
Erm	eritromicin
FAD	flavin adenin dinukleotid (angl. flavin adenine dinucleotide)
HCl	klorovodikova kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high performance liquid chromatography)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl. high-resolution mass spectrometry)
Kan	kanamicin
kb	kilobaza
KS	ketosintaza

LC-MS	tekočinska kromatografija - masna spektrometrija
MCAT	malonil-CoA:ACP transferaza
MCS	mesto za kloniranje (angl. multiple cloning site)
MeOH	metanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimum inhibitory concentration)
min	minuta
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (angl. nicotineamide adenine dinucleotide phosphate)
Neo	neomicin
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NRRL	zbirka sevov (Northern Regional Research Laboratory)
OD	optična gostota (angl. optical density)
OTC	oksitetraciklin
PactI	aktivatorski/promotorski sistem <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PEG	polietilenglikol (angl. polyethyleneglicol)
PKS	poliketid sintaza
ppm	delcev na milijon (angl. parts per million)
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	obratov na minuto (angl. revolutions per minute)
rRNA	ribosomska RNA
SAM	S-adenozil-L-metionin
SARP	streptomicetni antibiotični regulatorni protein (angl. <i>Streptomyces</i> antibiotics regulatory protein)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. sodium dodecyl sulphate)
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. solid-phase extraction)
TCA	trikloroocetna kislina
TES	N-[tris(hidroksimetil)metil]-2-aminoetansulfonska kislina
TFA	trifluoroocetna kislina
T _m	temperatura tališča (angl. melting temperature)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
tRNA	prenašalna RNA (angl. transfer RNA)
Tsr	tiostrepton
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

Bogat vir aktivnih učinkovin naravnega izvora so pogosto sekundarni metaboliti gliv in bakterij, pri čemer aktinomicete izstopajo kot izjemno bogat vir sekundarnih metabolitov (Berdy, 2005). Predpostavlja se, da imajo sekundarni metaboliti lahko različne vloge v bioloških procesih producentov, vsekakor pa sekundarni metaboliti omogočajo svojim producentom kompetitivno prednost v kompleksnih mikrobnih združbah naravnega okolja, kot so npr. tla, kjer so produkcijski sevi izpostavljeni različnim vrstam okoljskega stresa, poleg tega pa morajo tekmovati tudi za hranila (Hopwood, 2004). S proizvodnjo aktivnih učinkovin lahko zavirajo rast drugih mikroorganizmov, ki nimajo ustreznih genov za odpornost. Znano je, da so že v antičnem času znali uporabljati nitaste glice za zdravljenje infekcij (Wainwright, 1989). Nekaj let po Flemingovem odkritju penicilina pa se je začela zlata doba odkrivanja naravnih antibiotikov (Lefevre in sod., 2008), ko so različna podjeta in raziskovalne institucije odkrivali veliko število novih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov. Komercialna proizvodnja in uporaba protibakterijskih učinkovin je omogočila bistveno izboljšanje življenskih pogojev in izjemen porast povprečne življenske dobe ljudi. Poleg humane medicine, so protibakterijske učinkovine začeli obsežno uporabljati tudi v kmetijstvu, za zdravljenje kot tudi za preventivo. Z intenzivno uporabo protibakterijskih učinkovin se je takoj začela pojavljati tudi odpornost patogenov na antibiotike. Vedno bolj zaskrbljujoče so okužbe z bakterijami, ki so odporne proti najmočnejšim antibiotikom: MRSA (proti meticilinu odporni sevi *Staphylococcus aureus*), VRE (proti vankomicinu odporni sevi *Enterococcus*) in v zadnjih letih vse bolj odporni sevi *Pseudomonas aeruginosa* ter *Streptococcus pneumoniae*. Pojav rezistentnih patogenov (Mitscher, 2008) lahko zavremo z bolj racionalno uporabo komercialnih antibiotikov ali pa z razvojem novih protibakterijskih učinkovin. Najbolj pogosto razvoj novih protibakterijskih učinkovin sloni na razvoju analogov z uporabo pol-sintezne kemije. Poleg kemijske modifikacije pa se v zadnjih letih pogosto poslužujemo razvoja novih analogov obstoječih protibakterijskih in drugih biološko aktivnih učinkovin s pomočjo novih pristopov biosinteznega inženirstva. Izjemno hiter razvoj genskih orodij v zadnjih letih in dostopnost velikega števila sekveniranih genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov omogočata oblikovanje novih biološko aktivnih učinkovin (ki jih ni mogoče pripraviti s pristopi pol-sintezne kemije), proti katerim bakterije nimajo ustreznih mehanizmov odpornosti. Tetraciklini predstavljajo uporabne matrice s številnimi možnostmi za njihovo modifikacijo. S spremenjanjem tetraciklinskih struktur ne vplivamo le na spremembo njihove protimikrobne aktivnosti ampak med drugim lahko vplivamo tudi na njihovo protivnetno, imunosupresivno in protirakavo delovanje. Z vnosom genov za heterologne encime v producentski organizem lahko na tetraciklinsko ogrodje dodajamo različne stranske skupine. Takšne reakcije je s pristopi kemijske sinteze težko izvesti ali pa sploh niso izvedljive. Prav boljše razumevanje biosinteznih poti tetraciklinskih učinkovin

in vseh sekundarnih metabolitov na splošno bo lahko omogočilo pripravo novih analogov biološko aktivnih učinkov naravnega izvora, ki pa jih glede na veliko razprostranjenost odpornosti proti medicinsko pomembnim protibakterijskim učinkovinam nujno potrebujemo.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen doktorske naloge je bil predvsem razviti metode in orodja za gensko manipulacijo *Amycolatopsis sulphurea*, s čimer smo želeli prispevati k hitrejšemu razvoju orodij za manipulcijo aktinomicet iz rodu *Amycolatopsis*, ob enem pa razviti novo platformo za razvoj novih tetraciklinskih analogov na osnovi kelokardina (CHD), kot nove tetraciklinske matrice, ki zahvaljujoč svoji strukturni značilnosti sodi med t.i. nenavadne tetracikline. Pričakovali smo, da bomo v sevu *A. sulphurea* uspeli heterologno izraziti nekatere gene, ki so vključeni v pozne stopnje biosinteze drugih tetraciklinskih antibiotikov, kot sta oksitetraciklin (OTC) in klortetraciklin (CTC). Recipročno pa smo hkrati nameravali v heterolognih gostiteljih, ki producirajo druge tetraciklinske analoge, kot sta OTC in CTC, izraziti izbrane gene iz genske skupine, ki kodira biosintezo CHD. Predvidevali smo tudi, da bomo lahko na osnovi rezultatov heterolognega izražanja in identifikacije modificiranih tetraciklinskih analogov še poglobili razumevanje biosinteze CHD in drugih tetraciklinskih analogov. Poglavljenen namen doktorske disertacije je bil poglobljeno razumevanje biosinteznih poti tetraciklinskih antibiotikov s posebnim poudarkom na poznih stopnjah biosinteze. Poglobljeno razumevanje biosinteznih (predvsem poznih stopenj) poti enega izmed izbranih modelnih tetraciklinskih molekul, CHD, bo omogočilo pripravo novih matric za nadaljnji razvoj novih tetraciklinskih učinkovin s pomočjo metod biosinteznega inženirstva, ki do sedaj niso bile dostopne s klasičnimi kemijskimi pristopi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na do sedaj objavljene raziskave o biosintezi tetraciklinskih antibiotikov in pred kratkim klonirano in sekvenirano gensko skupino za biosintezo CHD smo predlagali naslednje hipoteze te doktorske naloge:

- a) S testiranjem in optimizacijo različnih metod transformacije (npr. transformacija micelija, konjugacija in elektroporacija) ter identifikacijo uporabnih vektorjev iz drugih aktinomicet (npr. *Streptomyces* sp. in *Nocardia*) bomo lahko razvili učinkovit sistem za gensko manipulacijo *A. sulphurea*.

- b) Z uporabo primernega poročevalskega sistema bo mogoče identificirati močne promotorje, ki delujejo v sevu *A. sulphurea*.
- c) V *A. sulphurea* bomo lahko izrazili heterologne gene, vpletene v pozne stopnje biosinteze, iz različnih genskih skupin, ki kodirajo biosintezo tetraciklinskih analogov (npr. OTC in CTC).
- d) V heterolognih gostiteljih (npr. *S. rimosus* in *S. aureofaciens*), ki proizvajajo tetraciklinske antibiotike, bomo lahko izrazili izbrane gene vpletene v pozne stopnje biosinteze CHD.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AKTINOMICETE

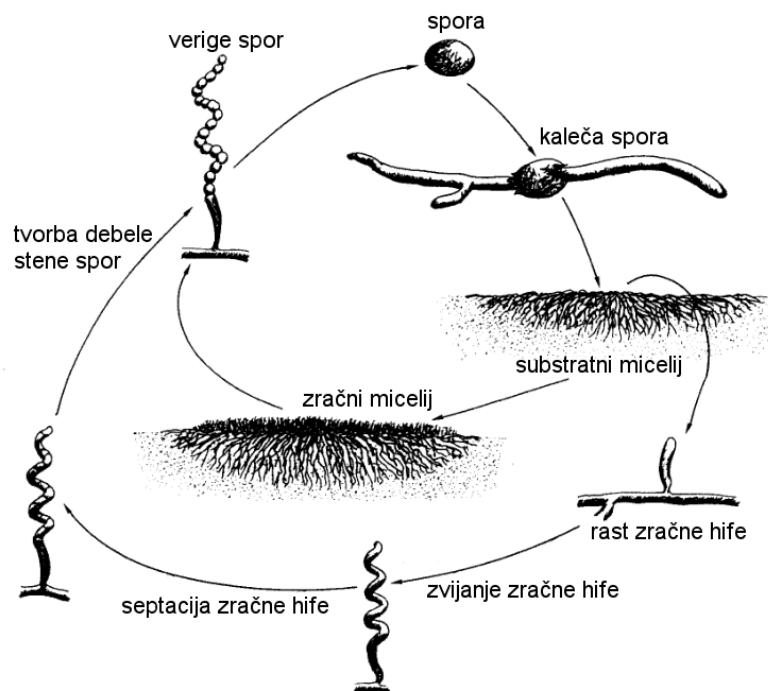
Aktinomicete, ki so ena največjih skupin v mikrobeni populaciji, prisotni v tleh, tvorijo raznoliko skupino po Gramu pozitivnih, aerobnih, micelijskih bakterij. Prvotno so jih uvrščali v vmesno skupino med bakterije in glice, danes pa vemo, da spadajo v skupino prokariotskih organizmov. Aktinomicete pripadajo redu *Actinomycetales*, zanje pa je značilna tvorba substratnega in zračnega micelija na trdnem gojišču, prisotnost vegetativnih spor in visoka vsebnost GC parov (65-75 %) v DNA. Obsegajo številne rodove, npr.: *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, in *Amycolatopsis*. Aktinomicete so metabolno izredno raznoliki mikrobi, ki se nahajajo v različnih naravnih okoljih. Proizvajajo različne zunajcelične encime, s katerimi razgrajujejo kompleksne polimere v mrtvem materialu rastlin, živali in gliv. Zaradi tega so pomembne pri biorazgradnji v tleh, saj so sposobne reciklirati tudi zelo odporne polimere (Kieser in sod., 2000; Malhotra in Lal, 2007).

Znane so predvsem po svojem medicinskem in industrijskem pomenu, saj proizvajajo različne encime, aminokisline, vitamine in bioaktivne sekundarne metabolite. Aktinomicete proizvajajo dve tretjini vseh znanih protibakterijskih učinkovin kot so npr. vankomicin, eritromicin (Erm) in tetraciklin. Proizvajajo pa tudi pomembne protiglivne (amfotericin B), protirakave (doksorubicin, rapamicin), protiparazitske (ivermektin) in imunosupresivne (takrolimus) spojine. V procesih industrijske proizvodnje so zelo uporabne vrste rodov *Streptomyces* and *Amycolatopsis*. Waksmanovo odkritje protituberkozognega antibiotika streptomicina iz kulture *Streptomyces griseus* leta 1944 je predstavljalo pomemben mejnik na področju naravnih kemoterapevtikov in napovedalo začetek iskanja antibiotikov v bakterijah rodu *Streptomyces* in sorodnih aktinomicetah (Kieser in sod., 2000; Malhotra in Lal, 2007; Nett in sod., 2009). S prihodom masovnega sekveniranja genomov aktinomicet v zadnjih letih ugotavljamo, da ima ta skupina mikroorganizmov večje genome v primerjavi z ostalimi bakterijami. Velik del genoma (5-10 %) pa pogosto kodira biosintezo skundarnih metabolitov. Zato je prav gotovo realno pričakovati, da smo identificirali do danes le del biosinteznega potenciala, ki ga posedujejo te filamentozne bakterije.(Alduina in Gallo, 2012).

2.1.1 Morfologija aktinomicet

Večina aktinomicet tvori dve vrsti micelija: primarni (substratni) in sekundarni (zračni) micelij, ki je hidrofoben in pogosto fragmentira v spore. Od aktinomicet je najbolj

proučena in opisana morfološka diferenciacija modelnega seva *Streptomyces coelicolor* (Slika 1). Med kultivacijo na trdnem gojišču so morfološke spremembe značilne kolonije *S. coelicolor* izjemno kompleksne. V prvih stopnjah iz spore požene kalitvena cevka, na čigar konici nastaja celična stena. S stranskim razvejanjem nastajajo nove hife, ki se nato septirajo. Razvejanost in septe so bolj pogoste v starejšem delu micelija in jih ne najdemo zelo blizu konic. Ko kolonije rastejo in se star micelij gosto nakopiči, pride do nadaljnjih sprememb, ki so lahko odgovor na omejitve s hranili, drug fiziološki stres in/ali celično gostoto preko zunajceličnih signalov ter kaskade signalov, ki so potrebni za nastanek zračnega micelija (Slika 2). Te spremembe so lahko: povečana proizvodnja nekaterih zunajceličnih proteinov (encimov), indukcija sekundarnega metabolizma, začetek lize nekaterih delov substratnega micelija, začetek skladiščenja metabolitov v substratnih hifah na površini kolonije in začetek rasti zračnih hif. Tvorba spor v *Streptomyces* spp. se začne z delitvijo nukleoidov in spremembami v membranskih strukturah zračnih hif. V dolgih, multigenomskih in pogosto zavith zračnih hifah se začne sinhrona tvorba prečnih sten, tako nastanejo cilindrični enogenomski predelki prespor. Ti se nato zaokrožijo in oblikujejo debelo steno spore (Kalakoutskii in Agre, 1976; Kieser in sod., 2000).

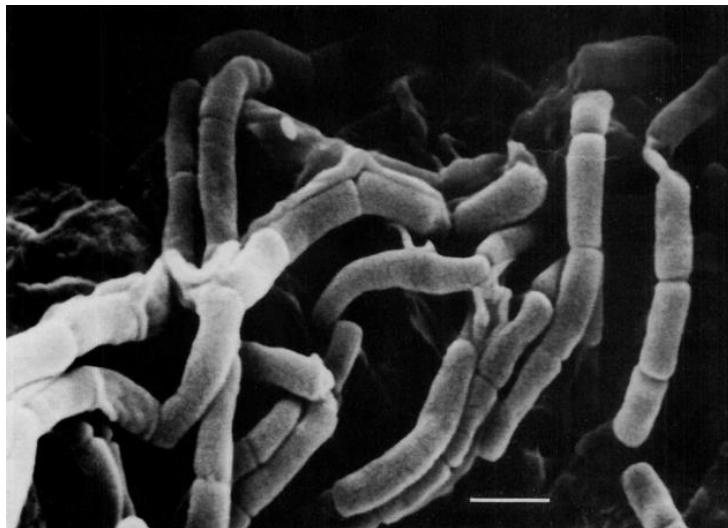


Slika 1: Življenjski cikel *S. coelicolor* (Kieser in sod., 2000)
Figure 1: The life cycle of *S. coelicolor* (Kieser et al., 2000)

2.1.2 Rod *Amycolatopsis*

Nokardioformni aktinomicetni rod *Amycolatopsis*, ki priprada družini *Pseudonocardiaceae*, so predlagali že Lechevalier in sod. (1986). Za bakterije rodu *Amycolatopsis* je značilna odsotnost mikolne kisine v celični steni, iz česar izvira tudi poimenovanje (Lechevalier in sod., 1986; Stackebrandt in Schumann, 2006). Rod *Amycolatopsis* spada med redke aktinomicete, kar pomeni, da so manjkrat izolirane in izkoriščane, kot npr. streptomicete (Lazzarini in sod., 2001; Tiwari in Gupta, 2012). Bakterijski sevi iz rodu *Amycolatopsis* so bogat vir biološko aktivnih učinkov in ostalih sekundarnih metabolitov: *Amycolatopsis orientalis* proizvaja vankomicin, ki predstavlja zadnjo možnost obrambe proti sevom *Staphylococcus aureus*, odpornim proti meticilinu; *Amycolatopsis mediterranei* proizvaja rifamicin, ki se ga je včasih uporabljalo za zdravljenje tuberkoloze in gobavosti; iz ostalih vrst rodu *Amycolatopsis* pa so izolirali še druge antibiotike (balhimicin, azicemicin, epoksikinomicin, itd.). Poleg tega pa številni sevi iz rodu *Amycolatopsis* razgrajujejo aromatske ogljikovodike (Gibson in sod., 2003; Lal in sod., 1998; Lal in sod., 1991; te Poele in sod., 2007). Za bakterije iz rodu *Amycolatopsis* je značilen krožen kromosom, ki ga najdemo tudi pri vrstah *Nocardia farcinica* in *Saccharopolyspora erythraea*, medtem ko je kromosom v bakterijah iz rodu *Streptomyces* navadno linearen (Zhao in sod., 2010).

V Bergeyejevem priročniku za sistematicno bakteriologijo (2012) so z namenom uskladitve taksonomije aktinobakterij predlagali spremembo, torej povišanje družine *Pseudonocardiaceae* v red *Pseudonocardiales* (poleg povišanja ostalih družin). Tako naj bi olajšali primerjave med debli in postavili enotno klasifikacijo vseh bakterij in arhej (Berger's..., 2012).



Slika 2: Zračni micelij *Amycolatopsis alba*, slikan z vrstičnim elektronskim mikroskopom
Merilo = 1 µm (Mertz in sod., 1993)

Figure 2: Aerial mycelium of *Amycolatopsis alba*, photographed by scanning electron microscope
Bar = 1 µm (Mertz et al., 1993)

Poimenovanje vrste *Amycolatopsis sulphurea* izvira iz besede sulphur (lat. žveplo), ki se nanaša na zelenorumeno obarvanost substratnega micelija. Iz *A. sulphurea* so pred več kot petdesetimi leti izolirali antibiotik CHD (Lechevalier in sod., 1986).

2.2 SEKUNDARNI METABOLITI

Pogosto uporabljena definicija naravnih produktov v najširšem smislu poudarja, da so to spojine, izolirane iz različnih živih bitij. Naravni produkti lahko izvirajo iz primarnega, pogosteje pa iz sekundarnega metabolizma. Primarni metaboliti (polisaharidi, proteini, nukleinske in maščobne kisline) se nahajajo v vseh bioloških sistemih. Sekundarni metaboliti pa imajo nizko molekulsko maso (pod 3000 Da) in so strukturno izjemno raznolike spojine s pogosto neznanim delovanjem, značilne za določeno ozko skupino organizmov. Sekundarni metaboliti niso nujno potrebni za preživetje, vsaj ne v laboratorijskem merilu - izgleda, kot da nimajo neke očitne vloge v življenjskem ciklu proizvajalcev. Značilni zanje so: izjemna struktorna raznolikost, visoka pogostost v naravi in širok spekter bioloških aktivnosti. V zlati dobi antibiotikov, smo antibiotike pojmovali kot sekundarni metabolite, ki so izolirani iz mikrobov in kažejo protimikrobnno (protibakterijsko, protiglivno, protiparazitsko), protitumorsko in/ali protivirusno aktivnost. Dandanes pa bi bilo morda treba prvotno definicijo antibiotika razširiti na vse tiste (mikrofone) sekundarne metabolite, ki že v nizkih koncentracijah regulirajo biološke procese, replikacijo in/ali kažejo neko vrsto odzivnega (spodbujanje, zaviranje) delovanja.

na življenjski cikel prokariontskih ali evkariontskih celic (Berdy, 2005; Lefevre in sod., 2008).

Od Flemingovega odkritja penicilina naprej so znanstveniki ogromno truda vložili v izolacijo sekundarnih metabolitov iz mikrobov. Med zlato dobo odkrivanja mikrobnih naravnih produktov v 40-tih in 50-tih letih prejšnjega stoletja so odkrili večino od vseh skupin pomembnih antibiotikov (penicilini, cefalosporini, tetraciklini, makrolidi, aminoglikozidi, itd.) (Lefevre in sod., 2008). Danes vemo, da aktinomicete proizvajajo preko 10000 bioaktivnih spojin, od katerih 7600 izvira iz rodu *Streptomyces*, 2500 pa iz redkih aktinomicetnih vrst (Berdy, 2005). Sekundarni metaboliti zelo verjetno omogočajo svojim producentom kompetitivno prednost v kompleksnem okolju v tleh, kjer so izpostavljeni vsem vrstam stresa (Hopwood, 2004).

Večina klinično pomembnih biološko aktivnih učinkovin, ki jih proizvajajo aktinomicete, je preveč kompleksnih, da bi jih lahko sintetizirali s pristopi sintezne kemije. Zato danes za industrijsko proizvodnjo teh učinkovin večinoma uporabljam naravne produkte ali pa polsinteze derivate metabolitov iz aktinomicet in gliv. Metode biosinteznega inženiringa, ki so se zelo razvile v zadnjem desetletju, nam danes omogočajo razvoj derivatov kompleksnih biološko aktivnih učinkovin in drugih sekundarnih metabolitov, ki bi jih težko, ali pa bi jih bilo nemogoče ustvariti s kemijsko sintezo. Poleg tega pa v zadnjih letih naše razumevanje gojenja t.i. ne-kultivabilnih mikrobov iz tal in morja močno narašča, zato je pričakovati povečano identifikacijo novih molekul. Glede na naraščanje odpornosti proti protibakterijskim in protiglivnim učinkovinam ter glede na potrebo po bolj učinkovitih protirakastih učinkovinah je zelo pomembno razviti močnejše biološko aktivne učinkovine. In prav gotovo nam novi pristopi, kot so pristopi biosinteznega inženirstva, lahko omogočijo razvoj novih, močnejših klinično uporabnih biološko aktivnih učinkovin (Baltz, 2007; Zhang in Demain, 2005).

2.2.1 Biosinteza poliketidov

Ena najbolj razširjenih skupin protibakterijskih in antibiotskih učinkovin nasploh so prav gotovo spojine iz skupine poliketidnih učinkovin. Skupna vsem poliketidnom je biosinteza dolgih ogljikovih verig, ki na vsakem drugem ogljikovem atomu vsebujejo keto skupino in nastanejo s ponavljajočo se vgradnjo dveh ogljikovih atomov enostavnih karboksilnih spojin, kot je npr. acetat. Biosintezo katalizirajo t.i. multifunkcijski encimi poliketidne sintaze (PKS), ki določajo dolžino verige, stopnjo oksidacije in vzorec razvejanja, ciklizacije ter stereokemije molekul (Hopwood, 2004; Hertweck, 2009). Ti kompleksni encimski sistemi delujejo v različnih kombinacijah in tako ustvarijo številne raznolike strukture. PKS so sorodne sintazam maščobnih kislin, vendar sodelujejo v veliko

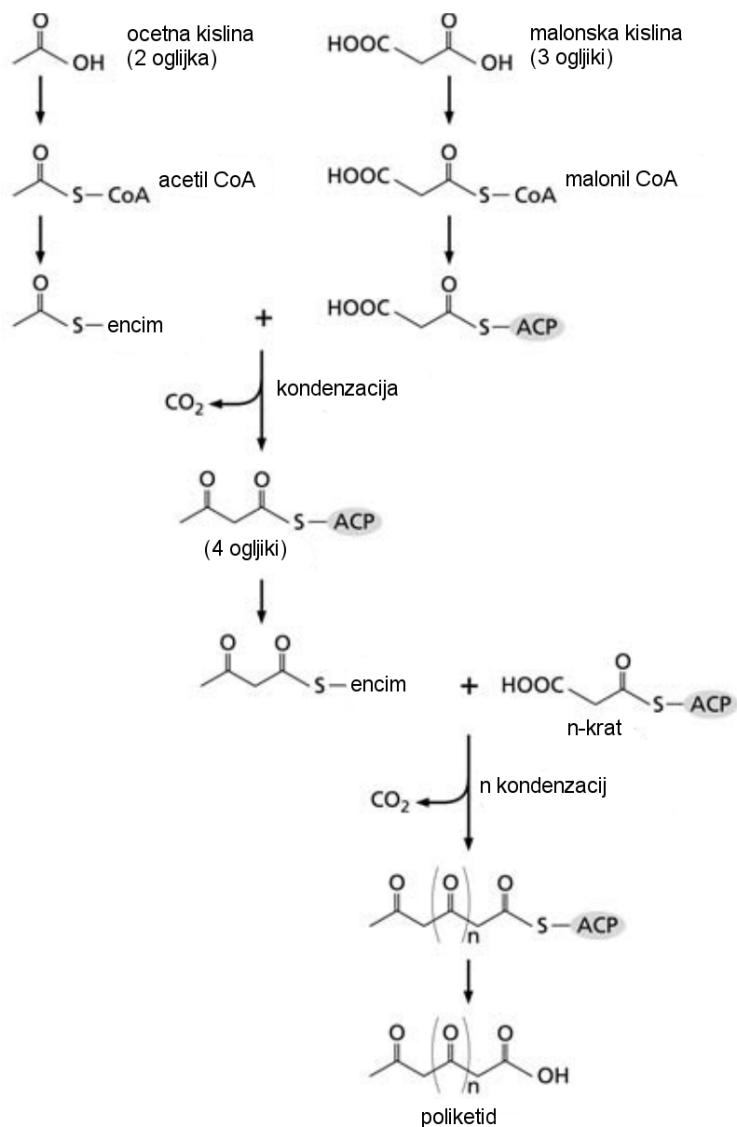
kompleksnejših biosinteznih poteh. Bistvo delovanja PKS je sinteza dolgih verig ogljikovih atomov z združevanjem (kondenzacijo) majhnih organskih kislin (npr. acetne in malonske kisline) s t.i. »ketosintaznim delovanjem«. Gre za uporabo gradbenih enot v obliki koencim A (CoA) aktiviranih derivatov, estrov: npr. acetil-CoA in malonil-CoA (Slika 3).



Slika 3: Strukturi malonil-CoA (levo) in acetil-CoA (desno) (PubChem..., 2013)

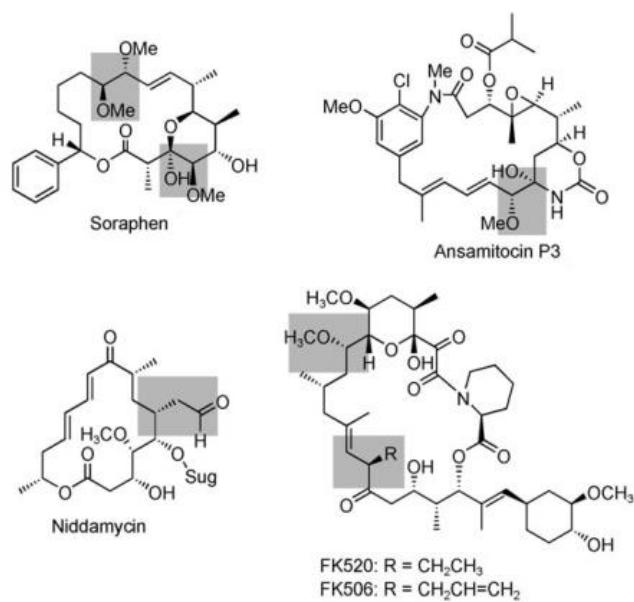
Figure 3: Structures of malonyl-CoA (left) and acetyl-CoA (right) (PubChem..., 2013)

Posebno obliko kondenzacije, ki te gradbene enote združuje, poganja izguba ogljikovega dioksida skozi proces Claisenove kondenzacije (Hopwood, 2004; Hertweck, 2009). Tako se, ko se združi acetil-CoA (2 C atoma) z malonil-CoA (3 C atomi), eden od treh C atomov izloči v obliki CO_2 molekule, nastane pa veriga iz 4 C atomov (Slika 4). Nadaljnje kondenzacije z vsakim novim korakom podaljšajo verigo za dva C atoma. Če program PKS namesto podaljševalne enote malonil-CoA vgradi metilmalonil-CoA, ki ima 4 C atome, potem se linearna veriga tudi v tem primeru podaljša za dva C atoma, "dodaten" C atom pa tvori stransko metilno skupino. Bolj kompleksne podaljševalne enote tvorijo bolj kompleksne stranske skupine (Slika 5). Raznolikost poliketidnih struktur izhaja iz številnih programiranih dogodkov pred, med in po biosintezi ogljikove verige. V vseh primerih pa sta glavni spremenljivki izbira števila in tipa biosinteznih gradbenih enot. Keto ($\text{C}=\text{O}$) skupine (iz česar izhaja ime poliketidi), ki se pojavi na vsakem drugem C atomu v rastoti verigi kot rezultat kondenzacije, lahko ostanejo nespremenjene, se v procesu redukcije modifcira ali pa celo »odstranijo«, kar vodi v nastanek alifatske verige. Tako na nekaterih mestih v verigi odstanejo keto skupine; ali pa se na nekaterih ogljikovih atomih z redukcijo keto skupine tvorijo hidroksilne (-OH) skupine; z nadaljnjo dehidracijo (odstranitev hidroksilne skupine) lahko nastane dvojna vez med sosednjima C atomoma; in končno, keto skupina se lahko popolnoma reducira z zasičenjem dvojne vezi z vodikovimi atomi (enoil redukcija) in nastankom enojne vezi (alifatska veriga) (Slika 6) (Hopwood, 1997). Pogosta spremenljivka na nastajajoči poliketidni verigi je tudi stereokemija hidroksilnih in metilnih skupin ali drugih ogljikovih razvezitev, od katerih lahko vsaka obstaja v dveh možnih konfiguracijah. Na koncu, ko nastala ogljikova veriga zapusti PKS kompleks, nastajajoča poliketidna veriga zavzame različne vzorce zvijanja, "krojaški" post-PKS encimi, v poznih stopnjah biosinteze, pa lahko na osnovno poliketidno verigo pripnejo še sladkorje in različne druge kemijske skupine na različne mesta verige kar vodi v vrsto sturturnih različic (Hopwood, 2004; Hertweck, 2009) (Slika 7).



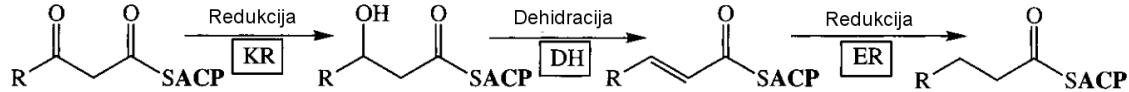
Slika 4: Biosinteza poliketidov (Hopwood, 2004)

Figure 4: Polyketide biosynthesis (Hopwood, 2004)



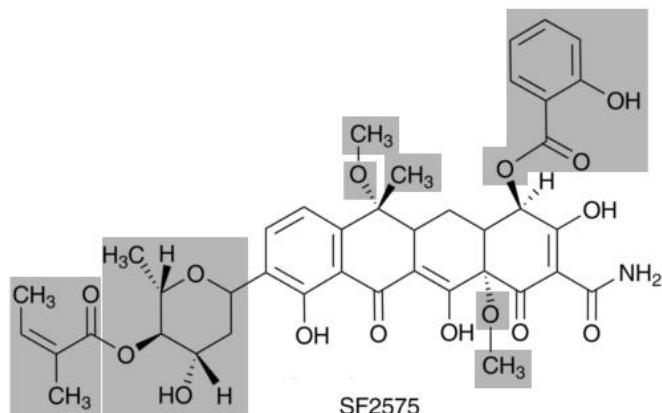
Slika 5: Vgradnja kompleksnih podaljševalnih enot, označenih s sivo barvo (Hertweck, 2009)

Figure 5: Incorporation of complex building blocks, highlighted with a grey background (Hertweck, 2009)



Slika 6: Modifikacije keto skupin poliketidov (Hopwood, 1997)

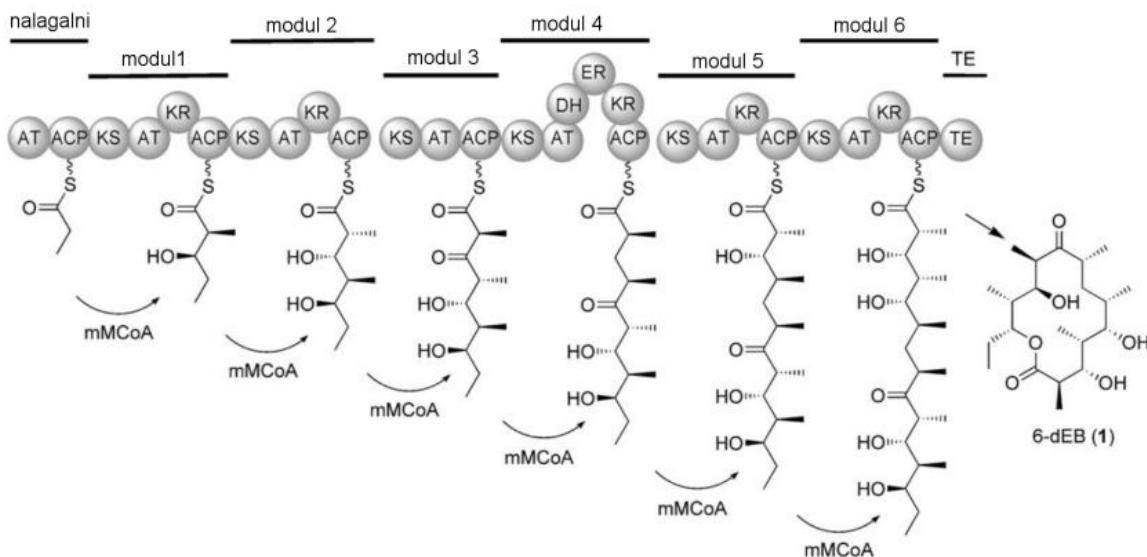
Figure 6: Modification of polyketide keto groups (Hopwood, 1997)



Slika 7: Modifikacije poliketidov v poznih stopnjah biosinteze so označene s sivo barvo (Pickens in sod., 2009)

Figure 7: Polyketide modifications in the late stages of biosynthesis are highlighted with a grey background (Pickens et al., 2009)

PKS razvrščamo v tri skupine glede na njihove sekvence, primarne strukture in katalitične mehanizme: klasificirane kot tip I, II in III. PKS tipa I (modularne PKS) so navadno ogromni sklopi multifunkcijskih polipeptidov, od katerih vsak vsebuje vrsto katalitičnih domen (Slika 8). V vsakem modulu navadno najdemo tri ključne domene domene za podaljševanje verige: ketosintaza (KS), aciltransferaza (AT) in acil prenašalni protein (ACP) (Slika 8). Prisotne so pa lahko še ostale domene, kot npr. ketoreduktaza, dehydrataza, enoil reduktaza in metiltransferaza, ki vplivajo na končno strukturo poliketidne molekule. Pri glivnem PKS tipu I se lahko domene uporabljajo ponavljajoče (iterativno), medtem ko je bakterijski PKS tipa I ponavadi procesiven, kar pomeni, da se navadno vsaka domena uporabi le enkrat. Pri neiterativnih modularnih PKS se vsak modul uporabi le enkrat - poliketidni intermediat se prenese na naslednji modul za podaljševanje verige. PKS tipa II (aromatske PKS) so veliki multiencimski kompleksi majhnih ločenih encimov z določenimi funkcijami. Na koncu lahko omenimo še PKS tipa III, ki so homodimeri samostojnih encimov. Njihovo edino aktivno mesto v vsakem monomeru iterativno katalizira začetek, podaljševanje in ciklizacijo za produkcijo polikedita. Kljub strukturni preprostosti pa PKS tipa III proizvajajo celo vrsto spojin, kot so: kalkoni, pironi, akridoni, floroglucinoli, stilbeni in rezorcinalni lipidi (Yu in sod., 2012).



Slika 8: Primer biosinteze poliketida tipa I (Hertweck, 2009)

Figure 8: Example of polyketide type I biosynthesis (Hertweck, 2009)

2.2.2 Gradbene enote za biosintezo poliketidov

Osnovno ogrodje poliketidov gradijo estri CoA enostavnih maščobnih kislin. Pri biosintezi aromatskih poliketidov pa sta substrata za gradnjo osnovne poliketidne verige acetil-CoA (navadno začetna enota) in malonil-CoA (podaljševalne enote). V nasprotju z aromatskimi poliketidi, pa so kompleksni poliketidi (tipa I) sestavljeni iz različnih acilnih enot: acetil-CoA, propionil-CoA in tudi butiril-CoA (začetne enote). Najbolj pogoste podaljševalne enote pa so malonil-CoA, metilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA. Prekurzorji za aromatske poliketide (acetil-CoA in malonil-CoA) večinoma izhajajo iz glikolize in β -oksidacije maščobnih kislin, medtem ko je izvor prekurzorjev za kompleksne poliketide lahko zelo različen. Prekurzorji lahko izvirajo tudi iz intermediatov ciklusa citronske kisline in katabolizma aminokisin (metionina, treonina, valina, levcina in izolevcina) (Brakhage, 2004; Stirrett in sod., 2009).

CoA ima ključno vlogo tako v primarnem kot v sekundarnem metabolizmu kot prenašalec karboksilnih kislin - podaljševalnih enot v biosintezi poliketidov (Chan in sod., 2009).

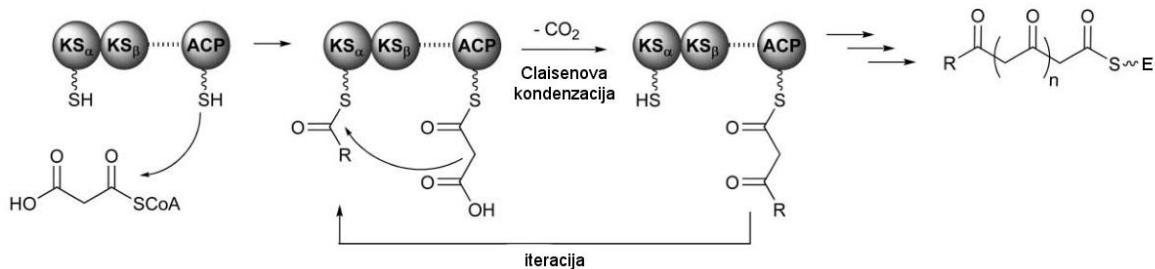
Biosinteza malonil-CoA poteka večinoma z od ATP odvisno karboksilacijo acetil-CoA in jo izvaja encim acetil-CoA karboksilaza. Reakcija je dvostopenjska in vključuje od ATP odvisno tvorbo karboksibiotina, ki ji sledi prenos karbonilne skupine na acetil-CoA (Rodriguez in sod., 2001). Za biosinezo malonil-CoA v *S. aureofaciens* in *S. ambofaciens* so opisali še alternativno pot, ki vključuje anaplerotska encima fosfoenol-piruvat karboksilazo (do oksaloacetata) in oksaloacetat dehidrogenazo (do malonil-CoA) (Behal in sod., 1997; Laakel in sod., 1994). Malonil-CoA lahko nastane tudi z neposredno pretvorbo malonata z malonil-CoA sintetazo (Chan in sod., 2009).

2.2.3 Biosinteza aromatskih poliketidov

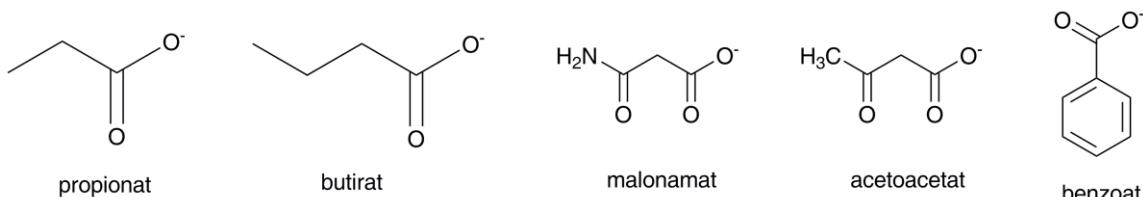
Na podlagi razlik v polifenolnem sistemu obročev in njihovih biosinznih poteh delimo metabolite, ki jih proizvajajo PKS tipa II, v več skupin: antraciklini, anguciklini, aureolične kisline (ang. aureolic acid), tetraciklini, tetracenomicini, pradomicinski tip polifenolov (ang. pradimicin-type polyphenols), benzoizokromanekinoni (ang. benzoisochromanequinones). Kljub strukturnim podobnostim med linearimi tetracikličnimi sistemi obročev tetraciklinov, antraciklinov in prekurzorji aureoličnih kislin, se ti razlikujejo v vzorcih ciklizacije in jih zato lahko razvrstimo v različne skupine aromatskih poliketidov (Hertweck in sod., 2007).

Minimalni PKS, ki je sestavljen iz treh proteinov, in je izjemno evolucijsko ohranjen, katalizira iterativno dekarboksilativno kondenzacijo malonil-CoA podaljševalnih enot z

začetno enoto, pri čemer nastane osnovna veriga aromatskih poliketidov (Slika 9). Minimalni PKS vključuje tri komponente: ketosintaza KS α , ketosintaza KS β ali CLF (faktor dolžine poliketidne verige) in ACP, ki služi kot sidro (prenašalec) za rastočo poliketidno verigo. KS α in KS β , ki imata visoko podobnost aminokislinske sekvence, se povežeta v heterodimerni kompleks, odgovoren za podaljševanje verige. AT prenese podaljševalno enoto na ACP, KS α -KS β pa katalizira nastanek C-C vezi s Claisenovi podobno dekarboksilativno kondenzacijo med vstopajočo podaljševalno enoto in nastajajočo poliketidno verigo. Za biosintezo aromatskih poliketidov, čigar genske skupine ne vsebujejo genov za AT, pa predvidevajo, da prenos malonil-CoA podaljševalnih enot poteka preko malonil-CoA:ACP transferaze (MCAT). Glede na to, da so geni, ki kodirajo MCAT, velikokrat odsotni iz genskih skupin za biosintezo poliketidov tipa II, predvidevajo, da se uporabi kar MCAT iz biosinteze maščobnih kislin. Rezultat ene takšne iteracije je dodatek ene acetatne enote (ene keto skupine) na rastoč poliketid. KS β naj bi nadzorovala dolžino verige preko velikosti odpbine med obema KS (Hertweck in sod., 2007; Hopwood, 2004; Pickens in Tang, 2010). Petković in sod. (1999) so pokazali, da s prekinivijo gena za OTC aromatazo/ciklazo v *S. rimosus* povzročimo nastanek novih poliketidov s krajsimi dolžinami verige, kar pomeni, da ima verjetno celoten PKS kompleks vpliv na dolžino poliketidne verige (Hertweck in sod., 2007; Petković in sod., 1999). Kako minimalni PKS kompleks izbira začetne enote, pa še ni povsem jasno, še posebno pri aromatskih poliketidih, kjer acetat ni začetna enota. Večina aromatskih poliketidov se začne z acetyl-CoA. Zelo verjetno se na encim najprej naloži molekula malonil-CoA, nato pa jo KS β , ki ima verjetno tudi dekarboksilativno aktivnost, dekarboksilira in uporabi acetyl-CoA kot začetno enoto (Bisang in sod., 1999). Obstaja pa kar nekaj aromatskih poliketidov (vključno s tetraciklini), ki imajo drugačne začetne enote: propionat, (izo)butirat, malonamat in benzoat (Bisang in sod., 1999; Hertweck in sod., 2007; Hopwood, 2004) (Slika 10). Poleg hipoteze, ki iniciacijo biosinteze razлага preko dekarboksilacije malonata, obstajata še dve alternativni hipotezi, ki so ju predlagali za vgradnjo ne-acetatnih PKS začetnih enot (Hertweck in sod., 2007). Pri prvi alternativni poti gre za bimodularne PKS tipa II, kjer obstaja poleg elongacijskega modula minimalnega PKS še iniciacijski modul, ki je odgovoren za biosintezo začetne enote. Iniciacijski modul obsega homodimerno KS, AT in ACP, medtem ko elongacijski modul obsega KS α , KS β , drug ACP in MCAT (Tang in sod., 2004a). Druga alternativna pot obsega neposredno nalaganje začetne enote z acil-CoA ligazo in AT, ki sta odgovorni za aktivacijo in prenos začetnih enot na PKS, v tem vrstnem redu. Ta mehanizem so predlagali za malonamatno in benzoatno začetno enoto v biosintezi tetraciklina in enetrocina, v tem vrstnem redu. Dodatne PKS podenote, ki vključujejo ketoreduktaze, ciklaze in aromataze, določajo vzorec zvitja nastajajočega poli-β-keto intermediata. Na koncu pa polifenole obdelajo še encimi poznih stopenj biosinteze: oksigenaze, glikozil- in metil-transferaze (Hertweck in sod., 2007).



Slika 9: Biosinteza aromatskih poliketidov (Hertweck in sod., 2007)
 Figure 9: Biosynthesis of aromatic polyketides (Hertweck et al. sod., 2007)



Slika 10: Strukture alternativnih začetnih enot v biosintezi aromatskih poliketidov (PubChem..., 2013)
 Figure 10: Structures of alternative starting units in the biosynthesis of aromatic polyketides (PubChem..., 2013)

2.3 MODIFIKACIJE AROMATSKIH POLIKETIDOV V POZNIH STOPNJAH BIOSINTEZE

2.3.1 Metiltransferaze

Metiltransferaze kot kofaktor navadno uporabljajo S-adenozil-L-metionin (SAM) in prenesejo njegovo aktivirano metilno skupino na N, C ali O atom različnih tarčnih molekul. Določili so več kot 20 aminokislinskih sekvenc, ki naj bi delovale kot metiltransferaze, ki so udeležene v biosintezi aromatskih poliketidov pri bakterijah rodu *Streptomyces*. Stopnja aminokislinske ohranjenosti med temi encimi je relativno nizka. Delovanje nekaterih od teh genov so določili z eksperimenti genske inaktivacije in naknadnega določanja struktur metabolitov, ki so jih proizvajale te mutante. Razrešili so pa tudi kristalne strukture nekaterih metiltransferaz (Hertweck in sod., 2007). Ohranjeni motivi, ki so vpleteni v vezavo substrata in kofaktorja SAM, so trije. Motiv I (VLDVGCGKG) je bogat z glicini in je najbolj ohranjen med različnimi metiltransferazami. Od motiva II (DVVLLSFVL) je ponavadi oddaljen za 36-90 aminokislinskih ostankov. Motiv III (ALEPGGGRLLV) se navadno nahaja 12-38 aminokislin od konca motiva II (Kagan in Clarke, 1994; Lozano in sod., 2000). Na N-

terminalnem delu proteina je SAM vezavna domena, na C-terminalnem delu pa domena za vezavo substrata (Martin in McMillan, 2002). OxyF je od SAM odvisna metiltransferaza, ki v biosintezi OTC na mesto C6 pretetramida doda metilno skupino (Zhang in sod., 2007). OxyT je tudi od SAM odvisna *N,N*-dimetiltransferaza, ki v biosintezi OTC dimetilira amino skupino na C4 (Zhang in sod., 2008). MtmMII je tudi od SAM odvisna metiltransferaza, ki v biosintezi mitramicina (aureolična kislina) metilira mesto C10 (Lozano in sod., 2000). ChdMI in ChdMII sta potencialni metiltransferazi, udeleženi v biosintezo CHD. ChdMI je homologna metiltransferazi OxyF in je zelo verjetno odgovorna za metilacijo CHD na mestu C6, medtem ko je ChdMII homologna MtmMII in je najverjetneje odgovorna za metilacijo atoma C9 na molekuli CHD (Petković in sod., 2013).

2.3.2 Oksigenaze

Oksigenaze so ključne za široko strukturno raznolikost poliketidov in njihovo biološko aktivnost, saj bistveno vplivajo na naboј in posledično topnost končne strukture. V splošnem ti encimi katalizirajo vgradnjo kisika v substrat. Delimo jih na monoooksigenaze in dioksigenaze, odvisno od števila kisikovih atomov, ki jih vgradijo. Poznamo različne tipe oksigenaz, ki imajo vlogo pri modifikacijah v poznih stopnjah biosinteze: citokrom P-450 monoooksigenaze, od flavina odvisne mono- in di-oksigenaze ter antron oksigenaze. Ti encimi katalizirajo različne reakcije: hidroksilacijo, epoksidacijo, tvorbo kinonov in oksidativno prerazporeditev tipa Baeyer–Villiger ali Favorskii (Torres Pazmino in sod., 2010; Xiang in sod., 2004). Oksigenaze se zelo razlikujejo v svojem načinu delovanja, potrebi po kofaktorjih in stopnji fleksibilnosti za substrat. Od flavina odvisne oksigenaze imajo pogosto visoko homologijo znotraj dveh regij aminokislinskih sekvenc. Prva regija, ki se ponavadi nahaja zraven N-terminalnega konca proteina, naj bi predstavljala mesto za vezavo adenozinskega dela kofaktorja FAD, drugi motiv pa je povezan z vezavo flavinskega dela FAD (Hertweck in sod., 2007). N-terminalni konec od flavina odvisnih oksigenaz vsebuje značilno ohranjeno sekenco G-X-G-2X-G-3X-A-6X-G (Mason in Cammack, 1992). OxyL, OxyE in OxyS so od flavina odvisne oksigenaze, udeležene v biosintezi OTC. OxyL je dioksigenaza, ki katalizira oksidacijo C12a in C4. OxyE pa je pomožna oksigenaza, odgovorna za bolj učinkovito C4 hidroksilacijo (Wang in sod., 2009; Zhang in sod., 2008). OxyS katalizira dve zaporedni hidroksilaciji ATC (anhidrotetraciklin) na mestih C6 in C5 z nasprotno stereokemijo (Wang in sod., 2013). Za oksigenazo OxyG, ki je tudi udeležena v biosintezo OTC, predvidevajo, da je majhna oksigenaza, ki tvori kinon iz obroča A (Pickens in Tang, 2010; Zhang in sod., 2006). V sekvenirani genski skupini za biosintezo CHD najdemo tri gene za potencialne oksigenaze ChdOI, ChdOII in ChdOIII, ki so homologne OxyE, OxyL ozziroma OxyG (v tem vrstnem redu) in so verjetno odgovorne za hidroksilacijo na mestu C4, hidroksilacijo na mestu C12a/C4 ozziroma

oblikovanje kinona iz obroča A (v tem vrstnem redu) (Petković in sod., 2013).

2.3.3 Glikoziltransferaze

Veliko bakterijskih aromatskih poliketidov vsebuje deoksisladkorje kot osrednje strukturne elemente. Tvorbo in vezavo teh sladkorjev (glikozidov) katalizirajo številni encimi, ki jih kodirajo geni, ki se nahajajo v biosinteznih genskih skupinah poleg ostalih genov, odgovornih za biosintezo poliketidov (Hertweck in sod., 2007). Glikozidne enote so lahko na aglikon vezane kot monosaharidi, disaharidi ali oligosaharidi spremenljivih dolžin preko C-, N- ali najpogosteje O-glikozilacije. Te glikozidne enote na ustrezen aglikon prenesejo glikoziltransferaze, ki so ponavadi specifične za določeno glikozidno enoto, aglikon in mesto glikozilacije. Najbolj pogoste glikozidne enote za glikozilacijo so 6-deoksiheksoze (včasih tudi 2-deoksiheksoze), ki nastanejo večinoma iz D-glukoze v postopnih reakcijah, ki jih katalizirajo dNTP-D-heksozne sintaze, dehidrataze, epimeraze, deoksigenaze, transaminaze in metilaze (Mendez in Salas, 2001). To so npr. MtmGI, MtmGII, MtmGIII in MtmGIV glikoziltransferaze, ki sodelujejo v biosintezi mitramicina. MtmGIV je najverjetneje odgovorna za dodajanje prvega (D-olivoze) in tretjega glikozida (D-mikaroze) na mesto C12a mitramicina. Vse te glikoziltransferaze vsebujejo zraven C-terminalnega dela proteina razmeroma ohranjen značilen motiv (P-X-NVR-X-V-3X-P-3X-LLP-X-C-4X-HHG-GT-2X-TA-3X-G-X-P) (Blanco in sod., 2000; Fernandez in sod., 1998; Wang in sod., 2011a). V genski skupini za biosintezo CHD najdemo tudi gen za potencialno glikoziltransferazo ChdGIV, homologno MtmGIV. Ker molekula CHD ne vsebuje glikozidnih enot, sklepamo, da glikoziltransferaza ChdGIV najbrž ni aktivna ali pa se sploh ne prepisuje (Petković in sod., 2013).

2.3.4 Halogenaze

Chl oziroma CtcP je od flavina odvisna halogenaza, ki v biosintezi CTC na mesto C7 doda klorovo skupino. Vse od flavina odvisne halogenaze potrebujejo reducirano obliko molekule FADH₂, kloridni ion in kisik kot ko-substrate za reakcijo halogenacije (Chen in van Pee, 2008; Dairi in sod., 1995; van Pee in Patallo, 2006; Zhu in sod., 2013). Mehanizem halogenacije se začne z reakcijo reduciranega flavinskega kofaktorja z molekularnim kisikom v prvem aktivnem mestu encima. Nastali peroksiflavin reagira s kloridnim ionom in tako nastane hipoklorova kislina, ki skozi tunel difundira do drugega aktivnega mesta. Tukaj reagira z ohranjenim lizinškim ostankom in tvori metastabilen lizin-kloramin, ki je donor kloridnega iona za klorinacijo substrata (Neumann in sod., 2010). Vse od flavina odvisne halogenaze imajo dva ohranjena motiva. Prvi motiv (GxGxxG), ki predstavlja mesto za vezavo kofaktorja FAD, je lociran zraven N-

terminalnega dela proteina. Drug zelo ohranjen motiv (WxWxIP), ki je lociran nekje v sredini encima, vsebuje pa dva triptofanska ostanka, ki naj bi blokirala vezavo substrata zraven flavina in tako preprečevala encimu, da bi kataliziral reakcijo monoooksigenacije (Chen in van Pee, 2008).

2.3.5 Transaminaze

OxyQ je od piridoksal fosfata (PLP - vitamin B6) odvisna aminotransferaza, ki v biosintezi OTC na mesto C4 doda amino skupino. Substrat za OxyQ je keto skupina na C4 atomu 4-keto-ATC, nastanek katere je rezultat delovanja oksigenaze OxyL (Zhang in sod., 2008). Gen *chdN* iz genske skupine za biosintezo CHD kodira potencialno od PLP odvisno aminotransferazo. Zelo verjetno na mesto C4 CHD doda amino skupino, ki pa je obratne stereokemije kot amino skupina na C4 mestu OTC. S to razliko se sklada tudi dejstvo, da je med obema aminotransferazama relativno nizka stopnja homologije (Petković in sod., 2013; Lukežič in sod., 2013). Sivaraman in sod. (2001) so določili kristalno strukturo histidinol fosfat aminotranferaze (HisC) iz *E. coli* in določili ohranjene aminokislinske ostanke, ki verjetno interagirajo s kofaktorjem PLP: Tyr⁵⁵, Asn¹⁵⁷, Asp¹⁸⁴, Tyr¹⁸⁷, Ser²¹³, Lys²¹⁴ in Arg²²². Večino teh ostankov najdemo tudi pri OxyQ in ChdN. PLP v kombinaciji z alfa-aminokislino tvori Schiffovo bazo, ki predstavlja substrat za transaminacijo (Sivaraman in sod., 2001).

2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE AROMATSKIH POLIKETIDOV

Celice, ki so pod vplivom različnih okoljskih stresnih dejavnikov, za biosintezo sekundarnega metabolita potrebujejo še dodatno energijo in vir gradnikov. Zaradi tega so biosinteze poti, vpletene v biosintezo sekundarnih metabolitov, pod strogo regulacijo notranjih in zunanjih signalov, ki pa pogosto vplivajo tudi na morfološko diferenciacijo celic. Začetek produkcije sekundarnega metabolita se zgodi v poznih eksponentnih ali zgodnjih stacionarnih stopnjah rasti v tekoči kulturi, kar kaže na časovno kontrolo produkcije biološko aktivnih učinkovin. Takšno kontrolo produkcije sekundarnih metabolitov uravnava različni mehanizmi in regulatorni elementi. Glede na opaženo akumulacijo mRNA tekom rasti so sklepali, da poteka kontrola na transkripcijskem nivoju preko ustreznih transkripcijskih faktorjev. Aktivnost teh faktorjev pa kontrolirajo drugi regulatorni mehanizmi na višji stopnji. Vsi ti regulatorni elementi aktivno medsebojno vplivajo drug na drugega v zelo kompleksnem in umreženem sistemu regulacije, kar zagotavlja fleksibilno in občutljivo kontrolo genskega izražanja (Hertweck in sod., 2007).

Nekateri regulatorni proteini simultano vplivajo tako na sekundarni metabolizem kot na

morfološko diferenciacijo. Pri *S. coelicolor* so opisali mutacije v genih, ki so jih poimenovali *bld* - okrajšava za plešast (angl. bald), saj so kolonije z mutiranimi geni iz skupine *bld* brez zračnega micelija in posledično ne oblikujejo spor. Najbolje proučen izmed genov *bld* je lokus *bldA*, ki kodira malo tRNA za levcinski kodon UUA. Ta kodon je izjemno redek v GC-bogatih genomih aktinomicet in je vpletен v regulacijo genskega izražanja preko translacijske selekcije mRNA. Leskiw in sod. (1993) so pokazali, da mora primarni transkript *bldA* skozi post-transkripcijsko modifikacijo in se aktivna tRNA oblikuje le na začetku stacionarne faze, ki sovpada z začetkom produkcije biološko aktivnih učinkovin (Hertweck in sod., 2007; Leskiw in sod., 1993). Obstajajo tudi regulatorji, ki vplivajo hkrati na sekundarni metabolizem in hitrost rasti, kot npr. *relA* iz *S. coelicolor*, ki kodira ppGpp (gvanozin tetrafosfat) sintetazo. ppGpp ima regulatorno funkcijo pri iniciaciji biosinteze aktinorodina v pomanjkanju dušika (Hertweck in sod., 2007; Hesketh in sod., 2001).

Med splošne signale, ki vplivajo na sekundarni metabolizem štejemo tudi γ -butirolaktone. Najbolje opisan je A-faktor iz *S. griseus*, ki je vpletен v regulacijo začetka biosinteze streptomicina (Horinouchi in sod., 2001). Primere vpletenosti γ -butirolaktonov v biosintezo naravnih produktov PKS tipa II so opisali pri *S. coelicolor* v biosintezi aktinorodina in pri *S. venezuelae* v biosintezi kloramfenikola (Cm) in jadomicina B (Takano in sod., 2000; Wang in Vining, 2003). Večina specifičnih transkripcijskih regulatorjev metabolnih poti, ki vplivajo na sekundarni metabolizem, spada v družino streptomicetnih antibiotičnih regulatornih proteinov (SARP). Proteine SARP so identificirali v številnih genskih skupinah za biosintezo aromatskih poliketidov: aktinorodina, daunorubicina, jadomicina B, landomycina A in E ter alpomicina. Pri *S. coelicolor* so ugotovili, da nekateri proteini SARP ne delujejo le znotraj pripadajoče biosinteze genske skupine, ampak imajo tudi pleiotropni vpliv na izražanje drugih genov za biosintezo sekundarnih metabolitov PKS tipa II. V nasprotju s pozitivnimi regulatorji pa je znanih le nekaj regulatornih proteinov, ki zavirajo biosintezo sekundarnih metabolitov PKS tipa II, npr. AbsA2 pri *S. coelicolor* in JdrR2 pri *S. venezuelae* (Hertweck in sod., 2007).

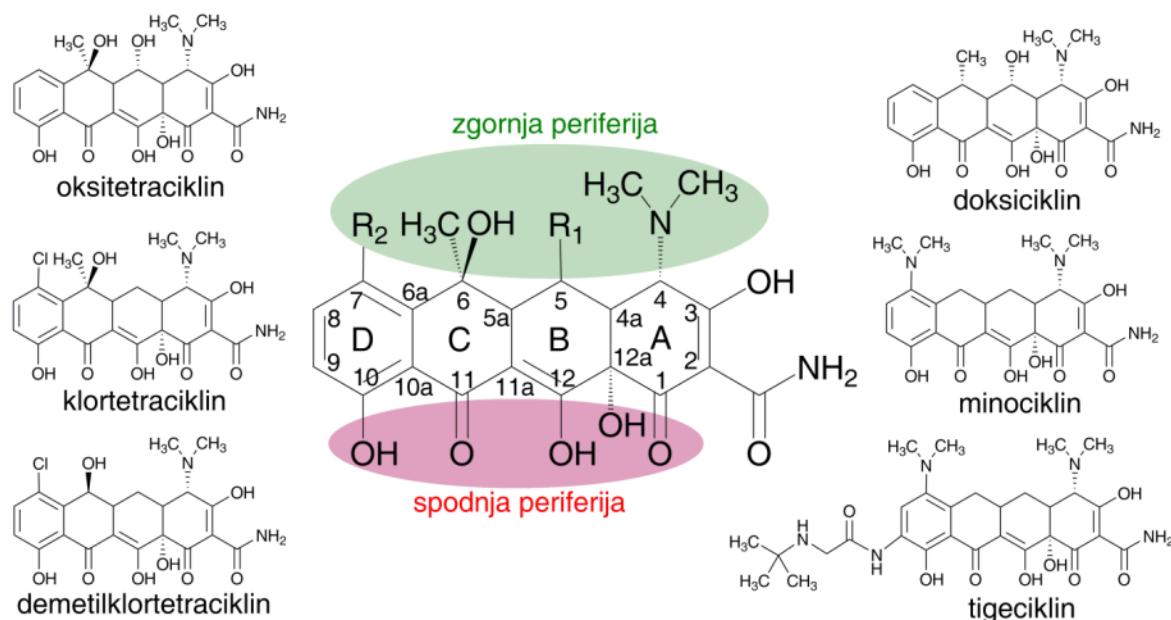
Regulacija sekundarnega metabolizma lahko poteka še preko post-translacijskih modifikacij biosinteznih encimov, ki so jih opazili pri raziskovanju proteoma *S. coelicolor*. Skoraj polovica encimov, ki katalizirajo biosintezo aktinorodina pri *S. coelicolor* je podvržena modifikacijam s kovalentno vezavo majhnih molekul (acetilne ali adenililne skupine) ali delno proteolitično razgradnjo z odstranitvijo vodilnih peptidov (Hesketh in Chater, 2003; Hesketh in sod., 2002).

2.5 TETRACIKLINI

Osnovno strukturo tetraciklinov predstavljajo širje linearne povezane obroči iz šestih C-atomov, na to strukturo pa so pripete različne funkcionalne skupine (Slika 11). Tetracikline so odkrili v 40-ih letih prejšnjega stoletja v sklopu presejalnih programov naravnih produktov in ker so imeli malo stranskih učinkov ter ugodne farmakološke lastnosti, se je njihova terapevtska uporaba začela že v 50-ih letih prejšnjega stoletja. Približno istočasno so ugotovili, da so tetraciklini zelo uporabni kot rastni promotorji pri živalih in so jih ekstenzivno uporabljali v kmetijstvu v Severni Ameriki. Delujejo proti širokemu spektru tako po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij, znotrajceličnim klamidijam, mikoplazmam in rikecijam. Te protibakterijske učinkovine so kot prve poimenovali za široko spektralne in jih ekstenzivno uporabljali tako v humani kot veterinarski medicini skozi desetletja (Brodersen in sod., 2000; Chopra in Roberts, 2001; Roberts, 2003; Zakeri in Wright, 2008). Kasneje so jih začeli uporabljati proti evkariontskim protozojskim parazitom in za zdravljenje različnih neinfekcijskih stanj, ponavadi v subterapevtskih koncentracijah (npr. proti aknam) in v daljših časovnih obdobjih (npr. 1 leto). Tetraciklini so učinkoviti za preventivo in zdravljenje malarije, ki jo povzroča *Plasmodium falciparum*, vključujoč proti meflokinonu rezistentne (Roberts, 2003).

Prva generacija tetraciklinov vključuje naravne antibiotike: tetraciklin, OTC, CTC in 6-demetylklortetraciklin (DMCTC) (Slika 11). Intenzivna produkcija in uporaba tetraciklinov prve generacije v humani in veterinarski medicini je povzročila pojav bakterijske rezistence proti tetraciklinom. Resnost bakterijske rezistence je zastavila nujno po razvoju novih tetraciklinskih derivatov, ki bi se izognili tem mehanizmom rezistence. Druga generacija tetraciklinov vključuje doksiciklin in minociklin (Slika 11), ki sta dva najbolj pogosto uporabljenih polsinteznih tetraciklinskih antibiotikov. Ta analoga sta bolj lipofilna od naravnih tetraciklinov in se hitreje absorbirata. Zaradi svojega širokega spektra antibiotiške učinkovitosti doksiciklin uporabljamo za zdravljenje vrste infekcij, vključno z antraksom, malarijo, klamidijskimi infekcijami, pljučnico, Lymsko boreliozo, kolero, sifilisom, kugo, parodontalnimi infekcijami, itd. Minociklin tudi kaže širok spekter delovanja in ga pogosto uporabljamo za zdravljenje hudičnih primerov aken, pa tudi za zdravljenje istih infekcij kot doksiciklin. Poskusi za razvoj tetraciklinskih analogov, ki bi premagali nove mehanizme rezistence in imeli boljše farmakološke lastnosti, so vodili v razvoj glicilciklinov (tretja generacija tetraciklinov). Najmočnejši glicilciklin je 9-tert-butylglicilamido derivat minociklina, znan tudi kot tigeciklin (Slika 11). Protibakterijska aktivnost glicilciklinov je primerljiva z aktivnostjo tetraciklinov prve generacije, so pa aktivni tudi proti patogenom, ki so odporni proti naravnim tetraciklinom. Tigeciklin je aktivni proti: MRSA, proti vankomicinu odpornim enterokokom, proti penicilinu odpornim sevom *Streptococcus pneumoniae* in po Gramu negativnim patogenom (še posebno *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter*) (Griffin in sod., 2010; Hertweck in sod.,

2007; Nelson in Levy, 2011; Pickens in Tang, 2010).



Slika 11: Strukture tetraciklinskih analogov (PubChem..., 2013)

Figure 11: Structures of tetracycline analogues (PubChem..., 2013)

2.5.1 Način delovanja tetraciklinov

Tetraciklini preidejo skozi zunanji membrano po Gramu negativnih enteričnih bakterij preko OmpF in OmpC porinskih kanalov kot pozitivno nabiti kationi (verjetno v koordinacijskem kompleksu z magnezijem). V periplazmi kompleks disociira, nenabite lipofilne sproščene molekule tetraciklina pa difundirajo skozi lipidni dvosloj notranje (citoplazemske) membrane. Podobno poteka tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah: elektronevtralna lipofilna oblika prečka citoplazemske membrano. Znotraj citoplazme tetraciklinske molekule najbrž spet kelirajo, saj sta notranji pH in koncentracija divalentnih kovinskih ionov višja kot zunaj celice. Verjetno je tudi aktivna oblika spojine, ki se veže na ribosom, magnezij-tetraciklinski kompleks (Chopra in Roberts, 2001).

Tetraciklini delujejo bakteriostatično: reverzibilno se vežejo na 30S ribosomsko podenoto in inhibirajo sintezo proteinov preko preprečevanja vezave aminoacilirane tRNA na mesto A (akceptorsko) 30S ribosomske podenote. Obstajajo pa tudi sekundarna mesta vezave tetraciklinov znotraj male in velike ribosomske podenote (Chopra, 1994; Griffin in sod., 2010; Hertweck in sod., 2007; Nelson, 1998; Pioletti in sod., 2001). Odsotnost protievkariontske aktivnosti izvira iz relativno šibke tetraciklinske inhibicije proteinske sinteze z 80S ribosomi. Vseeno pa tetraciklini inhibirajo proteinsko sintezo v

mitohondrijih, ki vsebujejo 70S ribosome, kar je eden od mogočih razlogov za njihovo protiparazitsko aktivnost (Chopra in Roberts, 2001).

Tetraciklini so fototoksični - povzročajo lahko bolečo fotosenzitizacijo pri nekaterih ljudeh, ki jih uporabljajo in so izpostavljeni svetlobi. Na svetlobi tvorijo toksične tetraciklinske zvrsti in kisikove radikale, ki lahko poškodujejo makromolekule. Tetraciklini lahko povzročijo hemolizo eritrocitov, poškodbo celičnih membran, oksidirajo maščobne kisline in se foto-vgradijo v ribosome preko tvorbe prostih radikalov in singlet kisikov. Še vedno pa so vsi ti procesi odvisni od svetlobe. V biološkem okolju lahko tetraciklini samo-oksidirajo tudi v temi v prisotnosti dvovalentnih ionov (npr. Co^{2+}) in tvorijo reaktivne zvrsti in difuzne citotoksine (Nelson, 1998).

2.5.2 Povezava med strukturo in aktivnostjo tetraciklinov

Za tetracikline je značilna edinstvena amido skupina na atomu C2 in linearno povezan tetraciklinski skelet, ki ima veliko dodatnih funkcionalnih skupin in tako tvori naftacenski karboksiamidni sistem obročev (obroči DCBA), kjer je navadno le obroč D aromatski (Slika 11). Najenostavnejši tetraciklin, ki še ima protibakterijsko aktivnost, je 6-deoksi-6-demetyl-tetraciklin (minimalni farmakofor). Oksidirana spodnja periferija molekule vključuje keto-enolno konfiguracijo na pozicijah C11, C11a in C12, ki je odgovorna za kelacijo divalentnih ionov. Poleg teh skupin so za interakcijo s 30S ribosomsko podenoto pomembne še: hidroksilni skupini na atomih C10 in C12a ter eksociklična karboksiamido skupina na poziciji C2. Modifikacije v spodnji periferiji (npr. na C1 in C10-C12a) zmanjšajo tako antibiotsko kot ne-antibiotsko aktivnost. Nasprotno pa so deli zgornje periferije tetraciklinov tolerantni na kemijske spremembe in so zato tarča polsinteznih modifikacij, ki lahko vodijo v nastanek molekul z večjo aktivnostjo proti številnejšim biološkim tarčam. Glede na obstoječa razumevanja vsi tetraciklinski antibiotiki za bioaktivnost potrebujejo dvakrat metilirano amino skupino na C4 atomu tetraciklinskega skeleta. Po drugi strani pa odstranitev dimetilamino skupine s C4 atoma preko sinteznih modifikacij poveča aktivnost proti ne-antibiotskim tarčam (Chopra in Roberts, 2001; Nelson, 1998; Pickens in Tang, 2010; Zakeri in Wright, 2008).

Tetraciklini niso statične molekule, saj pri različnih pH-jih spreminja svojo molekulsko konformacijo. Obstajajo lahko v dveh možnih konformacijah (nagib obroča A preko rotacije okoli vezi C4a-C12a), ki vplivajo na biološko aktivnost. Neionizirana iztegnjena lipofilna oblika lahko nemoteno prečka biološke membrane, vendar zelo verjetno ni konformacija, ki je odgovorna za bioaktivnost. Pri fiziološkem pH-ju prevladuje zwitterionska zvita oblika (protonirana dimetilamino skupina, negativni naboj razprtjen po trikarbonilnem sistemu). Na molekularnem nivoju in v biološkem okolju, kjer so možne

nizke vrednosti pH in visoke koncentracije vodikovih protonov, je razmerje v prid zwitterionski obliki, ki je potrebna konformacija za vezavo na makromolekularne tarče - tako antibiotika kot ne-antibiotika. Tetraciklini z močno afiniteto kelirajo kovinske ione. Skozi krvno plazmo se večinoma prenašajo v obliki Ca^{2+} in Mg^{2+} kelatov. Kelirani tetraciklini lahko delujejo kot prenašalci ali ionofori, ki prenašajo kalcijeve ione skozi lipofilne faze (celične membrane) do bioloških tarč. Ko je kalcij enkrat v celici, deluje kot sekundarni obveščevalec, ki vpliva na številne biološke poti kot so npr. metabolne reakcije, sekretorni procesi, aktivacija ali inhibicija receptorjev, celična delitev in membranski transport bioloških efektorskih molekul (Nelson, 1998).

2.5.3 Odpornost proti tetraciklinom

Odpornost kliničnih izolatov proti tetraciklinom so opazili že kmalu po njihovi prvi uporabi. Opazili so tudi soobstoj tetraciklinskih rezistenc in rezistenc proti strukturno drugačnim antibiotikom - pojav bakterij, odpornih na več zdravil (angl. "multidrug resistant bacteria"). V naslednji desetletjih se je odpornost proti tetraciklinom hitro širila med patogenimi bakterijami kot rezultat horizontalnega prenosa genov za rezistenco na mobilnih elementih kot so plazmidi in transpozoni. Tako kot pri večini antibiotikov se lahko odpornost proti tetraciklinom pojavi na različne načine: aktivno črpanje molekul tetraciklina iz celice, produkcija proteinov za zaščito ribosomov, zmanjšana prepustnost za tetracikline, modifikacija tarče z mutacijo in encimska inaktivacija tetraciklinov (Nelson in Levy, 2011; Thaker in sod., 2010). Prva dva mehanizma trenutno prevladujeta v kliničnih izolatih, odpornih proti tetraciklinom. Črpanje molekul iz celice poteka z membranskimi črpalkami (npr. Tet(A), Tet(B), Tet(C)); pri zaščiti ribosomov pa interakcija med ribosomom in proteini zaščite (najbolj pogosta sta Tet(M) in Tet(O)) povzroči, da molekula tetraciklina odpade iz ribosoma in ne more več preprečevati vezave aminoacil-tRNA na ribosomsko akceptorsko mesto (Chopra, 1994; Nelson in Levy, 2011; Thaker in sod., 2010). Regulacija izražanja genov za membranske črpalke je pod vplivom represorskih proteinov iz družine TetR. Proteini TetR se vežejo na operatorsko regijo navzgor od genov, ki kodirajo membranske črpalke in negativno regulirajo sintezo proteinov za črpanje iz celice. Ko so molekule tetraciklina prisotne v celici, se vežejo na TetR, kar povzroči konformacijsko spremembo, ki oslabi njegovo interakcijo z DNA. To pa vodi v odcepitev TetR z operatorske regije, kar omogoča sintezo proteinov za črpanje iz celice. Na ta način se geni za rezistenco izražajo ravno ob pravem času, kar je le takrat, ko je antibiotik prisoten v celici. Interakcija tetraciklina s TetR ni omejena na del molekule, ki je esencialna za interakcijo z ribosomom, ampak interakcije potekajo iz vseh smeri tetraciklinske strukture. To pomeni, da lahko modifikacija tetraciklinske strukture povzroči inhibicijo interakcije s TetR (in se tako vzdržuje represija izražanja proteinov za črpanje iz celice), medtem ko antibiotična aktivnost nove modificirane molekule ostane (Thaker in

sod., 2010). Tudi bakterije, ki proizvajajo tetracikline se morajo zaščititi pred njimi. Geni za antibiotične rezistence so ponavadi povezani z geni za produkcijo antibiotikov. *S. rimosus* (producent OTC) ima dve vrsti tetraciklinskih rezistenc. Eno predstavlja protein OtrA, ki je vezan na ribosom in ga zaščiti pred tetraciklinom. Drugi gen kodira protein OtrB, ki črpa molekule tetraciklina ven iz celice. Obstaja še tretji protein - OtrC, ki naj bi tudi imel vlogo pri črpanju iz celic (Speer in sod., 1992; Thaker in sod., 2010).

2.5.4 Ostali ne-protibakterijski učinki tetraciklinov

Tetraciklini imajo številne ne-protibakterijske učinke, ki vključujejo protivnetne, imunosupresivne, antiapoptočne in antiangiogene, inhibicijo lipazne in kolagenazne aktivnosti, povečano celjenje ran in inhibicijo metastaze. Uporaba antibiotika pri neinfektivnih stanjih se razlikuje od klasične protibakterijske terapije, saj zdravljenje neinfektivnih stanjih ponavadi traja leta in s subterapevtskimi koncentracijami, če primerjamo z zdravljenjem s terapevtskimi koncentracijami, ki traja v primeru bakterijskih infekcij nekaj dni (Garrido-Mesa in sod., 2013; Roberts, 2003; Sapadin in Fleischmajer, 2006).

Tako tetraciklini kot kemijsko modificirani tetraciklini (CMT) brez antibiotske aktivnosti inhibirajo kolagenazno aktivnost in številne druge matriks metaloproteinaze (MMP). Z inhibicijo kolagenolitičnih encimov inhibirajo razgradnjo vezivnega tkiva in kostnine. Prednost CMT je odsotnost razvoja rezistentnih mikroorganizmov med daljšo uporabo (Golub in sod., 1987; Golub in sod., 1991). Učinkovitost inhibicije razgradnje vezivnega tkiva s CMT so testirali v živalskih modelih za različne bolezni, vključno z revmatoidnim artritisom, osteoporozo, anevrizmo, perodontitisom in rakom (Liu in sod., 2002).

Minociklin in doksiciklin v živalskih modelih inhibirata angiogenezo zaradi tumorjev in apoptoze. V kliniki se tetracikline in njegove analoge uporablja ali testira za zdravljenje kožnih bolezni (akne, rosacea, dermatozza, sarkoidoza, Kaposijev sarkom), avtoimunskih bolezni (revmatoidni artritis, skleroderma, vnetje črevesja), rakavih obolenj, srčno-žilnih bolezni in perodontitisa (Garrido-Mesa in sod., 2013; Sapadin in Fleischmajer, 2006). Minociklin se že dolgo varno uporablja kot antibiotik in protivnetno zdravilo proti aknam in artirtisu (Stirling in sod., 2005). COL-3 (Metastat) je CMT in je obetaven kandidat za zdravljenje Kaposijevega sarkoma, povezanega z AIDS-om. Uspešno je prestal drugo fazo kliničnih testiranj (Thaker in sod., 2010). Tetraciklini (vključno s polsinteznima analogoma minociklin in doksiciklin) so koristni dodatki v perodontalni terapiji, ker zavirajo rast po Gramu negativnih patogenov in hkrati pomagajo pri regeneraciji perodontalnega tkiva (Golub in sod., 1987; Golub in sod., 1991).

Številne študije so pokazale, da ima minociklin nevroprotективne učinke pri uporabi v živalskih modelih s poškodovanim centralnim živčnim sistemom in nevrodegenerativnimi boleznimi. Minociklin ima tudi pozitivne učinke pri zmanjševanju vnetja živčevja in preprečevanju celične smrti. Minociklin so uspešno uporabili na živalskih modelih ishemije, Parkinsonove bolezni, Huntingtonove bolezni, Alzheimerjeve bolezni, multiple skleroze in poškodbe možganov (Garrido-Mesa in sod., 2013; Stirling in sod., 2005).

Tetraciklin in doksiciklin zmanjšata infektivnost prionov (ki povzročajo npr. Creutzfeldt–Jakobovo bolezen), boljša od drugih zdravil sta zaradi netoksičnosti in sposobnosti prečkanja bariere med krvjo in možgani (Zhang in Demain, 2005), sedaj pa sta v fazi kliničnih testiranj (Forloni in sod., 2009). Sriram in sod. (2007) so s kombiniranjem tetraciklinov in fluorokinolonov sintetizirali tetraciklinske derivate, ki delujejo tako proti HIV kot proti *Mycobacterium tuberculosis* (Sriram in sod., 2007). Za številne CMT, ki so jih modificirali z namenom, da bi odpravili protibakterijsko aktivnost, so ugotovili, da so pridobili protiglivno aktivnost (Liu in sod., 2002). Tetraciklinski derivati inhibirajo rast protozojskih parazitov kot so *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum* in *Leishmania major* (Speer in sod., 1992).

2.5.5 Naravni tetraciklini

Primarne tetracikline (tetraciklin, OTC, CTC, DMCTC) proizvajajo različne streptomacetne vrste, izolirane iz zemlje med presejalnim programom naravnih produktov tako industrijskih kot akademskih raziskovalnih skupin. Večino komercialno pomembnih tetraciklinov proizvajajo sevi *S. aureofaciens* and *S. rimosus*, uporabili so pa že tudi druge vrste (Petković in sod., 2006).

CTC proizvaja bakterija *S. aureofaciens*, ki ga je leta 1948 odkril Benjamin Duggar in s tem zaznamoval začetek zgodovine tetraciklinske družine. Zaradi svoje rumene barve so ga najprej poimenovali Aureomycin. Vrednost CTC so hitro prepoznali in patentirali v podjetju American Cyanamid (Pickens in Tang, 2010). *S. aureofaciens* proizvaja tudi tetraciklin, DMCTC in 6-demetyl-tetraciklin (Chopra in Roberts, 2001).

Leta 1950 so v podjetju Pfizer objavili odkritje antibiotika Terramycin, ki ga proizvaja *S. rimosus*, in kasneje preimenovali v OTC (Pickens in Tang, 2010). *S. rimosus* proizvaja tudi tetraciklin (Chopra in Roberts, 2001).

Obstajajo tudi drugi tetraciklinski naravni produkti, ki so jih odkrili pred kratkim in imajo zelo zanimive strukturne značilnosti in bioaktivnost. V začetku 90-ih let prejšnjega stoletja so pri *Streptomyces* sp. SF2575 odkrili tetraciklin SF2575, ki ima na mestu C4 salicilino

kislino in C-deoksi-sladkor na mestu C9. Ta tetraciklin kaže antibiotsko aktivnost le proti po Gramu pozitivnim bakterijam, ima pa močno protitumorsko aktivnost proti različnim rakavim celičnim linijam (Hatsu in sod., 1992a; Hatsu in sod., 1992b; Pickens in sod., 2009). Približno v istem času je druga skupina znanstvenikov objavila odkritje daktilociklinov iz *Dactylosporangium* Sp. SC14051. Poleg svoje nove strukture in vzorcev glikozilacije kažejo tudi antibiotsko aktivnost proti po Gramu pozitivnim bakterijam, ki so odporne proti tetraciklinom (Tymiak in sod., 1992). *S. tendae* HKI-179 proizvaja cervimicin C, ki je tudi aromatski poliketidni antibiotik s tetraciklinsko osnovo in modifikacijami z deoksi-sladkorji. Zelo učinkovit naj bi bil proti enterokokom, ki so odporni proti vankomicinu in ima drugačen način delovanja od klasičnih tetraciklinov (Herold in sod., 2004). Tudi gliva *Penicillium viridicatum* proizvaja tetraciklinski antibiotik - viridikatumtoksin. Čeprav je strukturno podoben klasičnim tetraciklinom, pa gre pri zvijanju tega poliketida za drugačen mehanizem (Hutchison in sod., 1973; Pickens in Tang, 2009).

2.6 BIOSINTEZA TETRACIKLINOV

2.6.1 Biosinteza CTC

McCormickova raziskovalna skupina je preko blokiranih mutant in njihovih produktov ter s poskusi dohranjevanja s substratom določila domnevno biosintezno pot CTC (McCormick in Jensen, 1965, 1968, 1969; McCormick in sod., 1968a; McCormick in sod., 1968b; McCormick in sod., 1965; McCormick in sod., 1959; McCormick in sod., 1963a; McCormick in sod., 1962; McCormick in sod., 1963b; Miller in sod., 1956). Dairi in sod. (1995) so klonirali gen za klorinacijo tetraciklina (*chl*) in njegovo vlogo dokazali s komplementacijo mutant, nesposobnih klorinacije (Dairi in sod., 1995). Ryan in sod. (1996) so klonirali gene iz genske skupine za biosintezo CTC, jo sekvenirali in jo uspešno izrazili v *S. lividans* (Ryan in sod., 1996). Pred kratkim so Zhu in sod. (2013) ponovno klonirali in sekvenirali gensko skupino za biosintezo CTC. Poleg tega so pokazali, da je zadnji in tudi omejujoč korak v biosintezi CTC klorinacija tetraciklina, ki jo katalizira od FADH₂ odvisna halogenaza CtcP (Zhu in sod., 2013).

Biosintezo osnovnega skeleta CTC katalizirajo encimi minimalnega PKS: CtcW (KSα), CtcV (KSβ) in CtcU (ACP). Ti encimi so odgovorni za sprejem malonamilne začetne enote in kondenzacijo osmih malonilnih podaljševalnih enot, iz česar nastane amidirana dekaketidna hrbtenica. CtcT je amidotransferaza, ki je odgovorna za biosintezo malonamilne začetne enote. Ketoreduktaza CtcG reducira C9 hrbtenice CTC, nato pa aromataza/ciklaza CtcF zapre prvi obroč (D). Ciklaza CtcD oblikuje obroč C, nastanek obroča B je spontan, oblikovanje obroča A pa naj bi katalizirala ciklaza CtcH. Sledijo

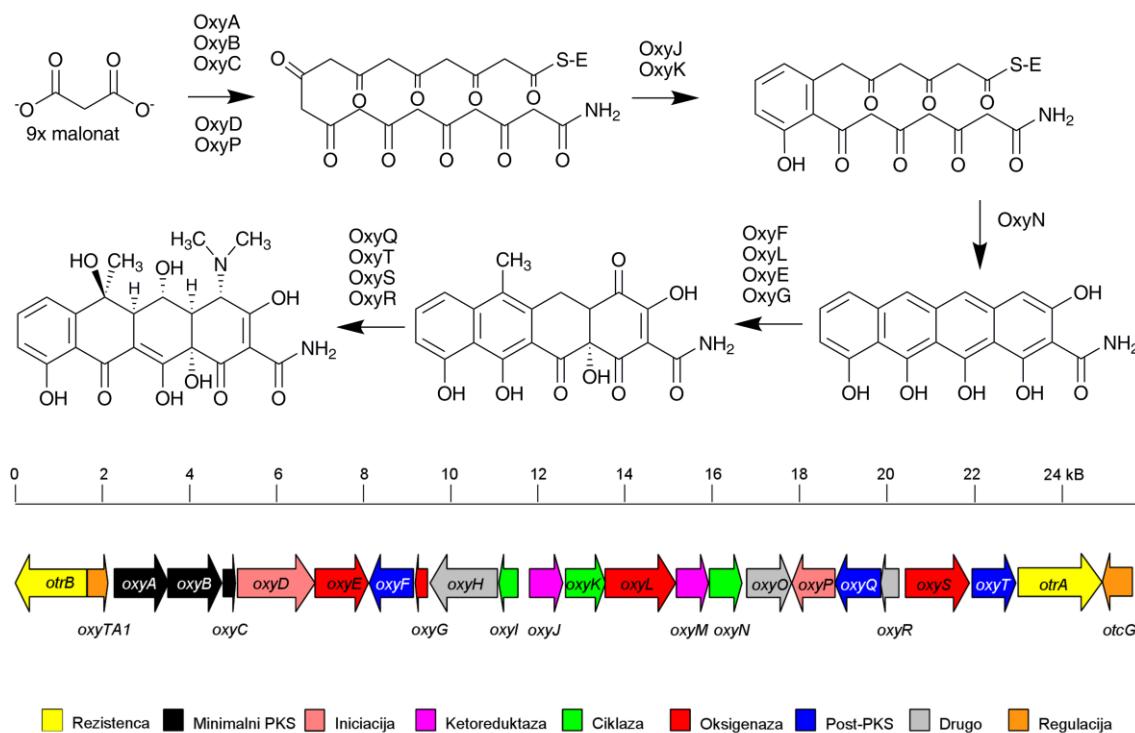
pozne oziroma post-PKS stopnje. Metiltransferaza CtcK na C6 atom doda metilno skupino. Sledi dvojna hidroksilacija obroča A z oksigenazama CtcE in CtcX. Aminotransferaza CtcL katalizira transaminacijo na C4, metiltransferaza CtcO pa dimetilira prej nastalo amino skupino. Oksigenaza CtcN hidroksilira C6 atom, CtcM pa reducira dvojno vez C5a–C11a do nastanka TC. Na koncu halogenaza Chl oziroma CtcP na C7 atom doda klorovo skupino. V halogenacijo je vpletena tudi flavin reduktaza CtcQ, ki reducira FAD v FADH₂ (Dairi in sod., 1995; Ryan, 1999; Wang in sod., 2013; Zhu in sod., 2013).

2.6.2 Biosinteza OTC

V raziskovalnem inštitutu PLIVA in v raziskovalnem centru Pfizer so se ukvarjali z razvojem mutant za komercialno proizvodnjo OTC in skušali razložiti stopnje v biosintezi OTC (Petković in sod., 2006; Rhodes in sod., 1981). Biosintezo OTC so intenzivno raziskali Butler in sod. (1990) ter Binnie in sod. (1989), ki so uspešno klonirali in v *S. lividans* heterologno izrazili gene za biosintezo OTC (Binnie in sod., 1989; Butler in sod., 1990). Zhang in sod. (2006) so sekvenirali celotno gensko skupino za biosintezo OTC in predpostavili vlogo posameznih proteinov (Zhang in sod., 2006). Druge raziskovalne skupine pa so z manipulacijo posameznih biosinteznih genov OTC prišle do različnih "nenaravnih" produktov, ki so pomagali razložiti funkcije posameznih encimov. Petković in sod. (1999) so v *S. rimosus* prekinili gen ki kodira encim OtcD1 (OxyK), odgovoren za ciklizacijo/aromatizacijo poliketidne hrabtenice v biosintezi OTC. Produkti rekombinantnega seva *S. rimosus* s prekinjenim genom so bili poliketidi krajsih dolžin, kar nakazuje na to, da ima OxyK vlogo tudi pri določanju dolžine poliketidne verige (Petković in sod., 1999). Perić-Concha in sod. (2005) pa so prekinili gen za ATC oksigenazo OtcC (OxyS), ki je v biosintezi OTC potrebna za C6-hidroksilacijo antraciklinske strukture. Rekombinantni sev *S. rimosus* s prekinjenim genom je proizvedel nov poliketid, ki pa je bil za dva C-atoma krajiš od OTC. To pomeni, da ATC oksigenaza pomembno vpliva tudi na sposobnost minimalnega PKS glede določanja pravilne dolžine poliketidne verige (Perić-Concha in sod., 2005). Leta 2007 so Zhang in sod. pokazali, da sta za kompletno ciklizacijo in aromatizacijo tetraciklina potreben le dve ciklazi (OxyK in OxyN). Oblikovanje zadnjega (A) obroča pri poliketidih z amidno začetno enoto je spontana reakcija, v nasprotju s poliketidi z acetilno začetno enoto, pri katerih je za ciklizacijo zadnjega obroča potrebna posebna ciklaza (Zhang in sod., 2007). Zhangova raziskovalna skupina je leta 2008 naredila vrsto poskusov, s katerimi so identificirali minimalni set encimov, potrebnih za biosintezo ATC (Zhang in sod., 2008). Leta 2009 so Wang in sod. pojasnili vlogo oksigenaz OxyL in OxyE. OxyL je dioksigenaza in je edini encim, ki je potreben za hidroksilacijo na mestih C12a in C4. OxyE pa je pomožna monooksigenaza za OxyL, ki igra nenujno, vendar vseeno pomembno vlogo v biosintezi OTC, saj služi kot bolj učinkovita C4 hidroksilaza (Wang in sod., 2009). Dve leti kasneje so Wang in sod.

razjasnili vgradnjo malonamatne začetne enote v biosintezi OTC, kjer igrata pomembno vlogo amidotransferaza OxyD in tioesteraza OxyP. OxyD najverjetneje amidira ali malonil-CoA ali malonil-ACP, pri čemer nastane ali malonamil-CoA ali malonamil-ACP (Zhang in sod., 2006). OxyP najverjetneje hidrolizira konkurenčne acetatne začetne enote in s tem omogoča vgradnjo malonamatne začetne enote. Na ta način zmanjšuje nivo produkcije ADOTC (2-acetyl-2-dekarboksiamido-oksitetraciklin; OTC analog z acetatno začetno enoto), ki je stranski produkt v biosintezi OTC (Wang in sod., 2011b). Pred kratkim je Wangova raziskovalna skupina pojasnila eno nabolj begajočih vprašanj v biosintezi OTC: hidroksilacijo na mestu C5. Ugotovili so, da je OxyS dioksigenaza, ki katalizira dve zaporedni hidroksilaciji na mestih C6 in C5. Nato pa OxyR reducira dvojno vez C5a-C11a in zaključi biosintezo OTC. Odsotnost C5 hidroksilacije pri CTC, katerega genska skupina vsebuje oksigenazi OxyS homologni encim Cts8 oziroma CtcN, so tudi poskusili razložiti: variacije v aktivnem mestu lahko vodijo v izključno produkcijo C6 hidroksiliranega produkta, dodatne substitucije na obroču D anhidrokortetraeklina (klorova skupina) pa najbrž vodijo v drugačno orientacijo substrata v aktivnih mestih encima (Wang in sod., 2013).

Za biosintezo osnovnega skeleta OTC (Slika 12) so odgovorni trije ključni encimi, ki skupaj tvorijo minimalni PKS: OxyA ($\text{KS}\alpha$), OxyB ($\text{KS}\beta$) in OxyC (ACP). Encimi minimalnega PKS katalizirajo iterativno kondenzacijo malonamilne začetne enote z osmimi malonilnimi podaljševalnimi enotami, iz česar nastane amidirana dekaketidna hrbtenica. Pri tem igrata pomembno vlogo tudi amidotransferaza OxyD in AT OxyP, ki sta odgovorni za biosintezo začetne enote. OxyJ je ketoreduktaza, ki reducira C9 hrbtenice OTC, nato pa aromataza/ciklaza OxyK zapre obroč D. Za oblikovanje obroča C je odgovorna ciklaza OxyN, nastanek obroča B je spontan, oblikovanje obroča A pa naj bi katalizirala ciklaza OxyI, čeprav je ena izmed možnih razlag tudi spontano zaprtje zadnjega obroča. Nato sledijo pozne oziroma post-PKS stopnje. Metilacijo C6 katalizira OxyF, nato pa pride do dvojne hidroksilacije obroča A z oksigenazama OxyL in OxyE. Aminotransferaza OxyQ katalizira transaminacijo na C4, OxyT pa dimetilira prej nastalo amino skupino. OxyS zaporedno hidroksilira mesti C6 in C5. Biosintezo OTC zaključi OxyR, ki reducira dvojno vez 5a-11a (Pickens in Tang, 2010; Wang in sod., 2013; Wang in sod., 2011b).



Slika 12: Biosintezna pot OTC (zgoraj) in *oxy* genska skupina (spodaj) (Pickens in Tang, 2010)

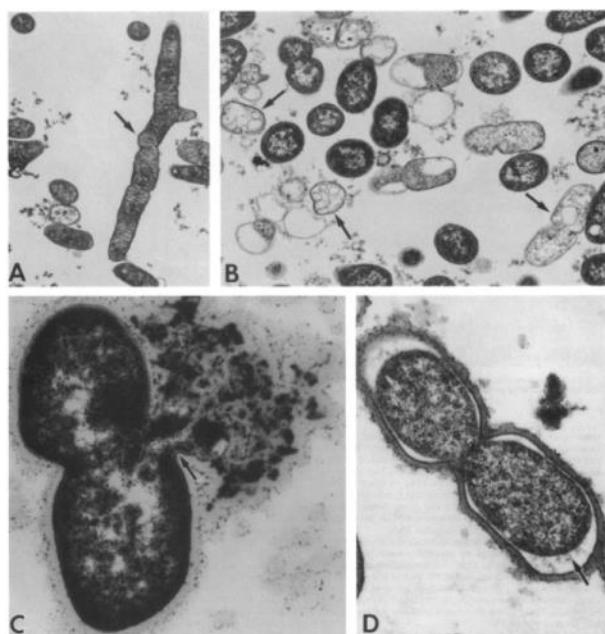
Figure 12: Biosynthetic pathway of OTC (above) and *oxy* gene cluster(below) (Pickens and Tang, 2010)

2.7 NENAVADNI TETRACIKLINI

Tetraciklinske antibiotike lahko razdelimo v dve skupini na podlagi njihovega načina delovanja. Tetraciklin, OTC, CTC, minociklin in doksiciklin (značilni ali klasični tetraciklini) preprečujejo bakterijsko rast (bakteriostatski učinek) z reverzibilno inhibicijo proteinske sinteze na nivoju ribosoma. V nasprotju s značilnimi tetraciklini pa za spojine iz druge skupine (nenavadni tetraciklini) velja, da ne inhibirajo proteinske sinteze in izgleda, da motijo organizacijo bakterijske citoplazemske membrane, kar vodi v celično smrt (baktericidni učinek). Med nenavadne tetracikline spadajo: 6-tiatetraciklin, ATC, anhidrokortetraçiklin, 4-epi-ATC in CHD (Chopra, 1994; Chopra in Roberts, 2001). Oliva in Chopra (1992) sta pokazala, da nenavadni tetraciklini delujejo proti sevom *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*, ki vsebujejo determinante za odpornost proti značilnim tetraciklinom z mehanizmi črpanja iz celice (TetB in TetK) ali zaščite ribosomov (TetM). Ti rezultati podpirajo razdelitev tetraciklinov v dve skupini glede na njihov način delovanja (Oliva in Chopra, 1992).

2.7.1 Način delovanja nenavadnih tetraciklinov

Rezultati študije z uporabo translacijskih sistemov *E. coli* in *Bacillus subtilis* izven celic kažejo, da so nenavadni tetraciklini šibki inhibitorji ali pa sploh ne inhibirajo proteinske sinteze. Tudi metode z uporabo kemijskih sond za določitev mesta interakcije antibiotika z rRNA so potrdile, da primarne tarče CHD in 4-epi-ATC niso ribosomi (Chopra, 1994; Rasmussen in sod., 1991). Vseeno pa so nenavadni tetraciklini hitro inhibirali in vivo vgradnjo prekurzorjev v DNA, RNA in proteinov, medtem ko so značilni tetraciklini inhibirali le vgradnjo aminokislin v proteine. Še vedno pa izgleda, da je primarno mesto delovanja nenavadnih tetraciklinov citoplazemska membrana. Tudi inhibicija vgradnje prekurzorjev v makromolekule je najbrž posledica izgube esencialnih kofaktorjev iz celice skozi poškodovano membrano (Rasmussen in sod., 1991). Oliva in sod. (1992) so ugotovili, da so nenavadni tetraciklini baktericidni in povzročajo lizo *E. coli*. Z opazovanjem pod elektronskim mikroskopom so ugotovili, da so nekatere celice, ki so bile izpostavljene nenavadnim tetraciklinom, doživele razne morfološke spremembe: izpraznите celic in pojav celičnih ostankov v gojišču (Slika 13). Čeprav so nenavadni tetraciklini povzročili lizo v intaktnih organizmih, niso povzročili lize v sferoplastih *E. coli*, kar nakazuje na to, da ti analogi niso neposredno poškodovali citoplazemske membrane. Te spojine morda povzročijo lizo in smrt celic preko interference z membranskim elektrokemijskim gradientom, ki nato vodi v stimulacijo aktivnosti avtolitičnih encimov in nato v celično lizo (Oliva in sod., 1992).

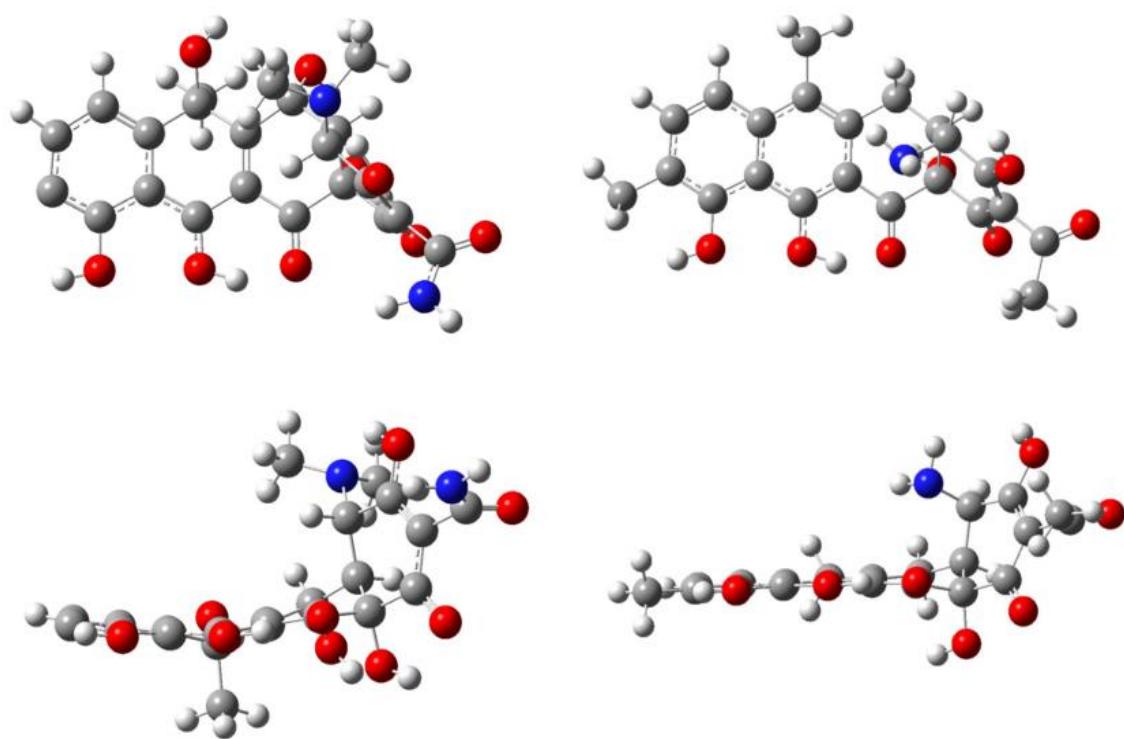


Slika 13: Posledice delovanja nenavadnih tetraciklinov na celice *E. coli* (Oliva in sod., 1992)
Celice se razvejjijo (A), izpraznejo (B), celična ovojnica se predre (C), periplazemski prostor se razširi (D).
Figure 13: The effect of atypical tetracyclines on *E. coli* cells (Oliva et al. 1992)
Cells are branched(A), vacant (B), the cell envelope is ruptured (C), the periplasmic region widens (D).

2.7.2 Povezava med strukturo in aktivnostjo nenavadnih tetraciklinov

Vzrok za delovanje nenavadnih tetraciklinov na membrano je najbrž povezan z relativno planarnostjo B, C in D obročev, tako da prevladuje lipofilna neionizirana oblika molekule (Slika 14). V interakciji s celico so nenavadni tetraciklini zato verjetno ujeti v hidrofobno okolje citoplazemske membrane, kjer motijo njeno delovanje (Chopra, 1994).

Pri fiziološkem pH-ju obstajajo tetraciklini v ravnotežni mešanici dveh oblik prostih baz, ki je odvisna od topila: nizkoenergijska lipofilna neionizirana oblika in visokoenergijska hidrofilna zwitterionska oblika. V nasprotju z ravnotežjem tetraciklinskih zvrsti, ki je odvisno od topila, pa CHD obstaja v isti konformaciji tako v polarnih kot v nepolarnih topilih. To naj bi bilo povezano s planarnostjo BCD obročev v CHD in je zato hidrofilna najprimernejša oblika, kar nakazuje na to, da CHD slabo interagira z ribosomom (Rasmussen in sod., 1991).

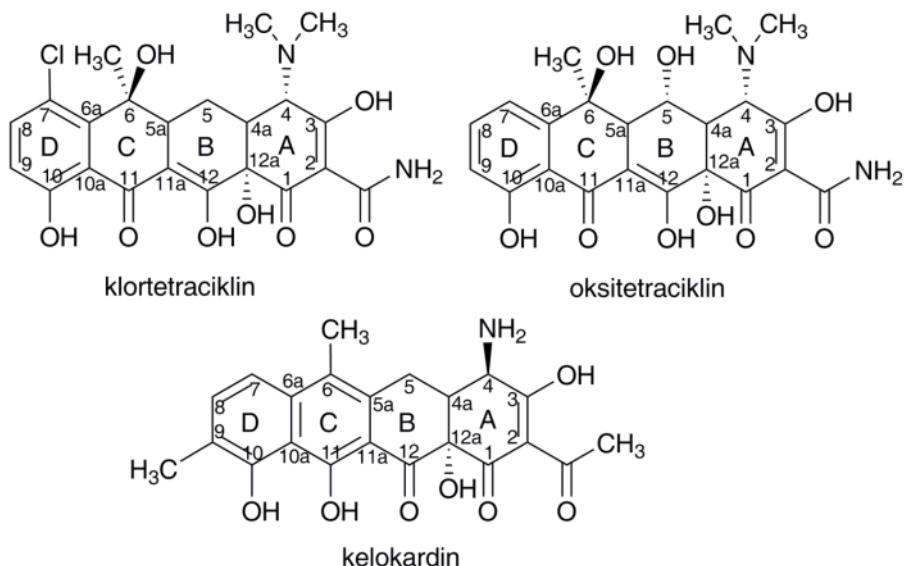


Slika 14: Tridimenzionalne strukture OTC (zgoraj levo in spodaj levo) in CHD (zgoraj desno in spodaj desno) (foto: Šala M., Kemijski inštitut)

Figure 14: Tridimensional structures of OTC (upper left and bottom left) and CHD (upper right and bottom right) (photo: Šala M., National Institute of Chemistry)

2.8 KELOKARDIN

Kelokardin (tudi cetociklin ali M-319), ki ga proizvaja aktinomiceta *Amycolatopsis sulphurea* (NRRL2822) je močan nenavaden tetraciklinski antibiotik s širokim območjem delovanja. Izolirali so ga leta 1956 in ga prvič opisali leta 1962, njegovo strukturo pa določili leta 1970 (Mitscher in sod., 1970). CHD je 2-dekarboksiamido-2-acetil-4-dedimetilamino-4-epi-amino-9-metil-5a,6-anhidrotetraciklin z molekulsko formulo C₂₂H₂₁NO₇ (Mitscher in sod., 1970), torej ATC derivat, ki se od klasičnih tetraciklinov razlikuje po aromatskem obroču C; acetilni skupini na atomu C2; nemetilirani amino skupini na atomu C4 obratne streokemije, kot je C4 amino skupina običajnih tetraciklinov; odsotnosti hidrosilne skupine na atomu C6 in dodatni metilni skupini na atomu C9 (Slika 15).



Slika 15: Strukture CTC, OTC in CHD (PubChem..., 2013)

Figure 15: Structures of CTC, OTC and CHD (PubChem..., 2013)

CHD kaže lastnosti šibke kisline (keto skupine) in zelo šibke baze (amino skupina). Topen je v raztopini NaOH, vendar v njem razpada. V vodi oziroma raztopinah kislin CHD ni topen, niti ni topen v obliki hidroklorida ali kompleksiran s kalcijevim kloridom. CHD je topen v MeOH (Oliver in Sinclair, 1964). Ker CHD oziroma kelokardin hidroklorid ni topen v vodi, pomeni, da se ga ne da uporabiti za pripravo injekcijskih raztopin. Po drugi strani pa so kelokardinske soli z bazo tako nestabilne, da nimajo na področju zdravil nobene vrednosti. Hitro razpadejo in izgubijo protibakterijsko aktivnost tudi, če jih shranimo na hladno v dušikovi atmosferi. Raziskovalcem v Abbott laboratorijih je uspelo nareediti stabilno mešanico CHD z natrijevim citratom, katere vodna raztopina je uporabna za injekcije (Farhadieh, 1977). Poleg tega so v Abbott laboratorijih pripravili veliko polsintežnih kelokardinskih analogov s povečano topnostjo v vodi in povečano in vitro aktivnostjo (Bernstein in sod., 1978; Garmaise in sod., 1979; Inaba in sod., 1975).

CHD kaže močno protibakterijsko aktivnost proti različnim po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam, med katerimi so npr. različne vrste *Clostridium*, *Salmonella* in *Proteus*, *E. coli* ter *S. aureus*. Ne deluje pa proti *Pseudomonas aeruginosa* in proti glivam (Oliver in Sinclair, 1964). Proctor in sod. (1978) so pokazali, da je CHD v primerjavi s klasičnimi tetraciklini bolj aktiven proti različnim kliničnim izolatom aerobnih po Gramu negativnih bacilov, vendar manj aktiven proti po Gramu pozitivnim kokom in praktično brez aktivnosti proti sevom *Pseudomonas*. CHD je v kliniki kazal uporabo pri zdravljenju infekcij urinarnega trakta, saj so ti organizmi velikokrat odporni proti ostalim

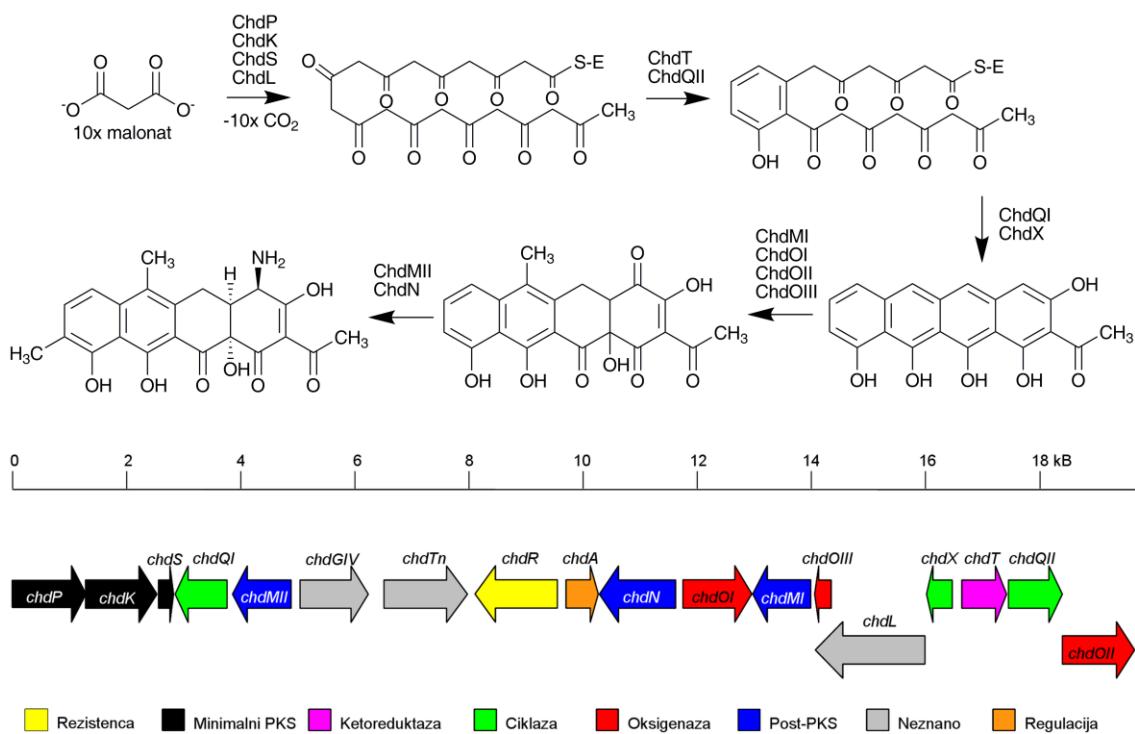
antibiotikom. Spodbudno je namreč, da so bili vsi testirani sevi *Proteus* kot tudi sevi *Enterobacter*, *Providencia* in *Serratia* občutljivi na CHD (Proctor in sod., 1978). Malo pred tem so objavili, da je CHD prestal drugo fazo klinično-farmakoloških testiranj za zdravljenje infekcij urinarnega trakta. Rezultati vpliva zdravila na 12 pacientov so bili pozitivni: ob blažjih stranskih učinkih so klinični simptomi izginili (Molnar in sod., 1977). CHD inhibira tudi cepitveno aktivnost ribocimov (tudi do 10-krat bolj kot klasični tetraciklini), ki so pomembni za virusno replikacijo (Jenne in sod., 2001; Rogers in sod., 1996).

2.8.1 Biosinteza CHD

Mitscher in sod. (1983) so s poskusi z dohranjvanjem ^{13}C -označenega acetata in propionata ugotovili, da v biosintezi CHD kot začetna enota služi acetat (Mitscher in sod., 1983). Petković in sod. pa so klonirali in sekvenirali gensko skupino za biosintezo CHD ter predložili verjetno biosntezano pot CHD (Lešnik, 2009; Petković in sod., 2013; Lukežič in sod., 2013). Pri poskusu razumevanja biosintezne poti CHD (Slika 16) si lahko pomagamo z biositezno potjo OTC, ki so jo preučevali že več kot 40 let (Pickens in Tang, 2010). Biosintezo osnovenga skeleta CHD predvidoma katalizirajo encimi ChdP (KS α), ChdK (KS β) in ChdS (ACP) (t.i. minimalni PKS), homologni encimom OxyA, OxyB in OxyC iz biosinteze OTC, pri čemer minimalni PKS genske skupine *otc* porabi deset molekul malonata za vsako molekulo CHD. V kelokardinski genski skupini ne najdemo genov, ki bi kodirali encime, homologne OxyD in OxyP, saj CHD ne vsebuje amidne skupine na začetni enoti. Ketoreduktaza ChdT (homolog OxyJ) nato predvidoma reducira C9, aromataza/ciklaza ChdQII (homolog OxyK) pa predvidoma zapre obroč D. Druga aromataza/ciklaza ChdQI, ki je tudi homologna OxyK, predvidoma zapre obroč C, ki je za razliko od tistega pri klasičnih tetraciklinih aromatiziran. Homologa OxyN tako v biosintezi CHD ne najdemo. Nastanek obroča B je najverjetneje, tako kot v biosintezi klasičnih tetraciklinov, tudi v biosintezi CHD spontan. Oblikovanje obroča A predvidoma katalizira ChdX (homolog OxyI). Nato sledijo pozne stopnje biosinteze. Metilacijo C6 predvidoma katalizira ChdMI (homolog OxyF), oksigenazi ChdOII (homolog OxyL) in ChdOI (homolog OxyE) pa predvidoma hidroksilirata obroč A. Aminotransferaza ChdN, ki ni homologna OxyQ, zelo verjetno katalizira transaminacijo na C4. Odsotnost večje homologije med obema aminotransferazama je verjetno povezana z različno stereokemijo C4 amino skupin OTC in CHD. V genski skupini za biosintezo CHD tudi ne najdemo genov, ki bi kodirali encima, homologna OxyT in OxyS - molekula CHD na C4 amino skupini nima dodatnih dveh metilnih skupin in hidroksilnih skupin na mestih C5 in C6. Še ena razlika med genskima skupinama, ki kodirata biosintezo OTC in CHD, je dodaten gen za metiltransferazo ChdMII (homolog MtmMII), ki katalizira metilacijo na mestu C9 CHD. V genski skupini za biosintezo CHD opazimo tudi odsotnost encima, ki bi bil

homologen reduktazi OxyR, odgovorni za zadnji korak v biosintezi OTC - redukcija C5a-C11a.

V genski skupini za biosintezo CHD najdemo le en gen, ki kodira rezistenco proti tetraciklinom – ChdR, ki je, sodeč po bioinformatski analizi homolognih proteinov (Lešnik, 2009), membranska črpalka. V genskih skupinah za biosintezo drugih tetraciklinov namreč opazimo po dve rezistenci – zaščita ribosoma in membranska črpalka (kot npr. OtrA in OtrB iz *oxy* genske skupine) (Pickens in Tang, 2010). Odsotnost ribosomske zaščite v primeru *A. sulphurea* lahko razložimo z dejstvom, da CHD najverjetneje deluje na nivoju membrane in ne na ribosom, zato zaščita ribosoma ni potrebna. Vendar se je treba v primeru produkcije kelokardinskih analogov zavedati, da lahko odsotnost ribosomske zaščite predstavlja problem, saj producentski sev ne bo odporen proti analognu, če se njegova struktura spremeni, s tem pa tudi način in tarča delovanja.



Slika 16: Predvidena biosinteza CHD (zgoraj) in *chd* genska skupin (spodaj) (Lešnik, 2009; Petković in sod., 2013)

Figure 16: Proposed biosynthesis of CHD (above) and *chd* gene cluster (below) (Lešnik, 2009; Petković et al., 2013)

2.9 ORODJA IN METODE ZA GENSKO MANIPULACIJO AKTINOMICET

V aktinomicete lahko DNA vnašamo na različne načine: transformacija s plazmidno, kozmidno ali kromosomske DNA; transfekcija z DNA, ki vsebuje fagni replikon; fagna transdukcija kromosomske ali plazmidne DNA; elektroporacija; konjugacija med aktinomicetami; konjugacija med *E. coli* in aktinomicetami. Veliko aktinomicet ima restriktivne sisteme, ki lahko občutno zmanjšajo frekvenco transformacije. *S. coelicolor* A3(2) npr. ima močan metilacijsko-specifičen restriktivni sistem, ki se ga pa lahko zaobide z uporabo DNA, izolirane iz sevov *E. coli*, ki ne metilirajo DNA (npr. ET12567) (Kieser in sod., 2000).

Transformacija in transfekcija protoplastov ali micelija sta veliko uspešnejši ob uporabi polietilen glikola (PEG). Na regeneracijo protoplastov oziroma frekvenco transformacije vplivajo številni parametri: starost micelija v času protoplastiranja oziroma transformacije; prisotnost kationov; koncentracija DNA v transformacijski mešanici; temperatura, pri kateri inkubiramo micelij oziroma protoplaste za regeneracijo; število protoplastov na transformacijo; suhost plošč za regeneracijo in seveda sestava gojišča (Kieser in sod., 2000; Madon in Hutter, 1991).

Elektroporacija vključuje uporabo kratkega, visokonapetostnega pulza na suspenziji celic in DNA, kar vodi v oblikovanje por v membrani in posledičen vnos DNA. Njena glavna prednost je, da lahko tako zaobidemo potrebo po razvoju pogojev za oblikovanje in regeneracijo protoplastov. Ponavadi celice obdelamo z lizocimom (in ustavimo njegovo delovanje pred začetkom nastanka protoplastov), da oslabimo celično steno in olajšamo vnos DNA. Pri elektroporaciji je pomembno, da se mešanica celic in DNA nahaja v pufru z nizko prevodnostjo (nizka koncentracija soli) (Kieser in sod., 2000; Pigac in Schrempf, 1995).

Konjugativni prenos DNA med *E. coli* in aktinomicetami poteka z uporabo tako replikativnih kot nereplikativnih vektorjev, ki se po prenosu integrirajo v kromosom z mestno-specifično rekombinacijo na integracijskih mestih (Φ C31, pSAM2 ali Φ BT1) ali pa preko homologne rekombinacije med plazmidnim insertom in kromosomom. Ti vektorji vsebujejo *oriT* - mesto začetka konjugativnega prenosa. *E. coli* donor mora imeti še plazmid pUZ8002, ki pomaga pri učinkoviti mobilizaciji drugih plazmidov, sam pa se zaradi mutacije v mestu *oriT* ne prenese dovolj učinkovito (Kieser in sod., 2000; Paget in sod., 1999).

Za transdukcijo se največkrat uporablja fage, ki temeljijo na temperiranem fagu Φ C31, ki v svojih morfologiji in genetiki spominja na kolifag lambda. Potem, ko fag inficira celico, se profag vgradi v kromosom preko specifičnih fagnih in kromosomskih mest *att*; ohranja pa

se s pomočjo represorja, ki ga določa fagni gen *c*. DNA ΦC31, izolirana iz virionov, je velika 41,4 kb, vsebnost GC parov je 63 % in ima kohezivne (*cos*) konce. Fagno DNA lahko vnesemo v celice tudi s transfekcijo protoplastov ob uporabi PEG in pod pogoji, podobnimi pri transformaciji s plazmidi (Kieser in sod., 2000).

2.9.1 Orodja in metode za gensko manipulacijo vrst *Amycolatopsis* spp.

Razvoj na področju genske manipulacije sevov *Amycolatopsis* je zaradi pomanjkanja genskih orodij in metod v primerjavi z razvojem na področju streptomicet napredoval razmeroma počasi. Zato genska manipulacija sevov *Amycolatopsis* ni enostavna, saj je treba za vsak določen sev razviti ali pa vsaj optimizirati metodo transformacije (Malhotra in Lal, 2007). V literaturi do sedaj še ni bil opisan niti en sam postopek transformacije *A. sulphurea*. V prejšnjih desetletjih so raziskovalci razvili nekaj klonirnih vektorjev in metod transformacije nekaterih sevov *Amycolatopsis*, predvsem *A. mediterranei* in *A. orientalis* (Dhingra in sod., 2003; Lal in sod., 1998; Lal in sod., 1991; Madon in Hutter, 1991; Matsushima in sod., 1987). Za vnos DNA v seve *Amycolatopsis* se uporablja različne metode transformacije: direktna transformacija micelija (transformacija suspenzije micelija z dodatkom PEG in kationov), elektroporacija, transformacija protoplastov, elektrodukcija (neposreden prenos plazmidne DNA med donorjem in recipientom pod pogoji elektroporacije) in konjugativni prenos *E. coli*-*Amycolatopsis* sp. (Dhingra in sod., 2003; Malhotra in Lal, 2007). Ker obstaja v vrstah *Amycolatopsis* zelo malo naravnih plazmidov, so na začetku za genske manipulacije rodu *Amycolatopsis* uporabljali streptomicetne vektorje, vendar je bila uporaba teh plazmidov pri nekaterih vrstah (*A. orientalis*) bolj uspešna, pri drugih (*A. mediterranei*) pa manj. Drug problem pri razvoju klonirnih vektorjev pa predstavlja visoka intrinzična odpornost večine vrst *Amycolatopsis* na antibiotike, proti katerim determinante odpornosti se v splošnem uporablja v konstrukciji aktinomicetnih vektorjev (Dhingra in sod., 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Za izvajanje eksperimentov smo uporabljali sestavine gojišč in kemikalije različnih proizvajalcev: Difco (ZDA), Biolife (Italija), Sigma-Aldrich (ZDA), Merck (Nemčija) in Oxoid Ltd. (Anglija). Uporabljali smo encime proizvajalca Thermo Fisher Scientific: Fermentas, Thermo Scientific in Finnzymes. Za določanje velikosti DNA fragmentov smo uporabljali DNA standard GeneRuler DNA Ladder Mix proizvajalca Fermentas.

3.1.1 Raztopine in pufri

0,5 M EDTA, pH 8.0

Zatehtamo 186,1 g Na₂EDTA×2H₂O in dodamo dH₂O do 800 ml. S peleti NaOH uravnamo pH na 8,0 in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

0,5 M Tris-HCl, pH 8.0

Zatehtamo 121 g baze Tris in dodamo dH₂O do 800 ml. S HCl uravnamo pH na 8,0 in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

Timusna DNA

Zatehtamo 10 mg goveje timusne DNA in dodamo 1 ml pufra TE. Sonificiramo toliko časa, da dosežemo nizko viskoznosti in centrifugiramo 15 min pri 14000 rpm. Supernatant nato inkubiramo 20 min pri 100 °C in shranimo pri -20 °C (Madon in Hutter, 1991).

Raztopina ET

Zatehtamo 30 g PEG 1000, 6,5 g saharoze in dodamo dH₂O do 50 ml. Dodamo še 10 ml glicerola in dopolnimo z dH₂O do 100 ml (Pigac in Schrempf, 1995).

Pufer TE

V 800 ml dH₂O dodamo 20 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) in 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ter dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

50× pufer TAE

V 700 ml dH₂O zatehtamo 242 g baze Tris, dodamo 57,1 ml ledocetne kisline, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

Raztopina elementov v sledovih

Zatehtamo 40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₃×6H₂O, 10 mg CuCl₂×H₂O, 10 mg MnCl₂×4H₂O, 10 mg Na₂B₄O₇×10H₂O, 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O in dopolnimo do 1 litra z dH₂O (Kieser in sod., 2000).

Depurinacijska raztopina

V 800 ml dH₂O dodamo 16,67 ml 37 % HCl in dopolnimo do 1 litra z dH₂O (Sambrook in Russell, 2001).

Denaturacijska raztopina

V 800 ml dH₂O zatehtamo 88 g NaCl in 20 g NaOH ter dopolnimo do 1 litra z dH₂O (Sambrook in Russell, 2001).

Nevtralizacijska raztopina

V 800 ml dH₂O zatehtamo 88 g NaCl in 78,5 g Tris-HCl ter dopolnimo do 1 litra z dH₂O (uravnamo pH na 7,4) (Sambrook in Russell, 2001).

Raztopina za prenos (20× SSC)

Zatehtamo 175,3 g NaCl in 88,2 g Na₃-citrata×H₂O in dodamo dH₂O do 800 ml. S HCl uravnamo pH na 7,0 in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

Pufer iz maleinske kisline

V 900 ml dH₂O zatehtamo 11,6 g maleinske kisline in 8,8 g NaCl. S trdnim NaOH uravnamo pH do 7,5 in dopolnimo do 1 litra z dH₂O (DIG..., 2012).

Pufer za spiranje membrane

Pufer za spiranje membrane je sestavljen iz pufra iz maleinske kisline z dodanim 0,3 % detergentom Tween 20 (DIG..., 2012).

Pufer za detekcijo

V 900 ml dH₂O zatehtamo 15,7 g Tris-HCl, 5,8 g NaCl, uravnamo pH na 9,0 in dopolnimo do 1 litra z dH₂O (DIG..., 2012).

3.1.2 Antibiotiki in indikatorji

Preglednica 1: Antibiotiki in indikatorji

Table 1: Antibiotics and indicators

Antibiotik ali indikator	Koncentracija za selekcijo	Koncentracija založne raztopine
Ampicilin (Amp)	100 µg/ml za <i>E. coli</i>	100 mg/ml v vodi
Kloramfenikol (Cm)	10 µg/ml za <i>E. coli</i>	10 mg/ml v absolutnem alkoholu
Apramicin (Apr)	50 µg/ml za <i>E. coli</i>	50 mg/ml v vodi
Kanamicin (Kan)	25 µg/ml za <i>E. coli</i>	25 mg/ml v vodi
Eritromicin (Erm)	30 µg/ml za <i>S. rimosus</i> (trdno gojišče) 10 µg/ml za <i>S. rimosus</i> (tekoče gojišče)	50 mg/ml v absolutnem alkoholu
Tiostrepton (Tsr)	30 µg/ml za <i>S. rimosus</i> (trdno gojišče) 5 µg/ml za <i>S. rimosus</i> (tekoče gojišče)	30 mg/ml v DMSO
X-gal	40 µg/ml za <i>E. coli</i>	20 mg/ml v DMSO
IPTG	0,1 mM za <i>E. coli</i>	100 mM v vodi

Koncentracije antibiotikov za selekcijo *A. sulphurea* so navedene v poglavju Rezultati (Preglednica 5). Vse založne raztopine smo hrаниli pri -20 °C. V modro-belem testu smo uporabili X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-galaktozidaza) kot substrat in IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) kot induktor za selekcijo sevov *E. coli* DH10β, ki so vsebovali vektor pVM1 z insertom v mestu za kloniranje (MCS). Tako smo ločevali bele klone s plazmidi, ki so imeli gen *lacZ alpha* (za podenoto α β-galaktozidaze) prekinjen z insertom, od modrih klonov, katerih gen *lacZ alpha* (za podenoto α β-galaktozidaze) ni bil prekinjen z insertom. Založne raztopine smo dodajali v gojišča z agarjem, ki smo jih ohladili do 55 °C.

3.2 SEVI IN PLAZMIDI

3.2.1 Sevi mikroorganizmov

Preglednica 2: Bakterijski in kvasni sevi

Table 2: Bacterial and yeast strains

Vrsta	Sev	Vir
<i>Escherichia coli</i>	DH10β (genotip: F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80lacZΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ- rpsL nupG</i>)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	ET12567 (genotip: F- <i>dam13::Tn9, dcm6, hsdM, hsdR, zjj-202::Tn10, recF143::TnII, galK2, galT22, ara14, lacY1, xyl5, leuB6, thi1, tonA31, rpsL136, hisG4, tsx78, mtl1 glnV44.</i>)*	(MacNeil in sod., 1992)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	168	(Burkholder in Giles, 1947)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM2155		ZIM Ljubljana, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
<i>Streptomyces rimosus</i> M4018	producent OTC	(Butler in sod., 1989)
<i>Amycolatopsis sulphurea</i> NRRL2822	producent CHD	ARS Culture Collection

*Sev ET12567 ne metilira DNA (brez *dam* in *dcm* metilaze) in je zato primeren za pripravo DNA za vnos v aktinomicetne seve, brez da bi jo ti poškodovali s svojim restriktionskim sistemom.

3.2.2 Bakterijski vektorji

Preglednica 3: Bakterijski vektorji, ki smo jih uporabili v tej študiji

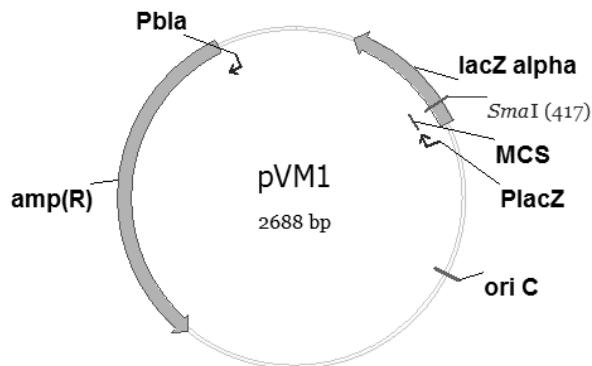
Table 3: Bacterial vectors used in this study

Ime vektorja	Dolžina	Rezistenca proti	Organizem	Vir
pVM1	2,7 kb	Amp	<i>E. coli</i>	Acies Bio (Magdevska, 2011)
pVM1Erm(R)	4,3 kb	Amp	<i>E. coli</i>	Acies Bio
pTS55	10,4 kb	Amp/Tsr	<i>E. coli/Streptomyces</i>	Iain S. Hunter (Smokvina in sod., 1990)
pAB03	6,3 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>	Acies Bio
pLUS02	11,6 kb	Amp/Kan/Neo	<i>E. coli/Streptomyces</i>	Acies Bio (Lešnik, 2009)
pOJ260	3,5 kb	Apr	<i>E. coli</i>	(Kieser in sod., 2000)
pNV18	4,4 kb	Kan/Neo	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>	(Chiba in sod., 2007)
pNV19	4,4 kb	Kan/Neo	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>	(Chiba in sod., 2007)
pKC1139	6,4 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces</i>	(Bierman in sod., 1992)
pIJ487	4,3 kb	Amp/Erm	<i>E. coli/Streptomyces</i>	(Ward in sod., 1986)
pLUC10E	10,6	Amp	<i>E. coli</i>	Acies Bio (Lešnik, 2009)
pSET152	5,7 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces</i>	(Bierman in sod., 1992)
pVM1ermE*xylE	3,9 kb	Amp	<i>E. coli</i>	Acies Bio
pBluescripttermE*	3,3 kb	Amp	<i>E. coli</i>	Acies Bio
pIJ4026	4,3 kb	Amp/Erm	<i>E. coli</i>	Iain S. Hunter (Bibb in sod., 1985)

Preglednica 4: Bakterijski vektorji, ki smo jih konstruirali v tej študiji

Table 4: Bacterial vectors constructed in this study

Ime vektorja	Dolžina	Rezistenca proti	Organizem
pAB03ermE*	5,4 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03rppA	7,4 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03ermE*rppA	6,5 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pNV18chdPKSErm	8,1 kb	Kan/Neo/Erm	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>
pAB03:8kb	12,7 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03chdPKS	9,1 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03oxyT	7,3 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03oxyS	7,8 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03chl	7,9 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03oxyD	8,1 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03oxyP	7,3 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pAB03oxyDP	9,2 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pNV18actIoxyDP	9,2 kb	Kan/Neo	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>
pAB03chdGIV	7,5 kb	Apr	<i>E. coli/Streptomyces/Amycolatopsis</i>
pBluescriptermE*chdMII	4,3 kb	Amp	<i>E. coli</i>
pTS55ermE*chdMII	9,3 kb	Amp/Tsr	<i>E. coli/Streptomyces</i>
pNV18chdMIIerm	10,4 kb	Kan/Neo/Erm	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>
pNV18chdNerm	9,7 kb	Kan/Neo/Erm	<i>E. coli/Nocardia/Amycolatopsis</i>
pIJ4026oxyPko	4,9 kb	Amp/Erm	<i>E. coli/Streptomyces</i>

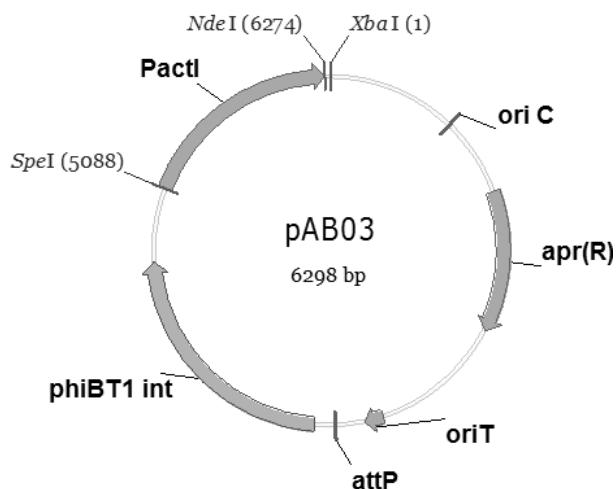


Slika 17: Vektor pVM1 (Magdevska, 2011)

Vektor pVM1 izhaja iz pUC19 (Invitrogen), vendar ne vsebuje restriktijskega mesta *NdeI* v genu *lacZ alpha*. Vsebuje *amp(R)* - gen za ampicilinsko rezistenco s promotorjem *Pbla*, gen *lacZ alpha*, ki kodira podenoto α β -galaktozidaze s promotorjem *PlacZ*, mesto začetka podvajanja v *E. coli* (*oriC*) in MCS iz vektorja pUC18.

Figure 17: Vector pVM1 (Magdevska, 2011)

pVM1 vector is a pUC19 (Invitrogen)-based vector without *NdeI* restriction site in the *lacZ alpha* gene. It contains *amp(R)* - gene coding for Amp resistance with the *Pbla* promoter, the *lacZ alpha* gene coding for α subunit β -galactosidase with the *PlacZ* promoter, origin of replication in *E. coli* (*oriC*) and MCS from pUC18 vector.

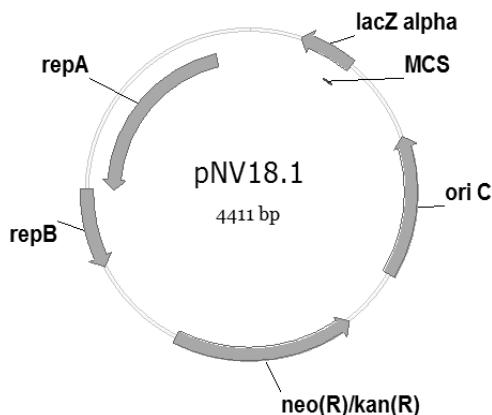


Slika 18: Ekspresijski vektor pAB03 (Acies Bio)

Integrativni vektor pAB03 vsebuje *apr(R)* - gen za rezistenco proti Apr za selekcijo v *E. coli* in aktinomicetah, *oriC* - mesto za začetek podvajanja v *E. coli*, *oriT* - mesto za začetek prenosa med konjugacijo, *phiBT1int* - gen za integrazo, *attP* - integracijsko mesto in promotor *PactI*

Figure 18: Expression vector pAB03 (Acies Bio)

Integrative vector pAB03 contains *apr(R)* - gene coding for resistance against Apr for selection in *E. coli* and actinomycetes, *oriC* - origin for replication in *E. coli*, *oriT* - origin of conjugal transfer, *phiBT1int* - gene coding for integrase, *attP* - integration site and promoter *PactI*



Slika 19: Vektor pNV18

Replikativni vektor pNV18 vsebuje *neo(R)/kan(R)* - gen za neomicinsko/kanamicinsko rezistenco, mesto začetka podvajanja v *E. coli* (*oriC*), gena *repA* in *repB* za začetek replikacije v aktinomicetah, MCS in gen *lacZ alpha*, ki kodira podenoto α - β -galaktozidaze.

Figure 19: pNV18 vector

pNV18 vector contains *neo(R)/kan(R)* - genes coding for Neo/Kan resistance, origin of replication in *E. coli* (*oriC*), *repA* and *repB* genes for the initiation of replication in actinomycetes, MCS and the *lacZ alpha* gene coding for α subunit of β -galactosidase.

3.3 RASTNI POGOJI ZA GOJENJE SEVOV

Vsa gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C za 20 min, razen če ni drugače navedeno.

3.3.1 Gojišča za *E. coli* in *B. subtilis*

Seve *E. coli* in *B. subtilis* smo gojili pri temperaturi 37 °C preko noči, tekoče kulture smo stresali pri 220 rpm.

2TY (tekoče)

Zatehtamo 16 g kazein peptona (tripton), 10 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl, dopolnimo z dH₂O do 1 litra in uravnamo pH na 7,0 (Sambrook in Russell, 2001).

2TY (trdno)

Zatehtamo 16 g kazein peptona (tripton), 10 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl, 15 g agarja, dopolnimo z dH₂O do 1 litra in uravnamo pH na 7,0 (Sambrook in Russell, 2001).

ABA

Zatehtamo 25,5 g Antibiotic Base Agar A2 (ABA) proizvajalca Biolife, dopolnimo z dH₂O do 1 litra, uravnamo pH na 6,5 in kuhamo do 80 °C. Čas sterilizacije: 15 min.

3.3.2 Gojišča za aktinomicete

Tekoče kulture aktinomicetnih sevov smo gojili v 5 ml gojišča v 50 ml centrifugirkah pri temperaturi 30 °C, stresanju 220 rpm in 60 % relativni vlagi, medtem ko smo kulture na ploščah gojili v inkubatorju pri isti temperaturi in vlagi. Inokulum smo pripravili v vegetativnem gojišču iz spor, ki so na ploščah SM rasle 10-14 dni, in inkubirali 24-36 h pri 30 °C in stresanju 220 rpm. Producjsko gojišče smo inokulirali z 10-15 % inokulumom iz vegetativnega gojišča in gojili pri 30 °C in stresanju 220 rpm 6-7 dni.

Kulture *A. sulphurea* za kemijsko transformacijo, kulture za pripravo elektrokompetentnih celic *S. rimosus* in kulture za izolacijo genomske DNA smo gojili v tekočem gojišču TSB. Transformante *A. sulphurea* smo selekcionirali na gojišču S27M, prelitim z R2L, transformante *S. rimosus* pa smo selekcionirali na trdnem gojišču TSB z dodanim antibiotikom. Za sporulacijo sevov smo uporabljali agarne plošče SM.

Soja-manitol agar (SM)

Zatehtamo 20 g D-manitola, 20 g sojine moke, 20 g agarja in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Kieser in sod., 2000). Čas sterilizacije: 30 min.

S27M

Zatehtamo 73,2 g D-manitola, 5 g peptona, 3 g kvasnega ekstrakta, 17 g Bacto agarja in dopolnimo z dH₂O do 1 litra (Madon in Hutter, 1991).

R2L

Zatehtamo 18,3 g D-manitola, 0,0625 g K₂SO₄, 2,52 g MgCl₂×6H₂O, 2,5 g glukoze, 0,025 g kazamino kislin, 1,25 g kvasnega ekstrakta, 1,75 g agaroze z nizkim tališčem in dopolnimo z dH₂O do 196 ml. Po avtoklaviraju razdelimo v alikvote po 19,6 ml. Na dan transformacije k vsakemu alikvotu dodamo: 2,5 ml 0,25 M TES (pH 7,2), 2 ml 3,68 % CaCl₂×2H₂O, 250 µl 0,5 % KH₂PO₄, 50 µl raztopine elementov v sledovih, 500 µl 10 % asparagina, 125 µl 1 M NaOH. Gojišče dobro premešamo in temperiramo pri 37 °C (Madon in Hutter, 1991).

TSB (tekoče)

Zatehtamo 30 g Tryptone Soya Broth (TSB) proizvajalca Oxoid (Thermo Scientific) in dopolnimo z dH₂O do 1 litra. Čas sterilizacije: 15 min.

TSB (trdno)

Zatehtamo 30 g Tryptone Soya Broth (TSB) proizvajalca Oxoid (Thermo Scientific), 15 g agarja in dopolnimo z dH₂O do 1 litra. Čas sterilizacije: 15 min.

CHD-V (vegetativno gojišče za *A. sulphurea*)

Zatehtamo 15 g sojine moke, 1 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl, 1 g CaCO₃, dopolnimo z vodovodno vodo do 1 litra in uravnamo pH na 7,0. Čas sterilizacije: 40 min. Po sterilizaciji dodamo 30 ml 50 % (w/v) glukoze (Oliver in Sinclair, 1964).

CHD-F2 (produkcijsko gojišče za *A. sulphurea*)

Zatehtamo 20 g sojine moke, 5 g kvasnega ekstrakta, 2 g CaCO₃, 0,5 g citronske kisline, dopolnimo z vodovodno vodo do 900 ml in uravnamo pH na 7,0. Čas sterilizacije: 40 min. Po sterilizaciji dodamo 100 ml 50 % (w/v) glukoze (Mitscher in sod., 1983).

GOTC-V (vegetativno gojišče za *S. rimosus*)

Zatehtamo 15 g triptona, 10 g glukoze, 1 g CaCO₃, 5,0 g kvasnega ekstrakta in dopolnimo z vodovodno vodo do 1 litra (Lešnik, 2009).

GOTC-F (produkcijsko gojišče za *S. rimosus*)

Zatehtamo 7 g MOPS, 42 g sojine moke, 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g MgCl_2 , 1,5 g NaCl , 7,3 g CaCO_3 , 28 g koruznega škroba, 10 ml 1 % (w/v) ZnSO_4 , 3,75 ml 1 % (w/v) MnSO_4 , dopolnimo z vodovodno vodo do 1 litra in uravnamo pH na 6,25. Gojišče med mešanjem segrejemo do temperature 80 °C. V produkcijsko gojišče pred sterilizacijo dodamo 2 % (v/v) sojinega olja. Čas sterilizacije: 30 min (Lešnik, 2009).

3.3.3 Gojišča za kvasovke

Tekoče kvasne kulture smo gojili v 5 ml gojišča YEPD v 50 ml centrifugirkah pri temperaturi 30 °C, stresanju 220 rpm in 60 % relativni vlagi, medtem ko smo kulture na ploščah gojili v inkubatorju pri isti temperaturi in vlagi.

YEPD (tekoče)

Zatehtamo 10 g glukoze, 20 g peptona, 20 g kvasnega ekstrakta in dopolnimo z dH_2O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

YEPD (trdno)

Zatehtamo 10 g glukoze, 20 g peptona, 20 g kvasnega ekstrakta, 20 g agarja in dopolnimo z dH_2O do 1 litra (Sambrook in Russell, 2001).

3.3.4 Shranjevanje sevov *E. coli* in aktinomicet

Alikvot prekonočnih kultur *E. coli* smo dodali enakemu volumnu 20 % (w/v) glicerola in zamrznili pri -80 °C. Aktinomicetne seve smo shranili kot suspenzijo spor v 20 % (w/v) glicerolu in tudi zamrznili pri -80 °C.

3.4 VNOS PLAZMIDNE DNA V *E. coli* IN AKTINOMICETE

3.4.1 Priprava elektrokompetentnih celic *E. coli* DH10β in *E. coli* ET12567

Za pripravo elektrokompetentnih celic *E. coli* smo inokulirali 400 ml gojišča 2TY s 4 ml prekonočne kulture *E. coli* in gojili približno 2-3 ure pri 37 °C in 220 rpm. Ko so celice dosegle OD_{600} 0,9, smo jih prenesli v sterilne centrifugirke in hladili na ledu za 20 min. Nato smo jih centrifugirali pri 4000 rpm za 10 min pri 4 °C. Po centrifugiranju smo celice dvakrat sprali (najprej z 200 ml in nato s 100 ml) z 1 mM raztopino HEPES (pH 7,0) in

enkrat s 100 ml 10 % (w/v) glicerola v 1mM raztopini HEPES (pH 7,0). Med vsakim spiranjem smo celice centrifugirali pri 4000 rpm za 10 min pri 4 °C. Po zadnjem centrifugiranju smo celice resuspendirali v 2,5 ml 10 % (w/v) glicerola v 1 mM raztopini HEPES (pH 7,0) in celice razdelili v alikvote po 40 µl in shranili pri temperaturi -80 °C.

3.4.2 Elektroporacija sevov *E. coli* DH10 β in *E. coli* ET12567

V 40 µl alikvota elektrokompetentnih celic smo dodali 1-5 µl (100-500 ng) plazmidne DNA ali ligacijske mešanice, zmešali in prenesli v sterilno elektroporacijsko kiveto. Celice smo elektroporirali z aparatom Micro Pulser Bio-Rad pri napetosti 2,5 kV, električni kapaciteti 25 µF in upornosti 200 Ω. Po elektroporaciji smo celicam dodali 960 µl gojišča 2TY in inkubirali pri 37 °C 45 min. Celice smo centrifugirali 2 min pri 5000 rpm in pelet razmazali na plošče 2TY z ustreznim antibiotikom za selekcijo vnešenih plazmidov.

3.4.3 Transformacija *A. sulphurea*

V 5 ml gojišča TSB smo inokulirali spore *A. sulphurea* s plošč SM in 48 h gojili pri 30 °C in 220 rpm. Po 48 urah inkubacije smo nato 100 ml gojišča TSB inokulirali z 1 ml kulture *A. sulphurea* in spet 48 h gojili pri 30 °C in 220 rpm. Nato smo kulturo 15 min centrifugirali pri 5000 rpm in vsakih 5 g micelija (mokra biomasa) resuspendirali v 4 ml 20 % glicerola ter shranili alikvote po 500 µl pri -20 °C.

Za transformacijo smo resuspendirani micelij (500 µl) odtajali in trikrat sprali v 1,5 ml pufra TE in centrifugirali 2 min pri 5000 rpm. Po zadnjem centrifugiranju smo micelij resuspendirali v 125 µl pufra TE in razdelili v alikvote po 50 µl. K vsakemu alikvotu smo dodali:

- 10 µl 0,1 M MgCl₂,
- 31,3 µl 4 M CsCl,
- 2 µl timusne DNA (za zaščito plazmidne DNA pred nukleazami),
- 5-7 µl izbrane plazmidne DNA za transformacijo (npr. pAB03),
- 100 µl 70 % PEG1000 v pufru TE.

Transformacijsko mešanico smo dobro homogenizirali in inkubirali 40 min pri 30 °C, medtem pa pripravili gojišče R2L. Transformacijsko mešanico smo nato inkubirali 5 min pri 42 °C in ohladili na sobno temperaturo. Po 0,2 ml transformacijske mešanice smo dodali k 2 ml gojišča R2L in razlili na plošče S27M, ki smo jih pred tem 3 h sušili v brezprašni komori, da so izgubile približno 10 % teže. Po 16 urah inkubacije pri 30 °C smo plošče prelili z 1 ml raztopine ustrezega antibiotka v vodi in inkubirali še 10 dni pri 30 °C

(Madon in Hutter, 1991).

3.4.4 Priprava elektrokompetentnih celic *S. rimosus*

50 µl suspenzije spor *S. rimosus* M4018, shranjenih pri -80 °C, smo uporabili za inokulacijo 5 ml gojiša TSB in inkubirali 24 ur pri 30 °C in 220 rpm. 1 ml tako pridobljene prekonočne kulture *S. rimosus* M4018 smo uporabili za inokulacijo 100 ml gojišča TSB, in kultivirali 24 ur pri 30 °C in 220 rpm. Po 24 h inkubacije smo micelij prenesli v sterilne centrifugirke in hladili na ledu 15-30 min, nato pa centrifugirali 15 min pri 10000 rpm in 4 °C. Micelij (pelet) smo dvakrat sprali s hladno raztopino 10 % saharoze (najprej 100 ml, nato 50 ml) in nato še enkrat s hladnim 15 % glicerolom. Micelij smo resuspendirali v 10 ml 15 % raztopine glicerola z lizocimom (400 µg/ml) in inkubirali 30 min pri 37 °C. Nato smo micelij dvakrat sprali s hladno raztopino 15 % glicerola in pelet na koncu resuspendirali v 1-5 ml raztopine ET. Celice smo razdelili v alikvote po 50 µl in shranili pri -80 °C (Pigac in Schrempf, 1995).

3.4.5 Elektroporacija *S. rimosus*

V 50 µl alikvot celic smo dodali do 10 µl (1 µg) nemetilirane plazmidne DNA, izolirane iz seva *E. coli* ET12567, homogenizirali in prenesli v 2 mm elektroporacijsko kiveto. Celice smo elektroporirali z aparatom Micro Pulser Bio-Rad pri napetosti 2 kV, električni kapaciteti 25 µF in upornosti 400 Ω. Po elektroporaciji smo celicam dodali 950 µl gojišča TSB in 3 h inkubirali pri 30 °C. Celice smo centrifugirali 2 min pri 5000 rpm in pelet razmazali na plošče TSB z ustreznim antibiotikom za selekcijo vnešenih plazmidov (Pigac in Schrempf, 1995).

3.5 BIOTEST ZA VREDNOTENJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Kot testne organizme za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti smo uporabljali *E. coli*, *B. subtilis* in *S. cerevisiae* (Preglednica 2).

Postopek za vrednotenje protibakterijske aktivnosti na testni organizem *E. coli*: 10 ml prekonočne kulture smo centrifugirali 10 min pri 4500 rpm in pelet resuspendirali v 10 ml 20 % glicerola. Gojišče ABA s pH 6,5 smo po avtoklaviranju ohladili na 45 °C in inokulirali z 1 % kulture iz 20 % glicerola. Gojišče smo razlili v plošče s premerom 90 mm in volumnom 15 ml ter jih za 2 h postavili na 4 °C. V plošče smo nato izvrtili luknjice premera 5 mm in v vsako dali 30 µl vzorca, kot negativno kontrolo smo uporabili MeOH.

Plošče smo za 3 h postavili nazaj na 4 °C, nato pa za 16 h na 37 °C.

Postopek za vrednotenje protibakterijske aktivnosti na testni organizem *B. subtilis*: 10 ml prekonočne kulture smo centrifugirali 10 min pri 4500 rpm in pelet resuspendirali v 4 ml 20 % glicerola. Gojišče ABA (pH 6,5) smo po avtoklaviranju ohladili na 45 °C in inokulirali z 2 % kulture *B. subtilis* iz 20% glicerola. Tako pripravljeno gojišče (25 ml) s testnim organizmom smo razlili v plošče s premerom 90 mm ter jih za 2 h pre-inkubirali na 4 °C. V plošče smo nato izvrtali luknjice premera 5 mm in v vsako dali 50 µl vzorca, kot kontrolo smo uporabili MeOH. Plošče smo za 3 h postavili nazaj na 4 °C, nato pa za 16 h na 37 °C.

Postopek za vrednotenje protibakterijske aktivnosti na testni organizem *S. cerevisiae*: 10 ml prekonočne kulture v gojišču YEPD smo centrifugirali 10 min pri 4500 rpm in pelet resuspendirali v 10 ml 20 % glicerola. Gojišče YEPD (pH 6,5) smo po avtoklaviranju ohladili na 45 °C in inokulirali z 1 % kulture *S. cerevisiae* iz 20 % glicerola. Razlili smo plošče s premerom 90 mm in volumnom 25 ml ter jih za 2 h pre-inkubirali pri 4°C. V plošče smo nato izvrtali luknjice s premerom 5 mm in v vsako dali 50 µl vzorca, kot kontrolo smo uporabili MeOH. Plošče smo za 3 h postavili nazaj na 4 °C, nato pa 18 ur inkubirali pri 30 °C.

3.6 MOLEKULARNE METODE

3.6.1 Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli*

Plazmidno DNA iz *E. coli* smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) po navodilih proizvajalca. Prekonočne kulture *E. coli* smo gojili v tekočem gojišču 2TY z ustreznimi antibiotiki.

3.6.2 Izolacija genomske DNA iz aktinomicet

Genomsko DNA iz aktinomicet smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) po navodilih proizvajalca. Kulture smo gojili 24-48 h v tekočem gojišču TSB z ustreznimi antibiotiki.

3.6.3 Pomnoževanje DNA *in vitro* (reakcija PCR)

Za pomnoževanje določenih odsekov DNA smo uporabljali verižno reakcijo s polimerazo

PCR. Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala:

- 10 µl Phusion polimeraznega pufra (5×),
- 5 µl 2 mM dNTP (GC:AT v razmerju 6:4) ,
- 1 µl matrične DNA (70 ng/µl),
- 2,5 µl oligonukleotidnih začetnikov 1 (10 µM),
- 2,5 µl oligonukleotidnih začetnikov 2 (10 µM),
- 1,5 µl DMSO,
- 0,5 µl Phusion DNA polimeraze (Finnzymes),
- ddH₂O do končnega volumna 50 µl.

Reakcija je potekala v aparatu TProfessional Thermocycler (Biometra). Program pomnoževanja je obsegal 3 korake:

1. 2-minutna začetna denaturacija DNA pri 98 °C;
2. 30 ciklov pomnoževanja:
 - denaturacija (15 s pri 98 °C),
 - prileganje oligonukleotidnih začetnikov (30 s pri T_m izbranih oligonukleotidnih začetnikov),
 - podaljševanje verige DNA (30 s/kb pri 72 °C);
3. Zaključek sinteze DNA (10 min pri 72 °C).

3.6.4 Fosforilacija 5'-koncev DNA

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

3.6.5 Rezanje DNA z restriktionskimi endonukleazami

Za rutinsko preverjanje DNA smo pripravljali 10 µl restriktionske mešanice, v katere smo dodajali okoli 0,2 µg DNA. DNA smo rezali s pomočjo restriktionskih endonukleaznih encimov FastDigest (Fermentas) s priloženimi pufri po protokolu proizvajalcev. Navadno smo v reakcijske mešanice dajali 0,5 U restriktionskega encima in inkubirali 10 min do 1 h pri ustreznih temperaturah, običajno 37 °C. Za rezanje večjih količin DNA smo volumne ustreznno povečali, čas inkubacije pa podaljšali na 1-2 h. Reakcijo smo pred nanosom na gel

ustavili z dodatkom nanašalnega pufra (Fermentas). Za postopke nadaljnega kloniranja pa smo DNA prečistili s pomočjo kompleta Wizard® SV Gel and PCR clean-up System (Promega).

3.6.6 Defosforilacija linearnih DNA fragmentov

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

3.6.7 Ligacija fragmentov DNA

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

3.6.8 Ustvarjanje topih koncev DNA z veliko podenoto polimeraze I (fragment Klenow)

Za ustvarjanje topih koncev DNA fragmentov smo uporabljali velik fragment polimeraze I (Klenow) (Fermentas). Fragment Klenow je proteolitični produkt *E. coli* DNA polimeraze I, ki ima polimerazno aktivnost in 3'→5' eksonukleazno aktivnost, vendar je izgubil 5'→3' eksonukleazno aktivnost. Reakcijska mešanica s končnim volumnom 50 µl je vsebovala DNA s štrlečimi konci, 1× pufer Klenow, 40 µM dNTP mešanico (GC:AT=6:4) in 10 U fragmenta Klenow. Reakcijo smo inkubirali 20 min pri 37 °C in ustavili z inaktivacijo encima pri 75 °C za 10 min.

3.6.9 Agarozna gelska elektroforeza

Fragmente DNA smo ločevali z elektroforezo na 0,8 % (w/v) agaroznih gelih v 1× pufru TAE. Na 100 ml gela smo dodali 1 µl barvila SYBR Safe (Invitrogen). Vzorce smo pred nanašanjem na gel zmešali z 1× nalagalnim pufrom (6× DNA Loading Dye, Fermentas). Za elektroforezo smo uporabljali elektroforezne kadičke Mini-Sub® Cell GT in Sub-Cell®

GT ter napajalnik Power PAC 3000 proizvajalca Bio-Rad. Za določanje velikosti in koncentracije DNA smo uporabljali standard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) v koncentraciji 1 µg na luknjico. Gele smo si ogledali na UV transiluminatorju in fotografirali ter obdelali s programom Quantity One (Bio-Rad).

3.6.10 Izolacija DNA iz agaroznega gela in čiščenje DNA po encimskih reakcijah

Fragmente DNA smo po izrezovanju iz agaroznega gela ali po obdelavi z encimi očistili s pomočjo komercialnega kompleta kemikalij Wizard®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) po navodilih proizvajalca.

3.6.11 Prenos DNA iz gela na membrano po Southernu

Za analizo DNA po Southernu smo DNA iz gela s pomočjo vakuumske črpalke prenesli na membrano, kjer smo jo hibridizirali z označeno sondijo. Za prenos fragmentov DNA na pozitivno nabito nitrocelulozno membrano Hybond-N+ (Amersham Pharmacia) smo uporabili alkalno metodo (Sambrook in Russell, 2001).

Najprej smo z restriktionskimi encimi razrezali približno 2 µg genomske ali 50 ng plazmidne DNA in fragmente ločili po velikosti z agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo postavili na membrano v aparat za prenos, povezan z vakuumsko črpalko. Nato smo gel prelili s 50 ml depurinacijske raztopine, vključili črpalko in pustili 20 min da je prišlo do delne razgradnje DNA, kar omogoča lažji prenos večjih fragmentov. Depurinacijsko raztopino smo odstranili in gel prelili s 50 ml denaturacijske raztopine in spet pustili 20 min. Nato smo odstranili denaturacijsko raztopino in jo nadomestili s 50 ml nevtralizacijske raztopine za 20 min. Po tem smo spet odstranili nevtralizacijsko raztopino in gel prelili z raztopino za prenos, tako da smo gel čisto prekrili. Prenos je trajal 1 h. Po prenosu smo membrano označili na desni zgornji strani in za lažjo orientacijo pri odčitavanju rezultatov z drobnimi luknjicami zaznamovali mesta, kjer so bile jamice na gelu. Membrano smo splaknili v 20× SSC, jo posušili na zraku in spekli 1-2 h pri 80 °C. Nadaljevali smo s predhibridizacijo.

3.6.12 Hibridizacija po Southernu

Za dokazovanje prisotnosti določenega DNA fragmenta na genomski ali plazmidni DNA smo uporabili komercialni komplet kemikalij DIG-High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I (Roche Diagnostics GmbH) za hibridizacijo DNA-DNA. Metoda

temelji na hibridizaciji označene DNA sonde z DNA, ki je prenešena na pozitivno nabito membrano Hybond-N+. V našem primeru smo sondi označili z DIG-dUTP, na katero smo smo vezali protitelesa anti-DIG-Ab in vizualizirali barvno reakcijo s substratom NBT/BCIP.

Priprava DNA sonde: 10 ng do 3 µg DNA v 16 µl ddH₂O smo 10 min denaturirali pri 100 °C, takoj postavili na led in dodali 4 µl mešanice za označevanje DNA z DIG-dUTP (Viala 1 iz DIG-High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I, Roche). Reakcijsko mešanico smo čez noč inkubirali pri 37 °C.

Predhibridizacija: Membrano s prenešeno DNA smo 30 min predhibridizirali v hibridizacijski raztopini (DIG-Easy Hyb granule smo raztopili v 64 ml ddH₂O z mešanjem pri 37 °C) pri 58 °C. Med predhibridizacijo membrane smo denaturirali z DIG-dUTP označeno sondi - za 5 min smo jo postavili na 100 °C in nato dodali k temperirani raztopini DIG-Easy Hyb granul (6 ml / 100 cm² membrane).

Hibridizacija: hibridizacijo tekočino iz procesa predhibridizacije smo odlili in v hibridizacijsko steklenico z membrano dodali svežo hibridizacijsko raztopino z denaturirano označeno sondi. Membrano smo preko noči hibridizirali pri 58 °C. Nato smo membrano dvakrat po 5 min sprali v 2× SSC/0,1 % SDS pri sobni temperaturi, nato pa dvakrat po 10 min v 0,5× SSC/0,1 % SDS pri 58 °C.

Imunološko dokazovanje vezane sonde (za 100 cm² membrane): Membrano smo za 1-5 min namakali v pufru za spiranje, nato pa 30 min inkubirali v 100 ml sveže pripravljene raztopine Blocking solution (Viala 6 iz DIG-High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I, Roche). Sledila je 30-minutna inkubacija v 20 ml raztopine Antibody solution (Viala 4 iz DIG-High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I, Roche), nato pa dvakratno 15-minutno spiranje v 10 ml pufra za spiranje. Membrano smo nato 2-5 min ekvilibrirali v 20 ml pufra za detekcijo in inkubirali v 10 ml sveže pripravljene raztopine z eno raztopljenim tabletko NBT/BCIP v ddH₂O in med razvijanjem barve inkubirali v temi. Ko smo dosegli želeno intenziteto, smo membrano sprali v ddH₂O in slikali.

3.7 METODA ZA VREDNOTENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI RppA

Aktivnost kalkon sintaze RppA oziroma produkcijo flavolinskih pigmentov smo merili po že opisanem postopku Magdevske in sod. (2010). Produkt RppA je 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (THN), ki spontano oksidira v temno rdeč kinon flavolin (2,5,7-trihidroksi-1,4-naftokinon), ki omogoča kvalitativno določanje genskega izražanja na agarnih ploščah kot tudi kvantitativno spektrofotometrično merjenje v tekočih kulturah

brez invazivnih postopkov in brez dodatkov eksternih substratov ter neodvisno od sestave uporabljenega gojišča (Magdevska in sod., 2010).

Vzorce kultur smo centrifugirali (14.000 rpm za 10 minut), supernatant redčili (da smo dosegli linearno območje merjenja) in izmerili absorbanco pri 270 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic (Tecan, Safire 2). Kot kontrolo ozadja kultur *A. sulphurea* smo izmerili še absorbanco kulture divjega tipa *A. sulphurea* pri 270 nm in jo odšteli od absorbance vzorcev.

3.8 ANALITSKE METODE

3.8.1 Določanje vsebnosti CHD in kelokardinskih analogov

Producjsko kulturo *A. sulphurea* smo zakisali s 50 % TFA do pH 1-2, na 5 ml kulture dodali 5 ml butanola in stresali 1 h pri 220 rpm. Vse skupaj smo centrifugirali 3 min pri 4000 rpm in zgornjo fazo prenesli v 2 ml centrifugirke. Vzorce smo še enkrat centrifugirali 10 min pri 14000 rpm in supernatant prenesli v novo centrifugirko. Za preverjanje vzorcev na HPLC smo butanolni izvleček redčili v MeOH.

3.8.2 Določanje vsebnosti OTC in oksitetraciklinskih analogov

Producjsko kulturo *S. rimosus* smo zakisali s 50 % TFA do pH 1-2 in stresali 1 h pri 220 rpm. Vse skupaj smo centrifugirali 20 min pri 14000 rpm in supernatant prenesli v 2 ml centrifugirke. Vzorce smo še enkrat centrifugirali 20 min pri 14000 rpm in supernatant prenesli v novo centrifugirko. Za preverjanje vzorcev na LC-MS smo vzorce filtrirali skozi 0,2 µm filter.

3.8.3 HPLC analiza CHD in kelokardinskih analogov

Uporabili smo aparat Thermo Finnigan Surveyor s kolono Machery Nagel Nucleodur (150 mm × 4,6 mm; velikost delcev 3 µm). Za gradientno HPLC smo uporabili mobilni fazi A in B:

- mobilna faza A: 10 % (v/v) acetonitril v ddH₂O z 1 % (v/v) mravljično kislino,
- mobilna faza B: 10 % (v/v) ddH₂O v acetonitrilu z 1 % (v/v) mravljično kislino.

Analiza je potekala pri naslednjih pogojih:

- volumen injiciranja: 10 µl,

- pretok: 1 ml/min,
- pogoji gradienata: 0 min – 90 % A in 10 % B, 1 min – 90 % A in 10 % B, 15 min – 5 % A in 95 % B, 19 min – 5 % A in 95 % B, 19,1 min – 90 % A in 10 % B, 24 min – 90 % A in 10 % B,
- temperatura kolone: 40 °C,
- valovna dolžina detekcije: 275 nm.

3.8.4 LC-MS analiza CHD in kelokardinskih analogov

LC-MS analize je opravil dr. Tomaž Polak iz Biotehniške univerze Univerze v Ljubljani. Za LC-MS/MS analize CHD in kelokardinskih analogov je uporabil sistem Agilent serije 1100 (model G1312A binary pump, G1330B autosampler) (Agilent Technologies). Ločba na reverzni fazi je potekala na koloni Gemini C18 (150 mm × 2,0 mm; velikost delcev 3 µm) (Phenomenex, ZDA). CHD je določil s primerjavo retenzijskih časov in m/z standarda CHD, ki nam ga je daroval prof. dr. Julian Davies (The University of British Columbia, Vancouver, Kanada).

Za gradientno LC je uporabil mobilni fazi A in B:

- mobilna faza A: 1 % (v/v) mravljična kislina v ddH₂O,
- mobilna faza B: 1 % (v/v) mravljična kislina acetonitrilu.

Analiza je potekala pri naslednjih pogojih:

- volumen injiciranja: 10 µl,
- pretok: 0,25 ml/min,
- pogoji gradienata: 0 min – 20 % B; 0-13 min - 20-90 % B; 13-15 min – 90 % B; 15-15,1 min - 90-20 % B; 15,1-25 min – 20 % B,
- temperatura kolone: 45 °C.

Za detekcijo je uporabil masni detektor (Micromass Quattro Micro, Watters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo v pozitivnem načinu (electrospray ionization ESI+), ki deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 20 V, temperatura izvora 100 °C, napetost kapilare 3,5 kV. Razpršilni plin je imel temperaturo 350 °C in pretok 350 l/h. Detekcija spojin na masnem detektorju je potekala v SIR (Single Ion Recording) načinu, potrdil pa jih je s fragmentacijo MS/MS (Daughter Scan). Rezultati so bili obdelani v računalniškem programu MassLynx V4.0 (Micromass, 2004).

3.8.5 LC-MS analiza OTC in oksitetraciklinskih analogov

LC-MS analize je opravil dr. Tomaž Polak iz Biotehniške univerze Univerze v Ljubljani. Za LC-MS/MS analize OTC in oksitetraciklinskih analogov je uporabil LC-MS sistem in kolono enaka kot za analizo CHD.

Za gradientno LC je uporabil mobilni fazi A in B:

- mobilna faza A: 1 % (v/v) mravljična kislina v ddH₂O,
- mobilna faza B: 1 % (v/v) mravljična kislina acetonitrilu.

Analiza je potekala pri naslednjih pogojih:

- volumen injiciranja: 10 µl,
- pretok: 0,25 ml/min,
- pogoji gradiента: 0 min – 7 % B; 0-13 min - 7-40 % B; 13-15 min - 40-60 % B; 15-15,1 min - 60-7 % B; 15,1-20 min – 7 % B,
- temperatura kolone: 45°C.

Za detekcijo je uporabil masni detektor (Micromass Quattro Micro, Watters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo v pozitivnem načinu (electrospray ionization ESI+), ki deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 22 V, temperatura izvora 120 °C, napetost kapilare 3,5 kV. Razpršilni plin je imel temperaturo 350 °C in pretok 350 l/h. Detekcija spojin na masnem detektorju je potekala v SIR (Single Ion Recording) načinu, potrdil pa jih je s fragmentacijo MS/MS (Daughter Scan). Rezultati so bili obdelani v računalniškem programu MassLynx V4.0 (Micromass, 2004).

3.8.6 NMR in HRMS analiza CHD in CDCHD

NMR analizo CHD in 2-karboksiamido-2-deacetil-CHD (CDCHD) je izvedla dr. Ajda Podgoršek na Institutu "Jožef Stefan". Obe spojini je raztopila v DMSO-D₆ do koncentracije okoli 5 mg/ml. Spektre jedrske magnetne rezonance vodika (¹H NMR) in jedrske magnetne rezonance ogljika (¹³C NMR) so posneli pri 25 °C na spektrometrih Varian NMR System 800 MHz (800 MHz, 5mm HCN Cold Probe Gen2) in Varian Unity Inova 300 MHz NMR (300 MHz/75 MHz). Masne spektre visoke ločljivosti je posnel dr. Martin Šala iz Nacionalnega inštituta za kemijo na LC sistemu Agilent technologies 1260 infinity in TOF/LC/MS aparatu Agilent technologies 6224.

3.9 IZOLACIJA CHD IN KELOKARDINSKIH ANALOGOV

S Strata™-X polimernimi SPE (ekstrakcija na trdni fazi) kolonami smo iz kulture sevov *A. sulphurea* izolirali CHD in kelokardinske analoge. 50 ml kulture smo najprej zakisali z 2 g TCA in jo ekstrahirali s 50 ml diklorometana (za CHD) oziroma butanola v primeru ostalih kelokardinskih analogov. Mešanico smo stresali ročno v liju ločniku ali na stresalniku pri 220 rpm, nato pa centrifugirali 10 min pri 4500 rpm. Organsko fazo smo prenesli v stekleno bučko, evaporirali topilo in raztopili v 20 ml MeOH. Metanolno raztopino smo nato zmešali s 50 ml 10 % (v/v) MeOH, zakisanega z 250 µl mravljične kisline. V primeru analogov smo raztopino pred nalaganjem na SPE kolono 5 min centrifugirali pri 4500 rpm, da smo se znebili nečistoč. Kolono smo spirali z naraščajočo koncentracijo MeOH v vodni raztopini. CHD smo eluirali s 70 % MeOH, analoge pa s 60 % MeOH. K 10 ml eluata smo dodali 3,3 mL 37 % HCl in evaporirali MeOH. Po nekaj dnevih inkubacije pri 4 °C se je tvoril precipitat, ki smo ga posušili in sprali s heksanom.

4 REZULTATI

Poglavitni namen doktorskega dela je bil proučevanje zaključnih oziroma poznih stopenj (post-PKS modifikacije) v biosintezi tetraciklinskih antibiotikov. Zato smo najprej razvili primerna orodja in metode za gensko manipulacijo producenta nenavadnega tetraciklina, bakterije *A. sulphurea*.

S prekinivjo in komplementacijo minimalnega PKS za biosintezo CHD smo potrdili vlogo genske skupine *chd* v biosintezi CHD. Da bi dokazali njuno funkcijo, smo preko dvojne homologne rekombinacije prekinili gena *chdMII* in *chdN* iz genske skupine za biosintezo CHD, ki predvidoma kodirata metiltransferazo oziroma aminotransferazo - encima, udeležena v modifikaciji CHD v poznih stopnjah biosinteze.

Z namenom testiranja substratne specifičnosti smo v *A. sulphurea* heterologno izrazili gene poznih stopenj biosinteze iz drugih tetraciklinskih genskih skupin: gena za oksigenzo OxyS in metiltransferazo OxyT iz genske skupine za biosintezo OTC in gen za halogenazo Chl iz genske skupine za biosintezo CTC. Za vnos heterolognih genov v *A. sulphurea* smo uporabili integrativni vektor pAB03. Z istim namenom smo v *S. rimosus* skušali izraziti gen za metiltransferazo ChdMII iz genske skupine za biosintezo CHD, pri čemer smo uporabili integrativni vektor pTS55.

Zanimala nas je tudi biosinteza in vgradnja začetne enote v osnovno poliketidno verigo tetraciklinov. Preveriti smo žeeli možnost vgradnje nenavadne začetne enote malonamil-CoA iz OTC biosintezne poti, zato smo v *A. sulphurea* heterologno izrazili gena za amidotransferazo OxyD in AT OxyP, udeležena v omenjeni proces v biosintezi OTC. Tudi v tem primeru smo za vnos heterolognih genov uporabili integrativni vektor pAB03. Poleg tega smo v *S. rimosus* preko enojne homologne rekombinacije prekinili gen *oxyP*, da bi potrdili udeleženost AT OxyP pri vgradnji malonamatne začetne enote v biosintezi OTC.

4.1 PREVERJANJE DELOVANJA ANTIBIOTSKIH MARKERJEV V *A. sulphurea*

Za potrebe razvoja metode za transformacijo *A. sulphurea*, smo najprej preverili intrinzično odpornost *A. sulphurea* na izbrane antibiotike v različnih gojiščih. Tekom postavljanja metode za transformacijo *A. sulphurea* smo določili še primerne koncentracije antibiotikov za selekcijo transformant *A. sulphurea* (Preglednica 5).

Preglednica 5: Primerne koncentracije antibiotikov, ki inhibirajo rast *A. sulphurea*, za selekcijo transformant *A. sulphurea* v različnih gojiščih

Table 5: Appropriate antibiotic concentrations, which inhibit *A. sulphurea* growth, for selection of transformants of *A. sulphurea* in different media

gojišče/antibiotik	Apr	Erm	Kan
S27M	200 µg/ml	20 µg/ml	300 µg/ml
SM	400 µg/ml	20 µg/ml	300 µg/ml
TSB (tekoče) / CHD-V	50 µg/ml	10 µg/ml	200 µg/ml
CHD-F2	75 µg/ml	20 µg/ml	200 µg/ml

4.2 RAZVOJ METODE ZA TRANSFORMACIJO *A. sulphurea*

Testirali smo različne metode vnosa DNA v *A. sulphurea*: konjugativni prenos iz *E. coli*, elektroporacijo, transformacijo protoplastov in transformacijo micelija. Postopek konjugativnega prenosa plazmidov med *E. coli* in *A. sulphurea* ter postopek transformacije protoplastov *A. sulphurea* smo izvedli po protokolih, ki so jih opisali Kieser in sod. (2000). Za pripravo elektrokompetentnih celic *A. sulphurea* smo sledili protokolu za *S. rimosus*, opisanem v podpoglavljinah 3.4.4 (Priprava elektrokompetentnih celic *S. rimosus*) in 3.4.5 (Elektroporacija *S. rimosus*). Postopek transformacije micelija *A. sulphurea* je opisan v podpoglavlju 3.4.3 (Transformacija *A. sulphurea*).

Elektroporacija, transformacija protoplastov in konjugativni prenos so se izkazali za neuspešne, medtem ko je transformacija micelija, povzeta po Madon in Hütter (1991), delovala in dala zadovoljive rezultate (Madon in Hutter, 1991). Tako smo lahko testirali uporabnost aktinomicetnih vektorjev za vnos DNA v *A. sulphurea*, tako replikativnih kot tudi integrativnih vektorjev. Testirali smo integrativne vektorje: pPLUS02 in pSET152, ki vsebujeta Φ C31 integrazo in odgovarjajoče mesto *attP* (Kuhstoss in Rao, 1991), pTS55, ki vsebuje integrazo pSAM2, in pAB03, ki vsebuje integrazo bakteriofaga Φ BT1 (Preglednica 3). Transformacija s plazmidoma pPLUS02 in pTS55 ni bila uspešna, medtem ko smo pri transformaciji z vektorjem pSET152 in pAB03 dobili transformante. Transformacija z vektorjem pAB03 je bila najbolj uspešna: s transformacijo 0,5 µg plazmidne DNA v *A. sulphurea* smo v prvih eksperimentih razvoja metode lahko dobili okoli 20 transformant. Metodo transformacije micelija smo nekoliko re-optimizirali za naš delovni organizem - *A. sulphurea* (Madon in Hutter, 1991). Najbolj primerna starost kulture *A. sulphurea* za transformacijo je bila 48 h. Ugotovili smo, da je optimalna količina plazmidne DNA za transformacijo med 0,5 µg in 1 µg, kjer smo dobili tudi do 300 transformant *A. sulphurea*.

Poleg integrativnih vektorjev smo preverili še uporabnost različnih aktinomicetnih

replikativnih vektorjev v *A. sulphurea*: npr. pKC1139, pIJ487 (replikativna vektorja v *Streptomyces* spp.), pNV18 oziroma pNV19 (replikativni vektor v *Nocardia* spp.) in nekateri replikativni vektorji v *A. orientalis* (Preglednica 3). Izmed vseh testiranih vektorjev se je za pogojno uporabnega izkazal le pNV18 oziroma pNV19. Ta vektor je v *A. sulphurea* zelo nestabilen (se slabo replicira) in se že po nekajkratnih precepljanjih kolonij transformant (tudi pod seleksijskim pritiskom) izloči iz celic.

4.3 VREDNOTENJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV V *A. sulphurea*

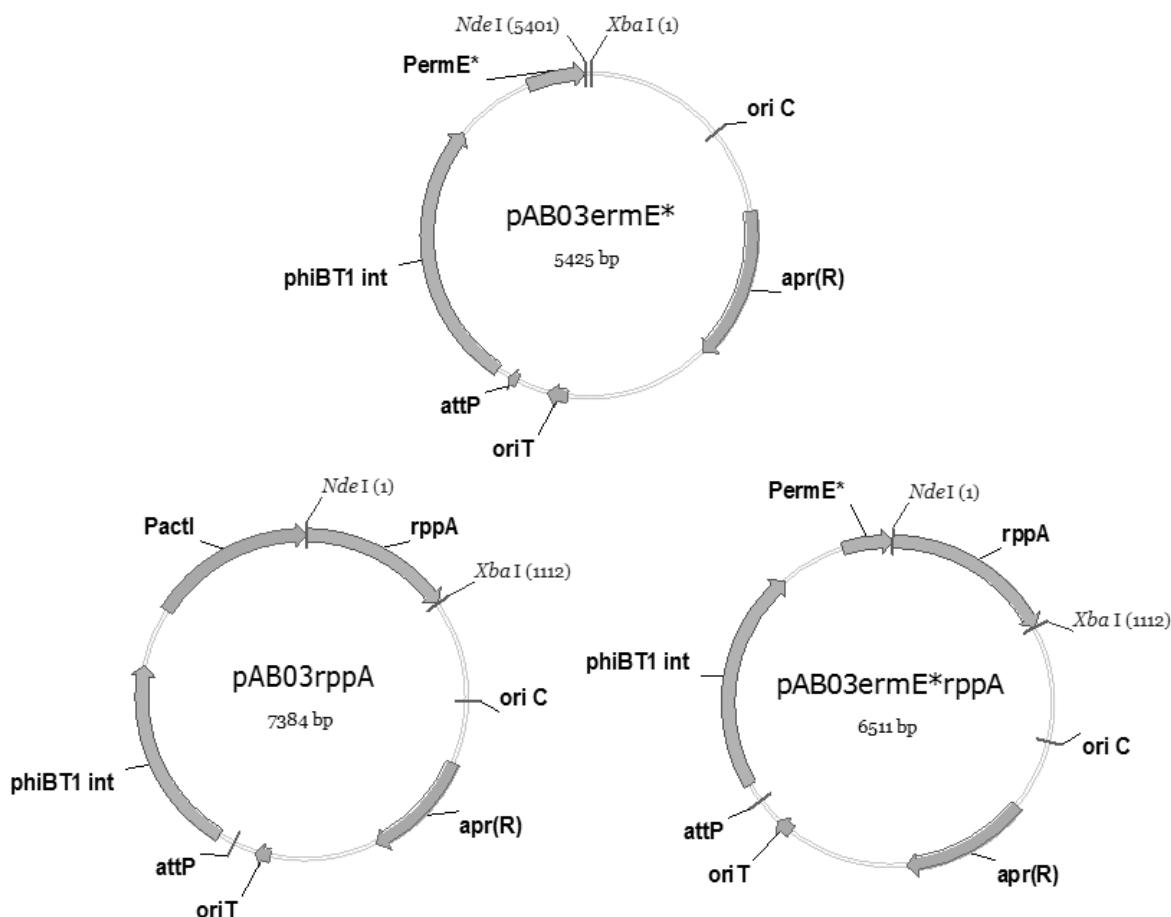
Kuščer in sod. (2007) ter Magdevska in sod. (2010) so v svojih delih prikazali uporabnost poročevalskega sistema, ki temelji na *rppA* genu (gen za kalkon sintazi podoben protein iz *Saccaropolyspora erythraea*) (Kuščer in sod., 2007; Magdevska in sod., 2010). Tudi mi smo uporabili ta poročevalski sistem za ovrednotenje delovanja dveh promotorjev v *A. sulphurea*: *PactI* oziroma aktivator/promotorski sistem *actII-ORF4/PactI* iz genske skupine za biosintezo aktinorodina iz *S. coelicolor* (Fernandez-Moreno in sod., 1991) in promotor *PermE**, ki predstavlja mutirani promotor gena za eritromicinsko rezistenco (metiltransferaza 16S rRNA) iz *S. erythraea*.

4.3.1 Konstrukcija vektorjev s poročevalskim genom *rppA*

Gen *rppA* je dolg 1104 bp in kodira protein, ki vsebuje 367 AK (Cortes in sod., 2002). Za primerjavo promotorjev *PactI* in *PermE** smo najprej iz vektorja pAB03 s postopno restrikcijsko reakcijo izrezali promotor *PactI*: vektor smo najprej linearizirali z restrikcijskim encimom *SpeI*, štrleče konce zapolnili s Klenowim fragmentom in vektor še enkrat rezali, tokrat z restrikcijskim encimom *NdeI*. Namesto promotorja *PactI* smo v vektor pAB03 nato klonirali promotor *PermE**, ki smo ga izrezali iz vektorja pVM1ermE*xyle: najprej smo ga linearizirali z restrikcijskim encimom *EcoRI*, štrleče konce zapolnili s Klenowim fragmentom in vektor še enkrat rezali, tokrat z restrikcijskim encimom *NdeI*. Promotor *PermE** smo z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pAB03 brez promotorja *PactI* in tako konstruirali vektor pAB03ermE* (Slika 20).

Gen *rppA* smo pomnožili z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma CHSF (5'-ATG GAG GCA CAT ATG GCA GTT CTA TGC ACC CCT GCG-3'), ki vsebuje restrikcijsko mesto *NdeI*, in CHSR (5'-AAT CTA GAG TCG GTC ATC GGT TGC CTC CCG GGG CGG ACG TG-3'), ki vsebuje restrikcijsko mesto *XbaI*, ter uporabili genomsko DNA iz *S. erythraea* kot matrico. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restrikcijskim encimon *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen

fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1rppA z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1,1 kb dolg fragment, očistili iz gela in z ligacijsko reakcijo zlepili v vektorja pAB03 in pAB03ermE*, ki smo ju prej linearizirali z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* - tako smo konstruirali vektorja pAB03rppA in pAB03ermE*rppA (Slika 20).



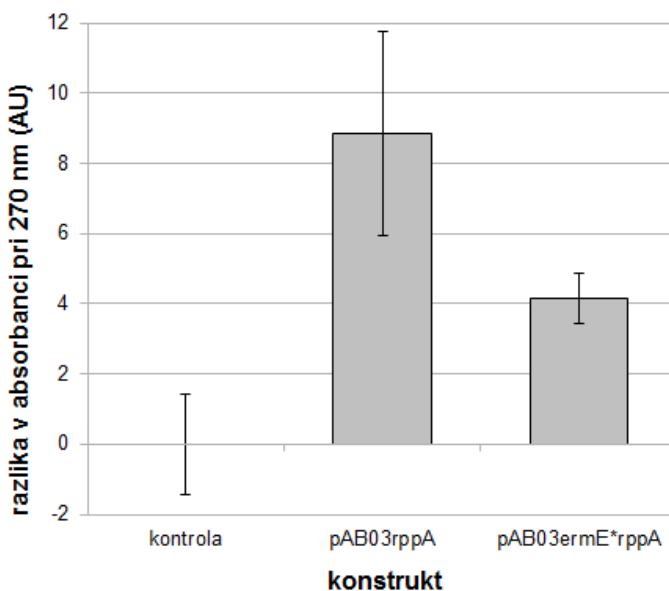
Slika 20: Vektorji pAB03ermE*, pAB03rppA in pAB03ermE*rppA
Figure 20: pAB03ermE*, pAB03rppA and pAB03ermE*rppA vectors

4.3.2 Vrednotenje izražanja poročevalskega gena *rrpA*

Vektorja pAB03rppA in pAB03ermE*rppA smo najprej transformirali v *E. coli* ET12567, da smo izolirano nemetilirano plazmidno DNA nato lahko vnesli v *A. sulphurea* z metodo transformacije micelija (Madon in Hutter, 1991). Po transformaciji smo proti Apr odporne

transformante precepili iz trdnega gojišča S27M na gojišče SM (Kieser in sod., 2000) z dodanim Apr ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$). Transformante smo nacepili v tekoče gojišče CHD-V z dodanim Apr ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) in 36 h gojili pri 30°C in 220 rpm. Tako pripravljen inokulum vegetativnega micelija smo nato precepili v prodekijsko gojišče CHD-F2 z dodanim Apr ($75 \mu\text{g}/\text{ml}$) in gojili 7 dni pri 30°C in 220 rpm. Po zaključeni inkubaciji smo ovrednotili produkcijo flavolinskih pigmentov s kalkon sintazo RppA. Vzorce kultur smo centrifugirali (14.000 rpm za 10 minut), supernatant redčili (da smo dosegli linearno območje merjenja) in izmerili absorbanco pri 270 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic (Tecan, Safire 2) (Magdevska in sod., 2010). Kot kontrolo smo uporabili kulturo divjega tipa *A. sulphurea*, njeno absorbanco smo odšteli od absorbance transformant *A. sulphurea*, ki so imele vgrajen vektor pAB03rppA oziroma pAB03ermE*rppA.

Ugotovili smo, da je *actII*-ORF4/*PactI* močnejši promotor v primerjavi z *PermE** (Slika 21), zato smo v nadaljnjih poskusih izražanja heterolognih genov v *A. sulphurea* uporabljali prav *actII*-ORF4/*PactI*.



Slika 21: Vrednotenje moči promotorjev *PactI* in *PermE** preko izražanja *rppA*

Pod kontrolo promotorja *PactI* (konstrukt pAB03rppA) smo dosegli višje izražanje gena *rppA* v *A. sulphurea* kot pa pod kontrolo promotorja *PermE** (konstrukt pAB03ermE*rppA). Absorbanco smo merili pri 270 nm in primerjali s kontrolnim sevom.

Figure 21: Evaluation of the *PactI* and *PermE** promoter strength through *rppA* expression

Higher expression of *rppA* gene in *A. sulphurea* was achieved under the control of *PactI* promoter (pAB03rppA construct) than under the control of *PermE** promoter (construct pAB03ermE*rppA). Absorbance was measured at 270 nm and compared to control strain.

4.4 PREKINITEV GENOV MINIMALNEGA PKS

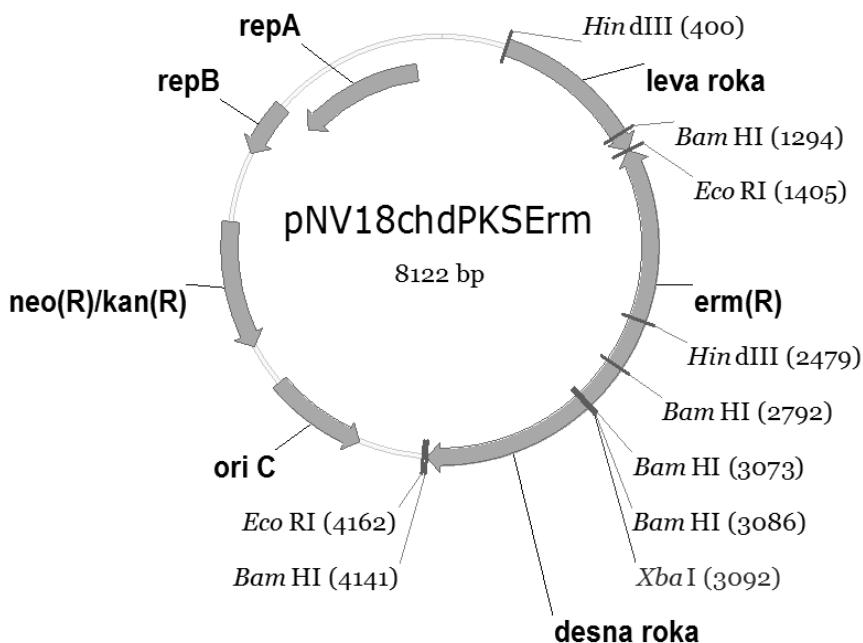
4.4.1 Konstrukcija vektorjev za prekinitev minimalnega PKS

Z namenom, da bi prekinili gene minimalnega PKS za biosintezo CHD, in s tem potrdili, da klonirana genska skupina zares kodira biosuntezo CHD, smo najprej pripravili konstrukt na osnovi pKC1139, v katerega smo klonirali del genske skupine za biosintezo CHD, ki smo jo prekinili z vnosom gena za odpornost proti Erm. Vektor pKC1139 vsebuje temperaturno občutljivo replikon za začetek podvajanja v streptomicetah in se zato pri temperaturi nad 34 °C v celicah ne podvaja več, zaradi česar začnejo celice izgubljati plazmid. Prav zaradi tega pa pod selekcijskim pritiskom antibiotika lahko rastejo le celice (kolonije), pri katerih se je plazmid na osnovi pKC1139 s homologno rekombinacijo vgradi v bakterijski kromosom. Ta pristop za prekinitev minimalnega PKS je bil neuspešen.

Ugotovili pa smo lahko le, da je vektor pKC1139 v *A. sulphurea* nestabilen tudi pri temperaturi pod 34 °C.

Naslednji pristop je vključeval uporabo samomorilskega vektorja pOJ260 za prekinitev minimalnega PKS. Samomorilski vektorji se v celici ne podvajajo in njihova edina možnost ohranitve v celicah je, da se s homologno rekombinacijo vgradijo v bakterijski kromosom in kasneje vzdržujejo pod selekcijskim pritiskom. V vektor pOJ260 smo klonirali gen za eritromicinsko rezistenco, obdan z leve in desne strani z dvema 1kb velikima sekvcencama s homologijo v predelu minimalnega PKS, ki kodira biosintezo CHD, ki omogočajo homologno rekombinacijo. Ta pristop tudi ni bil uspešen. Zelo verjetno je število kopij vektorja pOJ260 po transformaciji v celicah *A. sulphurea* prenizko in frekvenca homologne rekombinacije prenizka, da bi lahko dobili transformante s prekinjenim minimalnim PKS.

V naslednjem koraku smo poskusili uporabiti vektor pNV18, ki se v *A. sulphurea* ne replicira stabilno. Vektor se nekaj generacij še podvaja v celicah *A. sulphurea*, nato pa se izgubi. Konstruirali smo vektor pNV18chdPKSErm (Slika 22) za prekinitev kelokardinskega minimalnega PKS, kjer je 2150 bp osrednje regije kelokardinskega minimalnega PKS (2/3 gena *chdP*, cel gen *chdK* in začetek gena *chdS*) zamenjanih z genom za eritromicinsko rezistenco, obdajata pa jo dve 1 kb veliki homologni sekvenci, ki sta homologni preostalem delu genske skupine za biosintezo CHD v predelu minimalne PKS (Sliki 22 in 23). Z oligonukleotidnima začetnikoma 8kb-LHindIII-F (5'-TCA AGC TTC TGC TCC CAG CCG GC-3') in 8kb-LEcoRI-R (5'-GCT GGG GCA CCC CGG AAT TCG-3') smo z reakcijo PCR pomnožili levo roko homologije. Z oligonukleotidnima začetnikoma 8kb-DXbaI-F (5'-TTC TAG AGT TCA CGA TCG CC-3') in 8kb-DBamHI-R (5'-AGC CGA AGG CCC GGA TCC G-3') pa smo z reakcijo PCR pomnožili desno roko homologije. V obeh primerih smo za matrico uporabili genomsko DNA *A. sulphurea*. Konce leve roke smo rezali z restriktijskima encimoma *Hind*III in *Eco*RI, konce desne roke pa z *Xba*I in *Bam*HI. Poleg tega smo iz vektorja pVM1Erm(R) z restriktijskima encimoma *Eco*RI in *Xba*I izrezali gen za odpornost proti Erm in vektor pNV18 linearizirali z restriktijskima encimoma *Hind*III in *Bam*HI. Vse tri fragmente (obe roki homologije in gen za eritromicinsko rezistenco) smo z ligacijsko reakcijo zlepili v lineariziran vektor pNV18. Tako sestavljen vektor za prekinitev minimalnega PKS smo preverili s sekveniranjem.



Slika 22: Vektor pNV18chdPKSErm za prekinitev kelokardinskega minimalnega PKS.

Vsebuje *neo(R)/kan(R)* - gen za neomicinsko/kanamicinsko rezistenco, *erm(R)* – gen za eritromicinsko rezistenco, mesto začetka podvajanja v *E. coli* (*oriC*), gena *repA* in *repB* za začetek replikacije v aktinomicetah, levo in desno roko homologije *chd* minimalnega PKS.

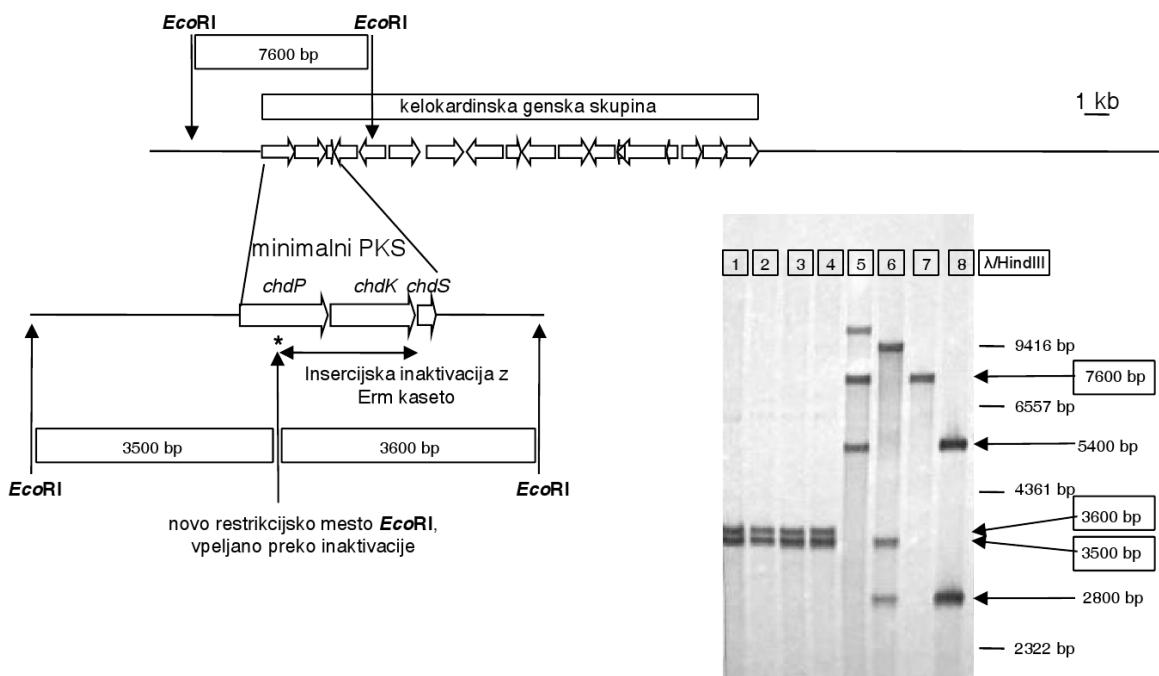
Figure 22: pNV18chdPKSErm vector for inactivation of CHD minimal PKS. It contains *neo(R)/kan(R)* - genes coding for Neo/Kan resistance, *erm(R)*- gene for Erm resistance, origin of replication in *E. coli* (*oriC*), *repA* and *repB* genes for the initiation of replication in actinomycetes, left and right homology of *chd* minimal PKS.

4.4.2 Vrednotenje produkcijske CHD pri transformantah *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS

pNV18chdPKSErm smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA transformirali v *A. sulphurea*. Transformante smo nato trikrat precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Erm (20 µg/ml) in preverili še rast na gojišču z dodanim Kan (300 µg/ml). Ko smo dobili transformante (sekundarne rekombinantne), občutljive na Kan in odporne proti Erm, je to pomenilo, da se je zgodila dvojna homologna rekombinacija - s prvo se je vektor pNV18chdPKSErm vgradil v kromosom *A. sulphurea*, z naslednjo rekombinacijo pa je ven padel prazen vektor pNV18 in kelokardinski minimalni PKS je ostal prekinjen z eritromicinsko rezistenco. Genotip sekundarnih rekombinantov smo potrdili s hibridizacijo po Southernu (Slika 23). Genomsko DNA rekombinantov smo razrezali z restriktionskim encimom *EcoRI* in jo hibridizirali s PKS sondami,

pomnoženo z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma chdPF (5'-TAT ATA TCA TAT GAC AGG ACC AAG CGA TGC-3') in chdSR (5'-TAT ATT CTA GAC CTT CAC AGC CTT TTC AGT-3').

Za preverjanje produkcije CHD smo rekombinante nacepili in 36 h gojili v tekočem gojišču CHD-V z dodanim Erm (10 µg/ml) pri 30 °C in 220 rpm za nagojitev vegetativnega inkoluma in nato precepili v produkcijsko gojišče CHD-F2 z dodanim Erm (20 µg/ml) in gojili 7 dni pri 30 °C in 220 rpm. Kulturo smo zakisali in ekstrahirali z butanolom ter produkcijo CHD overdnobili z metodama HPLC in LC-MS. Rekombinante s potrjenim prekinjenim minimalnim PKS niso proizvajale CHD (Slika 24).

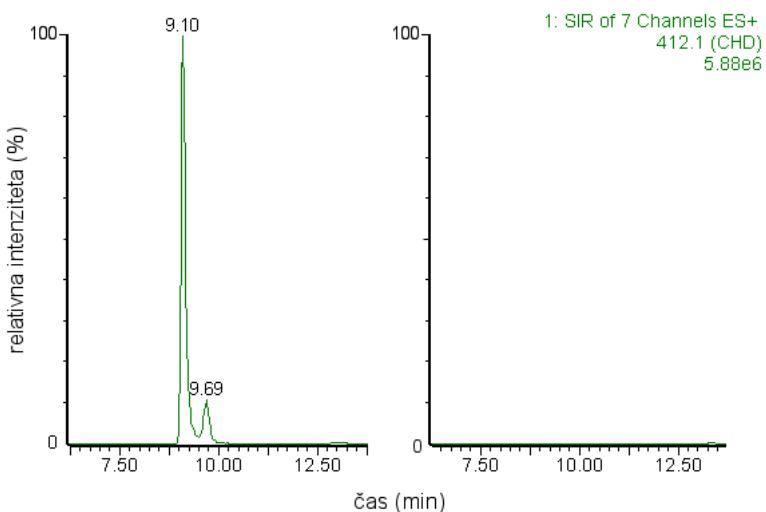


Slika 23: Potrditev prekinitev minimalnega PKS s hibridizacijo po Southernu

Desno: sekundarne rekombinante *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS (1-4), primarne rekombinante *A. sulphurea* (5, 6), divji tip *A. sulphurea* (7) in vektor pNV18chdPKSErm, rezan z *EcoRI* (8). Levo: razlaga velikosti fragmentov, ki jih opazimo po hibridizaciji.

Figure 23: Confirmation of minimal PKS inactivation by Southern hybridisation

Right: *A. sulphurea* secondary recombinants with inactivated minimal PKS (1-4), *A. sulphurea* primary recombinants (5,6), *A. sulphurea* wild-type (7) and pNV18chdPKSErm vector, digested with *EcoRI* (8). Left: Explanation of fragments, which can be detected after hybridization.



Slika 24: Analiza metabolitov sevov *A. sulphurea* z inaktiviranim minimalnim PKS s pomočjo LC-MS
V izvlečkih kulture divjega tipa *A. sulphurea* (levo) smo opazili prisotnost spojine z maso $[M+H]^+$ 412 in retencijskim časom 9,1 min ter 9,7 min, ki ustreza CHD, medtem ko v izvlečkih sekundarnih rekombinant *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS (desno) te spojine nismo opazili.

Figure 24: Metabolite analysis of *A. sulphurea* strains with inactivated minimal PKS using LC-MS
A compound with $[M+H]^+$ mass of 412 and retention time 9,1 min and 9,7 min, which corresponds to CHD, was found in *A. sulphurea* wild-type butanol extracts (left), while this compound was not detected in butanol extracts of *A. sulphurea* secondary recombinants with inactivated minimal PKS (right).

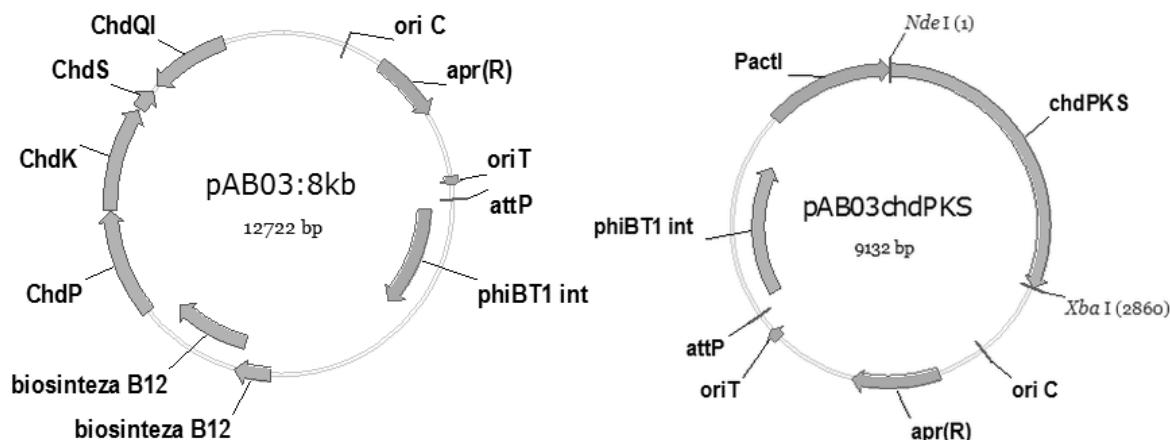
4.5 KOMPLEMENTACIJA SEVOV S PREKINJENIM MINIMALNIM PKS

4.5.1 Konstrukcija vektorjev za komplementacijo prekinitve minimalnega PKS

Za komplementacijo sevov s prekinjeno minimalno PKS regijo za biosintezo CHD smo konstruirali dva vektorja: pAB03:8kb in pAB03chdPKS (Slika 25). Prvi vsebuje gene minimalnega PKS pod kontrolo nativnega promotorja, drugi pa vsebuje gene minimalnega PKS, ki se prepisujejo pod kontrolo promotorja *PactI*.

Iz vektorja pLUC10E (Lešnik, 2009) smo z restriktionskim encimom *EcoRI* izrezali 8 kb velik fragment, s Klenowim fragmentom nato zapolnili štrleče konce in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v lineariziran vektor pAB03, ki smo mu z restriktionskima encimoma *SpeI* in *NdeI* izrezali promotor *PactI* in štrleče konce zapolnili s Klenowim fragmentom. Tako smo konstruirali vektor pAB03:8kb. Za konstrukcijo vektorja pAB03chdPKS pa smo z že zgoraj omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma chdPF in chdSR z reakcijo PCR namnožili gene minimalnega PKS, kjer smo za matrico uporabili genomsko DNA *A. sulphurea*. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restriktionskim encimom

SmaI ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1chdPKS z restriktionskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 2859 bp dolg fragment, ga očistili iz gela in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v linearizirani vektor pAB03, ki smo ga rezali z restriktionskima encimoma *NdeI* in *XbaI* - tako smo konstruirali vektor pAB03chdPKS.



Slika 25: Vektorja pAB03:8kb in pAB03chdPKS
Figure 25: pAB03:8kb and pAB03chdPKS vectors

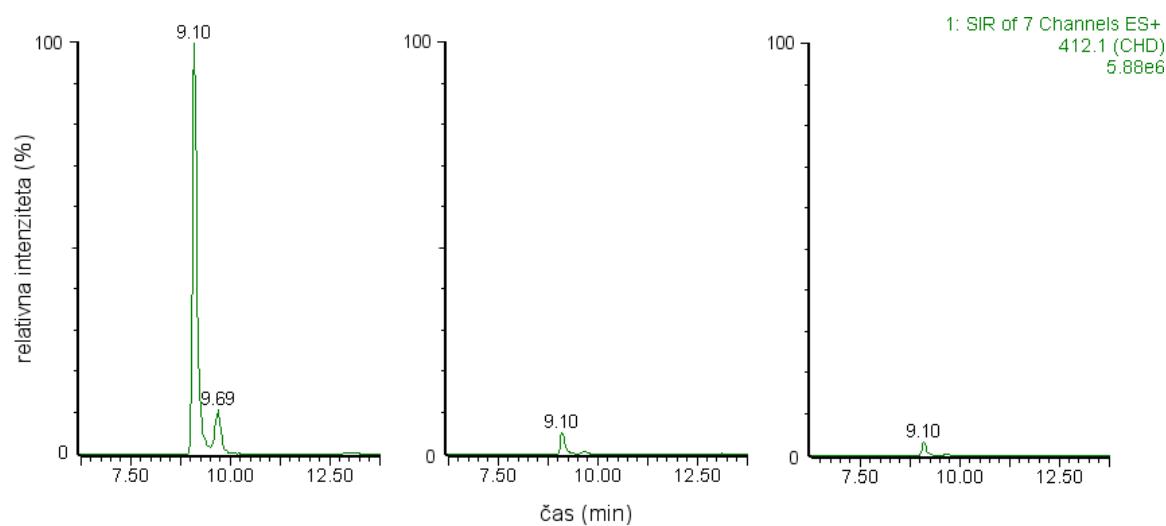
4.5.2 Vrednotenje produkcije CHD pri komplementiranih sevih *A. sulphurea*

Vektorja pAB03:8kb in pAB03chdPKS smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA transformirali v *A. sulphurea*. Transformante smo nato precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Apr (400 µg/ml) in Erm (20 µg/ml). Genotip komplementiranih transformant smo potrdili z reakcijo PCR. Integracijo vektorja pAB03:8kb v kromosom *A. sulphurea* smo potrdili z 2,6 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov C-MT1R (5'-GCT CGT AGG TCT TGG TCG AG-3') in AprRR (5'-CTT AAG ACC TTG CCC CTC CAA CGT CAT C-3'). Integracijo vektorja pAB03chdPKS pa smo potrdili z 3,6 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov antiKF (5'-ATT CTA GAA CCG GGA AGC GGG TAA CG-3') in AprRR.

Za preverjanje produkcije CHD smo komplementirane rekombinante nacepili in 36 h gojili v tekočem gojišču CHD-V z dodanim Apr (50 µg/ml) in Erm (10 µg/ml) pri 30 °C in 220 rpm za nagojitev vegetativnega inokuluma in nato precepili v produksijsko gojišče CHD-F2 z dodanim Apr (75 µg/ml) in Erm (20 µg/ml) in gojili 7 dni pri 30 °C in 220 rpm.

Kulturo smo zakisali in ekstrahirali z butanolom ter produkcijo CHD overdnотili z metodama HPLC in LC-MS (Slika 26). Komplementirane rekombinante so spet proizvajale CHD. Transformante z integriranim vektorjem pAB03:8kb so dosegale višje donose CHD kot transformante pAB03chdPKS, kar nakazuje na to, da je izražanje minimalnega PKS višje pod kontrolo nativnega promotorja kot pa pod kontrolo promotorja *PactI* (Slika 27). Kot pozitivni kontroli produkcije CHD smo uporabili divji tip *A. sulphurea* in transformanto *A. sulphurea* z integriranim praznim vektorjem pAB03, kot negativni kontroli pa smo uporabili rekombinante *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS in iste rekombinante z integriranim praznim vektorjem pAB03. Tudi na sliki 28 lahko opazimo, da je plošča, na katerih raste sev z inaktiviranim minimalnim PKS svetlejša od plošče, na kateri raste divji tip *A. sulphurea*. Temno obarvanost plošč lahko pripišemo prisotnosti CHD. S komplementacijo prekinitev minimalnega PKS se povrne produkcija CHD, kar spet opazimo kot rahlo (pAB03chdPKS) ali močnejšo (pAB03:8kb) potemnитеv plošč.

Preverili smo tudi protimikrobnou aktivnost čepkov iz plošč SM, na katerih so rasli sevi *A. sulphurea* s prekinjenim oziroma komplementiranim minimalnim PKS, proti *E. coli* DH10 β in *E. coli* ET12567 (Slika 29). Seva *E. coli* smo razmazali po plošči 2TY in nanje položili čepke iz plošč SM. Potrdili smo ugotovitve Olive in Chopre (1992), da so sevi *E. coli*, odporni proti tetraciklinom (npr. *E. coli* ET12567), občutljivi za CHD. Opazimo pa lahko, da je *E. coli* ET12567 manj občutljiva za CHD kot *E. coli* DH10 β . Na plošči z *E. coli* ET12567 vidimo cono samo pri čepku, namočenem v raztopini CHD, pri čepku z divjim tipom *A. sulphurea* pa je že ne moremo več opaziti.

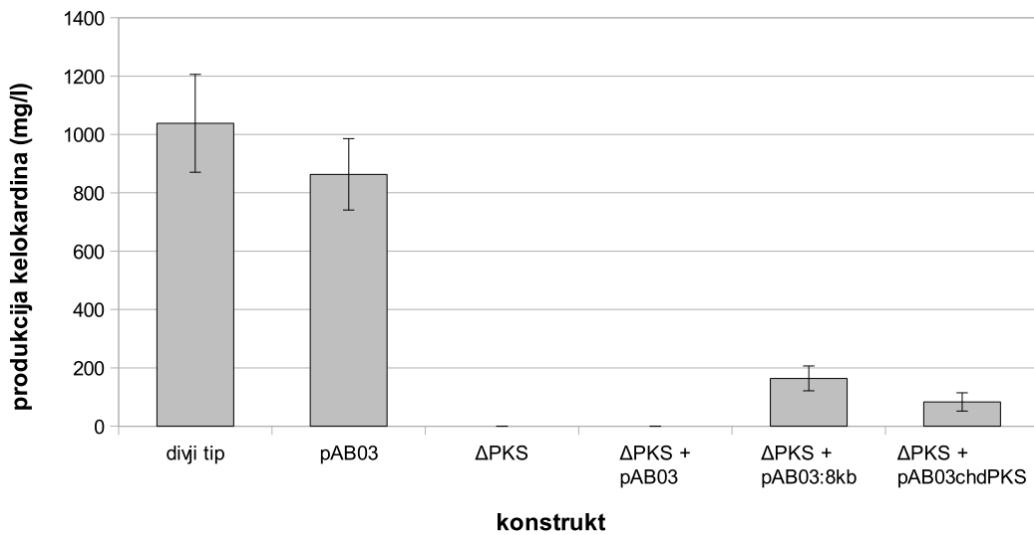


Slika 26: Analiza sevov *A. sulphurea* po komplementaciji sevov s prekinjenim minimalnim PKS s pomočjo LC-MS

Levo - izvleček kulture divjega tipa *A. sulphurea*; sredina - komplementirana rekombinanta *A. sulphurea* z vektorjem pAB03:8kb; desno - komplementirana rekombinanta *A. sulphurea* z vektorjem pAB03chdPKS. Pri vseh smo opazili spojino z maso $[M+H]^+$ 412 in retencijskim časom 9,1 min ter 9,7 min, ki ustreza CHD.

Figure 26: Analysis of *A. sulphurea* strains after the complementation of inactivated minimal PKS using LC-MS

Left - *A. sulphurea* wild-type butanol extract; in the middle - *A. sulphurea* recombinant complemented with pAB03:8kb vector; right - *A. sulphurea* recombinant complemented with pAB03chdPKS vector. A compound with $[M+H]^+$ mass of 412 and retention time 9,1 min and 9,7 min, which corresponds to CHD, was detected in all three strains extracts.

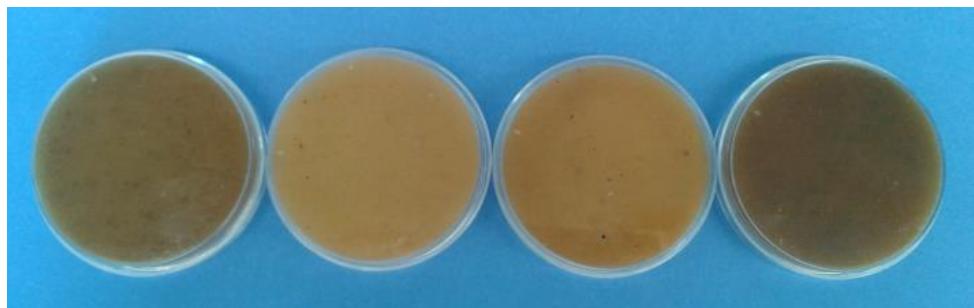


Slika 27: Producija CHD v rekombinantnih sevih *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS po komplementaciji

Producijo CHDsмо merili v divjem tipu *A. sulphurea*, transformantah z integriranim vektorjem pAB03, rekombinantah s prekinjenim minimalnim PKS (Δ PKS) in komplentiranih rekombinantah z vektorjem pAB03:8kb oziroma pAB03chdPKS. Transformante z integriranim vektorjem pAB03:8kb so dosegle višje donose CHD kot transformante s pAB03chdPKS. Kot dodatno kontrolo smo uporabili rekombinante s prekinjenim minimalnim PKS in integriranim praznim vektorjem pAB03.

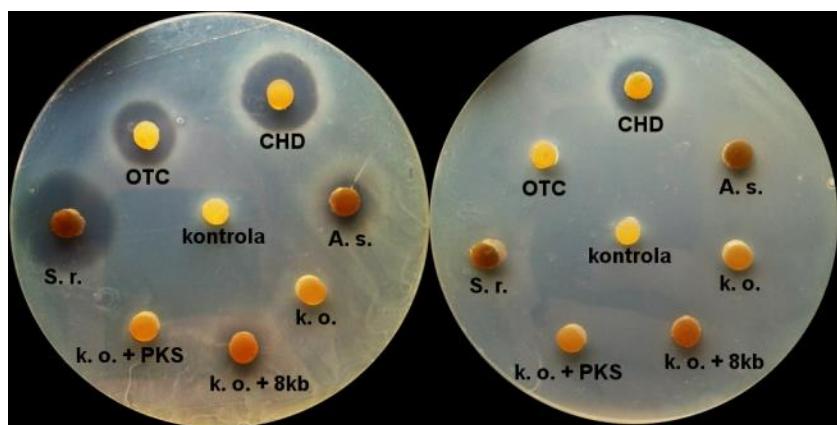
Figure 27: CHD production in recombinant *A. sulphurea* strains with inactivated minimal PKS after complementation

CHD production was measured in *A. sulphurea* wild-type, transformants with integrated pAB03 vector, recombinants with inactivated minimal PKS (Δ PKS) and complemented with pAB03:8kb or pAB03chdPKS vector. Higher CHD yields were measured in transformants with integrated pAB03:8kb vector than in those with integrated pAB03chdPKS vector. Recombinants with inactivated minimal PKS and integrated empty vector pAB03 were used as an additional control.



Slika 28: Rast sevov *A. sulphurea* s prekinjenim oziroma komplementiranim minimalnim PKS na ploščah SM
Od leve proti desni: divji tip *A. sulphurea*, sev *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS, komplementirana rekombinantna s pAB03chdPKS in komplementirana rekombinantna s pAB03:8kb

Figure 28: Growth of *A. sulphurea* strains with inactivated or complemented minimal PKS on SM plates
From left to right: *A. sulphurea* wild-type, *A. sulphurea* strain with inactivated minimal PKS, recombinant complemented with pAB03chdPKS and recombinant complemented with pAB03:8kb



Slika 29: Vrednotenje protimikrobske aktivnosti sevov *A. sulphurea* s prekinjenim oziroma komplementiranim minimalnim PKS na SM agarnem gojišču, z uporabo testnih sevov *E. coli* DH10 β (levo) in *E. coli* ET12567 (desno)

Kontrola - čepek, namočen v MeOH; CHD - čepek, namočen v 15 µg/ml CHD v MeOH; OTC - čepek, namočen v 15 µg/ml OTC v MeOH; A. s. - čepek z divjim tipom *A. sulphurea*; S. r. - čepek z divjim tipom *S. rimosus*; k. o. - čepek s sevom *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS: k. o. + 8kb - čepek s komplementirano rekombinanto s pAB03:8kb; k. o. + PKS - čepek s komplementirano rekombinanto s pAB03chdPKS

Figure 29: Evaluation of antimicrobial activity of *A. sulphurea* strains with inactivated and complemented minimal PKS on SM plates, using test strains *E. coli* DH10 β (left) in *E. coli* ET12567 (right)

Kontrola - plug, soaked in MeOH; CHD - plug, soaked in 15 µg/ml of CHD in MeOH; OTC - plug, soaked in 15 µg/ml of OTC in MeOH; A. s. - plug with *A. sulphurea* wild-type; S. r. - plug with *S. rimosus* wild-type; k. o. - plug with *A. sulphurea* minimal PKS inactivation mutant: k. o. + 8kb - plug with recombinant complemented with pAB03:8kb; k. o. + PKS - plug with recombinant complemented with pAB03chdPKS

4.6 HETEROLOGNO IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV IZ BIOSINTEZE DRUGIH TETRACIKLINOV V *A. sulphurea*

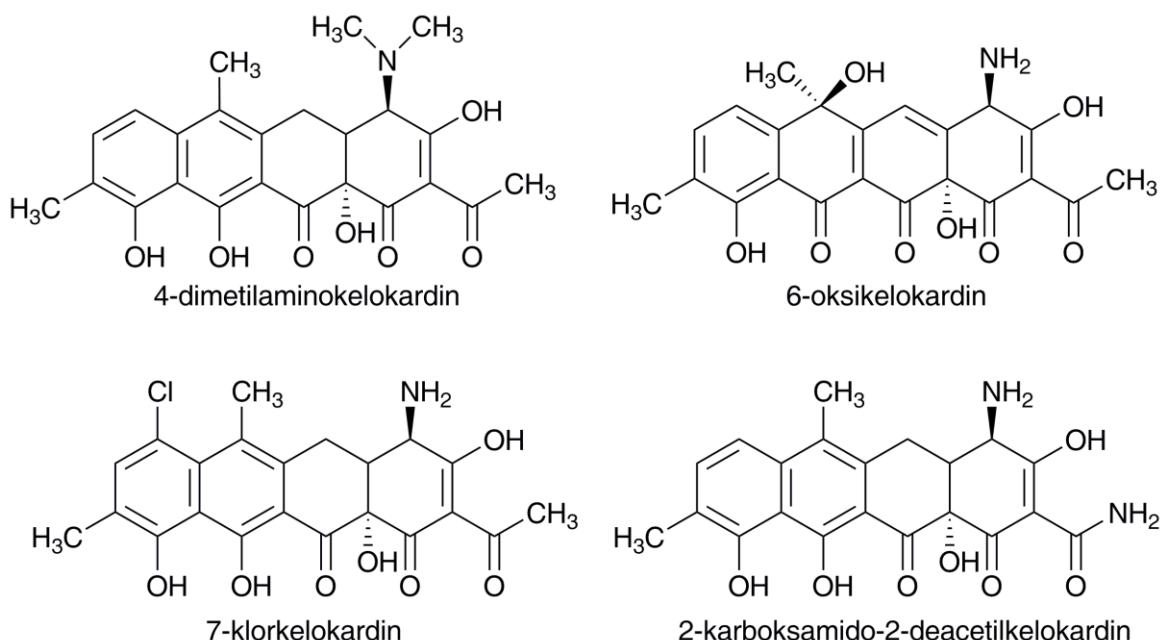
Za heterologno izražanje v *A. sulphurea* smo izbrali gene, ki kodirajo encime, ki katalizirajo pozne stopnje biosinteze OTC in CTC, kot so metiltransferaza OxyT in hidroksilaza OxyS iz genske skupine za biosintezo OTC, halogenaza Chl iz genske skupine za biosintezo CTC ter gena *oxyD* in *oxyP*, iz genske skupine za biosintezo OTC, čigar produkta sodelujeta pri vgradnji začetne enote v osnovno poliketidno verigo. Gene smo klonirali v vektor pAB03 pod kontrolo promotorja *PactI*.

Gen *oxyT* iz genske skupine za biosintezo OTC v *S. rimosus* kodira od S-adenozilmethionina odvisno *N,N*-dimetiltransferazo OxyT, ki v biosintezi OTC katalizira dimetilacijo amino skupine na C4 atomu 4-amino-ATC, kar vodi v nastanek v ATC (Zhang in sod., 2006; Zhang in sod., 2008). Predvidevali smo, da bo izražanje gena *oxyT* v *A. sulphurea* vodilo v nastanek novega kelokardinskega analoga z dimetilirano amino skupino na C4 atomu (Slika 30).

Gen *oxyS* iz genske skupine za biosintezo OTC v *S. rimosus* kodira ATC hidroksilazo OxyS, ki v biosintezi OTC katalizira dve zaporedni hidroksilaciji: na C6 in C5 atomu (Perić-Concha in sod., 2005; Wang in sod., 2013). Izražanjem gena *oxyS* v *A. sulphurea* naj bi vodilo v nastanek novega kelokardinskega analoga z dodatno hidroksilno skupino na C6 in morda tudi na C5 atomu (Slika 30).

Gen *chl* (*ctcP*) iz genske skupine za biosintezo CTC v *S. aureofaciens* je odgovoren za klorinacijo tetraciklina na C7 atomu (Dairi in sod., 1995). Izražanje gena *chl* v *A. sulphurea* naj bi vodilo v nastanek novega kelokardinskega analoga z dodatno klorovo skupino na C7 (Slika 30).

Gen *oxyD* iz genske skupine za biosintezo OTC v *S. rimosus* kodira amidotransferazo OxyD, ki je udeležena v sintezi malonamatne začetne enote. Gen *oxyP* iz iste genske skupine pa kodira AT/tioesterazo OxyP, za katerega literatura navaja, da odstranjuje »nepravilne« (tiste, ki niso malonamatne) začetne enote v biosintezi OTC. Encim OxyP predvidoma igra pomožno vlogo v biosintezi OTC - s hidrolizo predvidoma odstranjuje konkurenčne acetatne začetne enote in tako zmanjša nivo produkcije ADOTC (Wang in sod., 2011b; Zhang in sod., 2006). Lahko smo predpostavili, da bo izražanje genov *oxyD* in *oxyP* v *A. sulphurea* vodilo v nastanek novega kelokardinskega analoga s karboksiamido skupino na C2 (Slika 30).



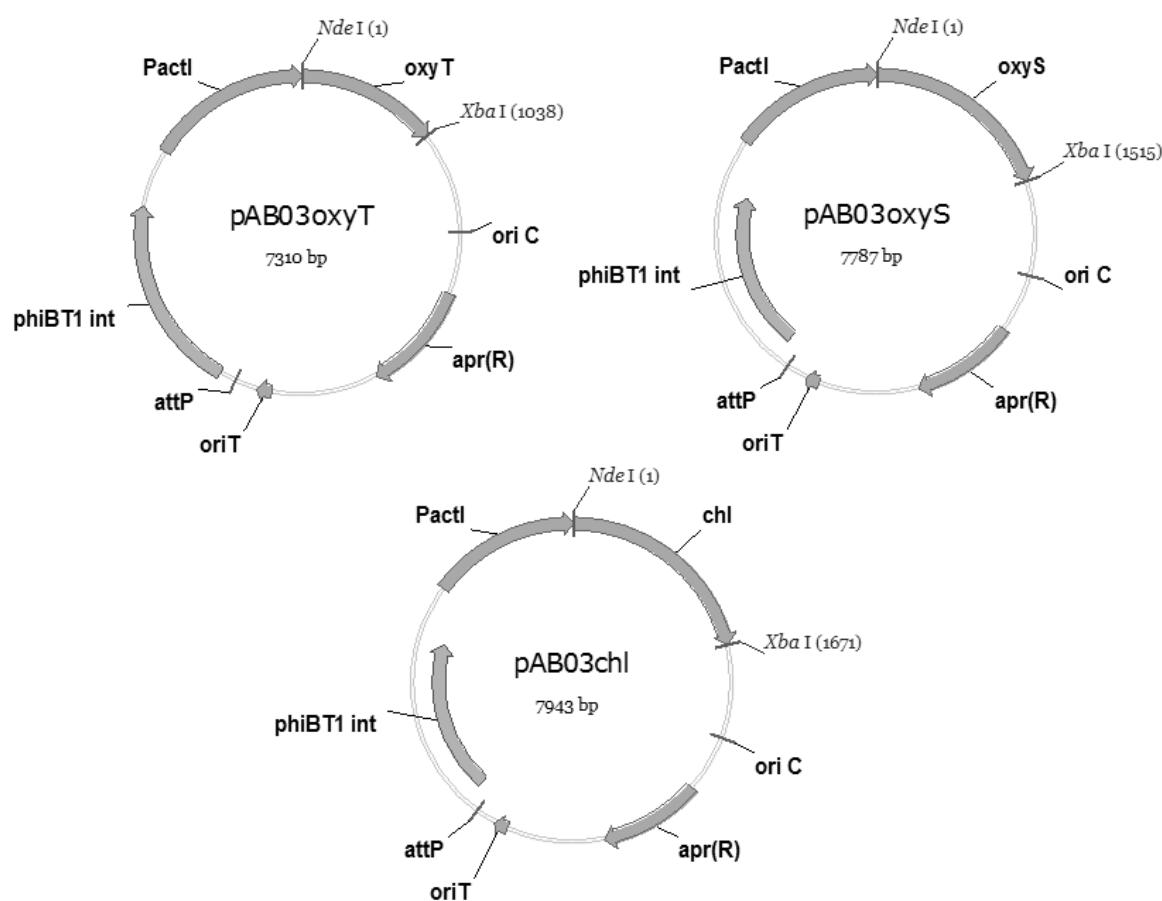
Slika 30: Predvidene strukture kelokardinskih analogov, ki jih producirajo rekombinantni sevi *A. sulphurea*
Figure 30: Predicted structures of CHD analogues, produced by recombinant *A. sulphurea* strains

4.6.1 Konstrukcija vektorjev za heterologno izražanje genov poznih stopenj biosinteze OTC in CTC iz sevov *S. rimosus* in *S. aureofaciens*

V *A. sulphurea* smo nameravali heterologno izraziti gene poznih stopenj biosinteze OTC in CTC, zato smo konstruirali vektorje na osnovi pAB03, ki se vgradijo v kromosom *A. sulphurea*. Izbrali smo gena za metiltransferazo OxyT in oksigenazo OxyS iz genske skupine *otc* in gen za halogenazo iz genske skupine *ctc*.

Gen *oxyT* smo pomnožili z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma *oxyTF* (5'-GCA TAT GAC CAC CAC ACC GCT CGC-3'), ki vsebuje restriktijsko mesto *NdeI*, in *oxyTR* (5'-CTC TAG ATC AGG GCT TGA CGG CGA CTA T-3'), ki vsebuje restriktijsko mesto *XbaI*, in uporabili genomsko DNA iz *S. rimosus* kot matrico. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restriktijskim encimon *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1oxyT z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1037 bp dolg fragment, očistili iz gela in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pAB03, ki smo ga prej linearizirali z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* - tako smo konstruirali vektor pAB03oxyT (Slika 31).

Na isti način smo konstruirali še vektorja pAB03oxyS in pAB03chl (Slika 31), le da smo v reakciji PCR za namnožitev 1,5 kb dolgega gena *oxyS* uporabili oligonukleotidna začetnika *oxySF* (5'-GCA TAT GCG GTA CGA CGT GGT GAT CG-3') in *oxySR* (5'-CTC TAG ATC ACA TGG CGG GCG GCC-3'), za namnožitev 1,7 kb dolgega gena *chl* pa *chlF* (5'-GCA TAT GAC CGA CAC AAC CGC GGA TC-3') in *chlR* (5'-CTC TAG ATT ACG GCT TGA CCC GCA TCG-3'). V prvem primeru smo kot matrico spet uporabili genomsko DNA iz *S. rimosus*, v drugem pa genomsko DNA iz *S. aureofaciens*.



Slika 31: Vektorji pAB03oxyT, pAB03oxyS in pAB03chl

Figure 31: pAB03oxyT, pAB03oxyS and pAB03chl vectors

4.6.2 Konstrukcija vektorjev za heterologno izražanje genov, ki predvidoma sodelujejo pri iniciacijski biosintezi nastajajoče poliketidne verige

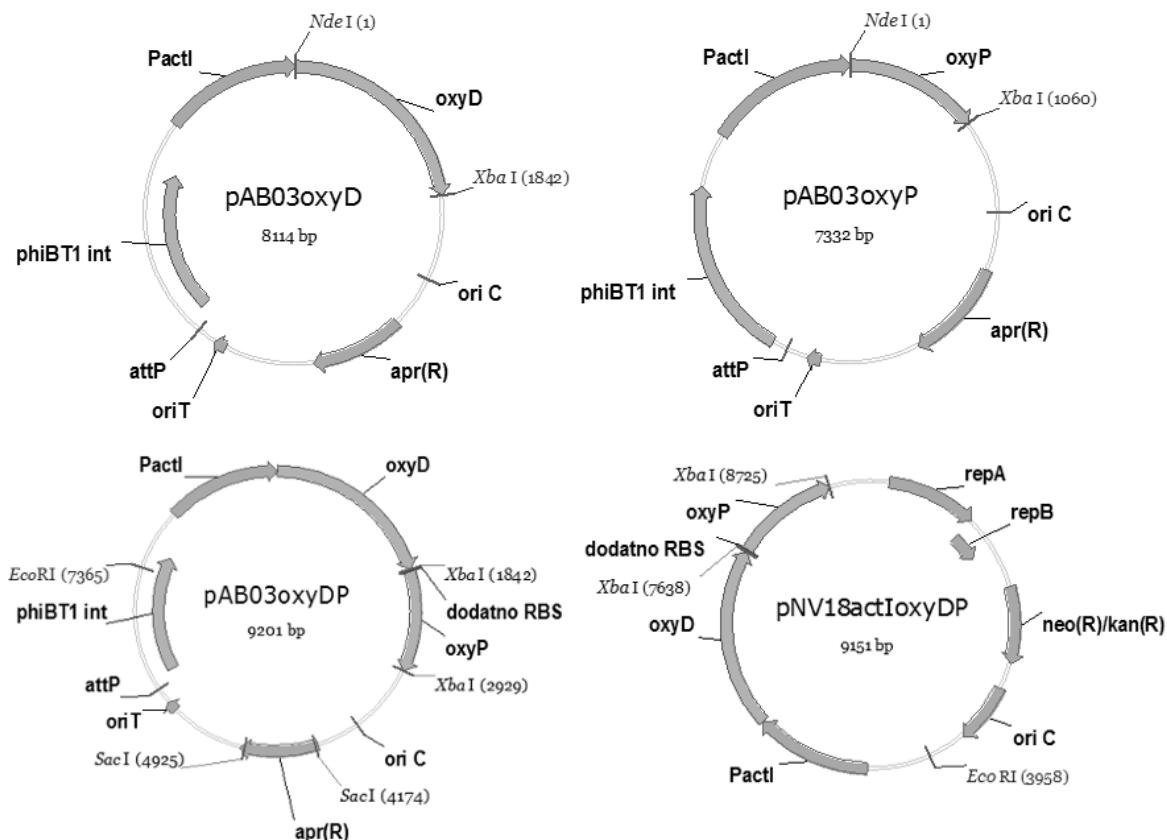
Z namenom vrednotenja vloge genov *oxyD* in *oxyP* pri izbiri in vgradnji malonamatne začetne enote v osnovno poliketidno verigo tetraciklinov smo konstruirali več različnih vektorjev. Z vnosom vektorjev pAB03oxyD in pAB03oxyP v *A. sulphurea* smo poskusili ovrednotiti delovanje posameznih genov *oxyD* in *oxyP*, z vektorjem pAB03oxyDP pa smo poskusili ovrednotiti sodelovanje obeh genov hkrati. Ker smo želeli doseči višje koncentracije encimov OxyD in OxyP v celicah *A. sulphurea*, smo konstruirali še vektor pNV18oxyDP.

Gen *oxyD* smo pomnožili z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma oxyDF (5'-GCA TAT GTG CGG AAT CGC CGG CTG-3'), ki vsebuje restriktivno mesto *NdeI*, in oxyDR (5'-CTC TAG ATC ATA GCT CCA GGC TGA CGC-3'), ki vsebuje restriktivno mesto *XbaI*, ter uporabili genomsko DNA iz *S. rimosus* kot matrico. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restriktivnim encimonom *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1oxyD z restriktivnimi encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1841 bp dolg fragment, očistili iz gela in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pAB03, ki smo ga prej linearizirali z restriktivnimi encimoma *NdeI* in *XbaI* - tako smo konstruirali vektor pAB03oxyD (Slika 32). Na enak način smo konstruirali še vektor pAB03oxyP (Slika 32), le da smo v reakciji PCR za namnožitev gena *oxyP* uporabili oligonukleotidna začetnika oxyPF (5'-TAT ATT CTA GAT CCG ATT AAT TAA GGA GGA CAC ATA TGA CGG CGG ACA CGA AGG C-3') in oxyPR (5'-TAT ATT CTA GAA GGA CGA TGG TTT CTG ATC G-3').

Oligonukleotidni začetnik oxyPF smo načrtovali tako, da poleg restriktivnega mesta *NdeI* vsebuje tudi restriktivno mesto *XbaI*, kar nam je omogočilo konstrukcijo vektorja pAB03oxyDP. Že prej konstruirani vektor pAB03oxyD smo linearizirali z restriktivnim encimom *XbaI* in ga defosforilirali ter vanj z ligacijsko reakcijo zlepili pomnožek gena *oxyP*, ki smo ga rezali z restriktivnim encimom *XbaI* - tako smo dobili vektor pAB03oxyDP (Slika 32). Oligonukleotidni začetnik oxyPF je pred start kodonom vseboval tudi 3' del sekvence promotorja *PactI*, ki vsebuje mesto za vezavo ribosoma (RBS): AGGAGG.

Vektor pNV18actIoxyDP smo konstruirali tako, da smo vektor pNV18 linearizirali z restriktivnimi encimoma *EcoRI* in *XbaI* ter vanj z ligacijsko reakcijo zlepili *EcoRI-XbaI* fragment izrezan iz pAB03oxyDP - poleg genov *oxyD* in *oxyP* smo tako v novi vektor prenesli še promotor *PactI*. Omenjeni vektor pAB03oxyDP smo poleg z restriktivnimi

encimi *EcoRI* in *XbaI* rezali še s *SacI*, da smo lahko ločili med fragmenti, ki bili v nasprotnem primeru vsi enako veliki. Na sliki 31 vidimo, da obstaja znotraj *EcoRI-XbaI* fragmenta *oxyDP* še eno restriktivno mesto *XbaI*, vendar ga encim ne prepozna, saj je metilirano.



Slika 32: Vektorji pAB03oxyD, pAB03oxyP, pAB03oxyDP in pNV18actIoxyDP

Figure 32: pAB03oxyD, pAB03oxyP, pAB03oxyDP and pNV18actIoxyDP vectors

4.6.3 Biosinteza in določanje vsebnosti novih kelokardinskih analogov z metodama HPLC in LC-MS

Zgoraj omenjene vektorje pAB03oxyT, pAB03oxyS, pAB03chl, pAB03oxyD, pAB03oxyP, pAB03oxyDP in pNV18oxyDP smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA transformirali v *A. sulphurea*. Transformante smo nato precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Apr (400 µg/ml) ozziroma Kan (300 µg/ml) v primeru vektorja pNV18actIoxyDP. Genotip transformant z integriranimi vektorji pAB03oxyT, pAB03chl, pAB03oxyP ozziroma pAB03oxyDP smo preverili z reakcijo PCR.

Integracijo vektorja pAB03oxyT v kromosom *A. sulphurea* smo potrdili z 1 kb dolgim

produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov oxyTF in oxyTR; integracijo vektorja pAB03chl z 1,7 kb dolgim produktom PCR ob uporabi chlF in chlR; integracijo vektorja pAB03oxyP z 1,1 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oxyPF in oxyPR; integracijo vektorja pAB03oxyDP pa z 2,9 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oxyDF in oxyPR začetnikov.

Genotip transformant z integriranimi vektorjema pAB03oxyS oziroma pAB03oxyD smo potrdili s hibridizacijo po Southernu. Genomsko DNA transformant smo razrezali z restriktijskim encimom *Pvu*I oziroma *Sph*I in jo hibridizirali s PKS sondjo, pomnoženo z reakcijo PCR s prej omenjenimi oligonukleotidnimi začetniki oxySF in oxySR oziroma oxyDF in oxyDR.

Za vrednotenje biosinteze CHD in kelokardinskih analogov smo transformante gojili, kakor je opisano v Materialih in metodah (podpoglavlje 3.3.2). Kulturo smo zakisali in ekstrahirali z butanolom ter produkcijo CHD in kelokardinskih analogov ovrednotili z metodama HPLC in LC-MS. Kot kontrolo smo uporabili transformante *A. sulphurea* z integriranim praznim vektorjem pAB03.

V izvlečkih kulture transformant *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03oxyT nismo opazili nove spojine, ki bi ustrezala kelokardinskemu analogu z dimetilirano C4 amino skupino. Predvidevamo, da je za delovanje encima OxyT na kelokardinski molekuli potreben substrat z obratno stereokemijo C4 amino skupine pri CHD, v primerjavi z OTC.

V izvlečkih kulture transformant *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03oxyS smo po LC-MS analizi opazili novo spojino z maso $[M+H]^+$ 426 (Slika 33), ki predvidoma ustreza kelokardinskemu analogu z dodatno hidroksilno skupino na C6, vendar z zmanjšanim številom H atomov. Z MS/MS analizo smo potrdili sorodnost nove molekule s CHD, s HRMS pa določili njeno molekulsko formulo: $C_{22}H_{19}NO_8$.

V izvlečkih kulture transformant *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03chl smo po LC-MS analizi opazili novo spojino z maso $[M+H]^+$ 446 (Slika 34), ki predvidoma ustreza kelokardinskemu analogu z dodatno klorovo skupino na C7. Z MS/MS analizo smo potrdili sorodnost nove molekule s CHD, s HRMS pa določili njeno molekulsko formulo: $C_{22}H_{20}NO_7Cl$.

V izvlečkih kulture transformant *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03oxyD smo po LC-MS analizi opazili novo spojino z maso $[M+H]^+$ 413 (Slika 35), ki bi lahko ustrezala CHD analogu z malonamatno začetno enoto - CDCHD. Z MS/MS analizo smo potrdili sorodnost nove molekule s CHD, s HRMS pa določili njeno molekulsko formulo: $C_{21}H_{20}N_2O_7$. Transformante *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03oxyDP so

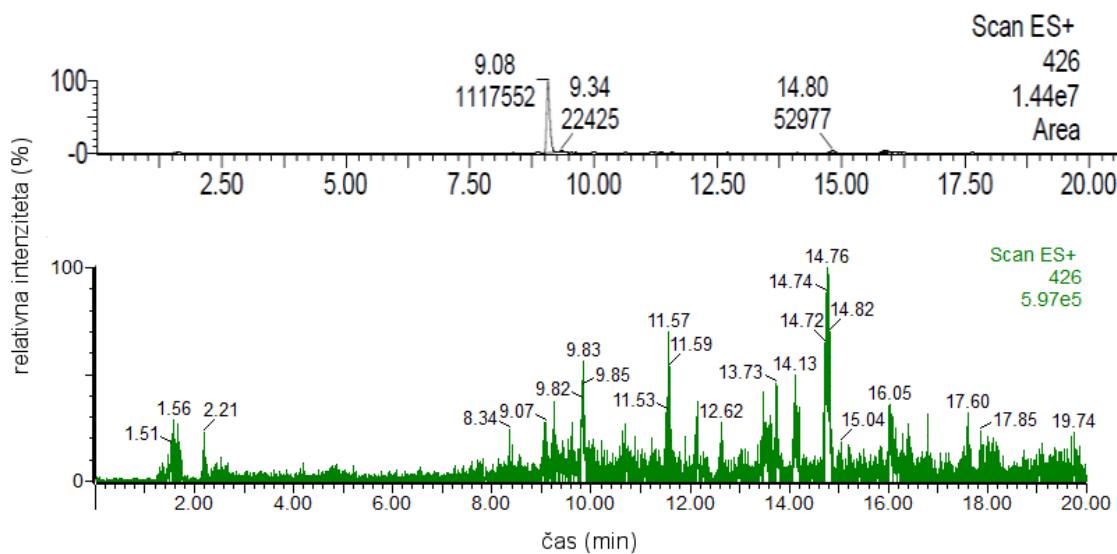
proizvedle bistveno več CDCHD kot transformante s pAB03oxyD. V izvlečkih kulture transformant z vektorjem pAB03oxyP nismo zaznali spojine CDCHD (Slika 36). Po izolaciji CDCHD po metodi SPE, opisani v Materialih in metodah, smo strukturo in sorodnost nove molekule s CHD ter zamenjavo acetilne skupine na C2 atomu z amido skupino potrdili še z metodama $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ (Priloge A-E). Vektor pNV18actIoxyDP se je izkazal za zelo nestabilnega v *A. sulphurea*, zato gojenje transformant s tem vektorjem v produkcijskem gojišču CHD-F2 ni bilo uspešno.

Vse omenjene transformante pa so še vedno proizvajale CHD, produkcija novih kelokardinskih analogov je bila 10- do 100- nižja od produkcije CHD, razen v primeru transformant *A. sulphurea* z integriranim plazmidom pAB03oxyDP, kjer je delež CDCHD predstavljal okoli 80% skupnih kelokardinov (CHD + CDCHD) v kulturi.

Preglednica 6: HRMS mase $[\text{M}+\text{H}]^+$ CHD in novih kelokardinskih analogov

Table 6: HRMS masses $[\text{M}+\text{H}]^+$ of CHD and new CHD analogues

Spojina	HRMS masa $[\text{M}+\text{H}]^+$	Razlika v masi (primerjava s CHD)	Molekulska formula
CHD	412	0	$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_7$
oksikelokardin	426	+14	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_8$
klorkelokardin	446	+34	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{NO}_7\text{Cl}$
CDCHD	413	+1	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$
DMCHD	398	-14	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_7$

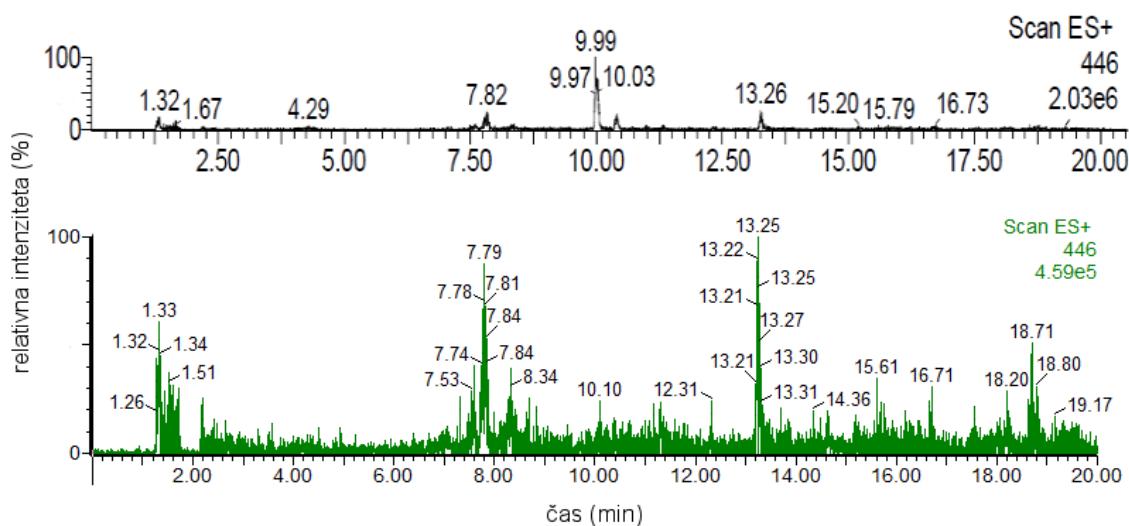


Slika 33: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kulture *A. sulphurea* z vektorjem pAB03oxyS

Pri transformanti *A. sulphurea* z vektorjem pAB03oxyS (zgoraj) opazimo novo spojino z maso $[M+H]^+$ 426 in retenzijski časom 9,1 min, medtem ko pri transformanti *A. sulphurea* z integriranim praznim vektorjem pAB03 (spodaj) spojine s to maso in tem retenzijskim časom ne opazimo. Opomba: intenziteta signalov na zgornjem kromatogramu je za približno 24-krat višja od intenzitete signalov na spodnjem kromatogramu.

Figure 33: LC-MS analysis of butanol extract of *A. sulphurea* transformant with pAB03oxyS vector

A new compound with $[M+H]^+$ mass of 426 and retention time of 9,1 min was detected in butanol extract of *A. sulphurea* transformant with pAB03oxyS vector (above), while this compound was not detected in butanol extract of *A. sulphurea* transformant with integrated empty vector pAB03 (below). Note: signal intensity in the upper chromatogram is approximately 24 times higher than in the lower chromatogram.

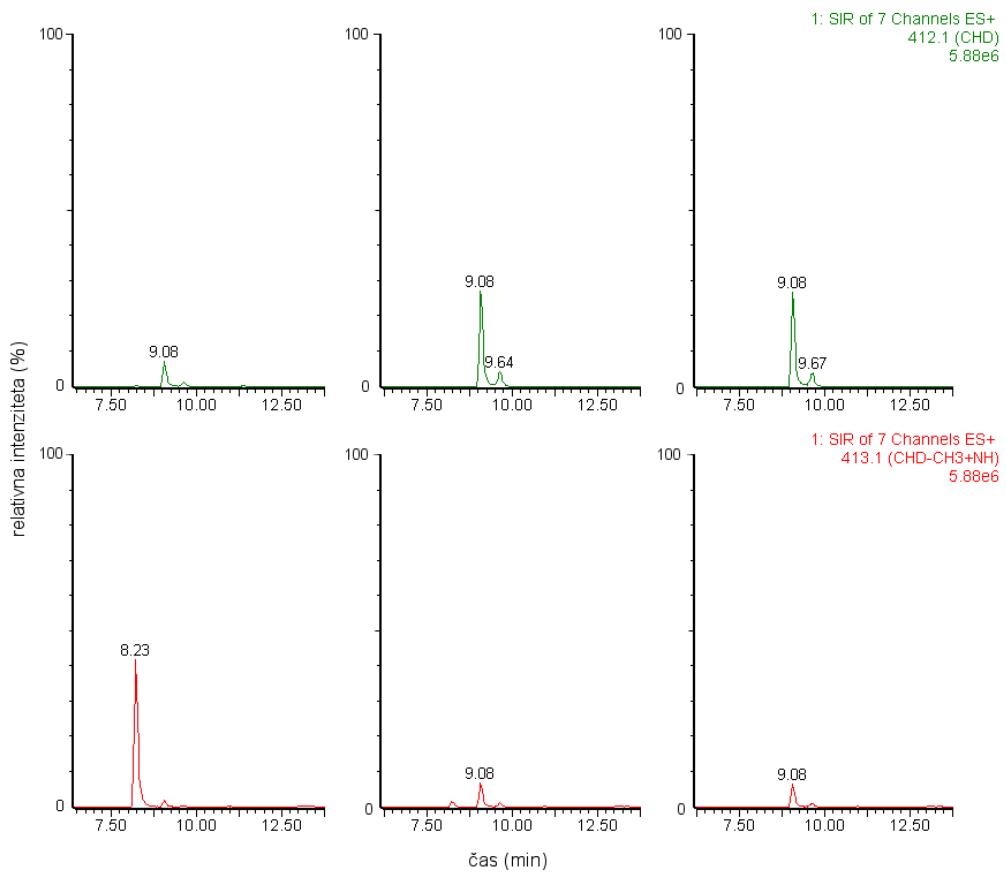


Slika 34: LC-MS butanolnih izvlečkov kulture *A. sulphurea* z vektorjem pAB03chl

Pri transformanti *A. sulphurea* z vektorjem pAB03chl (zgoraj) opazimo novo spojino z maso $[M+H]^+$ 446 in retencijski časom 10 min, medtem ko pri transformanti *A. sulphurea* z integriranim praznim vektorjem pAB03 (spodaj) spojine s to maso in tem retencijskim časom ne opazimo. Opomba: intenziteta signalov na zgornjem kromatogramu je za približno 4-krat višja od intenzitete signalov na spodnjem kromatogramu.

Figure 34: LC-MS analysis of butanol extract of *A. sulphurea* transformant with pAB03chl vector

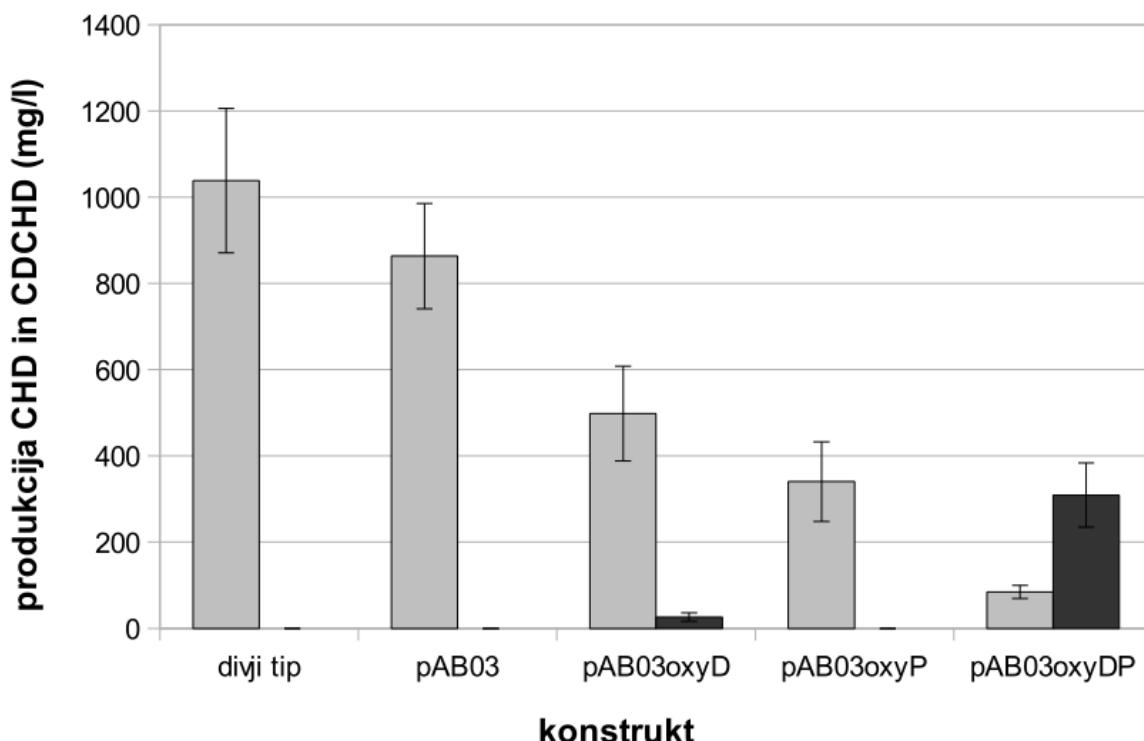
A new compound with $[M+H]^+$ mass of 446 and retention time of 10 min was detected in butanol extract of *A. sulphurea* transformant with pAB03chl vector (above), while this compound was not detected in butanol extract of *A. sulphurea* transformant with integrated empty vector pAB03 (below). Note: signal intensity in the upper chromatogram is approximately 4 times higher than in the lower chromatogram.



Slika 35: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kultur *A. sulphurea* z vektorji pAB03oxyDP (levo zgoraj in levo spodaj), pAB03oxyD (sredina zgoraj in sredina spodaj) in pAB03oxyP (desno zgoraj in desno spodaj) Spojini z maso $[M+H]^+$ 412 in retencijskima časoma 9,1 min in 9,6 min sta različni izomeri CHD. Spojini z maso $[M+H]^+$ 413 in istima retencijskima časoma sta tudi izomeri CHD, vendar z enim atomom ogljikovega izotopa ^{13}C namesto ^{12}C . V kulturi transformant *A. sulphurea* z vektorjem pAB03oxyD (sredina) oziroma pAB03oxyDP (levo) opazimo novo spojino z z maso $[M+H]^+$ 413 in retencijskim časom 8,2 min, medtem ko je v kulturi transformante *A. sulphurea* z vektorjem pAB03oxyP (desno) ne opazimo.

Figure 35: LC-MS analysis of butanol extracts of *A. sulphurea* transformants with pAB03oxyDP, pAB03oxyD and pAB03oxyP vectors

Compounds with $[M+H]^+$ mass of 412 and retention time of 9,1 min and 9,6 min are two isomers of CHD. The compounds with $[M+H]^+$ mass of 413 and the same retention times are also the two isomers of CHD, where there is one carbon isotope ^{13}C instead of ^{12}C . A new compound with $[M+H]^+$ mass of 413 and retention time of 8,2 min was detected in butanol extracts of *A. sulphurea* transformants with pAB03oxyD vector (in the middle) or pAB03oxyDP vector (left), while this compound was not detected in butanol extract of *A. sulphurea* transformant with pAB03oxyP vector (right).



Slika 36: Biosinteza CHD in CDCHD v transformantah *A. sulphurea*

Legenda: CHD (svetlo siva), CDCHD (temno siva)

Figure 36: CHD and CDCHD biosynthesis in *A. sulphurea* transformants

Legend: CHD (light grey), CDCHD (dark grey)

4.6.4 Optimizacija gojišč za produkcijo kelokardinskih analogov

Z namenom izboljšanja donosa novih kelokardinskih analogov smo poskusili z optimizacijo produkcijskega gojišča CHD-F2.

Z namenom izboljšanja donosa klorkekardina smo gojišče CHD-F2, v katerem smo gojili transformante *A. sulphurea*, ki so izražale gen za halogenazo *chl* iz genske skupine za biosintezo CTC, različno dopolnili. Dodali smo NaCl (2,5 g/l, 5 g/l, 10 g/l), vitamin B₂ (10 mg/l, 50 g/l, 100 g/l), kombinacijo NaCl in vitamina B₂ ter kompleks B-vitaminov (koncentracija vitamina B₂ 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l). Halogenaza, ki sodeluje v biosintezi CTC je od flavina odvisna (Neumann in sod., 2010), zato smo hoteli z dodatkom riboflavina (vitamin B₂) kot prekurzorja povečati koncentracijo tega kofaktorja. Odločili smo se tudi za povečanje koncentracije kloridnih ionov z dodatkom NaCl v gojišče. Vsi dodatki so minimalno povečali produkcijo klorkekardina, najbolj pozitiven vpliv pa je imel kompleks B-vitaminov.

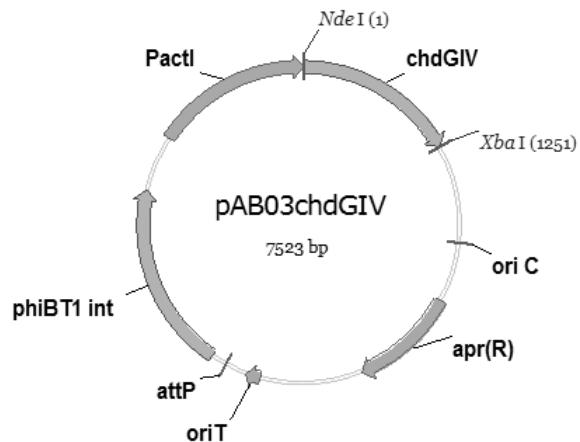
Z namenom izboljšanja donosa oksikelokardina smo gojišče CHD-F2, v katerem smo gojili transformante *A. sulphurea*, ki so izražale gen za hidroksilazo *oxyS* iz genske skupine za biosintezo OTC, dopolnili z vitaminom B₃ (10 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l) ali pa s kompleksom B-vitaminov (koncentracija vitamina B₃ 10 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l). Hidroksilaza OxyS je od NADPH odvisna (Perić-Concha in sod., 2005), zato smo tudi v tem primeru želeli z dodatkom niacina (vitamin B₃) kot prekurzorja povečati koncentracijo tega kofaktorja. Oba dodatka sta minimalno povečala produkcijo oksikelokardina.

4.7 PREKOMERNO IZRAŽANJE GENA ZA VERJETNO GLIKOZILTRANSFERAZO V *A. sulphurea* POD KONTROLERO *PactI*

Gen *chdGIV* iz genske skupine za biosintezo CHD kodira verjeten encim glikoziltransferazo. Genski produkt *chdGIV* je podoben glikoziltransferazam CmmGIV iz genske skupine za biosintezo kromomicina (Menendez in sod., 2004) in MtmGIV iz genske skupine za biosintezo mitramicina (Blanco in sod., 2000). Glede na to, da v kulturi *A. sulphurea* ne najdemo nobenega glikoziliranega kelokardinskega analoga, glikoziltransferaza ChdGIV najbrž ni aktivna ali pa se sploh ne izraža. Da bi dosegli produkcijo glikoziliranih kelokardinskih analogov smo gen *chdGIV* izrazili v *A. sulphurea* pod kontrolo promotorja *PactI*, za katerega vemo, da deluje v *A. sulphurea*.

4.7.1 Konstrukcija vektorja za prekomerno izražanje gena za glikoziltransferazo

Gen *chdGIV* smo pomnožili z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma chdGIVF (5'-TAT ATA TCA TAT GCG GCT GTT GCT GGT CAC-3'), ki vsebuje restriktijsko mesto *NdeI*, in chdGIVR (5'-TAT ATT CTA GAC CCT TCA CAG CCT TGG TCG-3'), ki vsebuje restriktijsko mesto *XbaI*, ter uporabili genomsko DNA iz *A. sulphurea* kot matrico. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restriktijskim encimon *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1chdGIV z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1250 bp dolg fragment, ga očistili iz gela in z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pAB03, ki smo ga prej linearizirali z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* - tako smo konstruirali vektor pAB03chdGIV (Slika 37).



Slika 37: Vektor pAB03chdGIV

Figure 37: pAB03chdGIV vector

4.7.2 Poskus identifikacije glikoziliranih kelokardinskih analogov z metodo HPLC

Vektor pAB03chdGIV smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA transformirali v *A. sulphurea*. Transformante smo nato precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Apr (400 µg/ml). Genotip transformant smo preverili z reakcijo PCR. Integracijo vektorja pAB03chdGIV v kromosom *A. sulphurea* smo potrdili z 3,3 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov chdGIVF (5'-TAT ATA TCA TAT GCG GCT GTT GCT GGT CAC-3') in AprRR.

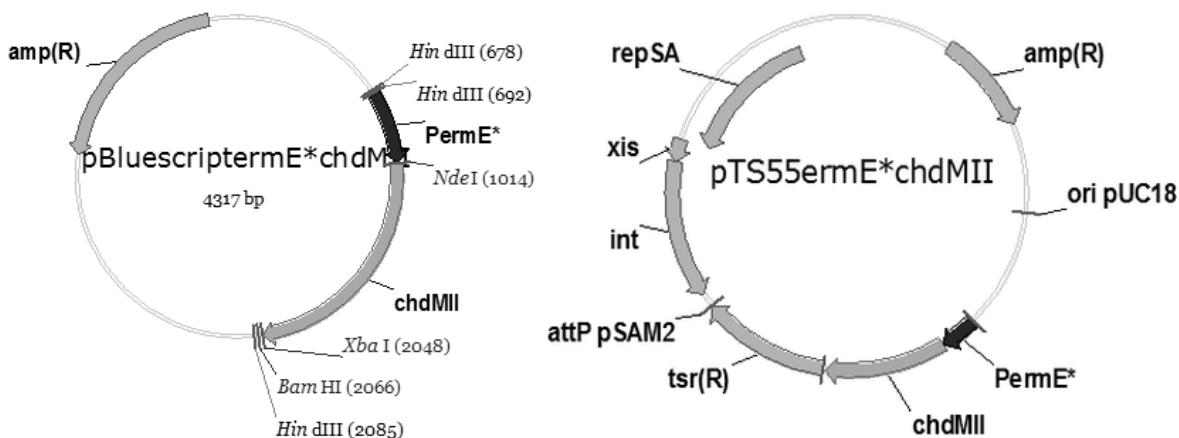
Za preverjanje produkcije glikoziliranih kelokardinskih analogov smo transformante nacepili in 36 h gojili v tekočem gojišču CHD-V z dodanim Apr (50 µg/ml) pri 30 °C in 220 rpm za nagojitev vegetativnega inokuluma. V producijsko gojišče CHD-F2 z dodanim Apr (75 µg/ml) smo nacepili vegetativni inokulum in gojili 7 dni pri 30 °C ter 220 rpm. Kulturo smo zakisali in ekstrahirali z butanolom ter produkcijo kelokardinskih analogov ovrednotili z metodo HPLC. V izvlečkih kulture transformant *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03chdGIV nismo opazili nobene nove spojine. Poskus gojenja transformant smo ponovili in v gojišče dodali različne sladkorje (2-DOG 2 g/l, L-ramnoza 2 g/l, D-riboza 2 g/l), ki bi encimu ChdGIV služili kot gradniki za glikozilacijo, vendar po HPLC analizi v izvlečkih kulture spet nismo opazili nobenih novih spojin.

4.8 HETEROLOGNO IZRAŽANJE GENA *chdMII* IZ *A. sulphurea*, KI VERJETNO KODIRA METILTRANSFERAZO, V *S. rimosus*

Genski produkt *chdMII* iz genske skupine za biosintezo CHD je podoben metiltransferazi CmmMII iz *Streptomyces griseus*, ki metilira C9 atom v molekuli kromomicina (Menendez in sod., 2004), in metiltransferazi MtMII iz *S. argillaceus*, ki tudi metilira C9 atom, v tem primeru molekule mitramicina (Lozano in sod., 2000). Z namenom potrditve vloge encima ChdMII v biosintezi CHD, smo gen *chdMII* poskusili izraziti v *S. rimosus*, ki proizvaja OTC – ki ne vsebuje metilno skupine na C9. Predvidevali smo, da bo izražanje *chdMII* v *S. rimosus* vodilo v produkcijo 9-metilositetraciklina.

4.8.1 Konstrukcija vektorja za heterologno izražanje gena *chdMII* v *S. rimosus*

Gen *chdMII* smo pomnožili z reakcijo PCR z oligonukleotidnima začetnikoma chdMIIF (5'-GCA TAT GAC CGA GAC GGA ACC GAC C-3'), ki vsebuje restriktionsko mesto *NdeI*, in chdMIIR (5'-GTC TAG ATC AGG CCT TGT CTG CGG TG-3'), ki vsebuje restriktionsko mesto *XbaI*, ter uporabili genomsko DNA iz *A. sulphurea* kot matrico. Produkt PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ga z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restriktionskim encimonom *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožen fragment smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1chdMII z restriktionskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1034 bp dolg fragment, očistili iz gela in z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pBluescriptE*, ki smo ga prej linearizirali z restriktionskima encimoma *NdeI* in *XbaI*. Iz vektorja pBluescriptE*chdMII smo z restriktionskima encimoma *HindIII* in *BamHI* izrezali regijo ermE*chdMII, jo klonirali v pTS55, lineariziran z restriktionskima encimoma *HindIII* in *BamHI* in tako konstruirali pTS55ermE*chdMII (Slika 38).



Slika 38: Vektorja pBluescriptermE*chdMII in pTS55ermE*chdMII

Figure 38: pBluescriptermE*chdMII and pTS55ermE*chdMII vectors

4.8.2 Poskus identifikacije metiloksitetraçiklina z metodo LC-MS

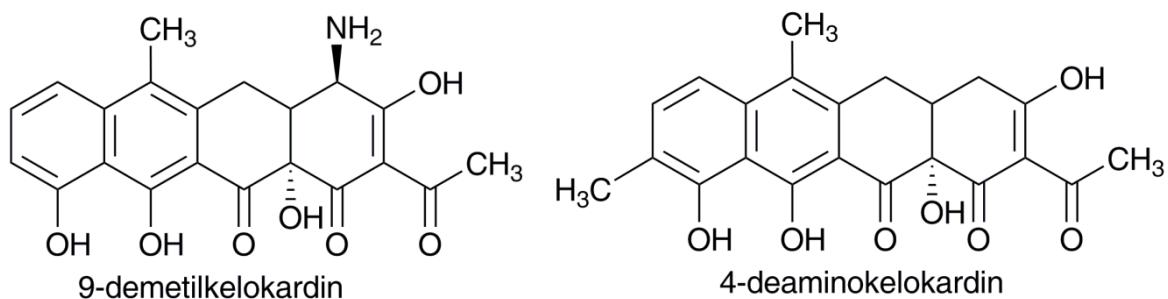
Vektor pTS55ermE*chdMII smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA vnesli v *S. rimosus* z elektroporacijo (Pigac in Schrempf, 1995). Transformante smo nato precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Tsr (30 µg/ml). Genotip transformant smo preverili z reakcijo PCR. Integracijo vektorja pTS55ermE*chdMII v kromosom *S. rimosus* smo potrdili z 1 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov chdMIIF (5'-GCA TAT GAC CGA GAC GGA ACC GAC C-3') in chdMIIR (5'-GTC TAG ATC AGG CCT TGT CTG CGG TG-3').

Za preverjanje produkije metiloksitetraçiklina smo transformante nacepili in 24 h gojili v tekočem gojišču GOTC-V z dodanim Tsr (5 µg/ml) pri 30 °C in 220 rpm za nagojitev vegetativnega inokuluma. V produksijsko gojišče GOTC-F z dodanim Tsr (5 µg/ml) smo nacepili vegetativni inokulum in gojili 6 dni pri 30 °C ter 220 rpm. Kulturo smo zakisali in supernatant overdnobili z metodama HPLC in LC-MS. V kulturi transformant *S. rimosus* z integriranim vektorjem pTS55ermE*chdMII nismo opazili nobene nove spojine. Predvidevamo, da je metiltransferaza ChdMII zelo specifična za svoj substrat in zato ne more katalizirati metilacije C9 atoma OTC. Molekula CHD je bolj planarna od OTC in morda tudi to vpliva na neprimerno orientacijo susbtrata v aktivnem mestu encima.

4.9 PREKINITEV IZBRANIH GENOV, VPLETENIH V POZNE STOPNJE BIOSINTEZNE POTI CHD V *A. sulphurea*

Z namenom potrditve vloge izbranih genov, vpletenih predvsem v pozne stopnje biosinteze CHD, smo izvedli prekinitev dveh genov, *chdMII* in *chdN*, ki sta značilna za gensko skupino, ki kodira biosintezo CHD, saj njenih homologov v genskih skupinah običajnih tetraciklinov, kot sta OTC in CTC, ne najdemo.

Gen *chdMII* predvidoma kodira metiltransferazo in njegov genski produkt smo že opisali v podpoglavlju 4.8. Genski produkt *chdN* je aminotransferaza, ki pripada skupini od piridoksal fosfata odvisnim aminotransferazam in katalizira aminacijo CHD na atomu C4. C4 aminotransferaze, ki jih najdemo v genskih skupinah za biosintezo značilnih tetraciklinov, imajo zelo nizko homologijo z aminotransferazo ChdN, kar lahko pojasni njihovo drugačno delovanje oziroma dodajanje C4 amino skupine z obratno stereokemijo. Da bi potrdili funkcijo encimov ChdMII in ChdN v biosintezi CHD, smo gena *chdMII* in *chdN* prekinili s postopkom dvojne homologne rekombinacije. Glede na bioinformatske analize (poglavlje 2.3; Lešnik, 2009; Petković in sod., 2013) smo predpostavili, da bo prekinitev metiltransferaze rezultirala v produkciji 9-demetikelokardina (DMCHD), posledica prekinitev aminotransferaze ChdN pa bi bila produkcija 4-deaminokelokardina (Slika 39).



Slika 39: Predvidene strukture kelokardinskih analogov po prekinitvi genov

Figure 39: Predicted structures of CHD analogues obtained by gene inactivation

4.9.1 Konstrukcija vektorjev za prekinitev genov *chdMII* in *chdN*, ki kodirata verjetno metiltransferazo in aminotransferazo

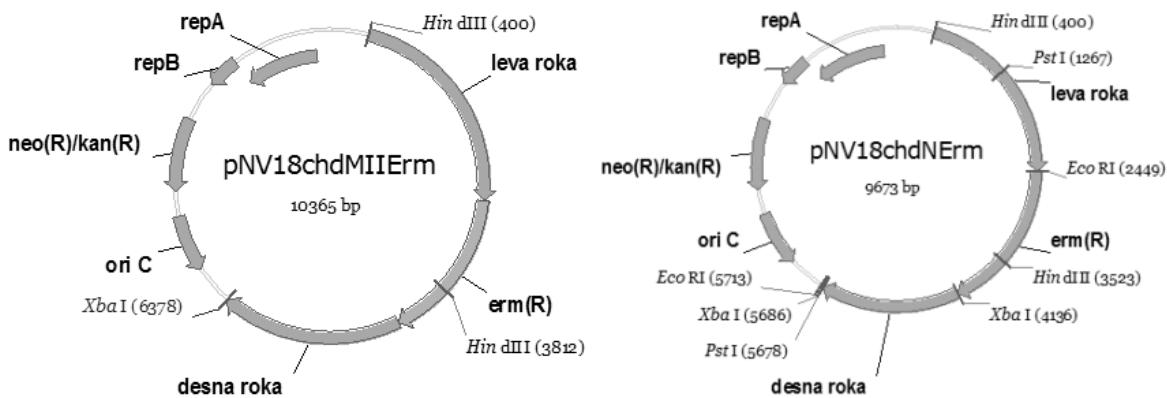
Za konstrukcijo vektorjev za prekinitev izbranih genov poznih stopenj v genski skupini za biosintezo CHD v *A. sulphurea* smo uporabili vektor pNV18, kot je opisano v poglavju 4.4. Za prekinitev gena *chdMII* smo konstruirali vektor pNV18chdMIIerm, in vektor pNV18chdNerm za prekinitev gena *chdN* (Slika 40). V obeh primerih smo vektor

konstruirali tako, da smo večino gena zamenjali z eritromicinsko rezistenco, ki jo na obeh straneh obdajata dve približno 2 kb dolgi roki, ki sta homologni genom z leve in desne strani gena *chdMII* oziroma *chdN* v genski skupini za biosintezo CHD.

Za konstrukcijo pNV18chdMIIerm smo z oligonukleotidnima začetnikoma chdMIILF (5'-AAG CTT CCC GAC TAC GCG ACC G-3') in chdMIILR (5'-CAT ATG CAC CGA CGC CGG TTT C-3') z reakcijo PCR pomnožili levo roko homologije, z oligonukleotidnima začetnikoma chdMIIDF (5'-GCC GCA TAT GAT TTC GTG CAG C-3') in chdMIIDR (5'-TCT AGA AGG GCA CCA CGC CGA T-3') pa desno roko homologije. V obeh primerih smo kot matrico uporabili genomsko DNA *A. sulphurea*. Produkta PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ju vsakega posebej z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restrikcijskim encimonom *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožena fragmenta smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1chdMIIL z restrikcijskima encimoma *HindIII* in *NdeI* izrezali 2354 bp dolg fragment za levo homologijo, iz vektorja pVM1chdMIID pa z restrikcijskima encimoma *NdeI* in *XbaI* izrezali 1962 bp dolg fragment za desno homologijo in ju očistili iz gela. Vektor pNV18 smo linearizirali z restrikcijskima encimoma *HindIII* in *XbaI* ter vanj z ligacijsko reakcijo zlepili obe roki homologije za prekinjanje gena *chdMII*. Nato smo to vmesno stopnjo konstruiranega vektorja še enkrat linearizirali, tokrat z restrikcijskim encimom *NdeI* (med obema rokama homologije) in štrelče konce zapolnli s Klenowim fragmentom ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. Medtem smo iz vektorja pVM1Erm(R) z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *XbaI* izrezali gen za eritromicinsko rezistenco in štrelče konce zapolnli s Klenowim fragmentom. Tako pripravljen gen za eritromicinsko rezistenco smo z ligacijsko reakcijo zlepili med obe roki homologije in konstruirali vektor pNV18chdMIIerm (Slika 40).

Za konstrukcijo pNV18chdNERm smo z oligonukleotidnima začetnikoma chdNLF (5'-TGA AGC TTG GGG TGG CGT GC-3') in chdNLR (5'-CGA ATT CAG CCC GCT GAC CG-3') z reakcijo PCR pomnožili levo roko homologije, z oligonukleotidnima začetnikoma chdNDF (5'-CGT CTA GAT GAG CAA CCG CAT CG-3') in chdNDR (5'-GGC TGC AGG TGG ACC GGG T-3') pa desno roko homologije. V obeh primerih smo kot matrico uporabili genomsko DNA *A. sulphurea*. Produkta PCR smo obdelali s T4-polinukleotidno kinazo in ju vsakega posebej z ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pVM1, ki smo ga poprej linearizirali z restrikcijskim encimom *SmaI* ter defosforilirali z alkalno fosfatazo. S PCR pomnožena fragmenta smo sekvenirali, da preverimo morebitne nastale mutacije med PCR reakcijo. Nato smo iz vektorja pVM1chdNL z restrikcijskima encimoma *HindIII* in *EcoRI* izrezali 2049 bp dolg fragment za levo homologijo, iz vektorja pVM1chdND pa z restrikcijskima encimoma *XbaI* in *PstI* izrezali 1542 bp dolg fragment za desno homologijo, ki smo ju očistili iz gela. Poleg tega smo iz vektorja pVM1Erm(R) z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *XbaI* izrezali gen za odpornost proti Erm in vektor

pNV18 linearizirali z restriktijskima encimoma *HindIII* in *PstI*. Vse tri fragmente (obe roki homologije in gen za eritromicinsko rezistenco) smo z ligacijsko reakcijo zlepili v lineariziran vektor pNV18 - tako smo konstruirali vektor pNV18chdNErm (Slika 40).



Slika 40: Vektorja pNV18chdMIIerm in pNV18chdNErm za prekinitev genov *chdMII* in *chdN* (v tem vrstnem redu)

Figure 40: pNV18chdMIIerm and pNV18chdNErm vectors for inactivation of *chdMII* and *chdN* genes, respectively

4.9.2 Biosinteza kelokardinskih analogov z rekombinantnimi sevi s prekinjenim genom *chdMII* oziroma *chdN*

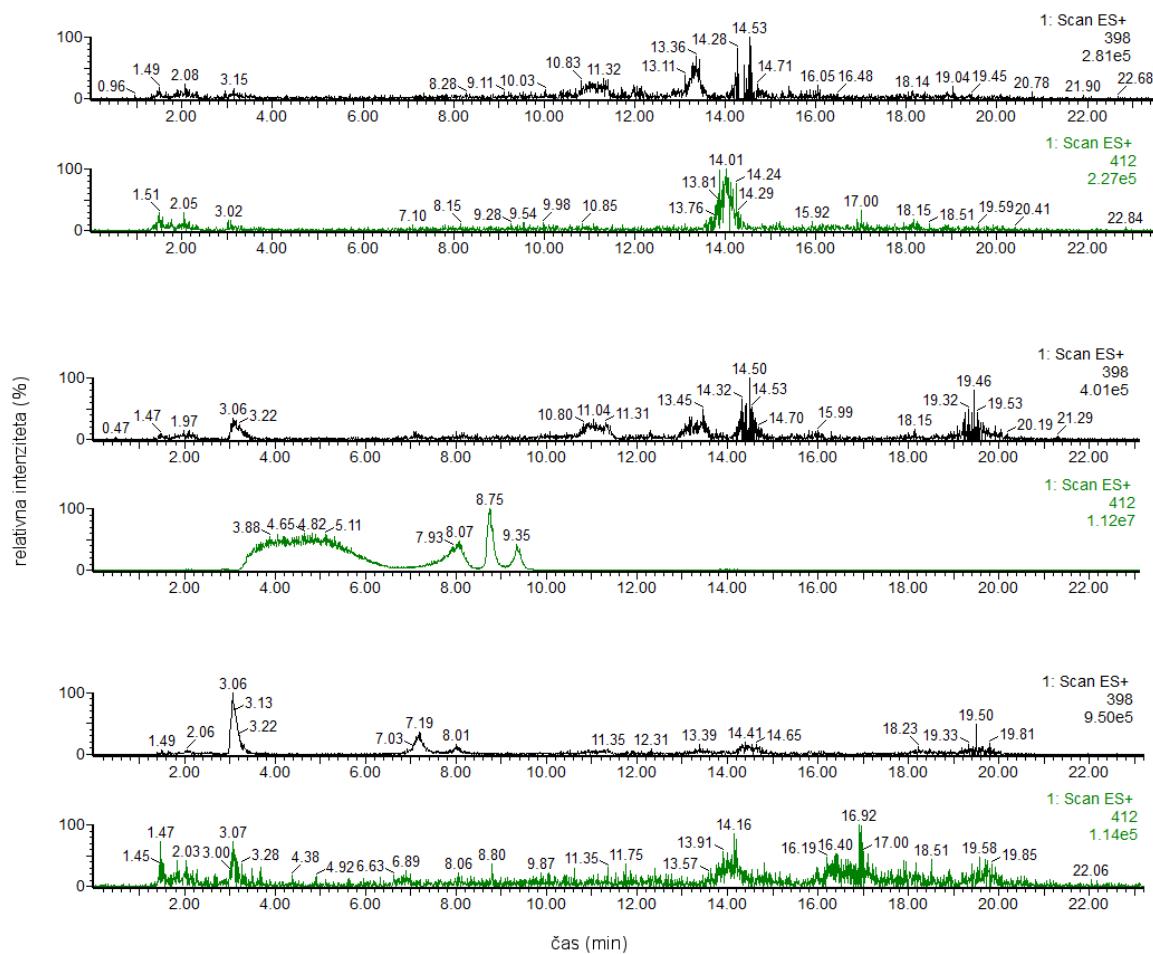
Vektorja pNV18chdMIIerm in pNV18chdNErm smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA transformirali v *A. sulphurea*. Transformante smo nato trikrat precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Erm (20 µg/ml) in preverili še rast na gojišču z dodanim Kan (300 µg/ml). Transformante (sekundarne rekombinante), občutljive na Kan in odporne proti Erm, kjer se je predvidoma zgodila dvojna homologna rekombinacija - s prvo sta se vektorja vgradila v kromosom *A. sulphurea*, z naslednjo rekombinacijo pa je bil izločen le sam vektor pNV18, kar je pomenilo da je gen *chdMII* oziroma *chdN* ostal prekinjen z eritromicinsko rezistenco. Genotip transformant s prekinjenim genom *chdMII* smo potrdili z 1,8 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov chdMIIF in chdMIIR, genotip transformant s prekinjenim genom *chdN* pa z 5,3 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov chdNLF (5'-TGA AGC TTG GGG TGG CGT GC-3') in chdNDR (5'-GGC TGC AGG TGG ACC GGG T-3').

Za preverjanje produkcije novih kelokardinskih analogov smo rekombinante nacepili in 36 h gojili v tekočem gojišču CHD-V z dodanim Erm (10 µg/ml) pri 30 °C in 220 rpm za nagojitev vegetativnega inokuluma in nato precepili v produkcijsko gojišče CHD-F2 z

dodanim Erm (20 µg/ml) in gojili 7 dni pri 30 °C in 220 rpm. Kulturo smo zakisali in ekstrahirali z butanolom ter produkcijo CHD overdnontili z metodama HPLC in LC-MS. Kot kontrolo smo uporabili divji tip *A. sulphurea* in rekombinante *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS.

V butanolnih izvlečkih kultur rekombinant *A. sulphurea* s prekinjenim genom *chdMII* smo po LC-MS analizi opazili novo spojino z maso $[M+H]^+$ 398, ki bi lahko ustrezala kelokardinskemu analogu z manjkajočo metilno skupino na C9. Z MS/MS analizo smo potrdili sorodnost nove molekule s CHD, s HRMS analizo pa potrdili molekulsko formulo novega analoga: $C_{21}H_{19}NO_7$. V produksijski kulturi nismo opazili CHD ($C_{22}H_{21}NO_7$), kakor smo tudi pričakovali (Slika 41).

V izvlečkih kulture rekombinant *A. sulphurea* s prekinjenim genom *chdN* po LC-MS analizi nismo opazili nove spojine, ki bi lahko ustrezala kelokardinskem analogu brez amino skupine na C4. Opazili pa nismo niti CHD, kar potruje, da smo uspeli inaktivirati *chdN*. Nato smo izvleček analizirali še z metodo HRMS in opazili spojino z maso $[M+H]^+$ 397 (molekulska formula $C_{22}H_{20}O_7$), ki bi lahko ustrezala kelokardinskemu analogu z manjkajočo amino skupino na C4. Možno pa je tudi, da novo nastale strukture ne znamo predvideti, in tega metabolita zato tudi ni mogoče detektirati na osnovi predpostavljene mase z metodo LC/MS.



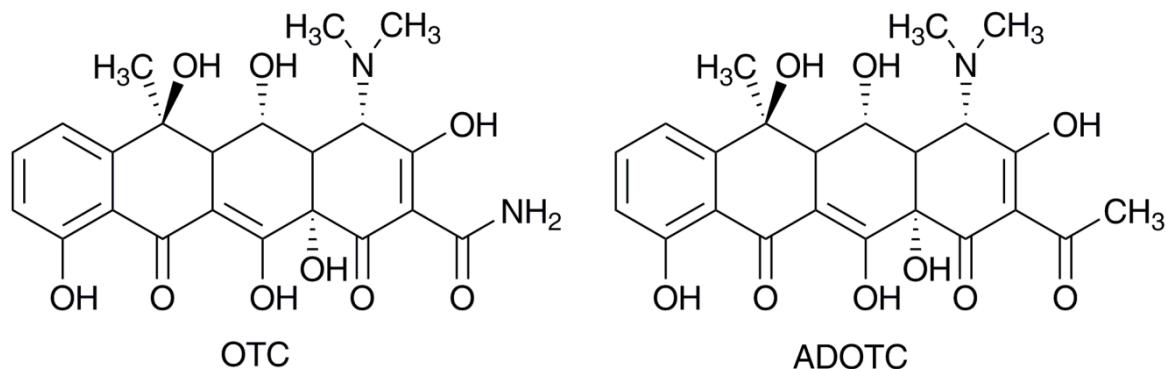
Slika 41: LC-MS analiza butanolnih izvlečkov kulture *A. sulphurea* s prekinjenim genom *chdMII*

Zgornja dva kromatograma pripadata izvlečku kulture rekombinante *A. sulphurea* s prekinjenim minimalnim PKS, kjer nismo opazili ne CHD ne DMCHD. Sredinska kromatograma pripadata kulturi divjega tipa *A. sulphurea*, kjer smo opazili le prisotnost CHD z maso $[M+H]^+$ 412 in retencijskim časom 8,8 min in 9,4 min. Spodnja dva kromatograma pripadata kulturi rekombinante *A. sulphurea* s prekinjenim genom *chdMII*, kjer nismo opazili CHD, prisotna pa je nova spojina z maso $[M+H]^+$ 398 in retencijskim časom 7,2 min in 8,0 min. Opomba: Izmed vseh posnetih mas (Scan ES+) so prikazani le pari kromatogramov za spojine z maso $[M+H]^+$ 398 oziroma 412.

Figure 41: LC-MS analysis of butanol extract of *A. sulphurea* recombinant with inactivated *chdMII* gene
 The upper two chromatograms represent the butanol extract of *A. sulphurea* recombinant with inactivated minimal PKS, where no CHD nor DMCHD were detected. The two chromatograms in the middle represent the butanol extract of *A. sulphurea* wild-type, where only CHD with $[M+H]^+$ mass of 412 and retention time 8,8 min and 9,4 min was detected. The bottom two chromatograms represent the butanol extract of *A. sulphurea* recombinant with inactivated *chdMII* gene, where a new compound with $[M+H]^+$ mass of 398 and retention time of 7,2 min and 8,0 min was detected, while CHD was not detected. Note: Of all the masses scanned (Scan ES+), only the pairs of chromatograms for compounds with $[M+H]^+$ mass of 398 or 412, respectively, are presented.

4.10 PREKINITEV GENA *oxyP*, KI KODIRA VERJETNO AT/TIOESTERAZO V S. *rimosus*

Verjetna vloga encima OxyP v biosintezi OTC je opisana v podpoglavlju 2.6.2. S prekinitvijo gena *oxyP* v *S. rimosus* smo žeeli ovrednotiti hipotezo Wanga in sod. (2011b), da AT OxyP sodeluje v resnici kot tioesteraza pri pravilnem izboru malonamatne začetne enote v začetnih stopnjah biosinteze poliketidne verige tako, da odstranjuje napačno začetno enoto (npr. malonil-CoA ali acetoacetil-CoA) iz kompleksa, ki je bil po napaki izbran kot začetna enota namesto strukturno podobnega malonamil-CoA. Na ta način naj bi encimski kompleks bistveno zmanjševal produkциjo ADOTC, stranskega produkta biosinteze OTC (Wang in sod., 2011b), ki ima okoli 10-krat nižjo protibakterijsko aktivnost v primerjavi z OTC (Slika 42). S tem namenom smo konstruirali vektor pIJ4026oxyPko, ki vsebuje inaktivirano obliko gena *oxyP*, ki mu na N- in C-terminalnem koncu manjka po približno 200 bp. Gre za enostopenjsko integracijo preko enojne homologne rekombinacije (integracije) v gen, ki kodira verjetno AT/tioesterazo OxyP, kar povzroči inaktivacijo gena *oxyP*. Ta pristop smo lahko uporabili zato, ker leži naslednji gen navzdol od *oxyP* v genskih skupini za biosintezo OTC v nasprotni orientaciji in inaktivacija *oxyP* tako nima t.i. polarnega učinka.

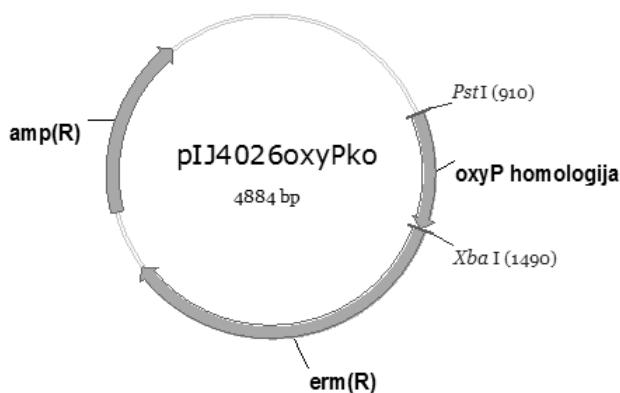


Slika 42: Strukture OTC in ADOTC

Figure 42: Structures of OTC and ADOTC

4.10.1 Konstrukcija vektorja za prekinitve gena *oxyP* iz *S. rimosus*, ki kodira verjetno AT

Z reakcijo PCR smo z oligonukleotidnima začetnikoma oxyPkoF2 (5'-TAT ATA TCT GCA GGA CCA CGT ACT GCG GGC GCA-3') in oxyPkoR2 (5'-TAT ATA TTC TAG AGG CCA GAA GCG CAC CTG GTC-3') pomnožili 604 bp dolg fragment, kjer smo genomsko DNA iz *S. rimosus* uporabili kot matrico. Produkt PCR smo rezali z restriktionskimi encimoma *Pst*I in *Xba*I in gaz ligacijsko reakcijo zlepili v vektor pIJ4026, ki smo ga prej linearizirali z restriktionskimi encimoma *Pst*I in *Xba*I. Tako sestavljen vektor pIJ4026oxyPko (Slika 43) za prekinitve gena *oxyP* smo preverili s sekveniranjem.



Slika 43: Vektor pIJ4026oxyPko

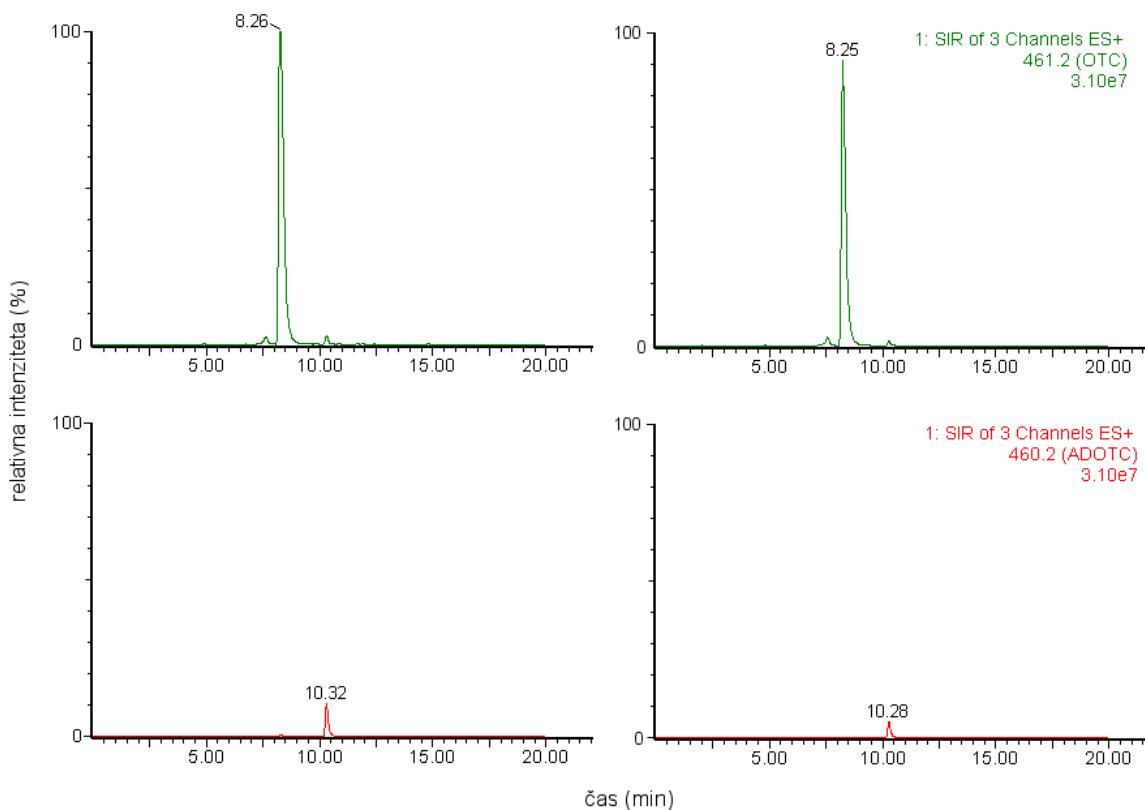
Figure 43: pIJ4026oxyPko vector

4.10.2 Vpliv inaktivacije *oxyP* na produkcijo OTC in ADOTC

Vektor pIJ4026oxyPko smo transformirali v *E. coli* ET12567 in izolirano nemetilirano plazmidno DNA vnesli v *S. rimosus* z elektroporacijo (Pigac in Schrempf, 1995). Transformante smo nato precepili na sporulacijsko gojišče SM z dodanim Erm (30 µg/ml). Genotip transformant smo preverili z reakcijo PCR. Integracijo vektorja pIJ4026oxyPko v kromosom *S. rimosus*, oziroma prekinitve gena *oxyP* z enojno rekombinacijo, smo potrdili z 0,7 kb dolgim produktom PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov oxyPkoF2 in ErmF3 (5'-GTA CCT CGA ACT CCG GTC CGA CAT C-3').

Z namenom vrednotenja produkcije OTC in ADOTC smo transformante iz plošč SM nacepili v tekoče gojišč GOTC-V z dodanim Erm (10 µg/ml) in 24 h gojili pri 30 °C ter 220 rpm za nagojitev vegetativnega inokuluma. V producijsko gojišče GOTC-F z dodanim Erm (10 µg/ml) smo nacepili 10 % vegetativni inokulum in gojili 6 dni pri 30 °C ter 220 rpm. Po končani inkubaciji smo kulturo zakisali in supernatant overdnontili z

metodo LC-MS (Slika 44). V kulturi transformant *S. rimosus* s prekinjenim genom *oxyP* smo opazili spremenjeno razmerje med OTC in ADOTC glede na razmerje v kulturi divjega tipa *S. rimosus*. V kulturi divjega tipa *S. rimosus* je bilo razmerje med OTC in ADOTC 30:1, v kulturi *S. rimosus* s prekinjenim genom *oxyP* pa se je razmerje znižalo na 20:1. Rezultati tega eksperimenta so v skladu z delom Wang in sod. (2011b) potrdili aktivnost AT OxyP pri izbiri malonamatne začetne enote v biosintezi poliketidne verige OTC.



Slika 44: LC-MS analiza kulture *S. rimosus* s prekinjenim genom *oxyP*

Pri transformantah *S. rimosus* s prekinjenim genom *oxyP* (levo) je produkcija ADOTC višja kot pri divjem tipu *S. rimosus* (desno).

Figure 44: LC-MS analysis of *S. rimosus* cultures with inactivated *oxyP* gene

Production of ADOTC is higher in *S. rimosus* transformants with inactivated *oxyP* gene (left) than in *S. rimosus* wild-type (right)

4.11 IZOLACIJA CHD IN NOVIH KELOKARDINSKIH ANALOGOV

Iz kulture seva divjega tipa *A. sulphurea* smo po postopku s SPE kolonami, opisanem v Materialih in metodah (podpoglavlje 3.9), izolirali CHD. Iz kulture rekombinantnih sevov *A. sulphurea* z integriranim vektorjem pAB03oxyDP smo izolirali CDCHD, iz rekombinantnih sevov s prekinjenim genom *chdMII* pa DMCHD. SPE metodo smo najprej postavili in optimizirali pri razvoju metode za izolacijo CHD, nato pa smo jo prilagodili še za potrebe izolacije kelokardinskih analogov CDCHD in DMCHD. Tako izoliranima spojinama CHD in CDCHD smo z metodama ^1H -NMR in ^{13}C -NMR potrdili predvideno strukturo (Priloge A-E) in uporabili za določanje protimikrobnene aktivnosti. Vzorec DMCHD, ki smo ga izolirali na tak način, ni bil dovolj kakovosten, da bi lahko njegovo strukturo določili z metodo NMR, zato smo uporabili metodi MS/MS in HRMS, da smo uspeli potrditi strukturo tega kelokardinskega analoga. Analizo NMR za potrditev struktur CHD in CDCHD so izvedli na Institutu "Jožef Stefan".

4.12 DOLOČANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI CHD IN KELOKARDINSKIH ANALOGOV

S pomočjo različnih testnih organizmov smo preverili protimikrobnou aktivnost spojin CHD, CDCHD in DMCHD, ki smo jih izolirali s SPE kolonami. Kot testne organizme smo uporabili: *E. coli*, *B. subtilis* in *S. cerevisiae*. Spojine smo raztopili v MeOH in jih nanesli v luknjice v ploščah ABA in YEPD, kakor je opisano v Materialih in metodah (podpoglavlje 3.5). Za pozitivno kontrolo delovanja proti *E. coli* in *B. subtilis* smo uporabili OTC, s poznano protibakterijsko aktivnostjo. Kot pozitivno kontrolo pri testiranju potencialne protiglivne aktivnosti s testnim mikroorganizmom *S. cerevisiae* smo uporabili antimikotik nistatin. Kot negativno kontrolo smo vedno uporabili enak volumen MeOH, ta pa ni inhibiral rasti testnih organizmov. Okoli luknjic, v katere so bile nanešene raztopine spojin, smo po 18-ih urah inkubacije pri 37°C v ploščah z *E. coli* oziroma *B. subtilis* ter po 48-ih urah pri 30°C v primeru plošč s *S. cerevisiae* opazili cono inhibicije (Slika 45).

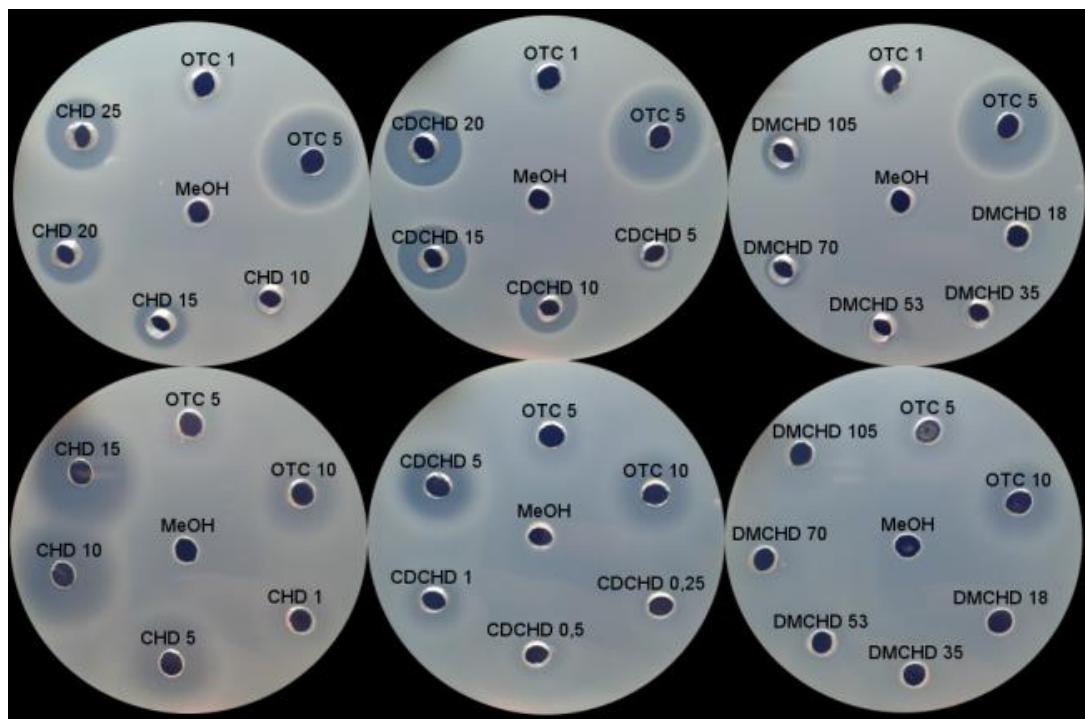
Določili smo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) CHD in kelokardinskih analogov s pomočjo testnih organizmov *E. coli* in *B. subtilis* (Preglednica 7). Kot pozitivno kontrolo smo ovrednotili MIC OTC, ki je bil v primeru delovanja na *E. coli* 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in *B. subtilis* 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ter MIC nistatina, ki je bil pri *S. cerevisiae* okoli 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. CHD je pokazal višjo aktivnost proti *E. coli* kot OTC, vendar nižjo aktivnost proti *B. subtilis*. CDCHD je v obeh primerih pokazal višjo aktivnost od CHD, vendar še vedno nižjo aktivnost proti *B. subtilis* v primerjavi z OTC. Aktivnost DMCHD tako proti *E. coli* kot proti *B. subtilis* je bila zelo nizka v primerjavi z ostalimi testiranimi spojinami, kar kaže na pomembno vlogo C-9 metilne skupine pri protibakterijski aktivnosti. Nobena od spojin ni pokazala protiglivne

aktivnosti. Poleg tega so na oddelku za mikrobiologijo bolnišnice Marques de Valdecilla-IFIMAV v Santanderju (Španija) testirali *in vitro* aktivnost CHD, CDCHD in DMCHD proti multirezistentnim kliničnim izolatom (Priloga F). Tudi oni so ugotovili, da je aktivnost CDCHD opazno višja v primerjavi s CHD. Aktivnost CDCHD proti testiranim izolatom je bila ponavadi 2-4-krat višja od aktivnosti CHD, kar potrjuje pomen 2-karboksiamido skupine za aktivnost tetraciklinov. CHD je bil skoraj neaktivен proti *P. aeruginosa*, medtem ko je CDCHD pokazal dosti višjo aktivnost proti temu patogenu. DMCHD pa praktično ni pokazal aktivnosti proti kliničnim izolatom (v testiranih koncentracijah), z izjemo izolata *S. aureus*, proti kateremu je bila aktivnost DMCHD približno 4-8-krat nižja od aktivnosti CHD.

Preglednica 7: MIC OTC, CHD in kelokardinskih analogov z uporabo testnih sevov *E. coli*, *B. subtilis* in *S. cerevisiae*

Table 7: MIC for OTC, CHD and CHD analogues using test strains *E. coli*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*

Organizem/Spojina	OTC	CHD	CDCHD	DMCHD
<i>E. coli</i>	5 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	cca. 35 µg/ml
<i>B. subtilis</i>	1 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	cca. 35 µg/ml
<i>S. cerevisiae</i>	/	> 500 µg/ml	> 500 µg/ml	> 350 µg/ml



Slika 45: Test protimikrobine aktivnosti OTC, CHD, CDCHD in DMCHD s testnima organizmoma *B. subtilis* (zgoraj) in *E. coli* (spodaj)

Navedene številke predstavljajo koncentracijo v µg/ml.

Figure 45: Testing of antimicrobial activity of OTC, CHD, CDCHD and DMCHD with test organisms *B. subtilis* (above) and *E. coli* (below)

Indicated numbers represent concentration in µg/ml.

5 RAZPRAVA

V skladu s predloženimi hipotezami (podpoglavlje 1.2) smo uspeli razviti učinkovit sistem za gensko manipulacijo *A. sulphurea*:

1. Postavili smo metodi za vnos in prekinjanje genov v *A. sulphurea* ter poiskali uporabne vektorje za replikacijo oziroma integracijo v kromosom *A. sulphurea*. Identificirali smo tudi dovolj močan promotor in funkcionalne gene za odpornost na antibiotike, ki so nam služili kot markerji, ki deluje v sevu *A. sulphurea*, ki smo jih tudi uporabili za nadaljnje eksperimente heterolognega izražanja.
2. V *A. sulphurea* smo uspeli prekiniti izbrane gene, odgovorne za biosintezo osnovnega kelokardinskega ogrodja, s čimer smo potrdili pomen genske skupine *chd* v biosintezi CHD. Tako smo prispevali k boljšemu razumevanju biosinteze tetraciklinskih antibiotikov.
3. Uspelo nam je prekiniti tudi enega izmed genov poznih stopenj iz genske skupine za biosintezo CHD - s tem nismo potrdili le njegove vloge, ampak smo hkrati uspeli konstruirati tudi nov kelokardinski analog.
4. V *A. sulphurea* smo uspeli heterologno izraziti dva gena poznih stopenj biosinteze CTC in OTC, ki ju proizvajata *S. aureofaciens* in *S. rimosus*: *chl* in *oxyS*; in dva gena, predvidoma udeležena v biosintezo začetne enote, iz genskih skupin za biosintezo OTC. Na ta način smo uspeli generirati tri nove kelokardinske analoge, potencialne matrice za nadaljni razvoj novih tetraciklinskih analogov.
5. Na koncu smo nekatere od kelokardinskih analogov tudi izolirali in preverili njihovo mikrobeno aktivnost. Z omenjenimi pristopi v *A. sulphurea* smo tako uspeli razvili zelo uporabno in unikatno platformo na osnovi skupine za biosintezo CHD z namenom oblikovanja novih tetraciklinskih antibiotikov.

5.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA

Tetraciklini so zaradi svojega širokega spektra delovanja in odsotnosti večjih neželenih stranskih učinkov hitro dobili pomembno vlogo v humani in veterinarski medicini. Intenzivna in morda prekomerna uporaba tetraciklinov pa je kmalu vodila v nastanek in razširjanje rezistenc proti tetraciklinom med patogenimi bakterijami. Kliniki so se proti rezistentam začeli boriti s kemijskimi modifikacijami tetraciklinov - tako je nastala druga generacija tetraciklinov (doksiciklin, minociklin), kasneje, ko so se med patogenimi bakterijami začele razširjati še rezistence proti drugi generaciji tetraciklinov, pa še tretja generacija tetraciklinov (glicilciklini). Z namenom razvoja novih tetraciklinskih analogov lahko, poleg kemijske polsinteze, strukturo molekule tetraciklinskih antibiotikov

spreminjamo tudi z biosinteznim inženiringom. Pri tem uporabimo priložnosti, ki nam jih omogočajo novejše metode biosinteznega inženirstva. Z uporabo t.i. »kombinatornih« pristopov biosinteznega inženirstva lahko gene iz različnih genskih skupin za biosintezo antibiotikov heterologno izrazimo v gostiteljskih organizmih. Da bi lahko smiselno načrtovali oblikovanje novih bioaktivnih tetraciklinskih analogov, pa je potrebno bolje razumeti biosintezne poti tetraciklinskih analogov oziroma natančno preučiti gene in biosintezo do sedaj znanih antibiotikov.

Tetraciklini niso omejeni le na področje zdravljenja infekcij, ampak se njihov potencial kaže tudi na drugih področjih humane medicine. Protimikrobní učinek tetraciklinov in aktivnost proti ne-antibiotskim tarčam nista neposredno povezana. Ugotovili so, da odstranitev C4 dimetilamino skupine iz molekule tetraciklina preko sinteznih modifikacij povzroči izgubo protimikrobega učinka, poveča pa se njena aktivnost proti ne-antibiotskim tarčam, npr. inhibicija kolagenaz (zdravljenje artritisa, osteoporoze, anevrizme, perodontitisa in raka). Odsotnost protimikrobnega učinka v takšnih zdravilih lahko štejemo za prednost, saj se tako izognemo neželenemu širjenju rezistenc med bakterijami.

Za CHD so že konec 70-ih let prejšnjega stoletja ugotovili, da kaže močno protimikrobní aktivnost (Proctor in sod., 1978). Ena od glavnih lastnosti CHD, ki pa je najbrž odvrnila od razvoja oziroma uporabe v humani medicini, pa je njegova zelo slaba topnost v vodi in posledično težavna priprava raztopin za injekcije (Farhadiéh, 1977). CHD bi bil primeren za zdravljenje infekcij urinarnega trakta, ker tam velikokrat najdemo proti mnogim antibiotikom rezistentne mikroorganizme, proti katerim pa CHD kaže zelo dobro aktivnost (Proctor in sod., 1978). Pred kratkim so ugotovili, da ima CHD tudi protivirusno aktivnost (Jenne in sod., 2001; Rogers in sod., 1996). Način delovanja CHD še ni povsem pojasnjen, ugotovili so le, da ne deluje na bakterijski ribosom, ampak zaradi svojega lipofilnega značaja verjetno poruši integriteto celične membrane, kar posredno vodi v bakteriolizo (Oliva in sod., 1992). Morda je to, da ne deluje na bakterijski ribosom, njegova prednost, ker se tako izognemo vsem mehanizmom bakterijske rezistence, ki delujejo na nivoju zaščite ribosomov, kot se je to nedavno izkazalo pri uvedbi novega antibiotika daptomicina v klinično uporabo. Za nadaljnji razvoj in uporabo CHD oziroma njegovih analogov v humani medicini je potrebno natančno preučiti način delovanja in biološke tarče CHD ter preveriti vpliv na evkarijontske celice.

5.2 CILJI NALOGE

Prvi cilj tega doktorskega dela je bil razvoj metod in orodij za gensko manipulacijo *A. sulphurea*, saj te redke aktinomicetne vrste do danes ni še nihče uspel gensko manipulirati. S tem smo hoteli prispevati k hitrejšemu razvoju orodij za manipulacijo teh redkih

aktinomicet iz rodu *Amycolatopsis*, hkrati pa odpreti vrata v proučevanje biosintezne poti nenavadnega tetraciklinskega antibiotika CHD oziroma biosinteznega potenciala kelokardinske genske skupine. Poglavnit cilj doktorskega dela je bil študij biosinteznih poti tetraciklinov, s posebnim poudarkom na vlogi in delovanju encimov poznih stopenj biosinteze, oksigenaz, metiltransferaz, aminotransferaz, halogenaz, glikoziltransferaz, saj je razumevanje delovanja biosinteznih encimov nujno za nadaljnji razvoj novih tetraciklinskih molekul s pomočjo biosinteznega inženiringa.

5.3 POSTAVITEV UČINKOVITEGA SISTEMA ZA GENSKO MANIPULACIJO A. *sulphurea*

Najprej smo se lotili preverjanja intrinzične rezistence seva *A. sulphurea* proti različnim antibiotikom in s tem ugotovili, katere antibiotike bomo lahko uporabljali kot markerje za nadaljnjo selekcijo transformant *A. sulphurea*. V skladu z opažanji pri drugih vrstah rodu *Amycolatopsis*, tudi *A. sulphurea* izkazuje zelo visoko intrinzično rezistenco proti Apr in Kan. Še vedno pa te koncentracije niso tako visoke, da bi onemogočale uporabo teh antibiotikov za namene selekcije transformant.

Nato smo poskusili postaviti metodo za transformacijo *A. sulphurea*. Preizkusili smo tri različne metode vnosa DNA v celice: konjugativni prenos iz *E. coli*, elektroporacijo in transformacijo micelija. Učinkovita je bila le transformacija micelija ob uporabi integrativnih vektorjev pAB03 in pSET152, ki se vgradita v bakterijski kromosom v mestu ΦBT1 oziroma ΦC31. Transformacija micelija po metodi, ki je bila razvita za sev *A. mediterranei* (Madon in Hutter, 1991), je bila zelo uspešna in smo jo le nekoliko optimizirali s spremjanjem starosti kulture in količine DNA za transformacijo. Po uspešni postavitevi metode za transformacijo smo preverili še uporabo drugih, replikativnih, vektorjev v *A. sulphurea*. Izmed vseh testiranih replikativnih vektorjev, ki so uporabni v drugih aktinomicetnih rodovih (*Streptomyces*, *Nocardia* in *Amycolatopsis*), se je v *A. sulphurea* podvojeval le pNV18 oziroma pNV19 (pNV18 z obratnim vrstnim redom restriktijskih mest v MCS). Ob preverjanju njegove ohranitve v celicah smo ugotovili, da se hitro preneha podvajati in se tako izgubi iz celice. V odsotnosti seleksijskega pritiska z antibiotikom se je plazmid izgubil iz celic že po dveh ali treh precepljanjih, kar se tudi na splošno zgodi s plazmidom, ki ne nosi nobenih drugih, za celico pomembnih, genov.

Za postavitev sistema za izražanje heterolognih genov v *A. sulphurea* smo najprej morali identificirati močne promotorje, ki delujejo v *A. sulphurea*. Odločili smo se za uporabo poročevalskega sistema, ki temelji na genu za kalkon sintazo RppA, čigar uporabnost so pokazali že Kuščer in sod. (2007) ter Magdevska in sod. (2010) (Kuščer in sod., 2007; Magdevska in sod., 2010). Posledica izražanja kalkon sintaze je tvorba flavolinskega

pigmenta. Količina proizvedenega pigmenta, ki jo določamo z merjenjem absorbance, pa je tako sorazmerna moči testiranga promotorja. Primerjali smo moč promotorjev *PactI* in *PermE** in ugotovili, da je nivo transkripcije, in posledično izražanja *rppA*, višji pod promotorjem *PactI*, ki izhaja iz genske skupine za biosintezo aktinorodina. Promotor *PactI* smo zato izbrali za nadaljnje poskuse izražanja heterolognih genov v *A. sulphurea*.

S postavljivjo sistema za prekinjanje genov v *A. sulphurea* smo imeli nekaj začetnih težav. Naša prvotna strategija za prekinjanjem genov je temeljila na uporabi samomorilskih vektorjev, ki se v celicah ne podvajajo in se morajo, da bi se ohranili v celici, zato s homologno rekombinacijo vgraditi v bakterijski kromosom. Vektorje smo konstruirali tako, da smo v vektor klonirali gen ozziroma skupino genov, prekinjeno z genom za določeno antibiotično rezistenco. Po nekaj neuspešnih poskusih transformacije s konstrukti v samomorilskih vektorjih smo sklepali, da je frekvenca homologne rekombinacije med insertom v vektorju in bakterijskim kromosomom prenizka, da bi dobili transformante, v katerih je prišlo do alelne zamenjave. Zato smo se odločili, da preizkusimo, ali bi bil za namene prekinjanja genov uporaben plazmid pNV18, ki se v celicah *A. sulphurea* očitno slabo replicira, kar pomeni, da bi se moral pod selekcijskim pritiskom vgraditi v bakterijski kromosom. Ta pristop je bil zelo uspešen. Za prekinjanje genov smo uporabili strategijo alelne zamenjave, kjer intakten gen v bakterijskem kromosому preko dvojnega prekrižanja zamenjamo z njegovo inaktivirano verzijo (osrednjo regijo gena zamenjamo z genom za antibiotično rezistenco).

5.4 POTRDITEV, DA GENSKA SKUPINA *chd* KODIRA BIOSINTEZO CHD

Po uspešni postavitvi sistema za prekinjanje genov v *A. sulphurea* je bilo potrebno potrditi, da klonirana genska skupina zares kodira biosintezo CHD - z inaktivacijo genske skupine in v nadaljevanju s povrnitvijo biosinteze s postopkom komplementacije. Potrditev vloge genske skupine bi se lahko lotili na dva načina: a) s postopkom inaktivacije in nato komplementacije, s čimer se povrne sposobnost biosinteze antibiotika in b) pogosto pa lahko dokazujemo s pomočjo heterolognega izražanja celotne genske skupine v gostiteljskem organizmu. Pred tem smo lahko le predvidevali, da je odkrita genska skupina (Petković in sod., 2013; Lukežič in sod., 2013) odgovorna za biosintezo CHD. Zgodilo bi se namreč lahko, da je ta genska skupina odgovorna za biosintezo CHD podobnega antibiotika, čeprav je bioinformatska analiza identificirala vse protrebne genske homologe, ki bi jih glede na trenutno razumevanje biosinteze tetraciklinskih analogov tudi pričakovali. Ciljne gene minimalnega PKS za biosintezo CHD smo inaktivirali z alelno zamenjavo s kaseto za eritromicinsko rezistenco preko dvojne homologne rekombinacije. Dvojne rekombinante *A. sulphurea* niso več proizvajale CHD, kar smo dokazali s HPLC in potrdili še z LC-MS analizo. Pred tem pa smo tudi pri ploščah, kjer so rastle rekombinante

s prekinjeno kelokardinsko gensko skupino, opazili drugačno obarvanost gojišča. Gojišče, na katerem raste divji tip *A. sulphurea*, se po dveh tednih rasti zaradi izločanja CHD obarva rumenorjavо, medtem ko rekombinantni sevi ne proizvajajo rumenega pigmenta. Producijo CHD v rekombinantnih sevih smo povrnili s vnosom plazmida, ki nosi 8 kb DNA fragment kelokardinske genske skupine oziroma s plazmidom, ki je vseboval gene minimalnega PKS za biosintezo CHD (*chdPKS*). Na prvem plazmidu so bili geni *chd* pod vplivom nativnega promotorja: pred start kodonom prvega gena iz kelokardinske genske skupine je bil še velik del sekvence iz kromosoma *A. sulphurea*. V drugem pristopu pa smo uporabili plazmidni konstrukt, kjer so bili geni minimalnega PKS pod vplivom promotorja *PactI* iz genske skupine za biosintezo aktinorodina. Povrnitev produkcije CHD smo dokazali s HPLC in maso CHD potrdili z metodo LC-MS. Po pričakovanju se je rumena pigmentacija gojišča, na katerem smo gojili komplementirane rekombinante, povrnila. Ugotovili smo, da je bila produkcija CHD v rekombinantah, ki smo jih komplementirali z geni *chd* pod vplivom nativnega promotorja višja od produkcije pri tistih rekombinantnih sevih, ki so bili komplementirani z geni minimalnega PKS pod vplivom promotorja *PactI*. Glede na to je mogoče sklepati, da je nativni promotor verjetno močnejši od promotorja *PactI*, obstaja pa verjetnost, da ima sekvenca pred prvim genom iz kelokardinske genske skupine še kakšen dodaten regulatorni vpliv na biosintezo CHD (Lukežič in sod., 2013).

5.5 BIOSINTEZA TETRACIKLINOV

Biosintezo CHD smo primerjali z biosintezo OTC, ki je zelo preučena in jo zato lahko uporabimo kot modelni sistem za študij biosinteze poliketidov tipa II. Biosintezo tetraciklinov lahko razdelimo v tri faze: iniciacijska faza, gradnja in ciklizacija osnovnega skeleta, pozne stopnje biosinteze.

5.5.1 Iniciacijska faza

V iniciacijski fazi se biosintetizira začetna enota in nato vgradi v osnovno poliketidno verigo. V tej fazi se biosintezni poti OTC in CHD zelo razlikujeta. Začetna enota v biosintezi OTC je verjetno malonamat, za čigar biosintezo je odgovorna amidotransferaza OxyD. Pri vgradnji malonamatne začetne enote v osnovno poliketidno verigo pa ima poleg tega pomembno vlogo tudi AT/tioesteraza OxyP. Nedavno so Wang in sod. (2011) predložili, da OxyP verjetno s pomočjo tioesterazne aktivnosti odstranjuje acetatne začetne enote, ki naj bi glede na podobnost med substrati, bili vgrajeni napačno. Po tej hipotezi bi encim OxyP na nek način izvajal kontrolo in odstranjeval napačno začetno enoto ter tako omogočal večjo frekvenco vgradnje malonamatne začetne enote. Začetna enota v biosintezi CHD pa je zelo verjetno, tako kot pri drugih aromatskih poliketidih

(tetracenomicin, aktinorodin), CoA aktiviran acetat, ki nastane z dekarboksilacijo malonata. Lahko pa je potencialno tudi acetoacetat, saj je ta bistveno bolj podoben malonamatu (Slika 10). Bisang in sod. (1999) so pokazali, da ima KS β (CLF) dekarboksilativno aktivnost za malonil-CoA, kar je zelo podobno vlogi KSQ modularnih PKS. V KSQ igra pomembno vlogo glutaminski ostanek (Bisang in sod., 1999), ki je prisoten tako v kelokardinski KS β (ChdK) kot v oksitetraciklinski KS β (OxyB), v nasprotju s cisteinskim ostankom, ki ga najdemo v KS α (ChdP in OxyA) in je pomemben za njeno katalitično aktivnost (oblikovanje vezi C-C). Zato je po tej hipotezi tudi mogoče, da minimalni PKS v resnici aktivira malonil-CoA, ki pa je zelo hitro dekarboksiliran. Z izgubo ene molekule CO₂ pa praktično nastane acetil-CoA, ki se uporabi kot začetna enota.

5.5.1.1 Izbira začetne enote pri iniciaciji biosinteze tetraciklinov

Ena od posebnosti, ki tetracikline loči od drugih poliketidov, sintetiziranih z encimskim kompleksom PKS tipa II, je izbira nenavadne (ne-acetatne) začetne enote v osnovno poliketidno verigo. Čeprav se predpostavlja, da je začetna enota pri biosintezi običajnih tetraciklinov malonamil-CoA, biosintezni izvor in struktura začetne enote še vedno ni povsem razumljena. Zhang in sod. (2006) so pokazali, da ima amidotransferaza OxyD iz genske skupine za biosintezo OTC iz *S. rimosus* esencialno vlogo v biosintezi tetraciklinskega skeleta, ki ima na mestu ogljika 2 karboksiamido skupino.

Za biosintezo malonamilne začetne enote v biosintezi OTC je odgovorna amidotransferaza OxyD, ki verjetno amidira malonil-CoA ali malonil-ACP (Zhang in sod., 2006). Poleg tega pa v genski skupini za biosintezo OTC najdemo še gen za AT OxyP, za katero so dolgo predvidevali, da ima pri izbiri začetne enote v biosintezi OTC pomembno vlogo. Vendar, kot smo že omenili, OxyP naj bi po trenutni hipotezi delovala kot tioesteraza in iz acetil-ACP kompleksa odstranjevala acetatne enote. Na ta način naj bi zmanjševala nivo produkcije ADOTC (OTC analog z acetatno začetno enoto), ki je stranski produkt v biosintezi OTC (Wang in sod., 2011b).

Zanimivo je, da v biosintezni skupini za biosintezo CTC ne najdemo gena za AT. Zelo težko je to tudi razložiti. Mogoče je, da ima minimalni PKS iz genske skupine, ki kodira biosintezo CTC iz *S. aureofaciens*, morda visoko specifičnost za malonamilno začetno enoto in zato encim s tioesterazno aktivnostjo za odstranjevanje konkurenčnih acetatnih enot ni potreben (Wang in sod., 2011b). Možno pa je tudi, da v tem procesu sodeluje tioesteraza iz drugih genskih skupin za biosintezo poliketidov, ki jih proizvaja *S. aureofaciens*. Vse skupaj kaže na to, da še vedno ne znamo natančno pojasniti vloge AT v biosintezi tetraciklinov.

Tudi v genski skupini za biosintezo CHD ne opazimo gena za AT, saj naj bi bila začetna enota v biosintezi CHD kar acetil-CoA, ki je običajna začetna enota pri iniciacijskih aromatskih poliketidov. Vendar pa izbira začetne enote v biosintezi CHD še ni čisto razjasnjena. Možne začetne enote pri iniciacijski CHD so lahko s CoA aktivirani acetat, acetoacetat ali dekarboksilirani malonat. Acetoacetat predstavlja zanimivo možnost iniciacije, pri čemer je nadaljnji korakov elongacije osnovne poliketidne verige le 8, saj acetoacetat v poliketidni skelet prispeva 4 C atome. V iniciacijski biosintezi CHD bi se lahko kot začetna enota uporabil tudi malonat, ki bi ga $\text{KS}\beta$ dekarboksilirala do začetne enote z dvema C atomoma, čemur bi sledilo 9 korakov podaljševanja verige z malonatnimi podaljševalnimi enotami (Slika 46).

V heterolognem sistemu minimalnega PKS aktinorodina ali tetracenomicina različnim raziskovalnim skupinam ni uspelo doseči produktivnega sodelovanja med amidotransferazo OxyD in heterolognimi minimalnimi PKS (za biosintezo tetracenomicina oziroma aktinorodina), ki navadno uporabljajo acetatne začetne enote. Ko so heterologno izrazili *oxyD* v sistemu minimalnega PKS aktinorodina ali tetracenomicina, ta ni proizvajal amidiranih poliketidov, ampak le poliketide z acetatnimi začetnimi enotami (Zhang in sod., 2006). Glede na bistveno večjo sorodnost med strukturami OTC in CHD, v primerjavi z aktinorodinom in tetracenomicinom, smo tudi mi ovrednotili, ali lahko pride do produktivnega sodelovanja med heterologno izraženo amidotransferazo OxyD in minimalnim PKS za biosintezo CHD iz *A. sulphurea*. Izkazalo se je, da transformante *A. sulphurea* z dodanim genom za OxyD poleg CHD proizvajajo še eno novo spojino - kelokardinski analog z amidirano začetno enoto (CDCHD) (Slika 46), vendar le v zelo nizkih koncentracijah. Nivo produkcije CHD je približno dvajsetkrat višji od nivoja produkcije amidiranega kelokardinskega analoga. Takšen rekombinantni sev prav gotovo ni primeren kot izvor nove spojine za nadaljnje delo na polsintezi, v kolikor bi imela CDCHD atraktivno biološko aktivnost, npr. protibakterijsko aktivnost. Demonstrirali smo, da OxyD lahko sodeluje s kelokardinskim minimalnim PKS, zaradi tako nizkega donosa novega analoga pa lahko sklepamo, da je OxyD morda zelo specifičen za OTC minimalni PKS in je sodelovanje s heterolognimi minimalnimi PKS toliko manj uspešno.

Kmalu zatem so Wang in sod. (2011b) objavili znanstveni članek, v katerem ugotavljajo, da za biosintezo in vgradnjo začetne enote v strukturo OTC odgovorni amidotransferaza OxyD in AT/tioesteraza OxyP. OxyP najverjetneje hidrolizira konkurenčne acetil-CoA ali pa malonilCoA (potencialno tudi acetoacetil-CoA) začetne enote in s tem omogoča vgradnjo malonamatne začetne enote. Na ta način zmanjšuje nivo produkcije oksitetraciklinskega analoga z acetatno začetno enoto (ADOTC). Pokazali so, da inaktivacija OxyP ne izniči biosinteze OTC, le razmerje med ADOTC in OTC se bistveno poviša v prid ADOTC. S tem so demonstrirali pomožno, vendar ne nepomembno vlogo OxyP v biosintezi OTC (Wang in sod., 2011b). Poskus inaktivacije *oxyP* v drugem sevu, *S.*

rimosus M4018, smo ponovili (podpoglavlje 4.10) in prišli do podobnega zaključka.

Tang in sod. (2004b) so pred tem pokazali, da dodatek AT/tioesteraze ZhuC k tetracenomicinskemu minimalnemu PKS prekine biosintezo dekaketidov z acetatno začetno enoto, kar v primeru dohranjevanja s heksanoilom vodi v izključno produkcijo oktaketidov s heksanoilno začetno enoto. V odsotnosti alternativnih donorjev acilnih verig pa ZhuC močno zmanjša aktivnost tetracenomicinskega minimalnega PKS, saj odceplja acetatne začetne enote, ki ponavadi prevladujejo v iniciaciji poliketidne verige. ZhuC tako omogoča vgradnjo alternativnih začetnih enot (Tang in sod., 2004b). Tang in sod. (2004a) so poleg tega uspeli doseči sodelovanje aktinorodinskega oziroma tetracenomicinskega minimalnega PKS z iniciacijskim modulom R1128 (*zhuGHC*), kar je vodilo v nastanek novih poliketidov z neacetatnimi začetnimi enotami, kot sta propionil in izobutiril (Tang in sod., 2004a).

V naslednjem koraku smo preverili, ali lahko v *A. sulphurea* hkrati heterologno izrazimo gena za amidotransferazo OxyD in aciltransferazo/tioesterazo OxyP. Heterologno izražanje obeh genov je bilo uspešno in uspeli smo prvi proizvesti poliketidno molekulo, ki je sprejela nenavadno enoto malonamil-CoA v heterolognem sistemu, detektirali smo zelo visok donos CDCHD (podpoglavlje 4.6.3), analog CHD ki vsebuje karboksiamido skupino na ogljikovem atomu C2.

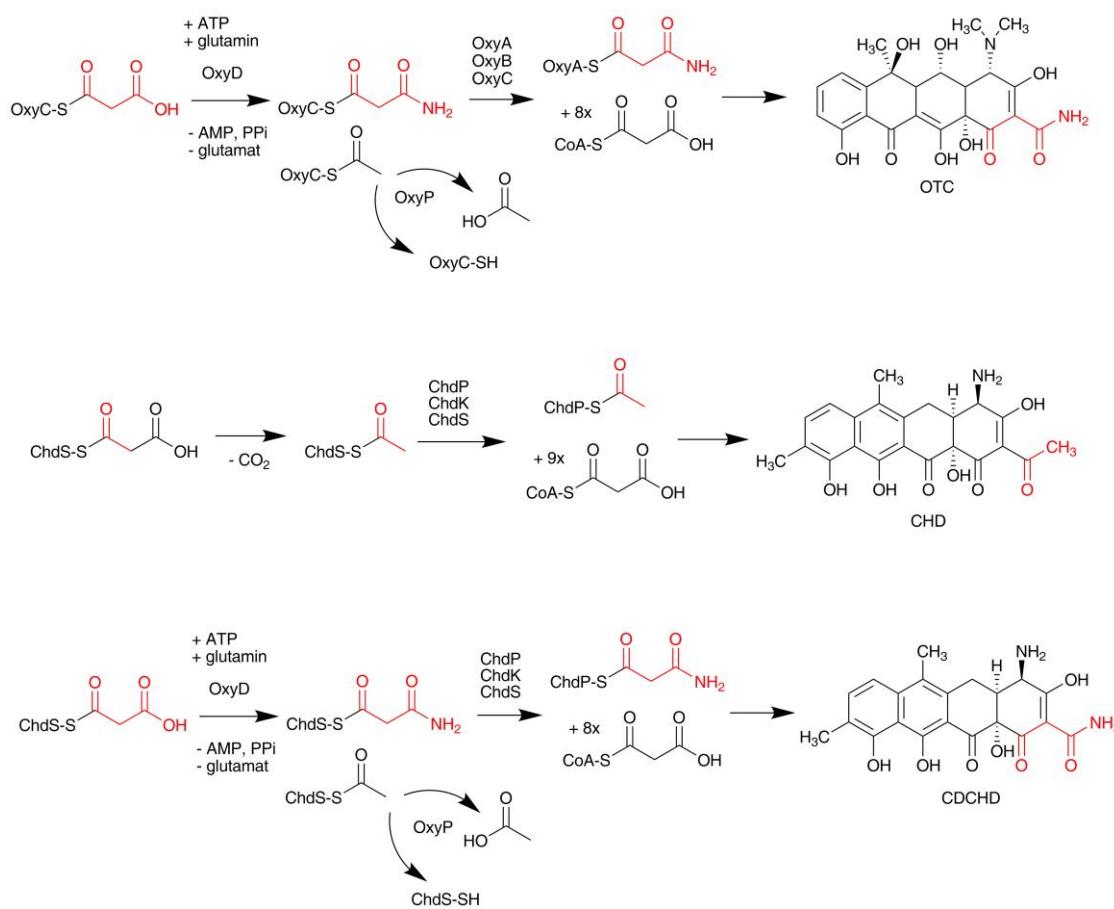
V naših poskusih, za razliko od rezultatov eksperimentov pri biosintezi OTC, se je izkazalo, da ima OxyP pri vgradnji amidirane začetne enote v poliketidno verigo CHD izjemno pomembno vlogo. Hkratno izražanje OxyD in OxyP v *A. sulphurea* je vodilo v izjemno povišanje produkcije CDCHD v primerjavi s produkcijo pri transformantah, ki so vsebovale le OxyD - produkcija se je povišala za več kot desetkrat. Spremenilo pa se je seveda tudi razmerje med produkcijo CHD in CDCHD, ki je bilo tokrat približno 1:3,6. Ker smo žeeli preveriti ugotovitev Wanga in sod. (2011b) o vplivu OxyP v biosintezi OTC, smo tudi mi inaktivirali gen za AT OxyP v *S. rimosus*. V skladu z rezultati Wang in sod. (2011b) smo ugotovili, da se je razmerje ADOTC:OTC povišalo v prid ADOTC in tako smo potrdili Wangovo razlago o negativnem vplivu OxyP na vgradnjo acetatne začetne enote v tetraciklinsko strukturo.

Vsekakor pa lahko ugotovimo, da ima OxyP bistveno bolj pomembno vlogo, kot smo pričakovali. Za potrditev vloge AT/tioesteraze OxyP pa bo verjetno potrebno v bodoče izvesti *in vitro* encimske eksperimente. Seveda je to zahtevna naloga, za katero je potrebno pridobiti vse potrebne topne proteine encimskega kompleksa minimalnega PKS CHD in OxyD/OxyP proteinov iz *S. rimosus* OTC genske skupine.

Sodelovanje kelokardinskega minimalnega PKS z encimi, ki sodelujejo pri iniciaciji OTC, je vodilo v produkcijo novega kelokardinskega analoga v visokem donosu, kar kaže na

veliko uporabnost kelokardinskega sistema minimalnega PKS (v sodelovanju s heterologno izraženo AT/tioesterazo) v kombinatorni biosintezi z različnimi nendaravnimi začetnimi enotami za produkcijo novih poliketidnih struktur – podobno, kakor je uspelo Tangu in sod. (2004b) v primeru sodelovanja tetracenomicinske minimalnega PKS z R1128 AT/tioesterazo ZhuC (Tang in sod., 2004b).

Če bi nam po drugi strani uspelo doseči vgradnjo malonamilne začetne enote v različne aromatske poliketide, bi s tem vnesli amino skupino v različne komercialne produkte, kar je še posebej privlačno, saj se da amino skupino z lako derivatizirati s polsinteznimi postopki, kar bi vodilo v oblikovanje številnih novih analogov komercialnih učinkovin.



Slika 46: Predvidena začetna stopnja biosinteze nastajajoče poliketidne verige z vgradnjem malonamatne oziroma acetatne začetne enote v OTC (zgoraj) (Wang in sod., 2011b), CHD (v sredini) in CDCHD (spodaj)
 Figure 46: Proposed early stage of biosynthesis of nascent polyketide chain with malonamate and acetate priming of OTC (above) (Wang et al., 2011b), CHD (in the middle) and CDCHD (below)

5.5.2 Gradnja osnovnega skeleta

Za gradnjo osnovnega skeleta poliketida je odgovoren minimalni PKS, sestavljen iz KS α , KS β in ACP. Encimi minimalnega PKS v biosintezi OTC (OxyABC) in CHD (ChdPKS) so si zelo podobni, tudi rezultat njihovega delovanja je nastanek podobnega osnovnega skeleta, ki se razlikuje le v začetni enoti. Do razlik v biosintezi OTC in CHD pride spet v fazi ciklizacije poliketidne verige. Ključno vlogo pri tem ima ketoreduktaza (OxyJ oziroma ChdT), ki reducira mesto C8, nato pa dvokomponentna ciklaza/aromataza zapre prvi obroč (D). V primeru biosinteze OTC je to OxyK, ki ima v genski skupini za biosintezo CHD dva homologa, ChdQI in ChdQII, kar je zelo neznačilno za PKS sisteme tipa II, ki imajo v svoji genski skupini ponavadi le eno dvokomponentno aromatazo/ciklazo. Druga aromataza/ciklaza iz genske skupine za biosintezo CHD je morda odgovorna za zaprtje obroča C. V biosintezi OTC ima vlogo zapiranja drugega obroča ciklaza OxyN, čigar homologa ne najdemo v genski skupini za biosintezo CHD. Zaprtje tretjega (B) obroča v biosintezi OTC je spontano, kar verjetno velja tudi v biosintezi CHD. Zaprtje zadnjega (A) obroča v biosintezi OTC naj bi tudi bilo spontano zaradi prisotnosti terminalne amino skupine (Zhang in sod., 2007), v biosintezi CHD pa naj bi bila za to odgovorna ciklaza ChdX. Da bi dokazali vlogo posameznih aromataz/ciklaz v biosintezi CHD, je potrebno gene, ki jih kodirajo, inaktivirati in ovrednotiti produkcijo CHD oziroma novih analogov s spremenjenim vzorcem ciklizacije.

5.5.3 Pozne stopnje biosinteze

Pozne stopnje biosinteze OTC in CHD se kar nekoliko razlikujejo, kar se odraža v drugače »okrašenem« osnovnem poliketidnem skeletu. CHD ima za razliko od OTC na mestu C9 metilno skupino, za kar naj bi bila odgovorna metiltransferaza ChdMII. CHD na mestu C4 nima dimetil-amino skupine, ampak le amino skupino, ki pa je obratne stereokemije kot amino skupine značilnih tetraciklinov, kar potrjuje tudi dejstvo, da imata C4 aminotransferazi OxyQ in ChdN zelo nizko stopnjo homologije. V genski skupini za biosintezo CHD ne najdemo metiltransferaze, ki bi bila homologna OxyT, encimu, ki v biosintezi OTC na C4 amino skupino doda dve metilni skupini. Mesto C6 je metilirano tako pri CHD kot OTC z verjetno metiltransferazo ChdMI oziroma OxyF. Pri CHD pa ne najdemo hidroksilnih skupin na mestih C5 in C6 kakor pri OTC, kar potrjuje tudi dejstvo, da v genski skupini za biosintezo CHD ne najdemo homologa oksigenaze OxyS, ki je odgovorna za ta dva koraka v biosintezi OTC.

Pri heterologen izražanju genov poznih stopenj iz genskih skupin za biosintezo OTC in CTC v *A. sulphurea* smo opazili, da je nivo produkcije novih kelokardinskih analogov veliko nižji od produkcije CHD. Morda je razlog v tem, da so ti encimi visoko specifični za

svoj substrat, lahko pa je odsoten kakšen pomemben kofaktor. Tudi pri prekinjanju genov poznih stopenj iz genske skupine za biosintezo CHD smo opazili, da je nivo produkcije kelokardinskih analogov padel v primerjavi s produkcijo CHD pri divjem tipu *A. sulphurea*. To je najbrž posledica dejstva, da biosintezni encimi delujejo v velikih encimskih kompleksih. Ob odsotnosti enega od encimov se spremeni kvartarna struktura kompleksa, kar negativno vpliva na učinkovitost encimov in tako pade nivo produkcije antibiotika. Perić-Concha in sod. (2005) so npr. naprej prekinili gen za ATC oksigenazo v *S. rimosus*, ki je zato proizvajal nov poliketid, za 2 C-atoma krajsi od OTC. Ko pa so ta prekinjen gen zamenjali z mutiranim genom (za katalitično neaktivnen encim), so pokazali, da se je povrnila sposobnost encimskega kompleksa za proizvodnjo poliketida z 19 C-atomi. Poliketid je bil spet dolžine, ki je ustrezala OTC, kar je nakazalo pomembno vlogo ATC oksigenaze v kvartarni strukturi sintaznega kompleksa (Perić-Concha in sod., 2005).

5.5.3.1 Metiltransferaza OxyT

OxyT je od SAM odvisna *N,N*-dimetiltranferaza, ki v biosintezi OTC dimetilira amino skupino na C4 (Zhang in sod., 2008). Želeli smo preveriti, ali lahko OxyT doda metilni skupini na C4 amino skupino v molekuli CHD, ki je postavljena v obratni stereokemiji kot pri OTC. V biosintezi OTC pride v manjši meri tudi do produkcije 4-epiOTC, vendar pa ta nastane z reverzibilno epimerizacijo OTC v kislih pufrskih raztopinah (McCormick in sod., 1957). V *A. sulphurea* smo vnesli gen za OxyT in preverili prisotnost novih kelokardinskih analogov v produkcijski kulturi. Opazili nismo novih spojin, zaradi česar smo sklepalni, da je metiltransferaza OxyT specifična za amino skupino v konfiguraciji, ki jo najdemo pri OTC in zato na amino skupino CHD ne deluje.

5.5.3.2 Oksigenaza OxyS

ATC oksigenaza OxyS katalizira zaporedno oksigenacijo na mestih C6 in C5 v biosintezi OTC pri *S. rimosus* (Wang in sod., 2013). Želeli smo preveriti, ali lahko OxyS katalizira hidroksilacijo CHD na mestih C6, C5 ali na obeh. Zato smo v *A. sulphurea* izrazili gen *oxyS* in preverili produkcijo novih kelokardinskih analogov. V produkcijski kulturi smo opazili novo spojino z maso, ki ustreza masi kelokardinskega analoga z eno dodatno hidroksilno skupino. Z MS/MS analizo smo potrdili, da gre za CHD sorodno molekulo, vendar natančnega mesta hidroksilacije nismo mogli določiti. Trdimo lahko le, da je prišlo do spremembe na obroču D, C ali B. Predvidevamo, da smo z izražanjem gena za OxyS v *A. sulphurea* proizvedli nov kelokardinski analog s hidroksilno skupino na mestu C6 in ne na mestu C5. Hidroksilacijo na mestu C6 opazimo namreč tudi pri CTC, kjer reakcijo katalizira oksigenazi OxyS homologni encim Cts8. Hidroksilacija na mestu C5 je prisotna

le pri OTC in izgleda, da je ATC oksigenaza v primeru hidroksilacije na mestu C5 zelo specifična za svoj substrat in dodatne substitucije na obroču D intermediatov biosinteze CTC in CHD najbrž vodijo v drugačno orientacijo substrata v aktivnih mestih encima in posledično njegovo neaktivnost (Wang in sod., 2013).

Da bi povečali produkcijo hidroksiliranega kelokardinskega analoga, smo v gojišče dodali vitamin B₃ (niacin), ki je prekursor za sintezo kofaktorja NADPH, od katerega je oksigenaza OxyS odvisna. Na ta način smo le minimalno povečali produkcijo oksikelokardina; razlog za nizko produkcijo hidroksiliranega kelokardinskega analoga je verjetno slabša afiniteta encima za kelokardinski intermediat v primerjavi z afiniteto za svoj naravni substrat ATC.

5.5.3.3 Halogenaza Chl

Dairi in sod. (1995) so dokazali, da je gen *chl* iz genske skupine za biosintezo CTC v *S. rimosus* odgovoren za klorinacijo molekule na mestu C7 (Dairi in sod., 1995). V *A. sulphurea* smo izrazili gen za halogenazo Chl in v izvlečkih kulture opazili novo spojino z maso, ki je ustrezala klorkelokardinu. Pokazali smo, da encim Chl ni strogo specifičen le za določen intermediat v biosintezi CTC ampak lahko deluje tudi na strukturno sorodne molekule, kot je npr. CHD, ter sodeluje tudi z encimi iz drugih sorodnih genskih skupin. Natančne pozicije nove klorove skupine na molekuli kelokardinskega analoga nismo mogli določiti, z MS/MS analizo pa smo lahko pokazali, da gre za CHD sorodno molekulo in da je do spremembe prišlo na enem od obročev D, C ali B. Če sklepamo po podobnosti CHD s CTC, je do spremembe najverjetneje prišlo na mestu C7 obroča D. Ker pripada halogenaza Chl k od flavina odvisnim halogenazam, smo sklepali, da bi lahko z dodatkom prekursorja kofaktorja FAD, vitamina B₂ (riboflavin), povečali njegovo učinkovitost. Odločili smo se, da v gojišče dodamo še NaCl kot izdaten vir klorove skupine. Vse te kombinacije dodatkov v gojišče so le minimalno povečale produkcijo klorkelokardina. Razlog za nizko produkcijo novega analoga je zelo verjetno stereo selektivnost CtcP halogenaze za substrat. Zhu in sod. (2013) so pokazali, da je CtcP specifična za tetraciklin (4S), ne deluje pa na epi-tetraciklin (4R). CHD (4R) torej ni ustrezen substrat za CtcP; epi-CHD (4S), ki je najverjetneje pravi substrat za CtcP, pa je v produkcijski kulturi *A. sulphurea* veliko manj kot CHD.

5.5.3.4 Metiltransferaza ChdMII

Za določitev vloge metiltransferaze ChdMII v biosintezi CHD smo se poleg bioinformatske analize odločili izvesti dva eksperimenta:

- 1) inaktivacija metiltransferaze in izolacija novega kelokardinskega analoga
- 2) heterologno izražanje metiltransferaze v producentu drugega tetraciklinskega analoga, npr. OTC ali CTC

Želeli smo preveriti vlogo gena *chdMII*, ki so ga Petković in sod. (2013) v sklopu z drugimi geni za biosintezo CHD klonirali in sekvenirali ter za njegov produkt ChdMII predvideli, da je odgovoren za metilacijo CHD na mestu C9 (Petković in sod., 2013). Zato smo v *S. rimosus* vnesli gen za metiltransferazo ChdMII iz *A. sulphurea*. Poleg produkcije OTC v produksijski kulturi transformant *S. rimosus* nismo opazili nobenih novih spojin. Sklepali smo, da je metiltransferaza najbrž zelo specifična za svoj naravni substrat in ne deluje na kelokardinski intermediat. Tudi Rodriguez in sod. (2004) so pokazali, da je metiltansferazi ChdMII homologna metiltransferaza MtmMII iz mitramicinske genske skupine visoko specifična za svoj naravni substrat in ne deluje na strukturno zelo podobne molekule, kot npr. na druge intermediate iz biosinteze mitramicina ali na sorodne aromatske poliketide (olivomicin, daunorubicin, tetraciklin) (Rodriguez in sod., 2004). Z dodatnimi izboljšavami gojišča se nismo ukvarjali, ker smo sklepali, da mora zadostovati potrebam po kofaktorjih in gradnikih za metilacijo. V biosintezi OTC sta namreč že prisotni metiltransferazi OxyF in OxyT, ki sta tudi, tako kot ChdMII, od SAM odvisni.

Za preverjanje delovanja metiltransferaze ChdMII smo izvedli še en poskus - v *A. sulphurea* smo prekinili gen, ki kodira ChdMII. Z LC-MS analizo smo potrdili našo domnevo, da transformante ne proizvajajo več CHD. V produksijski kulturi transformant pa smo opazili novo spojino z maso, ki je ustrezala novemu kelokardinskemu analogu brez metilne skupine in tudi MS/MS analiza te spojine je pokazala gre za CHD sorodno molekulo. Natančne pozicije manjkajoče metilne skupine na molekuli kelokardinskega analoga nismo mogli določiti, smo pa lahko pokazali, da je do spremembe prišlo na enem od mest C6 ali C9. Tako smo potrdili vlogo pred tem le potencialne metiltransferaze ChdMII v biosintezi CHD.

5.5.3.5 Aminotransferaza ChdN

Tudi gen *chdN* so Petković in sod. (2013) klonirali in sekvenirali v sklopu genske skupine za biosintezo CHD (Petković in sod., 2013). Da bi dokazali C4-transaminazno funkcijo aminotransferaze ChdN v biosintezi CHD smo prekinili gen *chdN* in preverili produkcijo novih kelokardinskih analogov. Transformante, kakor je bilo pričakovano, niso več proizvajale CHD. V produksijski kulturi smo po HRMS analizi opazili spojino z molekulsko formulo, ki ustreza kelokardinskemu analogu brez amino skupine. Trdimo lahko, da gre za odsotnost amino skupine na mestu C4, saj je ta edina v kelokardinski strukturi. Te spojine z LC-MS analizo nismo opazili, najbrž je bila njena vsebnost v

produkcijski kulturi zelo nizka. Poleg te spojine pa smo v produkcijski kulturi po HRMS analizi opazili še dve drugi spojini, ki sta po molekulski formuli sicer podobni CHD brez C4 amino skupine, vendar sta tudi krajišč za en C atom. Morda gre za podoben pojav, ki so ga opazili Perić-Concha in sod. (2005): ob odsotnosti enega od encimov poznih stopenj biosinteze se kvartarna struktura encimskega kompleksa spremeni, zato proizvaja kraješke poliketide (Perić-Concha in sod., 2005). V produkcijski kulturi s HRMS analizo nismo opazili kelokardinskega analoga, ki bi imel na mestu C4 namesto amino skupine keto skupino. Predvidevali smo namreč, da je ta spojina substrat za aminotransferazo ChdN, analogno kakor poteka transaminacija z OxyQ v biosintezi OTC. Substrat za aminotransferazo OxyQ je namreč 4-keto-ATC, ki ga pretvori v 4-amino-ATC. 4-keto-ATC v *in vivo* pogojih hitro razpade (Pickens in Tang, 2010), kar verjetno velja tudi za 4-keto intermediat v primeru biosinteze CHD, zaradi česar ga nismo mogli zaznati v izvlečkih kulture *A. sulphurea* s prekinjenim genom *chdN*.

5.5.4 Nenavadni geni, ki ne spadajo v biosintezo CHD

Med kloniranjem in sekveniranjem genske skupine za biosintezo CHD so Petković in sod. (2013) odkrili tudi gen za glikoziltransferazo ChdGIV (Petković in sod., 2013). Glede na to, da molekula CHD ne vsebuje glikozidnih enot, se ta gen morda ne izraža ali pa encim nima ustreznih gradnikov za glikozilacijo. Zato smo izvedli poskus, v katerem smo v *A. sulphurea* vnesli še eno kopijo gena *chdGIV*, tokrat na integrativnem vektorju pod vplivom promotorja *PactI*. Na ta način smo žeeli zagotoviti pravilno regulacijo izražanja izbranega gena. Ker po preverjanju produkcijske kulture transformant *A. sulphurea* nismo opazili nobenih novih spojin, smo izvedli še poskus z dodatki različnih sladkorjev v gojišče. Niti ta poskus ni privadel do novih glikoziliranih kelokardinskih analogov. Navadno najdemo v genskih skupinah za biosintezo glikoziliranih poliketidov tudi gene, ki kodirajo biosintezo nenavadnih sladkorjev. Glede na to, da tovrstnih genov v genski skupini za CHD ni, in da je bil gen *chdGIV* edini od genov, vpletenih v glikozilacijo, ki se je verjetno prenesel s horizontalnim prenosom iz drugega mikroorganizma, je to tehten razlog za odsotnost glikoziliranih kelokardinskih analogov. Možno pa je tudi, da molekula CHD oziroma intermediati v biosintezi CHD ne predstavljajo pravega substrata za glikoziltransferazo ChdGIV, katere gen je v gensko skupino za biosintezo CHD verjetno prišel v sev *A. sulphurea*, glede na bioinformatsko analizo, preko horizontalnega prenosa iz genske skupine, odgovorne za biosintezo mitramicinu podobne molekule, kar je bolj podrobno kasneje opisano v podpoglavlju 5.7.

5.6 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST NOVIH KELOKARDINSKIH ANALOGOV

Z uporabo znanj, ki smo jih pridobili skozi proučevanje biosinteze tetraciklinov, smo uspeli proizvesti nove kelokardinske analoge. Nekatere od njih smo tudi izolirali in testirali njihovo protimikrobnou aktivnost. Za konstrukcijo novih kelokardinskih analogov smo uporabili dva različna pristopa: heterologno izražanje genov poznih stopenj iz genskih skupin za biosintezo drugih tetraciklinov (opisano v podpoglavlju 4.6) in inaktivacija genov poznih stopenj biosinteze CHD (opisano v podpoglavlju 4.9).

S testiranjem protimikrobne aktivnosti CHD smo ugotovili, da ima v primerjavi z OTC CHD višjo aktivnost proti *E. coli* (po Gramu negativna bakterija), medtem ko ima proti *B. subtilis* (po Gramu pozitivna bakterija) nižjo aktivnost. To je skladno z ugotovitvami Proctorja in sod. (1978), ki so pokazali, da je CHD v primerjavi s klasičnimi tetraciklini bolj aktivven proti po Gramu negativnim bacilom, vendar manj aktivven proti po Gramu pozitivnim kokom (Proctor in sod., 1978). Morda je razlog za boljšo aktivnost CHD v njegovi lipofilni naravi (posledica planarne strukture), zaradi česar lažje prehaja skozi zunanjo membrano po Gramu pozitivnih bakterij kot bolj polaren OTC. Potrdili smo tudi navedbe Olive in Chopre (1992), ki sta ugotovila, da so sevi *E. coli*, ki vsebujejo različne gene za odpornost proti tetraciklinom, občutljivi za CHD. Struktura CHD se namreč toliko razlikuje od struktur klasičnih tetraciklinov, da lahko verjetno zaobide mehanizme črpanja iz celice in ribosomske zaščite, kar kodirajo geni za odpornost.

CDCHD je v primerjavi s CHD pokazal boljšo aktivnost tako proti *E. coli* kot proti *B. subtilis*, vendar je bila njegova aktivnost proti slednjemu še vedno nižja od aktivnosti OTC. Pri tetraciklinih velja, da je karboksiamido skupina na mestu C2 vpletena v vezavo na ribosom in posledično protibakterijsko aktivnost (Nelson, 1998). Z zamenjavo acetilne skupine na mestu C2 s karboksiamido skupino v primeru CDCHD smo pokazali, da karboksiamido skupina bistveno poveča biološko aktivnost kelokardinske molekule proti različnim kliničnim izolatom. To je v skladu s povezavo med strukturo in aktivnostjo, ki jo najdemo pri klasičnih tetraciklinskih antibiotikih, kjer kažejo tetraciklini z acetatno začetno enoto (nečistoče v biostinezni OTC) močno znižanje protibakterijske aktivnosti (Wang in sod., 2011b). Vgradnja malonamatne začetne enote v biosintezi CDCHD je privedla celo do delovanja proti multirezistentnim izolatom *P. aeruginosa*, proti katerim CHD ni kazal skoraj nobene aktivnosti. Ta rezultat kaže na potencial CDCHD kot osnove za nadaljnjo strukturno derivatizacijo in izboljšanje aktivnosti proti pomembnim patogenom kot so sevi MRSA in *P. aeruginosa*.

Testirali smo tudi delovanje drugega kelokardinskega analoga, ki smo ga lahko izolirali, DMCHD. Aktivnost tega kelokardinskega analoga je bila tako proti *E. coli* kot proti *B. subtilis* veliko nižja od aktivnosti CHD. Iz tega poskusa lahko sklepamo, da metilna

skupina v strukturi CHD veliko pripomore k njegovi protimikrobnii aktivnosti. S kemijsko modifikacijo tetraciklinov na mestih C5 do C9 lahko vplivamo na njihovo antibiotisko aktivnost (Nelson in Levy, 2011), kar smo posredno pokazali tudi mi z zmanjšanjem aktivnosti kelokardinskega analoga po inaktivaciji gena za C9-metiltransferazo. Metilna skupina na mestu C9 CHD morda pomembno vpliva na njegovo protimikrobnii aktivnost, saj podaljša planarni del molekule (obroči DCB), če ga primerjamo z ostalimi anhidrotetraciklini, in zaradi tega morda močneje interferira s citoplazemsko membrano kot kelokardinski analog brez metilne skupine na C9.

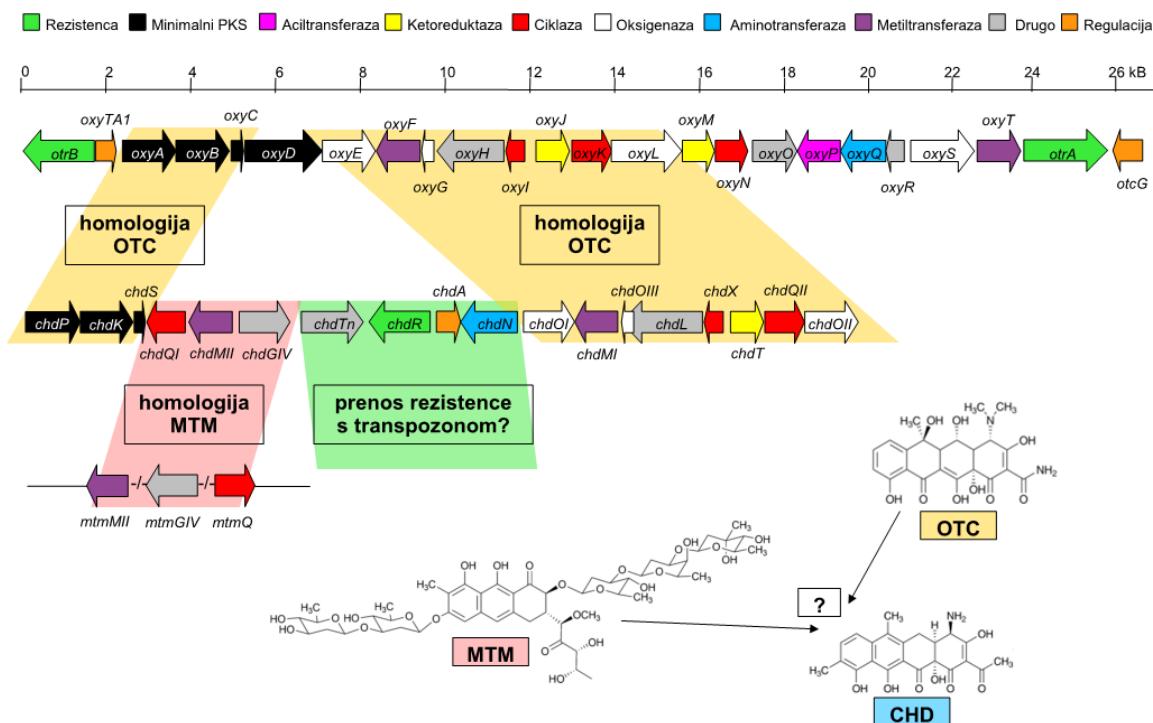
Ne CHD ne kelokardinska analoga niso pokazali aktivnosti proti glivam. Takšen rezultat smo predvideli, kljub temu pa smo že leli preveriti tudi protiglivno aktivnost. Pri CMT analogih so namreč opazili, da so z modifikacijami, ki so izničile protibakterijsko aktivnost, uvedli protiglivno aktivnost (Liu in sod., 2002). Čeprav CHD in njegovi analogi zelo verjetno delujejo preko interakcije z bakterijsko membrano, se ta v strukturi zelo razlikuje od celičnih membran pri glivah, kar je verjetno vzrok odsotnosti aktivnosti proti glivam.

5.7 ARHITEKTURA GENSKE SKUPINE ZA BIOSINTEZO CHD

Poleg preučevanja poznih stopenj v biosintezi tetraciklinskih antibiotikov smo se v sklopu te študije veliko ukvarjali tudi s celotnim potekom biosinteze tetraciklinskih antibiotikov oziroma aromatskih poliketidov in s primerjavo homolognih genov tetraciklinskih genskih skupin.

Prišli smo do zanimivih predvidevanj, da je genska skupina za biosintezo CHD nekakšen hibrid med gensko skupino za biosintezo OTC in gensko skupino za biosintezo mitramicina, kar se odraža tudi v strukturi CHD. Najbližje homologe večine genov za biosintezo CHD predstavljajo geni iz oksitetraciklinske genske skupine: geni minimalnega PKS, geni za ketoreduktazo, aromatazi in ciklazo ter večina genov poznih stopenj biosinteze (geni za oksigenaze in C6 metiltransferazo) (Petković in sod., 2013). Ti geni so odgovorni za biosintezo osnovnega ogrodja, ki zelo spominja na klasične tetracikline, do razlik pa pride zaradi odsotnosti genov, ki so odgovorni za vgradnjo začetne enote (gena za amidotranferazo in aciltransferazo), in dolčenih manjkajočih oziroma drugačnih genov poznih stopenj biosinteze (za C6/C5 oksigenazo, C4 aminotranferazo in *N,N*-dimetiltransferazo). Regija, ki je homologna genski skupini za biosintezo mitramicina pa vsebuje gene za aromatazo, C9 metiltransferazo in glikoziltransferazo. Predvidevamo, da se je skozi proces horizontalnega prenosa iz neke genske skupine, podobne mitramicinski genski skupini, prenesel le en od genov, ki sodelujejo v biosintezi glikozidnih enot in glikozilaciji osnovne molekule, saj molekula CHD ne vsebuje glikozidnih enot. Najbolj

očitna podobnost med CHD in mitramicinom je torej metilna skupina na atomu C9 in aromatizacija zadnjih dveh obročev. Genska skupina za biosintezo CHD vsebuje še eno regijo, znotraj katere najdemo homologijo s filogenetsko tudi zelo oddaljenimi geni (iz proteobakterij). Glede na to, da ta regija vsebuje gen za transpozazo in membransko črpalko, je v tem primeru morda šlo za horizontalni prenos rezistence s transpozonom, ob tem pa se je prenesel še gen za aminotransferazo, ki je odgovorna za dodatek amino skupine na molekulo CHD v obratni stereokemiji kot pri klasičnih tetraciklinih (Slika 47).



Slika 47: Prikaz aminokislinske homologije genske skupine za CHD (*chd*) z genskima skupinama za biosintezo OTC (*oxy*) in mitramicina (*mtm*) (PubChem..., 2013; Pickens in Tang, 2010; Petković in sod., 2013)

Figure 47: Aminoacid homology of CHD biosynthetic gene cluster (*chd*) with OTC (*oxy*) and mithramycin (*mtm*) biosynthetic gene cluster (PubChem..., 2013; Pickens and Tang, 2010; Petković et al, 2013)

5.8 NADALJNJI RAZVOJ TETRACIKLINSKIH ANALOGOV NA OSNOVI KELOKARDINSKE MATRICE

V sklopu raziskav te doktorske naloge smo postavili novo platformo in razvili učinkovita orodja za produkcijo novih kelokardinskih oziroma tetraciklinskih matric, katere lahko naknadno preoblikujemo s heterologno izraženimi encimi. Na ta način lahko oblikujemo nove spojine in preučujemo vlogo encimov iz različnih genskih skupin za biosintezo poliketidov. Pomembno je poudariti, da smo s to platformo omogočili oblikovanje popolnoma nove matrice, ki do sedaj niso bile dostopne. Nove strukture pa so izjemno

atraktivne matrice za nadaljnji razvoj tetraciklinskih analogov s pomočjo polsintezne kemije. Privlačnost kelokardinskega sistema je tudi zelo visok donos osnovne molekule (CHD) v divjem tipu *A. sulphurea*, ki dosega vrednosti do 1 g / l. V sklopu projekta Acies Bio nam je uspelo razviti zelo obetajočo platformo za pripravo novih spojin s poudarkom na protimikrobnih učinkovinah, kar sedaj omogoča Acies Bio zelo učinkovito produkcijo velikega števila popolnoma novih tetraciklinskih matric, zelo obetavnih struktur v razvoju novih biološko aktivnih učinkovin v programih razvoja novih antibiotikov v sklopu komercialnih projektov Acies Bio.

6 SKLEPI

V sklopu te doktorske naloge smo uspeli:

- 1) Razvili smo učinkovita orodja za gensko manipulacijo *A. sulphurea*, producenta nenavadnega tetraciklina CHD, kar sodeč po literaturi ni uspelo še nobeni raziskovalni skupini. Posledica tega je bila, da smo lahko v *A. sulphurea* heterologno izrazili gene, udeležene v biosintezi klasičnih tetraciklinov, OTC in CTC.
- 2) Uspešno smo inaktivirali gene minimalnega PKS in gena za C9 metiltransferazo in C4 aminotransferazo iz genske skupine za biosintezo CHD, s čimer smo potrdili pomen teh genov v biosintezi CHD.
- 3) S heterolognim izražanjem in prekinivami tako genov poznih stopenj biosinteze kot tudi ostalih biosinteznih genov smo oblikovali štiri nove kelokardinske analoge, ki predstavljajo zanimive matrice za oblikovanje novih tetraciklinskih antibiotikov.
- 4) Nekatere od kelokardinskih analogov so transformante *A. sulphurea* proizvajale v nižjih koncentracijah, ker so verjetno določeni heterologni encimi razmeroma specifični za svoj naraven substrat.
- 5) Tiste kelokardinske analoge, ki so jih transformante *A. sulphurea* proizvedle v višjih koncentracijah (primerljive s proizvodnjo CHD), pa smo izolirali in določili njihovo protimikrobnno delovanje, strukturo CDCHD pa celo potrdili z metodo NMR.
- 6) Kelokardinski analog s karboksiamido začetno enoto je pokazal izjemno povečanje aktivnosti proti različnim kliničnim izolatom, tako po Gramu pozitivnim kot negativnim kliničnim izolatom. Uspelo pa nam ni heterologno izraziti enega od genov poznih stopenj iz kelokardinske genske skupine v *S. rimosus*, verjetno spet zaradi visoke specifičnosti encima.
- 7) Poleg vsega pa smo še dodatno prispevali k razumevanju biosinteze tetraciklinov - tako poznih stopenj kot tudi osnovne začetne stopnje biosinteze poliketidne verige in izbire nenavadne začetne enote.
- 8) Med časom izvedbe eksperimentov v obsegu te doktorske naloge so tudi druge znanstvene skupine objavile kar nekaj zanimivih rezultatov in razlag biosinteze

OTC in CTC. Očitno je področje tetraciklinskih antibiotikov še vedno zanimivo za raziskovanje, saj je veliko vprašanj še nepojasnjениh in veliko poti odprtih. Tetraciklini niso zanimivi le zaradi možnosti oblikovanja novih antibiotikov, ki bi zaobšli vse bolj zaskrbljujoč pojav rezistenc med patogenimi bakterijami, ampak tudi zaradi svojih drugih terapevtskih učinkov, ki vključujejo protivnetne, imunosupresivne, nevroprotektivne, antiapoptotične in antiangiogene, inhibicijo lipazne in kolagenazne aktivnosti, povečano celjenje ran in inhibicijo metastaze.

- 9) S to doktorsko nalogo smo odgovorili na nekaj vprašanj o biosintezi tetraciklinov, hkrati pa postavili številna nova, katera bomo skušali pojasniti z nadaljnji poskusi. Poleg tega bi želeli izolirati tudi ostale kelokardinske analoge, ki smo jih oblikovali, da bi lahko določili njihovo molekulsko strukturo. Zelo zanimivo in še posebej koristno bi bilo preveriti ne-protimikrobne učinke CHD in kelokardinskih analogov. Včasih se za nove analoge antibiotikov izkaže, da so izgubili protimikrobno aktivnost, pridobili pa so druge, za današnji čas vedno bolj zanimive ne-antibiotične učinke.

6.1 POTRDITEV OZIROMA ZAVRNITEV HIPOTEZ

Glede na postavljene hipoteze nam je uspelo:

- a) Razvili smo učinkovit sistem za gensko manipulacijo *A. sulphurea*, ki vključuje uporabo integrativnega vektorja pAB03 za vnos in heterologno izražanje genov ter uporabo replikativnega vektorja pNV18, ki se slabo replicira v sevu *A. sulphurea*, in ga uspešno uporabili za prekinjanje genov ob uporabi transformacije micelija za vnos DNA v celico.
- b) Z uporabo poročevalskega sistema, ki temelji na genu za kalkon sintazo, smo identificirali dva promotorja, ki delujeta v sevu *A. sulphurea*: promotor *PactI* kot močnejši in *PermE** kot šibkejši promotor.
- c) V *A. sulphurea* smo uspešno izrazili dva od treh izbranih heterolognih genov, vpletenih v zaključne stopnje biosinteze tetraciklinskih antibiotikov: gen za oksigenazo OxyS iz genske skupine za biosintezo OTC in gen za halogenazo Chl iz genske skupine za biosintezo CTC - v produkcijski brozgi smo opazili nova kelokardinska analoga. Izražanje gena za metiltransferazo OxyT iz genske skupine za biosintezo OTC ni bilo uspešno, saj v tem primeru v produkcijski kulturi nismo zaznali nobenega novega kelokardinskega analoga.
- d) V heterolognem gostitelju *S. rimosus*, ki proizvaja OTC, nam ni uspelo izraziti gena za

metiltransferazo ChdMII iz genske skupine za biosintezo CHD - v produkcijski kulturi nismo zaznali nobenega novega oksitetraciklinskega analoga.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Tetraciklini so aromatski poliketidi, sestavljeni iz štirih linearne povezanih obročev iz šestih ogljikovih atomov, na to strukturo pa so pripete različne funkcionalne skupine. Terapevtska uporaba tetraciklinov kot široko spektralnih antibiotikov z malo stranskimi učinki se je začela že v 50-ih letih prejšnjega stoletja, v zadnjih desetletjih pa pridobivajo pomen tudi v zdravljenju neinfektivnih bolezni, kot so rakava obolenja, avtoimune bolezni, srčno-žilne bolezni, nevrodegenerativna obolenja, itd. Zaradi pojava bakterijskih rezistenc proti naravnim tetraciklinom so razvili prve polsinteze tetraciklinske analoge - tetracikline druge generacije, kamor spada minociklin in doksiciklin ter kasneje še tetracikline tretje generacije - glicilcikline, kamor spada tigeciklin. Klasični tetraciklini, kot sta klortetraciklin in oksitetraciklin, delujejo bakteriostatično: vežejo se na 30S podenoto ribosoma in inhibirajo proteinsko sintezo. Nasprotno pa nenavadni tetraciklini, kamor spada kelokardin (CHD), zaradi lipofilne narave, ki je posledica njihove razmeroma planarne strukture, delujejo bakteriolitično preko interakcije s citoplazemsko membrano. Nenavadni tetraciklini so učinkoviti proti bakterijskim sevom, ki so odporni proti klasičnim tetraciklinom, kar jim daje velik potencial v boju proti vse bolj odpornim patogenom. Biosinteza tetraciklinov poteka s polketidnimi sintazami (PKS) tipa II, ki katalizirajo iterativno dekarboksilativno kondenzacijo malonil-CoA podaljševalnih enot z malonamilno začetno enoto. Nastala ogljikova veriga zapusti PKS in s pomočjo ketoreduktaz, aromataz ter ciklaz zavzame različne vzorce zapiranja obročev. V zadnjih stopnjah biosinteze lahko t.i. post-PKS encimi oziora encimi poznih stopenj biosintezne poti na tetraciklinsko ogrodje dodajo različne kemijske skupine, kot so npr. hidroksilna, metilna in amino skupina. Predvidevamo, da biosinteza CHD poteka na enak način, le da je začetna enota v tem primeru acetat. CHD proizvaja aktinomiceta *Amycolatopsis sulphurea*, za katero pa vse do sedaj ni bilo razvitih orodij za gensko manipulacijo. V sklopu te doktorske naloge nam je uspelo postaviti metodi za vnos in prekinjanje genov v *A. sulphurea* z uporabo transformacije micelija. Tako smo si odprli vrata v gensko manipulacijo in izkoriščanje genskega potenciala *A. sulphurea*. Z delečijo in kasnejšo komplementacijo genov minimalnega PKS smo potrdili pomen genske skupine za biosintezo CHD. Z uspešnim heterolognim izražanjem genov, udeleženih v biosintezi začetne enote oksitetraciklina, *oxyD* in *oxyP*, v *A. sulphurea*, smo prvič demonstirali učinkovito delovanje s heterolognim minimalnim PKS, ki navadno sprejema acetatne začetne enote, kar do sedaj še ni bilo opisano v literaturi. Tako smo uspeli razviti nov CHD analog s karboksiamidno začetno enoto (CDCHD), ga izolirali, njegovo strukturo potrdili z analizo NMR in testirali protimikrobnno delovanje. V skladu s pomenom karboksiamido skupine za protimikrobnou aktivnost tetraciklinov se je tudi za CDCHD izkazalo, da je

njegova aktivnost bistveno višja od aktivnosti CHD. Bistveno pa se poveča tudi spekter delovanja. V *A. sulphurea* smo uspešno izrazili dva encima, udeležena v pozne stopnje biosinteze: gen za oksigenazo OxyS, udeleženo v biosintezo oksitetraciklina, in gen za halogenazo Chl, udeleženo v biosintezo klortetraciklina. Rezultat uspešnega heterolognega izražanja je bila biosinteza dveh novih kelokardinskih analogov, oksikelokardina in klorkelokardina. Poleg tega smo v *A. sulphurea* prekinili gen za metiltransferazo *chdMII*, s čimer smo proizvedli še četrti kelokardinski analog - demetylkelokardin, ki smo ga tudi izolirali in preverili njegovo protimikrobnou aktivnost. Izkazalo se je, da ima metilna skupina na mestu C9 pomembno vlogo pri aktivnosti CHD, saj se je aktivnost analoga v primerjavi s CHD bistveno znižala. Dosegli smo poglaviten namen doktorske naloge - poglobili smo razumevanje biosinteznih poti tetraciklinskih antibiotikov, še posebej delovanje poznih oziroma post-PKS encimov. CHD predstavlja privlačno matrico s številnimi možnostmi za modifikacijo in ravno poglobljeno razumevanje biosinteznih poti predstavlja pomemben doprinos k razvoju novih tetraciklinskih molekul s pomočjo biosinteznega inženiringa in nadaljnji kemijskimi modifikacijami. Dodaten pomen te doktorske naloge pa prinašajo izolirani kelokardinski analogi, katerih protimikrobnou delovanje smo tudi ovrednotili. Razvoj platforme za biosintezo kelokardinskih analogov bo omogočil v nadaljevanju tudi razvoj zelo atraktivnih molekul vodnic, ki bodo verjetno vodile v prve stopnje predkliničnih testiranj v nadaljevanju projekta v sklopu programa, ki poteka v Acies Bio.

7.2 SUMMARY

Tetracyclines are aromatic polyketides, composed of four linearly fused six-membered carbon rings, to which a variety of functional moieties are attached. The therapeutic use of tetracycline as broad spectrum antibiotic with a few side effects began in the 50s of last century, however in recent decades they also gained importance in the treatment of non-infectious diseases, such as cancer, autoimmune disorders, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, etc. Due to the emergence of bacterial resistance to natural tetracyclines first semi-synthetic tetracycline analogues have been developed: the second generation tetracyclines, which include minocycline and doxycycline, and later the third generation tetracyclines – glycylcyclines, including tigecycline. Classical tetracyclines, such as chlortetracycline and oxytetracycline, are bacteriostatic: they bind to the 30S subunit of the ribosome and inhibit protein synthesis. In contrast, for atypical tetracyclines, including chelocardin (CHD), it is thought they act bacteriolytic through the interaction with the cytoplasmic membrane due to their lipophilic nature, which is the result of relatively planar structure. Atypical tetracyclines are effective against bacterial strains that are resistant to classical tetracyclines, giving them a great potential in fighting pathogens, which are becoming more and more resistant. Tetracycline biosynthesis is carried out by

type II polyketide synthases (PKS), which catalyze the iterative decarboxylative condensation of malonyl-CoA extender units with malonamyl starter unit. The resulting nascent carbon chain can form different patterns of rings cyclisation, catalysed by C9 ketoreductases, aromatases and cyclases. Enzymes, which are involved in the late stages of biosynthesis, i.e. post-PKS enzymes, may add a variety of functional groups, such as hydroxyl, methyl and amino group, to the basic tetracycline skeleton. We assume that the biosynthesis of a potent antibacterial agent, CHD, takes place in the same way, except that the starter unit in this case is acetate. CHD is produced by an actinomycete *Amycolatopsis sulphurea*, for which until now no tools for genetic manipulation have been developed. Within the scope of this doctoral dissertation a method for introduction and inactivation of genes in *A. sulphurea*, using the transformation of mycelium, has been set up. With the deletion and subsequent complementation of minimal PKS genes it has been confirmed that we really cloned a gene cluster for the biosynthesis of CHD. By successful heterologous expression of genes, involved in the biosynthesis of the starter unit and in the initiation of biosynthesis of oxytetracycline from *Streptomyces rimosus*, *oxyD* and *oxyP*, in *A. sulphurea*, we have demonstrated for the first time the efficient cooperation with a heterologous minimal PKS, which usually accepts acetate starter units, which has not yet been described in the literature. This way a new CHD analogue with a carboxamido starter unit (CDCHD) has been developed. The analogue has been isolated, its structure confirmed by NMR analysis, and tested for antimicrobial activity. In accordance with the importance of the carboxamido group for the antimicrobial activity of tetracyclines, it has been shown also for CDCHD that its activity is significantly higher than the activity of CHD. Moreover, the activity spectrum has also increased. Further, we successfully expressed two heterologous genes, involved in the late stages of biosynthesis; a gene encoding oxygenase OxyS, involved in the biosynthesis of oxytetracycline, and a gene for halogenase Chl, involved in the biosynthesis of chlortetracycline, from *Streptomyces rimosus* and *Streptomyces aureofaciens*, respectively. The result of the successful heterologous expression was the biosynthesis of two new CHD analogues, oxychelocardin and chlorchelocardin. In addition, we inactivated the *chdMII* gene for methyltransferase in *A. sulphurea*, which has led to the generation of a fourth CHD analogue – demethylchelocardin, which has also been isolated and evaluated for its antimicrobial activity. It has turned out that the methyl group at the C9 position has an important role in the CHD activity, since the activity of the analogue decreased significantly when compared to CHD. We have thus contributed to the understanding of biosynthetic pathways of tetracycline antibiotics, especially the biosynthetic pathways related to the late stage or post-PKS enzymes. CHD represents an attractive backbone, with many options for its modification, therefore in-depth understanding of the biosynthetic pathway represents an important contribution to the development of new tetracycline molecules using biosynthetic engineering approaches and potentially extending with further chemical modifications. An additional significance of this doctoral dissertation has been achieved by isolation of CHD analogues, whose antimicrobial activity has also been evaluated. The

development of the platform for the biosynthesis of CHD analogues will hereinafter enable also the development of very attractive lead structures, which will likely lead to the first phase of preclinical trials in the continuation of the project within the program, taking place in Acies Bio.

8 VIRI

- Alduina R., Gallo G. 2012. Artificial chromosomes to explore and to exploit biosynthetic capabilities of actinomycetes. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012: 462049, 1-10
doi: 10.1155/2012/462049
- Baltz R.H. 2007. Antimicrobials from Actinomycetes: back to the future. *Microbe*, 2, 3: 125-131
- Behal V., Jechova V., Vanek Z., Hostalek Z. 1997. Alternate pathways of malonylCoA formation in *Streptomyces aureofaciens*. *Phytochemistry*, 16, 3: 347–350
- Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58, 1: 1-26
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2012. Volume 5: The Actinobacteria. 2nd ed. Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.-i., Parte A. (eds.). New York, Springer: 1750 str.
- Bernstein E., Chu D.T., Huckin S.N. 1978. 12A-Deoxy chelocardin. US patent US4104306: 3 str.
- 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
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., Schoner B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116, 1: 43-49
- Binnie C., Warren M., Butler M.J. 1989. Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 171, 2: 887-895
- Bisang C., Long P.F., Cortes J., Westcott J., Crosby J., Matharu A.L., Cox R.J., Simpson T.J., Staunton J., Leadlay P.F. 1999. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, 401, 6752: 502-505
- Blanco G., Fernandez E., Fernandez M.J., Brana A.F., Weissbach U., Kunzel E., Rohr J.,

- Mendez C., Salas J.A. 2000. Characterization of two glycosyltransferases involved in early glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor polyketide mithramycin by *Streptomyces argillaceus*. *Molecular & General Genetics*, 262, 6: 991-1000
- Brakhage A.A. 2004. Molecular biotechnology of fungal beta-lactam antibiotics and related peptide synthetases. Berlin, Springer: 284 str.
- Brodersen D.E., Clemons W.M., Jr., Carter A.P., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103, 7: 1143-1154
- Burkholder P.R., Giles N.H., Jr. 1947. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *American Journal of Botany*, 34, 6: 345-348
- Butler M.J., Binnie C., Hunter I.S., Sugden D.A., Warren M. 1990. Genetic manipulation of the oxytetracycline biosynthetic pathway genes. *Developments in Industrial Microbiology*, 31: 41–50
- Butler M.J., Friend E.J., Hunter I.S., Kaczmarek F.S., Sugden D.A., Warren M. 1989. Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Molecular & General Genetics*, 215, 2: 231-238
- 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
- Chen X., van Pee K.H. 2008. Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40, 3: 183-193
- Chiba K., Hoshino Y., Ishino K., Kogure T., Mikami Y., Uehara Y., Ishikawa J. 2007. Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60, 1: 45-47
- Chopra I. 1994. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 4: 637-640
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications,

- molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260
- Cortes J., Velasco J., Foster G., Blackaby A.P., Rudd B.A., Wilkinson B. 2002. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology*, 44, 5: 1213-1224
- Dairi T., Nakano T., Aisaka K., Katsumata R., Hasegawa M. 1995. Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 6: 1099-1106
- Dhingra G., Kumari R., Bala S., Majumdar S., Malhotra S., Sharma P., Lal S., Cullum J., Lal R. 2003. Development of cloning vectors and transformation methods for *Amycolatopsis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30, 4: 195-204
- DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I. 2012. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 26 str.
https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11745832910_en_13.pdf
(maj, 2013)
- Farhadieh B. 1977. Stable chelocardin composition. US patent US4025654: 3 str.
- 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
- Fernandez E., Weissbach U., Sanchez Reillo C., Brana A.F., Mendez C., Rohr J., Salas J.A. 1998. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *Journal of Bacteriology*, 180, 18: 4929-4937
- Forloni G., Salmona M., Marcon G., Tagliavini F. 2009. Tetracyclines and prion infectivity. *Infectious Disorders Drug Targets*, 9, 1: 23-30
- Garmaise D.L., Chu D.T., Bernstein E., Inaba M., Stamm J.M. 1979. Synthesis and antibacterial activity of 2'-substituted chelocardin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22, 5: 559-564
- Garrido-Mesa N., Zarzuelo A., Galvez J. 2013. Minocycline: far beyond an antibiotic.

- British Journal of Pharmacology, 169, 2: 337-352
- Gibson K.J., Gilleron M., Constant P., Puzo G., Nigou J., Besra G.S. 2003. Identification of a novel mannose-capped lipoarabinomannan from *Amycolatopsis sulphurea*. The Biochemical Journal, 372, 3: 821-829
- Golub L.M., McNamara T.F., D'Angelo G., Greenwald R.A., Ramamurthy N.S. 1987. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. Journal of Dental Research, 66, 8: 1310-1314
- Golub L.M., Ramamurthy N.S., McNamara T.F., Greenwald R.A., Rifkin B.R. 1991. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 2, 3: 297-321
- Griffin M.O., Fricovsky E., Ceballos G., Villarreal F. 2010. Tetracyclines: a pleitropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 299, 3: C539-C548
- Hatsu M., Sasaki T., Gomi S., Kodama Y., Sezaki M., Inouye S., Kondo S. 1992a. A new tetracycline antibiotic with antitumor activity. II. The structural elucidation of SF2575. The Journal of Antibiotics, 45, 3: 325-330
- Hatsu M., Sasaki T., Watabe H., Miyadoh S., Nagasawa M., Shomura T., Sezaki M., Inouye S., Kondo S. 1992b. A new tetracycline antibiotic with antitumor activity. I. Taxonomy and fermentation of the producing strain, isolation and characterization of SF2575. The Journal of Antibiotics, 45, 3: 320-324
- Herold K., Xu Z., Gollmick F.A., Grafe U., Hertweck C. 2004. Biosynthesis of cervimycin C, an aromatic polyketide antibiotic bearing an unusual dimethylmalonyl moiety. Organic & Biomolecular Chemistry, 2, 17: 2411-2414
- Hertweck C. 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. Angewandte Chemie (International Edition), 48, 26: 4688-4716
- Hertweck C., Luzhetskyy A., Rebets Y., Bechthold A. 2007. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. Natural Product Reports, 24, 1: 162-190
- Hesketh A., Chater K.F. 2003. Evidence from proteomics that some of the enzymes of

actinorhodin biosynthesis have more than one form and may occupy distinctive cellular locations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30, 8: 523-529

Hesketh A., Sun J., Bibb M. 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII*-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 39, 1: 136-144

Hesketh A.R., Chandra G., Shaw A.D., Rowland J.J., Kell D.B., Bibb M.J., Chater K.F. 2002. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 46, 4: 917-932

Hopwood D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* 97, 7: 2465-2498

Hopwood D.A. 2004. Cracking the polyketide code. *PLoS Biology*, 2, 2: e35, 1-4
doi: 10.1371/journal.pbio.0020035

Horinouchi S., Ohnishi Y., Kang D.K. 2001. The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 3: 177-182

Hutchison R.D., Steyn P.S., Van Rensburg S.J. 1973. Viridicatumtoxin, a new mycotoxin from *Penicillium viridicatum* Westling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 24, 3: 507-509

Inaba M., Bernstein E., Garmaise D.L. 1975. Chelocardin derivatives. US patent US3907889: 5 str.

Jenne A., Hartig J.S., Piganeau N., Tauer A., Samarsky D.A., Green M.R., Davies J., Famulok M. 2001. Rapid identification and characterization of hammerhead-ribozyme inhibitors using fluorescence-based technology. *Nature Biotechnology*, 19, 1: 56-61

Kagan R.M., Clarke S. 1994. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310, 2: 417-427

- Kalakoutskii L.V., Agre N.S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*, 40, 2: 469-524
- Kieser T. Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, John Innes Foundation: 613 str.
- Kuhstoss S., Rao R.N. 1991. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage ΦC31. *Journal of Molecular Biology*, 222, 4: 897-908
- Kuscer 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
- Laakel M., Lebrihi A., Khaoua S., Schneider F., Lefebvre G., Germain P. 1994. A link between primary and secondary metabolism: malonyl-CoA formation in *Streptomyces ambofaciens* growing on ammonium ions or valine. *Microbiology*, 140, 6: 1451-1456
- Lal R., Khanna R., Dhingra N., Khanna M., Lal S. 1998. Development of an improved cloning vector and transformation system in *Amycolatopsis mediterranei* (*Nocardia mediterranei*). *The Journal of Antibiotics*, 51, 2: 161-169
- Lal R., Lal S., Grund E., Eichenlaub R. 1991. Construction of a hybrid plasmid capable of replication in *Amycolatopsis mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3: 665-671
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. 2001. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79, 3-4: 399-405
- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P., Ruan J.S. 1986. Two new genera of nocardioform *Actinomycetes*: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 1: 29-37
- Lefevre F., Robe P., Jarrin C., Ginolhac A., Zago C., Auriol D., Vogel T.M., Simonet P., Nalin R. 2008. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. *Research in Microbiology*, 159, 3: 153-161
- Leskiw B.K., Mah R., Lawlor E.J., Chater K.F. 1993. Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 175, 7: 1995-2005

Lešnik U. 2009. Kloniranje genov za biosintezo tetraciklinov iz izbranih bakterij redu *Actinomycetales*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 194 str.

Liu Y., Ryan M.E., Lee H.M., Simon S., Tortora G., Lauzon C., Leung M.K., Golub L.M. 2002. A chemically modified tetracycline (CMT-3) is a new antifungal agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 5: 1447-1454

Lozano M.J., Remsing L.L., Quiros L.M., Brana A.F., Fernandez E., Sanchez C., Mendez C., Rohr J., Salas J.A. 2000. Characterization of two polyketide methyltransferases involved in the biosynthesis of the antitumor drug mithramycin by *Streptomyces argillaceus*. *Journal of Chemical Biology*, 275, 5: 3065-3074

Lukežič T., Lešnik U., Podgoršek A., Horvat J., Polak T., Šala M., Jenko B., Raspor P., Herron P.R., Hunter I.S., Petković H. 2013. Identification of the chelocardin biosynthetic gene cluster from *Amycolatopsis sulphurea*: a platform for producing novel tetracycline antibiotics. *Microbiology*, 159, 12: 2524-2532

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

Madon J., Hutter R. 1991. Transformation system for *Amycolatopsis (Nocardia) mediterranei*: direct transformation of mycelium with plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*, 173, 20: 6325-6331

Magdevska V. 2011. *Streptomyces rimosus* as a potential host for heterologous protein expression. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 150 str.

Magdevska V., Gaber R., Goranović D., Kuščer E., Boakes S., Duran Alonso M.B., Santamaria R.I., Raspor P., Leadlay P.F., Fujs Š., Petković H. 2010. Robust reporter system based on chalcone synthase *rppA* gene from *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 2: 111-119

Malhotra S., Lal R. 2007. The genus *Amycolatopsis*: Indigenous plasmids, cloning vectors and gene transfer systems. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 1: 3-14

Martin J.L., McMillan F.M. 2002. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-

- dependent methyltransferase fold. Current Opinion in Structural Biology, 12, 6: 783-793
- Mason J.R., Cammack R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annual Review of Microbiology, 46: 277-305
- Matsushima P., McHenney M.A., Baltz R.H. 1987. Efficient transformation of *Amycolatopsis orientalis* (*Nocardia orientalis*) protoplasts by *Streptomyces* plasmids. Journal of Bacteriology, 169, 5: 2298-2300
- McCormick J.R., Jensen E.R. 1965. Biosynthesis of the tetracyclines. VIII. Characterization of 4-hydroxy-6-methylpretetramid. Journal of the American Chemical Society, 87: 1794-1795
- McCormick J.R., Jensen E.R. 1968. Biosynthesis of tetracyclines. X. Protetrone. Journal of the American Chemical Society, 90, 25: 7126-7127
- McCormick J.R., Jensen E.R. 1969. Biosynthesis of the tetracyclines. XII. Anhydrodemethylchlortetracycline from a mutant of *Streptomyces aureofaciens*. Journal of the American Chemical Society, 91, 1: 206
- McCormick J.R., Jensen E.R., Arnold N., Corey H.S., Joachim U.H., Johnson S., Miller P.A., Sjolander N.O. 1968a. Biosynthesis of tetracyclines. XI. The methylanthrone analog of protetrone. Journal of the American Chemical Society, 90, 25: 7127-7129
- McCormick J.R., Jensen E.R., Johnson S., Sjolander N.O. 1968b. Biosynthesis of the tetracyclines. IX. 4-Aminodimethylaminoanhydrodemethylchlortetracycline from a mutant of *Streptomyces aureofaciens*. Journal of the American Chemical Society, 90, 8: 2201-2202
- McCormick J.R., Joachim U.H., Jensen E.R., Johnson S., Sjolander N.O. 1965. Biosynthesis of the tetracyclines. VII. 4-hydroxy-6-methylpretetramid, an intermediate accumulated by a blocked mutant of *Streptomyces aureofaciens*. Journal of the American Chemical Society, 87: 1793-1794
- McCormick J.R., Sjolander N.O., Johnson S., Doerschuk A.P. 1959. Biosynthesis of tetracycline's. II. Simple, defined media for growth of *Streptomyces aureofaciens* and elaboration of 7-chlorotetracycline. Journal of Bacteriology, 77, 4: 475-477
- McCormick J.R.D., Fox S.M., Smith L.L., Bitler B.A., Reichenthal J., Origoni V.E., Muller

- W.H., Winterbottom R., Doerschuk A.P. 1957. Studies of the reversible epimerization occurring in the tetracycline family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-*epi*-tetracyclines. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 11: 2849–2858
- McCormick J.R.D., Johnson S., Sjolander N.O. 1963a. Biosynthesis of the tetracyclines. V. Naphthacenic precursors. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 11: 1692–1694
- McCormick J.R.D., Miller P.A., Johnson S., Arnold N., Sjolander N.O. 1962. Biosynthesis of the tetracyclines. IV. Biological rehydration of the 5a,6-anhydrotetracyclines. *Journal of the American Chemical Society*, 84, 15: 3023–3025
- McCormick J.R.D., Reichenthal J., Johnson S., Sjolander N.O. 1963b. Biosynthesis of the tetracyclines. VI. Total synthesis of a naphthacenic precursor: 1,3,10,11,12-pentahydroxynaphthacene-2-carboxamide. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 11: 1694–1695
- Mendez C., Salas J.A. 2001. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnology*, 19, 11: 449-456
- Menendez N., Nur-e-Alam M., Brana A.F., Rohr J., Salas J.A., Mendez C. 2004. Biosynthesis of the antitumor chromomycin A3 in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chemistry & Biology*, 11, 1: 21-32
- Mertz F.P., Yao R.C. 1993. *Amycolatopsis alba* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 4: 715-720
- Miller P.A., McCormick J.R., Doerschuk A.P. 1956. Studies of chlorotetracycline biosynthesis and the preparation of chlorotetracycline-C14. *Science*, 123, 3206: 1030-1031
- Mitscher L.A. 2008. Coevolution: mankind and microbes. *Journal of Natural Products*, 71, 3: 497-509
- Mitscher L.A., Juvarkar J.V., Rosenbrook W., Jr., Andres W.W., Schenk J., Egan R.S. 1970. Structure of chelocardin, a novel tetracycline antibiotic. *Journal of the American Chemical Society*, 92, 20: 6070-6071

Mitscher L.A., Swayze J.K., Hogberg T., Khanna I., Rao G.S., Theriault R.J., Kohl W., Hanson C., Egan R. 1983. Biosynthesis of cetocycline. *The Journal of Antibiotics*, 36, 10: 1405-1407

Molnar V., Matković Z., Tambić T., Kozma C. 1977. Kliničko-farmakološko ispitivanje kelokardina u bolesnika s infekcijom mokraćnih puta. *Liječnički Vjestnik*, 99: 560-562

Nelson M.L. 1998. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Advances in Dental Research*, 12, 2: 5-11

Nelson M.L., Levy S.B. 2011. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241: 17-32

Nett M., Ikeda H., Moore B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26, 11: 1362-1384

Neumann C.S., Walsh C.T., Kay R.R. 2010. A flavin-dependent halogenase catalyzes the chlorination step in the biosynthesis of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 13: 5798-5803

Oliva B., Chopra I. 1992. Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines: further evidence for division of tetracyclines into two classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 4: 876-878

Oliva B., Gordon G., McNicholas P., Ellestad G., Chopra I. 1992. Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 5: 913-919

Oliver T.J., Sinclair A.C. 1964. Antibiotic M-319. US patent US3155582: 8 str.

Paget M.S., Chamberlin L., Atriñ A., Foster S.J., Buttner M.J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 181, 1: 204-211

Perić-Concha N., Borovička B., Long P.F., Hranueli D., Waterman P.G., Hunter I.S. 2005. Ablation of the *otcC* gene encoding a post-polyketide hydroxylase from the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Streptomyces rimosus* results in novel

- polyketides with altered chain length. *Journal of Chemical Biology*, 280, 45: 37455-37460
- Petković H., Cullum J., Hranueli D., Hunter I.S., Perić-Concha N., Pigac J., Thamchaipenet A., Vujaklija D., Long P.F. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 3: 704-728
- Petković H., Raspor P., Lešnik U. 2013. Genes for biosynthesis of tetracycline compounds and uses thereof. US patent US 8361777 B2: 48 str.
- Petković H., Thamchaipenet A., Zhou L.H., Hranueli D., Raspor P., Waterman P.G., Hunter I.S. 1999. Disruption of an aromatase/cyclase from the oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* results in production of novel polyketides with shorter chain lengths. *Journal of Chemical Biology*, 274, 46: 32829-32834
- Pickens L.B., Kim W., Wang P., Zhou H., Watanabe K., Gomi S., Tang Y. 2009. Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 48: 17677-17689
- Pickens L.B., Tang Y. 2009. Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. *Metabolic Engineering*, 11, 2: 69-75
- Pickens L.B., Tang Y. 2010. Oxytetracycline biosynthesis. *Journal of Chemical Biology*, 285, 36: 27509-27515
- Pigac J., Schrempf H. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomycetes by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 352-356
- Pioletti M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R., Gluhmann M., Avila H., Bashan A., Bartels H., Auerbach T., Jacobi C., Hartsch T., Yonath A., Franceschi F. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, 20, 8: 1829-1839
- Proctor R., Craig W., Kunin C. 1978. Cetocycline, tetracycline analog: in vitro studies of antimicrobial activity, serum binding, lipid solubility, and uptake by bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13, 4: 598-604

Information.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (november, 2013)

Rasmussen B., Noller H.F., Daubresse G., Oliva B., Misulovin Z., Rothstein D.M., Ellestad G.A., Gluzman Y., Tally F.P., Chopra I. 1991. Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 11: 2306-2311

Rhodes P.M., Winskill N., Friend E.J., Warren M. 1981. Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis. *Microbiology*, 124, 2: 329-338

Roberts M.C. 2003. Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 4: 462-467

Rodriguez D., Quiros L.M., Salas J.A. 2004. MtMII-mediated C-methylation during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin is essential for biological activity and DNA-drug interaction. *Journal of Chemical Biology*, 279, 9: 8149-8158

Rodriguez E., Banchio C., Diacovich L., Bibb M.J., Gramajo H. 2001. Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9: 4166-4176

Rogers J., Chang A.H., von Ahsen U., Schroeder R., Davies J. 1996. Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics. *Journal of Molecular Biology*, 259, 5: 916-925

Ryan M.J. 1999. Strain for the production of 6-demethyltetracycline, method for producing the strain and vector for use in the method. US patent US5965429: 60 str.

Ryan M.J., Lotvin J.A., Strathy N., Fantini S.E. 1996. Cloning of the biosynthetic pathway for chlortetracycline and tetracycline formation and cosmids useful therein. US patent US5589385: 41 str.

Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2344 str.

Sapadin A.N., Fleischmajer R. 2006. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54, 2:

258-265

- Sivaraman J., Li Y., Larocque R., Schrag J.D., Cygler M., Matte A. 2001. Crystal structure of histidinol phosphate aminotransferase (HisC) from *Escherichia coli*, and its covalent complex with pyridoxal-5'-phosphate and 1-histidinol phosphate. *Journal of Molecular Biology*, 311, 4: 761-776
- Smokvina T., Mazodier P., Boccard F., Thompson C.J., Guerineau M. 1990. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene*, 94, 1: 53-59
- Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 4: 387-399
- Sriram D., Yogeeshwari P., Senchani G., Banerjee D. 2007. Newer tetracycline derivatives: synthesis, anti-HIV, antimycobacterial activities and inhibition of HIV-1 integrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 8: 2372-2375
- Stackebrandt E., Schumann P. 2006. Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. Vol 3. V: The Prokaryotes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer New York: 297-321
- Stirling D.P., Koochesfahani K.M., Steeves J.D., Tetzlaff W. 2005. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist*, 11, 4: 308-322
- Stirrett K., Denoya C., Westpheling J. 2009. Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the Type II polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 1: 129-137
- Takano E., Nihira T., Hara Y., Jones J.J., Gershater C.J., Yamada Y., Bibb M. 2000. Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Chemical Biology*, 275, 15: 11010-11016
- Tang Y., Lee T.S., Khosla C. 2004a. Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. *PLoS Biology*, 2, 2: e31, 1-12
doi: 10.1371/journal.pbio.0020031

- Tang Y., Koppisch A.T., Khosla C. 2004b. The acyltransferase homologue from the initiation module of the R1128 polyketide synthase is an acyl-ACP thioesterase that edits acetyl primer units. *Biochemistry*, 43, 29: 9546-9555
- te Poele E.M., Habets M.N., Tan G.Y., Ward A.C., Goodfellow M., Bolhuis H., Dijkhuizen L. 2007. Prevalence and distribution of nucleotide sequences typical for pMEA-like accessory genetic elements in the genus *Amycolatopsis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 2: 285-294
- Thaker M., Spanogiannopoulos P., Wright G.D. 2010. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 3: 419-431
- Tiwari K., Gupta R.K. 2012. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 2: 108-132
- Torres Pazmino D.E., Dudek H.M., Fraaije M.W. 2010. Baeyer-Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14, 2: 138-144
- Tymiak A.A., Ax H.A., Bolgar M.S., Kahle A.D., Porubcan M.A., Andersen N.H. 1992. Dactylocyclines, novel tetracycline derivatives produced by a *Dactylosporangium* sp. II. Structure elucidation. *The Journal of Antibiotics*, 45, 12: 1899-1906
- van Pee K.H., Patallo E.P. 2006. Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 6: 631-641
- Wainwright M. 1989. Moulds in ancient and more recent medicine. *Mycologist*, 3, 1: 21-23
- Wang G., Kharel M.K., Pahari P., Rohr J. 2011a. Investigating Mithramycin deoxysugar biosynthesis: enzymatic total synthesis of TDP-D-olivose. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 12, 17: 2568-2571
- Wang L., Vining L.C. 2003. Control of growth, secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 by *jadW(1)*, a member of the *afsA* family of gamma-butyrolactone regulatory genes. *Microbiology*, 149, 8: 1991-2004
- Wang P., Bashiri G., Gao X., Sawaya M.R., Tang Y. 2013. Uncovering the enzymes that catalyze the final steps in oxytetracycline biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 19: 7138-7141

- Wang P., Gao X., Chooi Y.H., Deng Z., Tang Y. 2011b. Genetic characterization of enzymes involved in the priming steps of oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus*. *Microbiology*, 157, 8: 2401-2409
- Wang P., Zhang W., Zhan J., Tang Y. 2009. Identification of OxyE as an ancillary oxygenase during tetracycline biosynthesis. *ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology*, 10, 9: 1544-1550
- Ward J.M., Janssen G.R., Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J. 1986. Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Molecular & General Genetics*, 203, 3: 468-478
- 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
- Zakeri B., Wright G.D. 2008. Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochemistry and Cell Biology*, 86, 2: 124-136
- Zhang L., Demain A.L. 2005. Natural products: drug discovery and therapeutic medicine. Totowa, Humana Press: 382 str.
- Zhang W., Ames B.D., Tsai S.C., Tang Y. 2006. Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4: 2573-2580
- Zhang W., Watanabe K., Cai X., Jung M.E., Tang Y., Zhan J. 2008. Identifying the minimal enzymes required for anhydrotetracycline biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 19: 6068-6069
- Zhang W., Watanabe K., Wang C.C., Tang Y. 2007. Investigation of early tailoring reactions in the oxytetracycline biosynthetic pathway. *Journal of Chemical Biology*, 282, 35: 25717-25725
- Zhao W., Zhong Y., Yuan H., Wang J., Zheng H., Wang Y., Cen X., Xu F., Bai J., Han X., Lu G., Zhu Y., Shao Z., Yan H., Li C., Peng N., Zhang Z., Zhang Y., Lin W., Fan Y., Qin Z., Hu Y., Zhu B., Wang S., Ding X., Zhao G.P. 2010. Complete genome

sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Research*, 20, 10: 1096-1108

Zhu T., Cheng X., Liu Y., Deng Z., You D. 2013. Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens*. *Metabolic Engineering*, 19: 69-78

Xiang L., Kalaitzis J.A., Moore B.S. 2004. EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 44: 15609-15614

ZAHVALA

Rada bi se iskreno zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Hrvoju Petkoviću za ponujeno priložnost sodelovanja na zanimivem projektu, diskusije in podporo. Poleg tega bi se rada zahvalila tudi članom komisije: prof. dr. Dušici Vujakliji in prof. dr. Davidu Stoparju za koristne nasvete in popravke.

V veliko pomoč so mi bili seveda sodelavci iz podjetja Acies Bio: Urška, ki me je vpeljala v delo na projektu; Gregor, Štefan, Enej, Vasilka, Jaka, Branko, Dušan, Blaž, Beno, Petra, Marinka, Helena, Katarina, Katarina, Tadeja, Nina, Tjaša, Krešo, Marko, Mirjan, Peter, Jure, Jernej, Tina, Rok, Andreja,... Hvala za pomoč v laboratoriju, koristne diskusije, zanimive ideje in seveda vse zabavne trenutke.

Ajdi, Martinu in Tomažu bi se rada zahvalila za pomoč pri razumevanju in določanju kemijskih struktur ter na sploh za izčrpne razlage s področja kemije.

Delo je nastalo s pomočjo finančne podpore Javne agencije SPIRIT Slovenija za mlade raziskovalce iz gospodarstva: P-MR-09/104.

Na koncu bi se rada še posebej zahvalila svoji družini za spodbudo, podporo in pomoč. Hvala, Tadej, ker si ves čas verjel vame.

PRILOGE

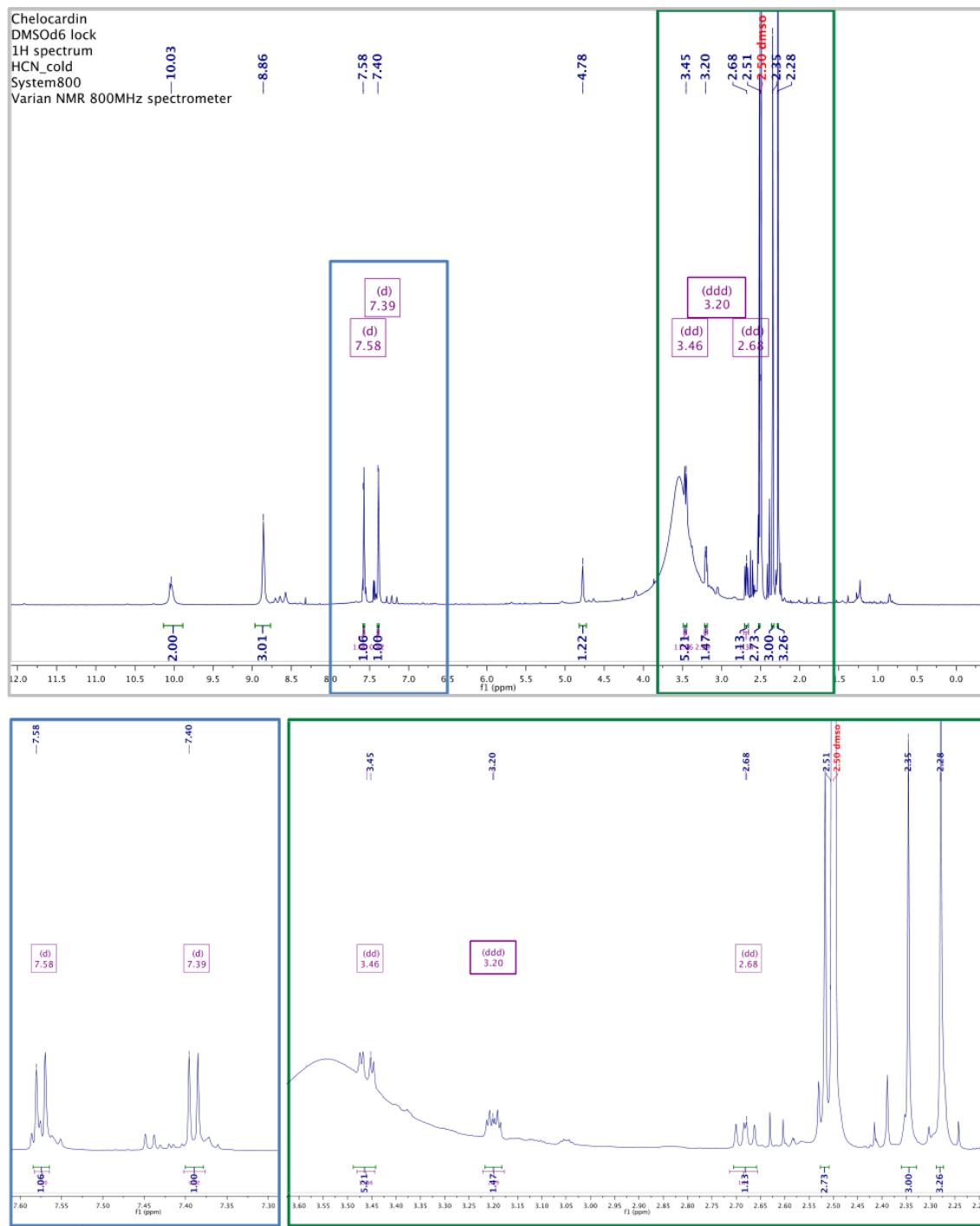
Priloga A: NMR podatki za CHD in CDCHD

Appendix A: NMR data for CHD and CDCHD

CHD
<p>¹H NMR (800 MHz; DMSO-d₆): δ 2.28 (s, 3H, 9-CH₃), 2.35 (s, 3H, 6-CH₃), 2.51 (s, 3H, (CO)CH₃), 2.68 (dd, 1H, 5-H', J_{5-H', 5-H''} = 17.3 Hz, J_{5-H', 4a-H} = 13.1 Hz), 3.20 (ddd, 1H, 4a-H, J_{4a-H, 5-H'} = 13.1 Hz, J_{4a-H, 5-H''} = 5.1 Hz, J_{4a-H, 4-H} = 4.8 Hz), 3.46 (dd, 1H, 5-H'', J_{5-H'', 5-H'} = 17.3 Hz, J_{5-H'', 4a-H} = 5.1 Hz), 4.78 (bs, 1H, 4-H), 7.40 (d, 1H, H(Ar), J_{8-H, 7-H} = 8.5 Hz), 7.58 (d, 1H, H(Ar), J_{7-H, 8-H} = 8.5 Hz), 8.86 (bs, 3H, 4-NH₂, v obliki NH₃⁺), 10.03 (bs, rahlo razdeljen vrh, 2H).</p>
<p>¹³C NMR (76 MHz; DMSO-d₆): δ 14.0, 15.4, 25.0, 26.8, 52.8, 77.6, 108.5, 110.8, 111.4, 114.7, 119.7, 122.1, 129.1, 135.6, 137.1, 154.8, 162.8, 190.1, 192.6, 199.9, 200.0. Vrh, pričakovani okoli 40 ppm, ki ustreza 4a-C, je skrit pod vrhom DMSO-d₆.</p>
CDCHD
<p>¹H NMR (800 MHz; DMSO-d₆): δ 2.28, (s, 3H, 9-CH₃), 2.35 (s, 3H, 6-CH₃), 2.73 (dd, 1H, 5-H', J_{5-H', 5-H''} = 17.3 Hz, J_{5-H', 4a-H} = 12.9 Hz), 3.19 (ddd, 1H, 4a-H, J_{4a-H, 5-H'} = 12.9 Hz, J_{4a-H, 5-H''} = 5.1 Hz, J_{4a-H, 4-H} = 4.9 Hz), 3.42 (dd, 1H, 5-H'', J_{5-H'', 5-H'} = 17.3 Hz, J_{5-H'', 4a-H} = 5.1 Hz), 4.71 (bs, 1H, 4-H), 7.39 (d, 1H, H(Ar), J_{8-H, 7-H} = 8.5 Hz), 7.51 (bs, 1H, OH), 7.57 (d, 1H, H(Ar), J_{7-H, 8-H} = 8.5 Hz), 8.81 (bs, 3H, 4-NH₂ v obliki NH₃⁺), 9.35 (s, 1H, OH), 9.59 (s, 1H, OH), 10.03 (s, 1H, OH).</p>
<p>¹³C NMR (76 MHz; DMSO-d₆): δ 14.0, 15.4, 25.1, 52.1, 77.1, 96.6, 108.4, 111.4, 114.7, 119.6, 122.2, 129.1, 135.5, 137.1, 154.8, 162.8, 172.6, 189.3, 190.5, 199.9. Vrh, pričakovani okoli 40 ppm, ki ustreza 4a-C, je skrit pod vrhom DMSO-d₆.</p>
<p>Opomba: Kemijski premiki (δ) za signale za protone in ogljike so navedeni v ppm-jih z interno referenco na rezidualne protone in ogljik v DMSO-d₆ pri δ 2.50 in 39.51 ppm. Podatki so navedeni v tem vrstnem redu: kemijski premik, multipliciteta (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, širok), površina signala, sklopitvena konstanta v Hz in asignacija. V obeh vzorcih signal vode delno prekrije signal doubletov pri 3,4 ppm.</p> <p>Asignacija vseh signalov v ¹H NMR spektru CHD in CDCHD je bila narejena na podlagi primerjave med našimi izmerjenimi podatki in analognih molekul, N-acetyl-CHD in tetraciklina ter računalniško napovedanih spektrov; niso bili potrjeni z ustreznimi razklopiljenimi eksperimenti.</p>

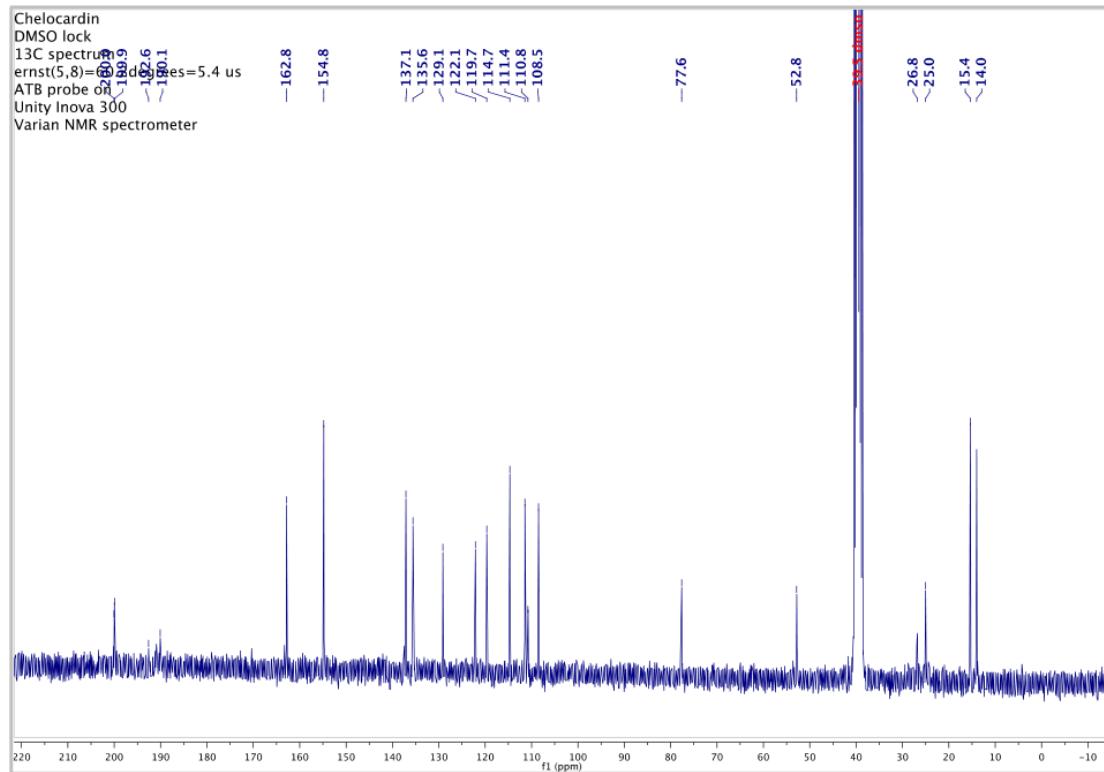
Priloga B: ^1H NMR spekter CHD v DMSO-d₆ pri 800 MHz

Appendix B: ^1H NMR spectrum of CHD in DMSO-d₆ at 800 MHz



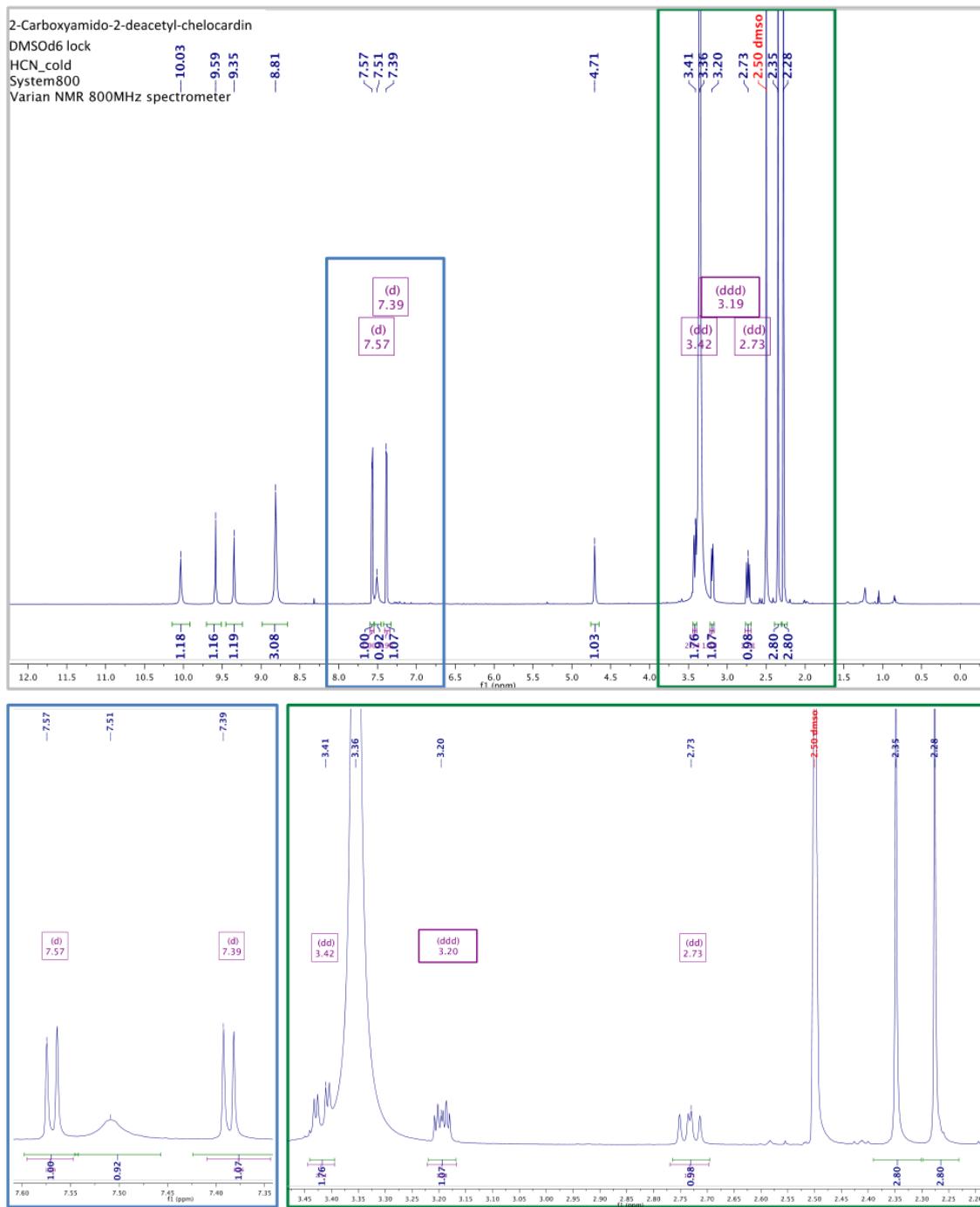
Priloga C: ^{13}C NMR spekter CHD v DMSO-d₆ pri 75 MHz

Appendix C: ^{13}C NMR spectrum of CHD in DMSO-d₆ at 75 MHz



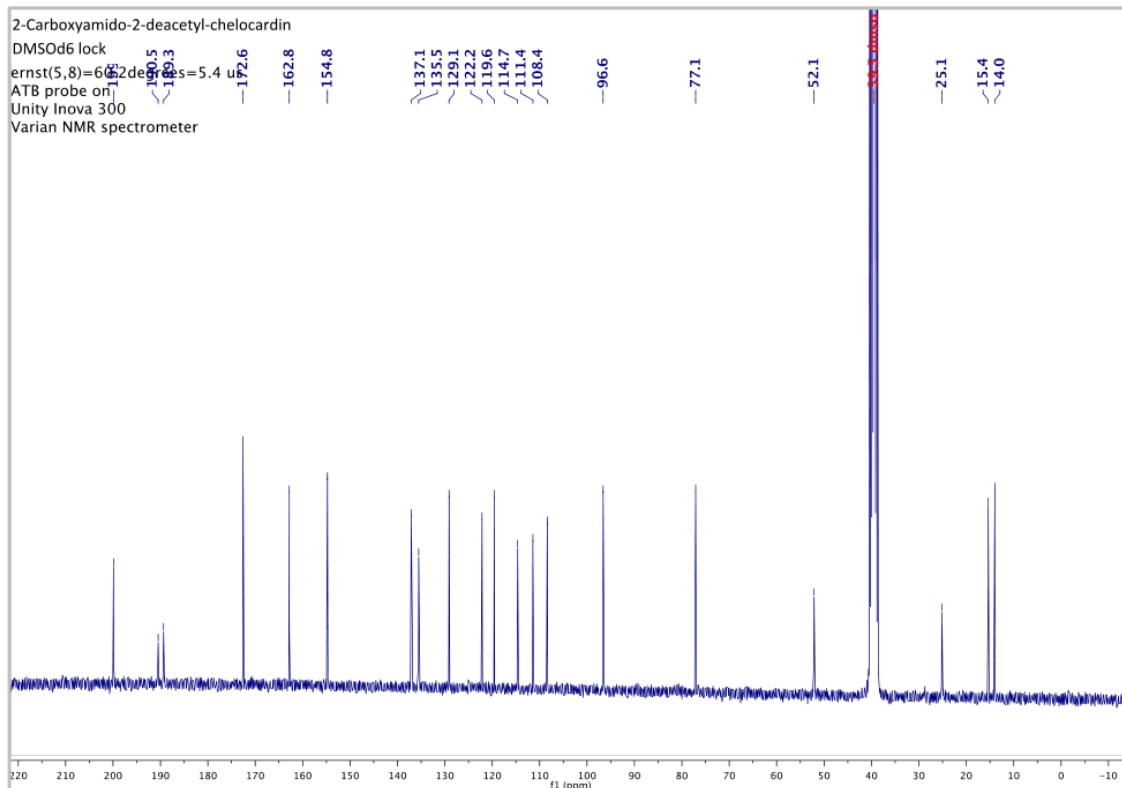
Priloga D: ^1H NMR spekter CDCHD v DMSO-d_6 pri 800 MHz

Appendix D: ^1H NMR spectrum of CDCHD in DMSO-d_6 at 800 MHz



Priloga E: ^{13}C NMR spekter CDCHD v DMSO-d₆ pri 75 MHz

Appendix E: ^{13}C NMR spectrum of CDCHD in DMSO-d₆ at 75 MHz



Priloga F: Aktivnost CHD, CDCHD in DMCHD proti multirezistentnim kliničnim izolatom

Appendix F: Activities of CHD,CDCHD and DMCHD against multiresistant isolates of clinical origin

Vrsta	N	Spojina	Število izolatov, inhibiranih z navedeno koncentracijo ($\mu\text{g/ml}$)												MIC_{50}	MIC_{90}
			<=0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64			
<i>E. coli</i>	15	CHD			3	4	4	2	1	1					2	8
		CDCHD		2	6	3	3	1							0.5	2
		DMCHD												15	>64	>64
<i>K. pneumoniae</i>	25	CHD			2	5	8	4	3	3					2	16
		CDCHD	1	2	4	7	7	4							1	4
		DMCHD												25	>64	>64
<i>E. cloacae</i>	20	CHD				1	12	5	2						2	4
		CDCHD			2	11	7								1	2
		DMCHD											2	18	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	20	CHD					2	5	8	4	1				8	16
		CDCHD						2	12	5	1				8	16
		DMCHD												20	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	15	CHD										1	8	6	64	>64
		CDCHD							8	5	2				8	32
		DMCHD												15	>64	>64
<i>S. aureus</i> MR	20	CHD			1	3	5	10	1						4	4
		CDCHD			1	1	10	8							2	4
		DMCHD								10	10				16	32
<i>E. faecium</i>	10	CHD					2	5	3						4	8
		CDCHD					4	6							2	2
		DMCHD											2	8	>64	>64
Vsi organizmi	125	CHD			6	13	33	31	18	8	2	8	6	4	16	
		CDCHD	1	4	13	22	31	21	20	10	3				2	8
		DMCHD								10	10	4	101	>64	>64	