

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maša LENASI

**METABOLNE POTI ZA ASIMILACIJO ACETATA
PRI BAKTERIJI *Streptomyces* sp.**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maša LENASI

**METABOLNE POTI ZA ASIMILACIJO ACETATA
PRI BAKTERIJI *Streptomyces* sp.**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**METABOLIC PATHWAYS FOR ACETATE ASSIMILATION IN
Streptomyces sp.**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v podjetju Acies Bio d.o.o.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Hrvoje Petković, za somentorja dr. Marko Blažič in za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Marko BLAŽIČ
 Acies Bio d.o.o

Član: prof. dr. Tom TURK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Maša Lenasi

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 601.2:576.34:579.24 (043.2)
KG aktinomicete/*Streptomyces tsukubaensis/Streptomyces coelicolor*/asimilacija acetata/etilmalonil-CoA pot/glioksilatni cikel
AV LENASI, Maša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)/BLAŽIČ, Marko (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2016
IN METABOLNE POTI ZA ASIMILACIJO ACETATA PRI BAKTERIJI *Streptomyces* sp.
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XV, 84 str. [12] str., 21 pregl., 39 sl., 9 pril., 72 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Za rast mikroorganizma na viru ogljika z dvema ogljikovima atomoma, kot edinem viru ogljika je ključno, da vsebujejo metabolne poti, ki omogočajo konverzijo acetil-CoA v različne prekurzorje. Pri večini bakterij lahko asimilacija acetata poteka po dveh metabolnih poteh: glioksilatnem ciklu, ki vključuje klasično anaplerotsko reakcijo Krebsovega cikla, in etilmalonil-CoA poti, nedavno odkrita alternativna pot za asimilacijo acetata. V obsegu magistrske naloge smo preučevali sev *S. tsukubaensis*, producent medicinsko pomembnega imunosupresorja FK506, ki za asimilacijo acatata uporablja EMC pot, in modelni sev *S. coelicolor*, ki v genomu nosi zapis za gene obeh metabolnih poti, EMC in glioksilatne poti. Namen magistrskega dela je bil preučiti vlogo genskih homologov, ki sodelujejo v metabolnih poteh etilmalonil-CoA in glioksilatnega cikla za asimilacijo acetata pri omenjenih sevih. Sev *S. tsukubaensis* z inaktivirano EMC potjo ni sposoben asimilirati acetata iz minimalnega gojišča. S pomočjo čezmernega heterolognega izražanja genov glioksilatne poti iz *S. coelicolor* smo sevu *S. tsukubaensis* poskusili povrniti sposobnost rasti na acetatu. Z vnosom protismiselne RNA encima izocitrat dehidrogenaze, ki sodeluje v Krebsovem ciklu pri *S. tsukubaensis* smo uspeli sevu z inaktivirano EMC potjo delno povrniti sposobnost rasti na acetatu, kot edinem viru ogljika. V nadaljnje smo v sevu *S. coelicolor* inaktivirali *emc* operon in ugotovili, da je sev kljub neaktivni etilmalonil-CoA poti zmožen asimilirati acetat iz minimalnega gojišča, najverjetneje po nativni glioksilatni poti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 601.2:576.34:579.24 (043.2)
CX actinomycetes/*Streptomyces tsukubaensis*/*Streptomyces coelicolor*/acetate
asimilation/ethylmalonyl-CoA pathway/glyoxylate cycle
AU LENASI, Maša
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)/BLAŽIČ, Marko (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in
Biotechnology
PY 2016
TI METABOLIC PATHWAYS FOR ACETATE ASSIMILATION IN *Streptomyces*
sp.
DT M. Sc. thesis (Master Study Programmes)
NO XV, 84 p. [12] p., 21 tab., 39 fig., 9 ann., 72 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Key to efficient bacterial growth on C2 compounds, as only carbon source, is the presence of enzymes and metabolic pathways that enable the conversion of aceetyl-CoA into various compounds, which represent cell building blocks. Conversion of acetyl-CoA into key precursor molecules is also referred to as the »acetyl-CoA assimilation«. Bacteria generally use one of two widely distributed acetyl-CoA assimilation strategies; glyoxylate cycle, anaplerotic reaction to the citric acid cycle, or the ethylmalonyl-CoA pathway, a newfound alternative pathway. Our work was carried out on *S. tsukubaensis*, which uses EMC pathway for assimilation, and on *S. coelicolor*, which appears to use both acetyl-CoA assimilation strategies. Our goal was to study the role of gene homologues in previously mentioned *Streptomyces* strains, which participate in acetyl-CoA assimilation. We based our studies on *emc*-inactivated strain of *S. tsukubaensis* and tried to restore its ability to grow on acetate with constitutive overexpression of glyoxylate pathway genes from *S. coelicolor* and addition of antisense RNA sequence of isocitrate dehydrogenase enzyme, which participates in citric acid cycle in *S. tsukubaensis*. Further, we inactivated *emc* operon in *S. coelicolor* and tested for its ability to grow on acetate, as only carbon source, using the native glyoxylate cycle. We demonstrated that the *emc*-inactivated strain of *S. coelicolor* was still able to assimilate acetate from minimal media, presumably via native glyoxylate pathway.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
ZAHVALA	VIII
PRILOGE	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RED <i>Actinomycetales</i>	3
2.2 ROD <i>Streptomyces</i>	3
2.2.1 Morfologija in življenjski cikel streptomicet	3
2.2.2 Genom streptomicet	4
2.2.3 Primarni metabolizem pri streptomicetah	5
2.2.3.1 Glioksilatni cikel	6
2.2.3.2 Pot etilmalonil-CoA	8
2.2.3.3 Pomen metabolnih poti za asimilacijo acetata	11
2.2.4 Poliketidi	14
2.3 PROTISMISELNA RNA	14
2.3.1 Mehanizem delovanja protismiselne RNA	15
2.3.2 Uporaba tehnologije protismiselne RNA	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Plazmidi	19
3.1.1.1 Plazmid pSET152	19
3.1.1.2 Plazmid pCR2.1	20
3.1.1.3 Plazmid pKC1139	20
3.1.2 Oligonukleotidni začetniki	21

3.1.3 Mikroorganizmi	22
3.1.4 Gojišča	23
3.1.4.1 2TY (tryptone yeast extract medium)	23
3.1.4.2 MMAM	23
3.1.4.3 SM (mannitol soya flour medium)	24
3.1.4.4 CRM	24
3.1.4.5 MM (minimal medium)	24
3.1.4.6 NMMB	25
3.1.4.7 NMMP	25
3.1.4.8 ISP4	25
3.1.5 Encimi	26
3.1.6 Antibiotiki	26
3.1.7 Pufske raztopine	27
3.1.8 Ostali reagenti in raztopine	28
3.1.9 Komercialni kitici	28
3.1.10 Laboratorijske aparature in oprema	28
3.1.11 Laboratorijska steklovina in potrošni material	29
3.2 METODE	30
3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo	30
3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	31
3.2.3 Transformacija	31
3.2.3.1 Modro-beli test	32
3.2.4 Priprava plazmidov	32
3.2.4.1 Izolacija plazmidov	32
3.2.4.2 Restrikcija	33
3.2.4.3 Ligacija	33
3.2.4.4 Dodajanje A-repkov in kloniranje v vektor pCR2.1	33
3.2.4.5 Defosforilacija	34
3.2.4.6 Gibson reakcija	34
3.2.5 Priprava spor	35
3.2.6 Konjugacija	35
3.2.6.1 Priprava plazmidne DNA in celic za konjugacijo	36
3.2.6.2 Postopek konjugacije	36
3.2.7 Selekcija konjugant na trdnih gojiščih	37
3.2.8 Plazmidni konstrukt pSET152+<i>PermE*</i>+<i>emcOp</i>	38
3.2.9 Plazmidni konstrukt pSET152+<i>PermE*</i>+<i>iclOp</i> in prenos v <i>S. tsukubaensis</i> s pomočjo konjugacije z <i>E. coli</i>	38
3.2.10 Priprava plazmidnega konstrukta pSET152+<i>PermE*</i>+<i>iclOp</i>+<i>PermE*</i>(<i>bRBS</i>)+<i>antiICD</i> in prenos v <i>S. tsukubaensis</i> s pomočjo konjugacije z <i>E. coli</i>	39
3.2.10.1 PCR reakcija za fragment <i>anti-ICD</i>	39

3.2.10.2	Plazmidni konstrukt pSET152+ <i>PermE*</i> (<i>bRBS</i>)+ <i>antiICD</i>	39
3.2.10.3	Plazmidni konstrukt pSET152+ <i>PermE*</i> + <i>iclOp</i> + <i>PermE*</i> (<i>bRBS</i>) + <i>antiICD</i>	40
3.2.11	Inaktivacija genov <i>emc</i> operona bakterije <i>S. coelicolor</i>.....	43
3.2.11.1	Izolacija genomske DNA	43
3.2.11.2	Priprava fragmentov s PCR reakcijo in restrikcijo	43
3.2.11.3	Restrikcija vektorja pKC1139.....	44
3.2.11.4	Gibson reakcija.....	44
3.2.11.5	Izolacija in preverjanje konstrukta ter prenos pKC1139+ <i>emc del+ts</i> plazmida v <i>S. coelicolor</i> s pomočjo konjugacije z <i>E. coli</i>	45
3.2.11.6	Postopek subkultivacije (<i>S. coelicolor</i>).....	45
3.2.11.7	Potrditev sekundarnih rekombinant z metodo PCR na osnovi kolonije .	46
3.2.11.8	Potrditev sekundarnih rekombinant s sekvenciranjem.....	47
3.2.12	Testiranje rasti <i>Streptomyces tsukubaensis</i> na minimalnem gojišču z acetatom	48
3.2.13	Gojenje in vzorčenje sevov <i>Streptomyces tsukubaensis</i> v tekočem gojišču ..	48
3.2.14	Izolacija celičnih proteinov.....	49
3.2.15	Merjenje koncentracije proteinov z Bradford metodo	49
3.2.16	Merjenje aktivnosti encima ICD.....	49
3.2.17	Testiranje rasti <i>Streptomyces coelicolor</i> na minimalnem gojišču z acetatom	50
3.2.17.1	Gojenje in vzorčenje sevov <i>S. coelicolor</i> v tekočem gojišču.....	50
3.2.17.2	HPLC analiza	50
4	REZULTATI.....	52
4.1	BIOINFORMATSKA ANALIZA SEVA <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	52
4.2	TEST RASTI NA ACETATU.....	52
4.3	POVRNITEV RASTI NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO <i>emc</i> OPERONA.....	53
4.4	POVRNITEV RASTI <i>S. tsukubaensis ΔemcOp</i> NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO <i>icl</i> OPERONA IZ <i>S. coelicolor</i>	54
4.4.1	Plazmidni konstrukt pSET152+<i>PermE*</i>+<i>iclOp</i> z zapisom za glioksilatni cikel iz <i>S. coelicolor</i>.....	55
4.5	POVRNITEV RASTI NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO <i>icl</i> OPERONA IZ <i>Streptomyces coelicolor</i> IN PROTISMISELNE RNA GENA ZA ENCIM ICD.....	56
4.5.1	PCR reakcija za fragment anti-ICD	57
4.5.2	Plazmidni konstrukt pSET152+<i>PermE*</i>(<i>bRBS</i>)+<i>antiICD</i>	57
4.5.3	Plazmidni konstrukt pCR2.1+<i>PermE*</i>(<i>bRBS</i>)+<i>antiICD</i>	58
4.5.4	Priprava fragmenta <i>PermE*</i>(<i>bRBS</i>)+<i>antiICD</i>	58

4.5.5 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD .	59
.....	
4.5.6 Testiranje povrnitve rasti na acetatu	59
4.6 MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMA IZOCITRAT DEHIDROGENAZE.....	61
4.7 BIOINFORMATSKA ANALIZA <i>emc</i> operona SEVA <i>Streptomyces coelicolor</i> ..	64
.....	
4.8 PREKINJANJE <i>emc</i> OPERONA SEVA <i>Streptomyces coelicolor</i>	64
4.8.1 Načrtovanje konstrukta za inaktivacijo operona	64
4.8.2 Oblikanje začetnih oligonukleotidov	65
4.8.3 Izolacija genomske DNA.....	66
4.8.4 Priprava fragmentov s PCR reakcijo in restrikcijo	66
4.8.5 Izolacija in preverjanje konstrukta pKC1139+emc del+ts	67
4.8.6 Postopek subkultivacij in iskanje sekundarnih rekombinant.....	68
4.8.7 Potrjevanje sekundarnih rekombinant s PCR reakcijo na osnovi kolonije	68
4.8.8 PCR reakcija za sekvenciranje	69
4.9 Testiranje rasti na acetatu	70
5 RAZPRAVA	71
6 SKLEPI	76
7 POVZETEK	77
8 VIRI	78

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Približno št. biološko aktivnih metabolitov glede na proizvodni organizem (Bérdy, 2005)	14
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi. Vsa zaporedja so navedena od 5`- proti 3`-koncu.	21
Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov <i>E. coli</i> :	22
Preglednica 4: Seznam uporabljenih sevov <i>S. tsukubaensis</i> :	22
Preglednica 5: Seznam uporabljenih sevov <i>S. coelicolor</i> :	22
Preglednica 6: Sestava 2TY gojišča (Sambrook in sod. 1989).....	23
Preglednica 7: Sestava MMAM gojišča (Kieser in sod., 2000).	23
Preglednica 8: Sestava MS gojišča (Kieser in sod., 2000).	24
Preglednica 9: Sestava CRM gojišča (Kieser in sod., 2000).	24
Preglednica 10: Sestava MM gojišča (Kieser in sod., 2000).....	24
Preglednica 11: Sestava NMMB gojišča (Kieser in sod., 2000).	25
Preglednica 12: Sestava NMMP gojišča (Kieser in sod., 2000).....	25
Preglednica 13: Sestava ISP4 gojišča.....	25
**Preglednica 14: Sestava mineralne raztopine za ISP4 gojišče.	26
Preglednica 15: Seznam uporabljenih encimov.....	26
Preglednica 16: Seznam uporabljenih antibiotikov in ustrezne koncentracije.	26
Preglednica 17: Seznam uporabljenih pufrov.....	27
Preglednica 18: Potek PCR reakcije.....	31
Preglednica 19: Podatki o izvedenih PCR reakcijah.	44
Preglednica 20: Potek PCR reakcije na osnovi kolonije.	47
Preglednica 21: Fragmenti, s katerimi smo pripravili konstrukt za inaktivacijo operona... ..	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel streptomicet (Flärdh in Buttner, 2009).....	4
Slika 2: Molekula acetil-CoA kot intermediat centralnega metabolizma.....	6
Slika 3: Shema povezave treh metabolnih poti	7
Slika 4: Regulacija glioksilatnega cikla pri bakteriji <i>E. coli</i>	8
Slika 5: Shema poti etilmalonil-CoA (Alber, 2011).....	10
Slika 6: Nenavadni intermediati poti etilmalonil-CoA (Alber, 2011)	11
Slika 7: Organizacija poti etilmalonil-CoA v genomu desetih streptomicet	13
Slika 8: Shema osnovnega plazmida pSET152	19
Slika 9: Shema osnovnega plazmida pCR2.1.....	20
Slika 10: Shema osnovnega plazmida pKC1139.....	20
Slika 11: Plazmidni konstrukt pSET152+ <i>PermE*</i> + <i>emcOp</i>	38
Slika 12: Plazmidni konstrukt pSET152+ <i>PermE*</i> + <i>iclOp</i>	39
Slika 13: Shema plazmidnega konstrukta pSET152+ <i>PermE*(bRBS)+antiICD</i>	40
Slika 14: Shema kloniranja fragmenta <i>PermE*(bRBS)+antiICD</i>	41
Slika 15: Shema plazmidnega konstrukta pSET152+ <i>PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)</i> + <i>antiICD</i>	42
Slika 16: Organizacija genov <i>emc</i> operona bakterije <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488.	52
Slika 17: Rezultati testiranja rasti sevov <i>S. tsukubaensis</i> na acetatu.....	53
Slika 18: Rezultati testiranja rasti sevov <i>S. tsukubaensis</i> na acetatu.....	54
Slika 19: Organizacija genov <i>icl</i> operona bakterije <i>S. coelicolor</i>	55
Slika 20: Rezultati testiranja rasti sevov <i>S. tsukubaensis</i> na minimalnem gojišču z acetatom.	56
Slika 21: Fotografija gela elektroforeze, s katero smo preverili uspešnost PCR reakcije za fragment <i>antiICD</i>	57
Slika 22: Fotografija gela, s katerim smo ločevali fragmente po restrikciji plazmidov pSET152+ <i>PermE*(bRBS)+antiICD</i>	57
Slika 23: Fotografija elektroforeznega gela, kjer smo analizirali fragmente po restrikciji plazmidov pCR2.1+ <i>PermE*(bRBS)+antiICD</i>	58
Slika 24: Fotografija elektroforeznega gela za pripravo fragmenta <i>PermE*(bRBS)</i> + <i>antiICD</i>	58

Slika 25: Slika elektroforeznega gela, s katerim smo preverjali plazmidne konstrukte pSET152+ <i>ermE*</i> + <i>iclOp</i> + <i>ermE*</i> (<i>bRBS</i>)+ <i>antiICD</i>	59
Slika 26: Rezultati testiranja rasti sevov <i>S. tsukubaensis</i> na acetatu.....	60
Slika 27: Spremljanje optične gostote pri 600 nm v odvisnosti od časa	61
Slika 28: Spremljanje pH vrednosti v odvisnosti od časa.	62
Slika 29: Prikaz aktivnosti encima izocitrat dehidrogenaze v odvisnosti od časa.....	63
Slika 30: Organizacija <i>emc</i> operona bakterije <i>S. coelicolor</i>	64
Slika 31: Konstrukt za inaktivacijo <i>emc</i> operona.	65
Slika 32: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi.....	66
Slika 33: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo preverili produkte PCR rekacije.	66
Slika 34: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo preverili koncentracije fragmentov pred Gibson rekacijo.....	67
Slika 35: Fotografija agaroznega elektroforetskega gela, na katerem smo ločevali fragmente po restriktivni analizi plazmida pKC1139+ <i>emc del+ts</i>	67
Slika 36: Rezultati pečatenja.	68
Slika 37: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo potrjevali sekundarne rekombinante.....	69
Slika 38: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo potrjevali sekundarne rekombinante.....	69
Slika 39: Izmerjena vsebnost glukoze in acetata v različnih časovnih točkah	70

KAZALO PRILOG

Priloga A: DNA velikostni standard

Priloga B: Umeritvena krivulja Bradford reakcije

Priloga C: Naleganje začetnih oligonukleotidov na genu *icd*

Priloga D: Umeritvena krivulja standarda NADH za test ICD encimske aktivnosti

Priloga E: Test encimske aktivnosti izocitrat dehidrogenaze v *S. tsukubaensis*

Priloga F: Test encimske aktivnosti izocitrat dehidrogenaze v *S. tsukubaensis*

Priloga G: Naleganje začetnih oligonukleotidov pri oblikovanju konstrukta za inaktivacijo
emc operona *S. coelicolor*

Priloga H: Naleganje začetnih oligonukleotidov pri potrjevanju inaktivacije *emc* operona *S. coelicolor*

Priloga I: Merjenje koncentracije glukoze, acetata v gojišču NMMB s sevi *S. coelicolor*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>aceA</i>	gen za izocitrat liazo
<i>aceB2</i>	gen za malat sintazo v primarnem metabolizmu
<i>allR</i>	gen za krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo v sekundarnem metabolizmu
Amp	ampicilin
Apr	apramicin
asRNA	protismiselna RNA (angl. antisense RNA)
bp	bazni par
C _{2/3/4/...}	spojine, ki imajo 2/3/4/... ogljikove atome
CCK	cikel citronske kislina (Krebsov cikel)
CCR	encim krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza
<i>ccrI</i>	gen za krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo v primarnem metabolizmu
Cm	kloramfenikol
CoA	koencim A
dH ₂ O	deionizirana voda
<i>emc</i> operon	področje DNA, ki omogoča asimilacijo acetata po etilmalonil-CoA poti
EMC pot	etilmalonil-CoA metabolna pot za asimilacijo acetata
EDTA	etylendiaminotetraocetna kislina
<i>fadC2</i>	gen za β-hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo
FD	Fast Digest produkti
gDNA	genomska DNA
<i>hcd</i>	gen za hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo
<i>icd</i>	gen za encim izocitrat dehidrogenazo
ICD (IDH)	encim izocitrat dehidrogenaza (angl. Isocitrate Dehydrogenase)
ICL	encim izocitrat liaza
ICL pot	glioksilatni cikel za asimilacijo acetata
<i>icl</i> operon	področje DNA, ki omogoča asimilacijo acetata po glioksilatni poti
IDHKP	izocitrat dehidrogenazna kinaza-fosfataza

IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
Kn	kanamicin
<i>mch</i>	gen za mezakonil hidratazo
MDPI	mikobakterijski DNA-vezavni protein I
<i>meaA</i>	gen za etilmalonil mutazo
miRNA	mikro RNA (angl. micro RNA)
<i>mml</i>	gen za metilmalil liaz
MS	encim malat sintaza
<i>msd</i>	gen za metilsukcinil dehidrogenazo
Nal	nalidinska kislina
ncRNA	nekodirajoče RNA (angl. non-coding RNA)
<i>oriC</i>	mesto začetka podvojevanja (<i>E. coli</i>)
<i>oriT</i>	mesto začetka podvojevanja (streptomicete)
PEP	fosfoenolpiruvat
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
sRNA	majhne RNA (angl. small RNA)
siRNA	majhne interferenčne RNA (angl. small interference RNA)
TAE	pufer za agarozno gelsko elektroforezo (Tris, ocetna kislina in EDTA)
<i>tetR</i>	gen za tetraciklinski represor
Tm	temperatura tališča (angl. Melting Temperature)
Ts	tiostrepton
<i>ts</i>	gen za odpornost proti antibiotiku tiostretonu
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galatopiranozid

SLOVARČEK

Aktinomicete – Skupina bakterij, ki spada v red *Actinomycetales* (deblo *Actinobacteria*).

Anaplerotska reakcija – Vrsta metabolne reakcije, pri kateri se tvorijo nadomestni intermediati, ki so se porabili pri odvzemu iz druge metabolne poti. Primer takšne reakcije je glioksilatni cikel v Krebsovem ciklu, kjer se dodaja malat zaradi porabe izocitrata.

Protismiselna RNA – Enoverižna RNA, komplementarna določeni mRNA. Če jo vnesemo v celico inhibiramo translacijo omenjene mRNA. Obstajajo tudi naravne celične asRNA, ko eden od načinov uravnavanja izražanja genov.

Claisenova kondenzacija – Reakcija, pri kateri pride do nastanka vezi med dvema ogljikoma. Produkt je β -keto ester ali β -diketon.

Genska skupina – Skupina dveh ali več genov, ki kodirajo podobne proteine, s podobno funkcijo.

Glukoneogeneza – Metabolni proces, obraten procesu glikolize.

Homologni geni – Vsi geni, enaki po zgradbi, delovanju in izvoru.

Operon – Funkcionalno področje DNA, ki vključuje več strukturnih genov, ki so hkrati regulirani in skupaj prepisani.

Promotor – Nukleotidno zaporedje na 5' koncu gena, ki regulira njegovo izražanje.

Sekvenciranje – Tehnika, s katero določamo nukleotidno zaporedje nukleinske kisline (največkrat DNA).

Shine-Dalgarnova sekvenca – Zaporedje na DNA, kamor se veže ribosom.

Streptomicete – Bakterije rodu *Streptomyces*.

Transformacija – Pojem, ki opisuje brezvirusni prenos DNA v bakterijo ali v neživalske evkariontske celice.

Začetni oligonukleotid – je kratkoverižna nukleinska kislina, ki je potrebna za začetek podvajanja DNA. Hibridizira na tarčno DNA in služi za začetno točko, od koder bo encim polimeraza sintetiziral komplementarno verigo DNA.

1 UVOD

Streptomicete so Gram-pozitivne nitaste bakerije, ki imajo ene izmed največjih bakterijskih genomov, kar sovпадa z izredno pestrim in raznolikim primarnim in sekundarnim metabolizmom (Bentley in sod., 2002). Za rast lahko uporabljajo širok nabor virov ogljika, med drugim so sposobne rasti na spojinah z dvema ogljikovima atomoma. Med te spojine spadajo na primer acetat, maščobne kisline ter voski in alkeni, ki v centralni metabolizem vstopajo na stopnji molekule acetil-CoA. Pretvorbo acetil-CoA do ključnih prekurzorskih metabolitov imenujemo »asimilacija acetil-CoA«. Za učinkovito rast bakterij na acetatu, kot edinem viru ogljika, je ključno, da vsebujejo encime in metabolne poti, ki omogočajo pretvorbo acetil-CoA v različne celične gradnike - piruvat/fosfoenolpiruvat, oksaloacetat in α -ketoglutarat (Kornberg in Madsen, 1958).

Pri večini bakterij asimilacija acetata poteka preko glioksilatnega cikla, ki predstavlja klasično anaplerotsko reakcijo Krebsovega cikla, prva sta ga opisala (Kornberg in Madsen, 1958). Ključna encima sta izocitrat liaza, ki cepi izocitrat na sukcinat in glioksilat, in malat sintaza, ki spoji glioksilat z molekulo acetil-CoA v malat. Pri mnogih bakterijah, kot so na primer streptomicete, pa asimilacija acetata poteka po poti etilmalonil-CoA, ki so jo odkrili nedavno (Erb in sod., 2007). EMC pot je neciklična in se začne s kondenzacijo dveh molekul acetil-CoA v acetoacetil-CoA. Ključni encim poti je krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (CCR), ki katalizira reduktivno karboksilacijo krotonil-CoA do etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007).

Vloga asimilacije acetata v primarnem metabolizmu je dobro poznana, vendar pa ima lahko pomen tudi v sekundarnem metabolizmu. Pri številnih bakterijah, med drugim pri mnogih industrijsko pomembnih streptomicetah, ki proizvajajo sekundarne metabolite, ima metabolit etilmalonil-CoA pomembno vlogo. Je gradbena enota biološko aktivnih poliketidnih spojin, kot je to pri medicinsko pomembenem imunosupresivu FK506, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces tsukubaensis* (Blažič in sod., 2015). Analiza genomov streptomicet je pokazala, da nekateri sevi vsebujejo tako gene za glioksilatni cikel kakor tudi gene EMC poti, takšna je na primer bakterija *Streptomyces coelicolor*, medtem ko drugi sevi vsebujejo le alternativno EMC pot, na primer bakterija *S. tsukubaensis* (Alber, 2011).

1.1 NAMEN DELA

V izbranih streptomacetnih sevih *S. tsukubaensis* in *S. coelicolor* je bil namen preučiti vlogo genskih homologov metabolnih poti etilmalonil-CoA (EMC) in glioksilatnega cikla, ki sodelujejo pri asimilaciji acetata. Nameravali smo prekiniti ključne gene EMC poti in preveriti sposobnost rasti tako gensko manipuliranih sevov na acetatu kot edinem viru ogljika.

S prekinitvijo oziroma čezmernim izražanjem homologov izocitrat liaze in malat sintaze nameravamo ovrednotiti potencialno vlogo teh genov pri asimilaciji acetata v izbranih streptomacetnih sevih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da bomo s prekinitvijo ključnega operona metabolne poti etilmalonil-CoA pridobili mutanta, ki ne bo sposoben rasti na acetatu, kot edinem viru ogljika.
- Pričakujemo, da bomo v mutantu, ki ima prekinjen ključni operon EMC metabolne poti, s čezmernim heterolognim izražanjem genskih homologov izocitrat liaze in malat sintaze, ponovno vzpostavili sposobnost rasti na acetatu kot edinem viru ogljika.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RED *Actinomycetales*

Aktinomicete so aerobne, po gramu pozitivne bakterije. Uvrščamo jih v deblo aktinobakterij, katerih značilnost je visoka vsebnost GC baznih parov v genomu. Mnoge aktinomicete tvorijo micelij, podoben tistemu, ki ga tvorijo filamentozne glive. Večina rodov aktinomicet tvori vegetativne spore. Najštevilčnejši v skupini aktinomicet je rod *Streptomyces* (Madigan in sod., 2009).

2.2 ROD *Streptomyces*

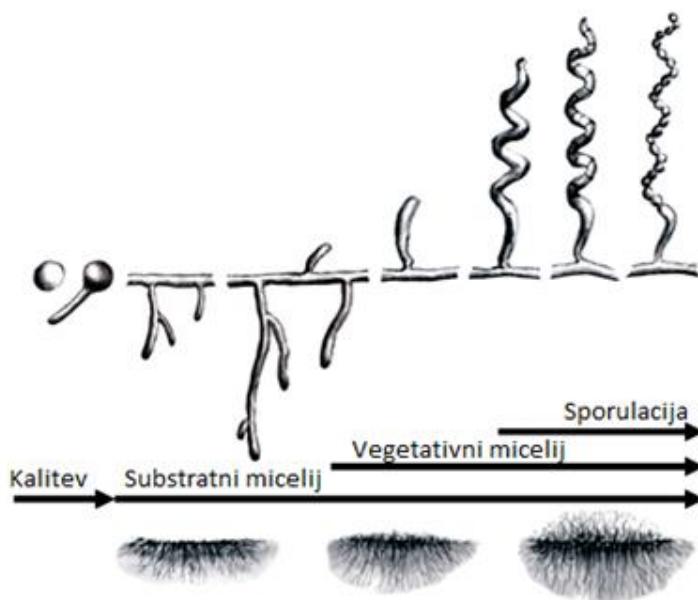
Madigan in sod. (2009) navajajo, da je poznanih več kot 500 vrst streptomicet. Streptomicete najdemo skoraj povsod, večinoma v zemlji, manj pogosto pa tudi v vodi. Najdemo jih predvsem v tleh, katerim dajejo značilen vonj po zemlji. To lahko pripisemo tvorbi kompleksnih sekundarnih metabolitov, geozminov. Največkrat jih najdemo v bazičnih ali nevtralnih tleh, kjer so aerobne razmere (Madigan in sod., 2009). Micelij je občutljiv na sušo, medtem ko so spore odporne na pomanjkanje hranil in vode. V okolju so zato največkrat v obliki neaktivnih spor. Proizvajajo mnogo zunajceličnih encimov kot so celulaze, ksilanaze, hitinaze, amilaze, maltaze, ki jim omogočajo razgradnjo kompleksnih polimerov (Kieser in sod., 2000).

2.2.1 Morfologija in življenjski cikel streptomicet

Filamenti streptomicet dosegajo v premeru 0,5 – 1 µm. Rastejo na koncih filamentov, značilna je razvejanost micelija. Za streptomicete so značilni zračni filamenti, imenovani sporoforji, na katerih rastejo spore, imenovane konidiji. Streptomicetne spore se močno razlikujejo od endospor bakterij rodu *Bacillus* in *Clostridium*. Celična diferenciacija, ki poteka pri omenjenih rodovih, vodi v nastanek endospor, medtem ko spore streptomicet nastanejo z oblikovanjem prečnih sten v večjedrnih sporoforih, čemur sledi ločitev posameznih celic v spore, navajajo Madigan in sod. (2009). Razlike v postavitvi in obliki zračnih filamentov ter drugih struktur s sporami so eden izmed dejavnikov za ločevanje med pozameznimi vrstami streptomicet. Sporofori in konidiji so pogosto pigmentirani in dajejo značilno barvo zreli koloniji (Huttner in sod., 1997; Madigan in sod., 2009).

Življenjski cikel streptomicet se prične z brstenjem posamezne spore (Slika 1), kot navajata Flärdh in Buttner (2009). Sledi nastanek enega ali več večjedrnih filamentov, ki se podaljšajo in razvejajo v substratni micelij. Ta se razraste po površini rastne podlage in v njo. Pri izrabi hranih v rastnem mediju se sprožijo določeni signali, ki spodbudijo rast zračnih hif, ki štrlijo navzgor iz substratnega micelija in tvorijo zračni micelij. S koncem podaljševanja multigenomskega zračnih hif nastopi sinhrona septacija. Iz hif nastane večjedren sporofor, ki se ob nastanku prečnih sten loči na posamezne spore. Enogenomske

spore se razpršijo in pričnejo cikel nove generacije. Ob sporulaciji začno streptomicete izdelovati tudi sekundarne metabolite, s katerimi si najverjetneje zagotovijo prednost pred drugimi v okolju prisotnimi mikroorganizmi (Madigan in sod., 2009).



Slika 1: Življenjski cikel streptomicet (Flärdh in Buttner, 2009).

2.2.2 Genom streptomicet

Streptomicete imajo med bakterijami enega najvišjih deležev C (citozin) in G (gvanin) nukleotidov v svoji DNA, delež naj bi se gibal v območju od 70 – 74 %. Tako visok delež dosegajo tudi drugi rodovi iz aktinomicet, kot so *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis* in *Micromonospora*. Večina streptomicetnih sevov vsebuje plazmide, ki so lahko linearni ali krožni, in kažejo enake vsebnosti/razmerja GC nukleotidov (Kieser in sod., 2000).

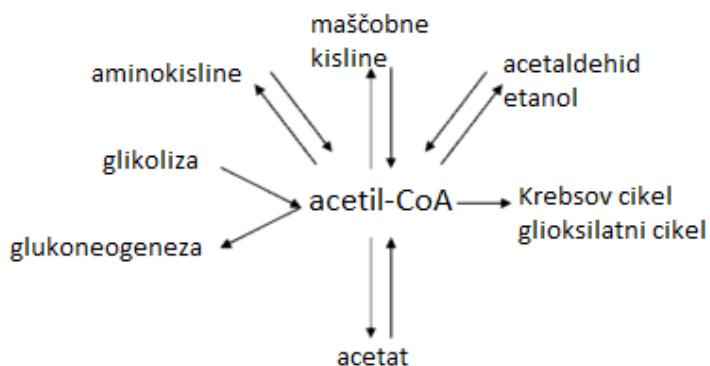
Najbolj genetsko preučena je modelna streptomiceta *S. coelicolor* A3(2). Velikost njenega genoma so določili leta 2002 in vsebuje 8 667 507 baznih parov. V raziskavo (Bentley in sod., 2002) je bilo vključenih kar 43 raziskovalcev. V projektu sekvenciranja njenega celotnega genoma so napovedali kar 7 825 potencialnih genov, med drugim tudi več kot 20 genskih skupin, ki kodirajo zapise za sekundarne metabolite. Njen kromosom je linearen, tako kot pri večini streptomicet, povprečno dolžino gena pa so ocenili na 991 bp. Regulatorno funkcijo opravlja 965 proteinov, kar predstavlja več kot 12 % do sedaj določenega genoma (Bentley in sod., 2002).

2.2.3 Primarni metabolizem pri streptomicetah

Za presnovo glukoze večina streptomicet uporablja Embden-Meyerhof-Parnasovo pot glikolize, nekatere tudi pentoza fosfatno pot, nekaj sevov streptomicet pa uporablja obe poti (Kieser in sod., 2000). V novejši raziskavi (Borodina in sod., 2005) navajajo, da so v bakteriji *Streptomyces tenebrarius* odkrili tudi aktivno Entner-Doudoroffovo pot (ED). Pot se začne z vnosom sladkorjev v celico, kjer pride do fosforilacije s specifičnimi kinazami. Pri nekaterih streptomicetah, kot so *S. coelicolor*, *S. lividans* in *S. griseofuscus* pa za transport in fosforilacijo sladkorjev najdemo tudi fosfotransferazni sistem (PEP-PTS) (Kieser in sod., 2000).

Biosinteza celičnih komponent se v celici začne s sintezo t.i. prekurzorskih metabolitov. To so pogosto spojine z dvema C atomoma (acetil-CoA), s tremi (piruvat, fosfoenolpiruvat), s štirimi (oksalacetat) ali s petimi C atomi (α -ketoglutarat). Po podatkih, ki so jih objavili Alber in sod. (2011), v bakterijskih celicah večina celičnega ogljika izvira iz piruvata oz. fosfoenolpiruvata; kar 50%, 30% ga izvira iz acetil-CoA, 13% iz oksaloacetata in 7% iz α -ketoglutarata, C₁ in C₂ spojine, kot sta acetat in metanol, vstopajo v centralni ogljikov metabolizem na nivoju acetil-CoA (Slika 2). Pretvorbo acetil-CoA v celični ogljik imenujemo asimilacija acetil-CoA, poteka lahko na dva načina; preko glioksilatnega cikla (Kornberg in Madsen, 1958) ali po poti etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007). Pri obeh poteh pride do pretvorbe acetil-CoA v malat, ki je intermediat Krebsovega cikla. Pri etilmalonil-CoA poti pride, za razliko od glioksilatnega cikla, do asimilacije dodatnih C atomov, in sicer se asimilirata še 1 molekula CO₂ in 1 molekula HCO₃⁻ (Alber, 2011).

Pred kratkim so odkrili še še tretjo pot asimilacije acetata, ki poteče z metilaspartatnim ciklom. V raziskavi (Khomyakova in sod., 2011) so pri haloarhejah opisali pot, v kateri se acetil-CoA oksidira do glioksilata preko ključnega intermediata metilaspartata. Kondenzacija glioksilata z dodatno molekulo acetil-CoA pa vodi v nastanek malata, ki je končni produkt asimilacije.



Slika 2: Molekula acetil-CoA kot intermediat centralnega metabolizma pri *E. coli* (Wolfe, 2005).

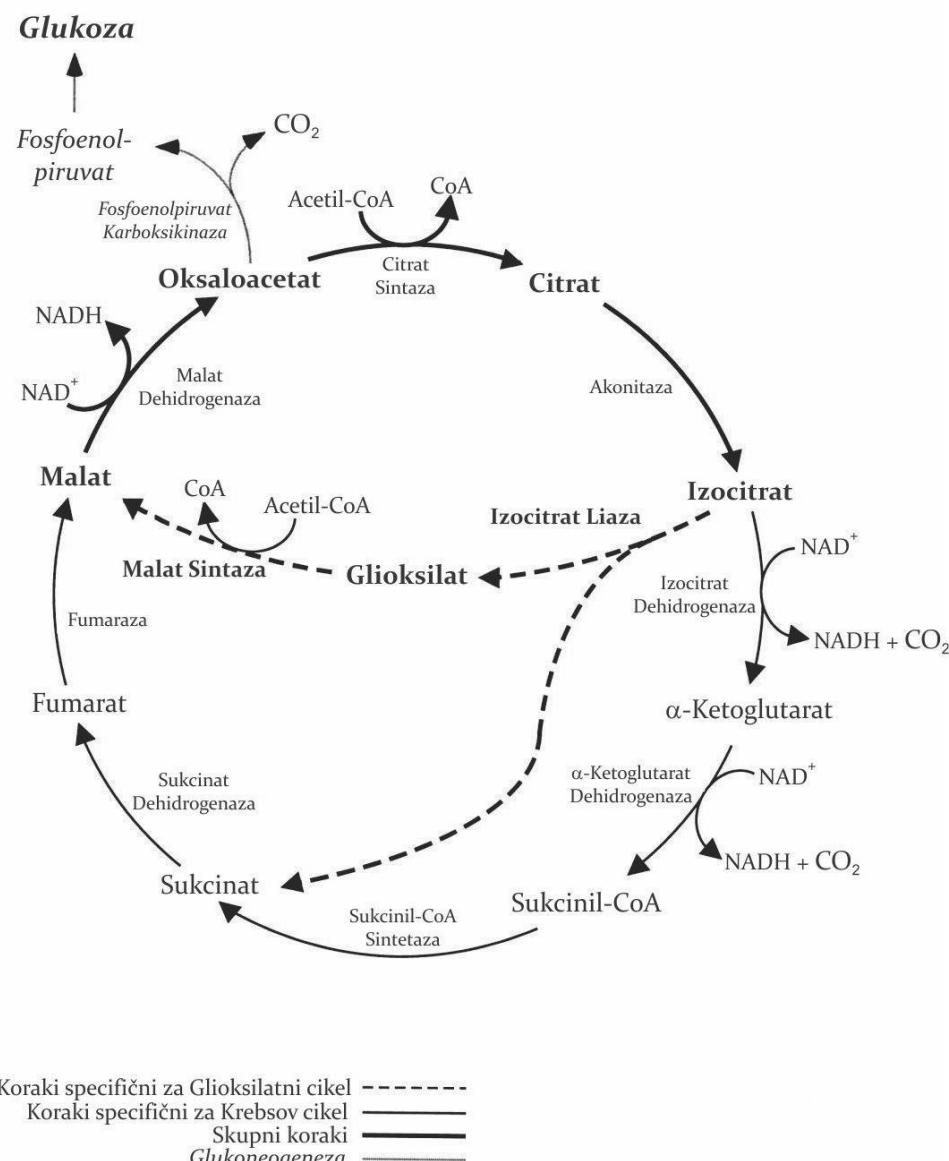
2.2.3.1 Glioksilatni cikel

Glioksilatni cikel (Slika 3) sta prvič opisala že Kornberg in Madsen, 1958. Je metabolna pot, ki više razvitim rastlinam, nekaterim mikroorganizmom in algam omogoča, da izkoriščajo acetat kot vir ogljika in izhodno spojino za biosintezo glukoze (Kornberg in Madsen, 1958). Pomemben je takrat, ko je acetat za organizem edini ali glavni vir ogljika. V ciklu iz dveh molekul acetil-CoA nastane sukcinat, kislina s štirimi ogljikovimi atomi in dvema karboksilnima skupinama (Erb in sod., 2007).

Encimske reakcije glioksilatnega cikla

Ključna encima glioksilatnega cikla sta izocitrat liaza, ki pretvarja izocitrat v sukcinat in glioksilat, ter malat sintaza, ki kondenzira glioksilat in acetil-CoA v malat in CoA. Ker s tem obidemo dve reakciji dekarboksilacij, ga imenujemo tudi glioksilatni obhod. V prvih dveh korakih Krebsovega cikla pride do nastanka citrata s kondenzacijo acetil-CoA in oksaloacetata. Molekula citrata nato izomerizira v izocitrat. Reakciji katalizirata dva encima Krebsovega cikla, citrat sintaza in akonitaza. Nastali izocitrat lahko pot nadaljuje po Krebsovem ciklu ali pa se usmeri v glioksilatni obhod, kot navajata Han in Reynolds (1997). Če pot nadaljuje po Krebsovem ciklu, pride do oksidativne dekarboksilacije z encimom izocitrat dehidrogenazo, produkt je α -ketoglutarat. Če pa se izocitrat usmeri proti glioksilatnemu obhodu, pride do cepitve na sukcinat in glioksilat z encimom izocitrat liaza. Malat sintaza nato katalizira nastanek malata z aldolno kondenzacijo iz glioksilata in dodatne molekule acetil-CoA (Han in Reynolds, 1997). Reakcija malat sintaze je substratno specifična, encim pa sodeluje tudi pri razgradnji purinov (Huttner in sod., 1997). Enačba spodaj prikazuje neto reakcijo ene ponovitve glioksilatnega cikla (Alber, 2011).



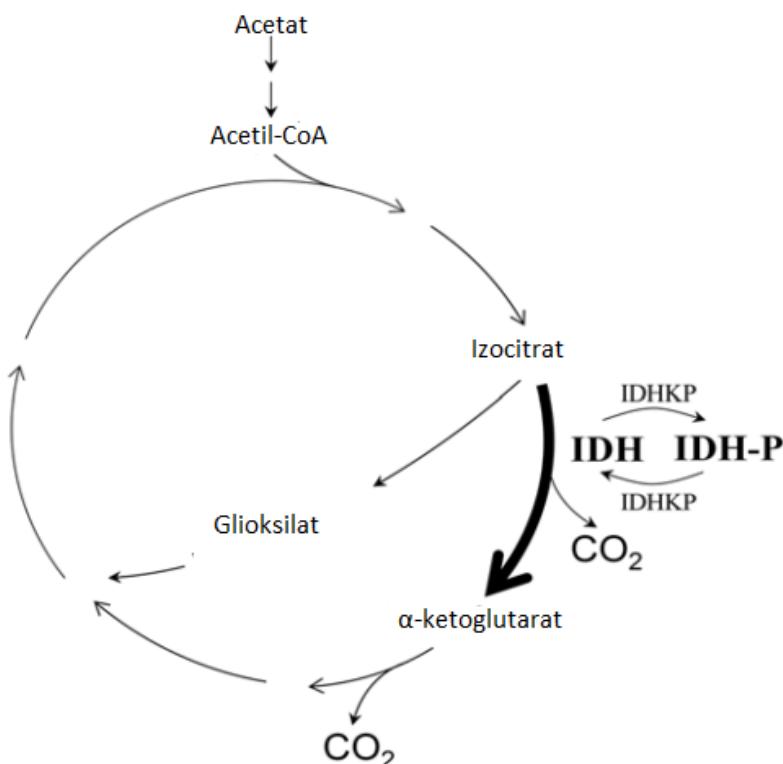


Slika 3: Shema povezave treh metabolnih poti; Krebov cikel, glioksilatni cikel in začetek glukoneogeneze (Lorenz in Fink, 2002).

Regulacija glioksilatnega cikla pri bakteriji *Escherichia coli*

Glioksilatni cikel omogoča rast na C₂ spojinah, saj obide dve reakciji dekarboksilacij, in tako ne pride do izgub ogljika v obliki CO₂, kot se to zgodi v klasičnem Krebovem ciklu. Preusmeritev v glioksilatni cikel je pri *E. coli* regulirana z fosforilacijo encima izocitrat dehidrogenaze z bifunkcionalno kinazo-fosfatazo IDHP. Sistem regulacije s kratico imenujemo IDHP/IDH sistem (Slika 4). Le-ta je zanimiv predvsem za to, ker vpleteni encim IDHP izvaja dve nasprotni si reakciji, zato mu pravimo, da je bifunkcionalen. Encim izvaja tako fosforilacijo kot defosforilacijo izocitrat dehidrogenaze. IDHP/IDH

sistem na ta način uravnava razporeditev toka ogljika med Krebsovim in glioksilatnim ciklom. Natančna regulacija je ključna kadar bakterija raste na ogljikovih spojinah, ki imajo le dva C atoma. Brez glioksilatnega cikla bi v Krebsovem ciklu prihajalo do izgub obeh C atomov z dekarboksilacijo, posledično za sintezo celične biomase ogljik ne bi bil na voljo. Med rastjo bakterij na spojinah, ki imajo več kot 2 C atoma, je IDH večinoma v nefosforiliranem stanju in je aktivna. Večina ogljika je usmerjenega v Krebsov cikel (Shinar in sod., 2009). Pri rasti na C₂ spojinah je izocitrat dehidrogenaza s fosforilacijo inaktivirana. Tako je tok ogljika usmerjen v glioksilatni cikel in proti glukoneogenezi. (Huttner in sod., 1997).



Slika 4: Regulacija glioksilatnega cikla pri bakteriji *E. coli* sistemom IDHKP/IDH, ki pretvarja encim IDH iz fosforilirane oblike v nefosforilirano, in obratno. S pretvorbo iz neaktivne oblike v aktivno usmerja tok ogljika v Krebsov cikel (Shinar in sod., 2009).

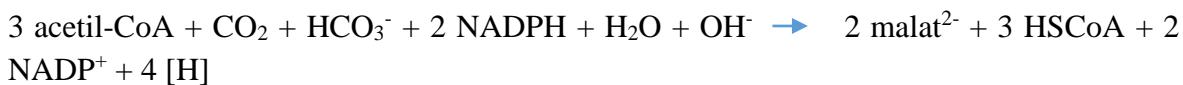
2.2.3.2 Pot etilmalonil-CoA

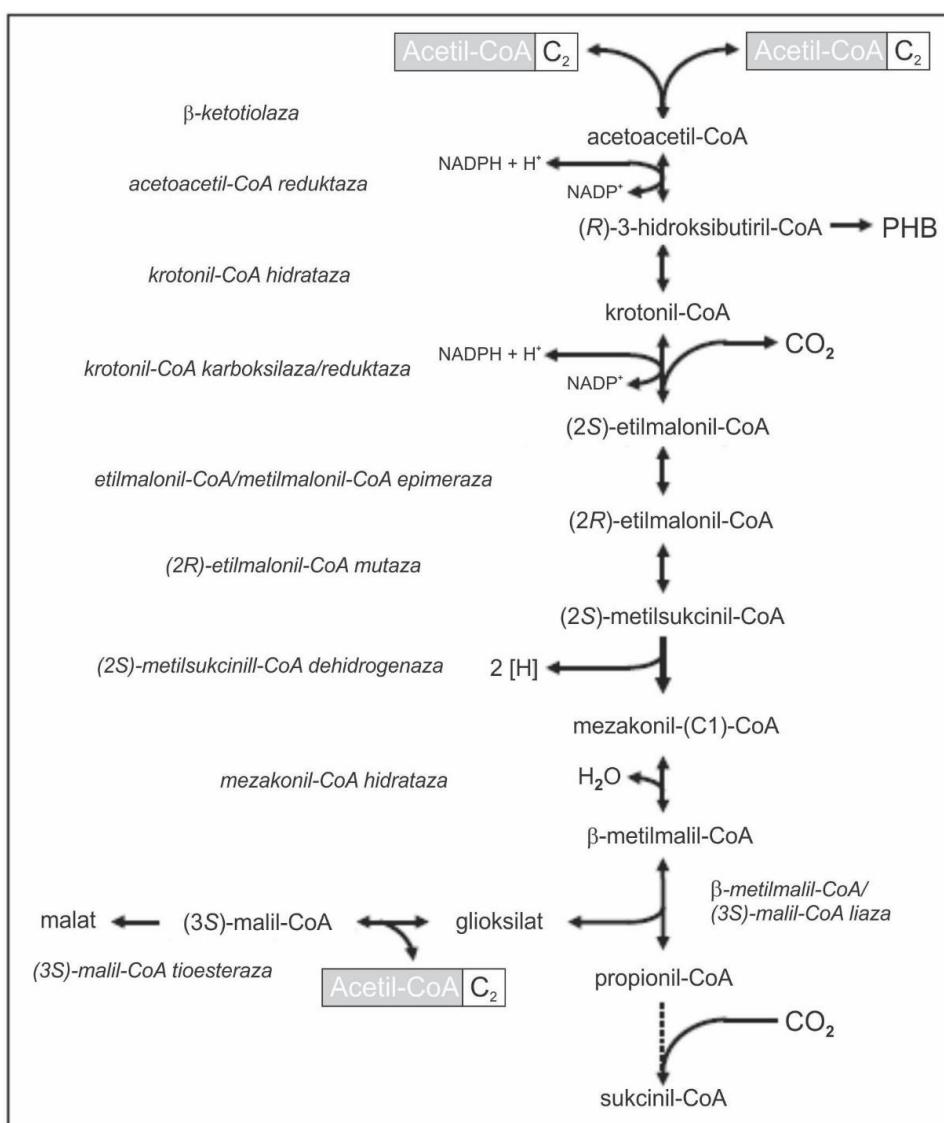
Pri velikem številu bakterij ni prisotnega zapisa za gen izocitrat liaz, ki je ključni gen glioksilatnega cikla. Med njimi so tudi nekatere streptomicer in tudi druge industrijsko pomembne bakterije kot so *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides* in *Rhodospirillum rubrum* (Alber in sod., 2006; Erb in sod., 2009) pa tudi fakultativni denitrifikatorji kot je *Paracoccus versutus* (Alber, 2011). Iskanje alternativne poti za asimilacijo acetata so Alber in sod., 2006 raziskovali na bakteriji *R. sphaeroides*. To asimilacijsko različico so Erb in sod., 2007 poimenovali pot etilmalonil-CoA (Slika 5).

Glavna funkcija poti je pretvorba centralnega metabolita acetil-CoA do specifičnih prekurzorskih metabolitov, ki so vključeni v biosintezo celičnih komponent. Mnoge streptomicete pa to pot uporabljajo tudi za zagotavljanje prekurzorjev za sintezo bioaktivnih učinkovin sekundarnega metabolizma (Erb in sod., 2007).

Encimske reakcije metabolne poti etilmalonil-CoA

Pot etilmalonil-CoA je neciklična in se začne s kondenzacijo dveh molekul acetil-CoA do acetoacetil-CoA. Sledi redukcija C₄ spojine, acetoacetil-CoA, do krotonil-CoA, ki se nadalje reduktivno karboksilira do etilmalonil-CoA. Reakcijo reduktivne karboksilacije katalizira krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr). S hidracijo C₅ molekule mezakonil-CoA nastane β-metilmalil-CoA, ki se razcepi na glioksilat in propionil-CoA. Kondenzacija glioksilata in dodatne molekule acetil-CoA vodi v nastanek malata; propionil-CoA se karboksilira v sukcinat (Erb in sod., 2007). Reakcijo opisuje spodnja enačba, ki prikazuje neto reakcijo ene ponovitve poti etilmalonil-CoA (Alber, 2011).





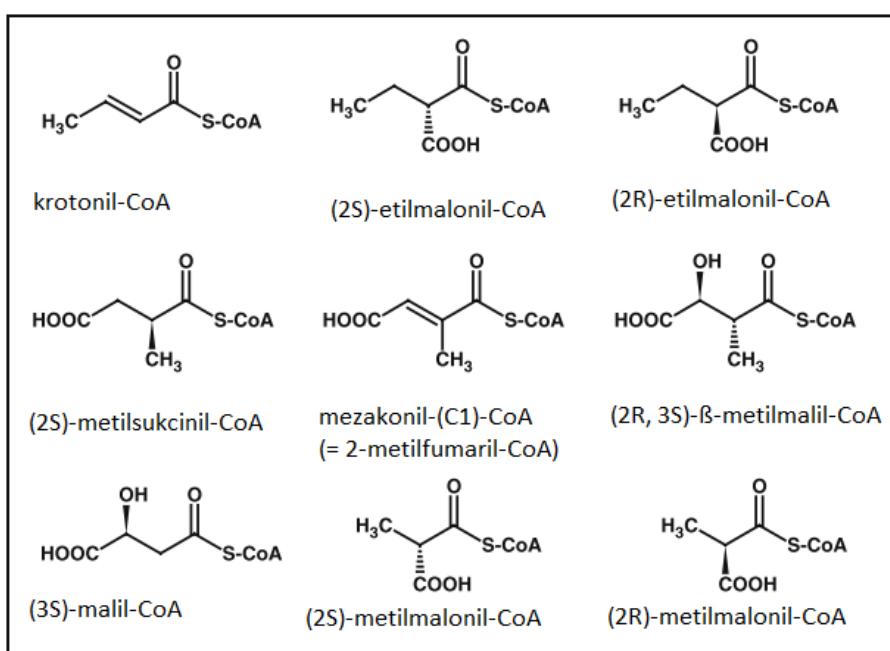
Slika 5: Shema poti etilmalonil-CoA (Alber, 2011)

Ključni encimi in intermediati

Ključni encim poti etilmalonil-CoA je krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr), ki katalizira reduktivno karboksilacijo krotonil-CoA do etilmalonil-CoA. Pri reakciji sodeluje koencim NADPH, ki zagotavlja reduktivno moč (Erb in sod., 2009). Reakcija reduktivne karboksilacije enoil-CoA je v biologiji precej redka, zato lahko ob prisotnosti gena za encim Ccr trdimo, da organizem za asimilacijo C_2 spojin uporablja pot etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007).

Intermediati poti etilmalonil-CoA so po svoji strukturi zelo zanimivi (Slika 6). Gre za specifične CoA-estre, ki jih v drugih metabolnih poteh ne najdemo. To so (2R)- in (2S)-etilmalonil-CoA, (2S)-metilsukcinil-CoA, mezakonil-(C1)-CoA in (2R, 3S)-metilmalil-CoA. Identifikacija teh intermediatov zahteva tudi nove encime, ki pretvarjajo prej naštete

spojine. Poleg ključnega encima Ccr je v metabolno pot vključen tudi encim (3S)-malil-CoA tioesteraza. Gre za prvi primer encima, ki katalizira ne-Claisenovo kondenzacijo in ga uvrščamo v popolnoma nov razred encimov tioesteraz (Alber, 2011).



Slika 6: Nenavadni intermediati poti etilmalonil-CoA (Alber, 2011)

2.2.3.3 Pomen metabolnih poti za asimilacijo acetata

Ena izmed razlag zakaj v naravi obstajata dve različni poti za asimilacijo acetata, je ta, da imajo mikroorganizmi dva različni poti biosinteze malata. Ob preučitvi celotnih bakterijskih genomov so ugotovili, da ena tretjina od 413 preiskanih rodov vsebuje gene za glioksilatni cikel (izocitrat liao in malat sintazo), 7% jih vsebuje gene za etilmalonil-CoA pot (krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo, etilmalonil-CoA mutazo in metilsukcinil-CoA dehidrogenazo), le 1% preučenih rodov pa vsebuje gene za asimilacijo acetata po obeh poteh. Preostalih 60% rodov ne potrebuje metabolne poti za asimilacijo acetata, saj imajo na voljo širši nabor substratov, ali pa uporabljal do sedaj še neznano pot asimilacije. Specifične metabolne poti za asimilacijo acetata prav tako ne potrebujejo anaerobne bakterije; pri njih se acetil-CoA neposredno pretvori v piruvat z reakcijo reduktivne karboksilacije. Od tu naprej pa v oksaloacetat in α -ketoglutarat. Encim, ki katalizira reduktivno karboksilacijo, za sprejem elektronov uporablja feredoksin, ki je sprejemnik z nizkim redoks potencialom in nastaja v anaerobnih razmerah (Alber, 2011).

Pot etilmalonil-CoA je neciklična, tako da ni potrebe po regeneraciji akceptorske molekule. Acetil-CoA lahko nastaja iz vrste obnovljivih ogljikovih substratov, ki se stekajo v metabolizem. Pot etilmalonil-CoA nima direktnih povezav do cikličnih poti (npr. Krebsov cikel), kar pomeni, da deluje neodvisno od drugih poti pretvarjanja C₂ enot v

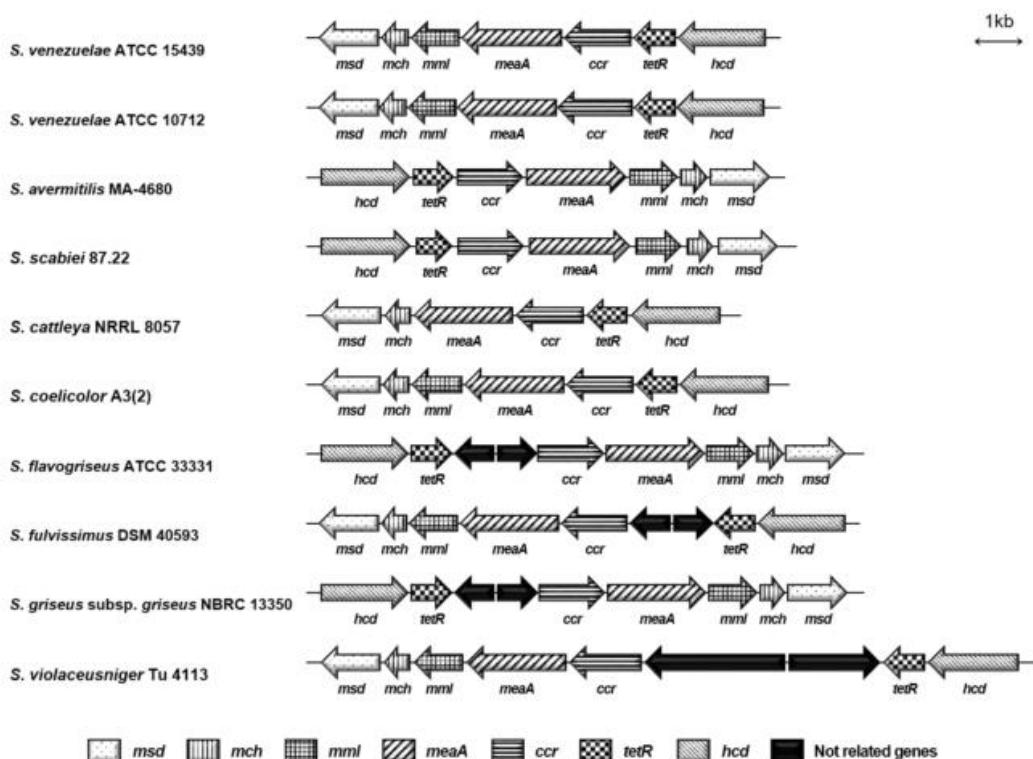
glukoneogene prekurzorje. To omogoča, da se lahko vsi intermediati poti etilmalonil-CoA porabijo za biosintezo uporabnih spojin (npr. polihidroksibutirati, poliketidi) (Alber, 2011).

Genski homologi krotonil-CoA karboksilaze/reduktaze

Ključni geni, povezani s potjo etilmalonil-CoA, so prisotni v genomu številnih bakterij rodu *Actinomycetales*. Navadno so nameščeni skupaj, najbolj pogosto v enem operonu, imenovanem *emc* operon (Slika 7), kot navajajo Jung in sod. (2014). Zanimivo je, da poleg gena za krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo v *emc* operonu, najdemo tudi dodatne kopije genskega homologa *ccr* v genskih skupinah za biosintezo sekundarnih metabolitov. Quade in sod. (2012) opisujejo številne poliketidne strukture s stranskimi verigami, ki naj ne bi izvirale iz primarnega metabolizma. Demonstirali so, da imajo homologi *ccr* gena pomembno vlogo pri biosintezi nenavadnih podaljševalnih enot kot je na primer etilmalonil-CoA. Homologi Ccr so vključeni v reduktivno karboksilacijo raznolikih 2-alkenoil karboksilnih kislin, produkt pa so nenavadni alkilmalonil tioestri, ki se uporabijo pri biosintezi poliketidnih verig. S tem se močno poveča nabor in raznolikost biološko aktivnih metabolitov (Quade in sod., 2012). Analiza sekvenc PKS genskih skupin v raziskavah je pokazala, da ležijo homologi *ccr* gena v skupinah za biosintezo konkanamicina (Haydock in sod., 2005), indanomicina (Li in sod., 2009), elaiofilina (Haydock in sod., 2004), spiramicina (Karray in sod., 2007), foslaktomicina A (Palaniappan in sod., 2003), FK520 (Wu in sod., 2000), oligomicina (Omura in sod., 2001) in mnogih drugih.

V raziskavi, ki so jo opravili Goranovič in sod. (2010), so v genomu bakterije *S. tsukubaensis* odkrili dva homologa gena *ccr*. *S. tsukubaensis*; ta je pomemben proizvajalec sekundarnega metabolita poliketidnega izvora FK506 (takrolimus), ki se v humani medicini uporablja kot imunosupresiv za preprečevanje zavrnitve organov po transplantacijah. Gen, poimenovan *ccrl*, je del primarne metabolne poti (etilmalonil-CoA pot) in katalizira pretvorbo krotonil-CoA do etilmalonil-CoA. V skupini za biosintezo poliketida FK506 pa obstaja še en genski homolog *ccr*, imenovan *allR*, ki ima vlogo pri sintezi nenavadne podaljševalne enote alilmalonil-CoA. Gena *ccr* in *allR* izražata precej visoko skladnost - 66% identičnost nukleotidnega zaporedja in 57,4% identičnost aminokislinskega zaporedja, kljub temu, da sta v različnih celičnih metabolnih poteh (Goranovic in sod., 2010).

Številne PKS genske skupine, ki vgrajujejo v strukturo poliketidne verige etilmalonil-CoA podaljševalno enoto, vsebujejo *ccr* homolog, saj si tako zagotovijo dovolj prekurzorja (2S)-etilmalonil-CoA. Izjemi sta npr. *S. cinnamonensis* in *S. coelicolor*, ki sintetizirata monenzin in germicidin. Za njuno sintezo je prav tako potreben (2S)-etilmalonil-CoA, vendar prekurzor verjetno pridobivata iz primarnega metabolizma, saj v PKS genski skupini niso odkrili *ccr* homologa (Jung in sod., 2014).



Slika 7: Organizacija poti etilmalonil-CoA v genomu desetih streptomicet; *msd* (metilsukcinil dehidrogenaza), *mch* (mezakonil hidrataza), *mml* (metilmalil liaza), *meaA* (etilmalonil mutaza), *ccr* (krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza), *tetR* (tetraciklinski represor), *hcd* (hidroksibutiril-CoA dehidrogenaza), “Not related genes” (geni, ki s potjo niso povezani) (Jung in sod., 2014). Organizacija *emc* operona *S. tsukubaensis* je podobna kot organizacija operona prikazana na sliki pri *S. coelicolor A3(2)*.

Sekundarni metabolizem streptomicet

Poleg primarnega metabolizma so streptomicete znane po raznovrstnem in kompleksnem sekundarnem metabolizmu, ki se navadno začne izražati v stacionarni fazi rasti kot navajajo Kieser in sod. (2000). Vloga sekundarnega metabolizma pri teh mikroorganizmih ni natačno poznana, kot možni funkciji se navajata medcelično signaliziranje in prednost pri tekmovanju z drugimi organizmi (Preglednica 1). Veliko število produktov sekundarnega metabolizma je medicinsko uporabnih, za številne pa biološke vloge še ne poznamo (Kieser in sod., 2000). Streptomicete proizvajajo veliko vrst sekundarnih metabolitov; kar polovica vseh sevov streptomicet naj bi proizvajala vsaj enega ali več od 500 antibiotikov, ki jih poznamo kot produkte sekundarnega metabolizma vrst rodu *Streptomyces* (Madigan in sod., 2009).

Med mikrobne sekundarne metabolite prištevamo številne antibiotike, pigmente, toksine, efektorje tekmovanja in simbioze v mikrobični ekologiji, feromone, encimske inhibitorje, imunomodulirajoče spojine in rastne promotorje živali in rastlin (Demain, 1998). Sekundarni metaboliti imajo velik vpliv na zdravje, prehrano in ekonomiko naše družbe.

Pogosto imajo nenavadne strukture, njihova sinteza pa je uravnavana s hranili, hitrostjo rasti, povratno zvezo, inaktivacijo in indukcijo encimov. Regulacija je pogosto kompleksna, nanjo pa vplivajo specifične nizko-molekularne spojine, prenašalna RNA, sigma faktorji in produkti genov, sintetizirani v pozni eksponencialni fazi (Demain, 1998).

Geni za sintezo sekundarnih metabolitov so navadno kodirani na kromosomalni DNA v skupinah. Redko jih kodira plazmidna DNA (Demain, 1998). Posamezna genska skupina navadno kodira vse potrebne encime metabolne poti, ki skupaj katalizirajo niz biokemijskih reakcij, ki vodijo do končnega produkta. Zaradi podobnosti poliketidov in aminokislinskih zaporedij proteinov, ki sodelujejo pri sintezi maščobnih kislin sklepajo, da so se poti sekundarnega metabolizma razvile s podvojitvijo in modifikacijo genov za primarni metabolizem (Madigan in sod., 2009).

Preglednica 1: Približno št. biološko aktivnih metabolitov glede na proizvodni organizem (Bérdy, 2005)

Vir (organizem)	Antibiotiki	Drugi bioaktivni metaboliti	Vsi bioaktivni metaboliti	Uporaba v humanu terapiji	Neaktivni metaboliti
Bakterije	2900	900	3900	10 – 12	3000 – 5000
Aktinomicete	8700	1400	10 100	100 – 120	5000 – 10 000
Glive	4900	3700	8600	30 – 35	20 000 – 25 000

2.2.4 Poliketidi

Poliketidi so obsežna skupina naravnih produktov, ki jih sintetizirajo streptomicete, pa tudi druge bakterije, glive in rastline. Med klinično pomembnejše prištevamo tetraciklinske protibakterijske učinkovine, protirakaste učinkovine antracicline (daunorubicin) in rapamicin, makrolide (eritromicin), učinkovine ki znižujejo krvni cholesterol (lovastatin) in mnoge druge medicinsko pomembne metabolite (Shen, 2003). Kljub strukturni raznolikosti so vsi poliketidi sintetizirani z zaporednimi reakcijami Claisenove kondenzacije. Gre za reakcijo med tioesterificiranimi derivati malonata, ki delujejo kot podaljševalne enote, in acilnimi tioestri, ki so rastoča veriga. Encime, ki katalizirajo dekarboksilativne kondenzacije, imenujemo poliketid sintaze, s kratico PKS. Zaradi podobnosti v sintezi maščobnih kislin in poliketidov za poimenovanje PKS uporabljamo nomenklaturo, ki izvira iz poimenovanja sintaz maščobnih kislin (Chan in sod., 2009).

2.3 PROTISMISELNA RNA

Protismiselna RNA tehnika deluje na principu vezave majhnih RNA - sRNA (angl. small RNA), poimenovanih tudi nekodirajoče RNA - ncRNA (angl. non-coding RNA), na komplementarno mRNA, pri čemer pride do prekinitve translacije, saj sRNA prepreči vezavo ribosoma. Prileganje sRNA na mRNA lahko vodi celo v razgradnjo RNA dupleksa z ribonukleazami (Rasmussen in sod., 2007).

2.3.1 Mehanizem delovanja protismiselne RNA

sRNA z dolžino 50-1000 nukleotidov kontrolirajo številne celične procese pri prokariontih. Večina do sedaj znanih bakterijskih sRNA deluje na nivoju post-transkripcijskega uravnavanja preko interakcije s 5'-vodilno regijo mRNA, s čimer spreminjajo stabilnost mRNA, ki se prevaja (Panek in sod., 2008). Za vezavo sRNA na tarčno mRNA je potrebna tudi vezava pomožnega proteina, šaperona Hfq. Ta naj bi povečal *in vivo* stabilnost molekul sRNA, saj naj bi jih zaščitil pred razgradnjo. Pri nekaterih organizmih imajo sRNA glavno regulatorno vlogo pri učinkovitosti translacije in stabilnosti mRNA (Man in sod., 2011).

sRNA uravnavajo številne celične procese v prokariontih: kontrolo kakovosti translacije, proteinsko inhibicijo, homeostazo železa, nastanek proteinov zunanje membrane, zaznavanje kvorum, metabolizem sladkorjev, preživetje v stacionarni fazи, virulenco in odgovor na stres. Način regulacije genov preko sRNA je med bakterijskimi vrstami zelo ohranjen. (Man in sod., 2011; Tezuka in sod., 2009). sRNA so identificirali tako v mikobakterijah kot v streptomictetah, kjer negativno vplivajo na rast, produkcijo sekundarnih metabolitov in virulenco (Arnvig in Young, 2009; D'Alia in sod., 2010). Očitna številčnost funkcionalnih sRNA v bakteriji *S. coelicolor* zelo verjetno odraža povečane potrebe te vrste po regulaciji (glede na njen nenavadno velik genom), prilagoditev različnim okoljem in virom hranil ter zelo raznovrsten sekundarni metabolizem, vključno z natančno usklajenimi potmi za produkcijo antibiotikov (D'Alia in sod., 2010).

2.3.2 Uporaba tehnologije protismiselne RNA

Male RNA v evkarijontih, kot npr. mikro RNA - miRNA (angl. micro RNA) in majhne interferenčne RNA - siRNA (angl. small interfering RNA), predstavljajo močno eksperimentalno tehniko za utišanje genskega izražanja tako v celičnih kulturah kakor v živih organizmih (Man in sod., 2011). Antisense tehniko za nižanje genskega izražanja so pred leti začeli uporabljati tudi pri streptomictetah in mikobakterijah (Lewin in sod., 2008; Sharbati in sod., 2009; Uguru in sod., 2013; Choi in sod., 2007; D'Alia in sod., 2010). V raziskavi so Lewin in sod. (2008) tehniko protismiselne RNA uporabili na patogeni bakteriji *Mycobacterium bovis*. Utišali so gensko izražanje mikobakterijskega DNA-vezavnega proteina I (MDP I). Oblikovali so protismiselno RNA dolžine 113 bp. V primerjavi s kontrolnim sevom so uspeli v mutantu znižati izražanje proteina MDP I za 50%. S tem so dosegli hitrejšo rast seva, višje koncentracije biomase v stacionarni fazи in povečano občutljivost na antibiotik ampicilin. V raziskavi so Uguru in sod. (2013) z uporabo protismiselne RNA uspešno znižali izražanje gena za aktinorodin in tako inhibirali produkcijo antibiotika. Raziskovalci Choi in sod. (2007), ki so raziskovali vlogo *sprC* gena pri *Streptomyces griseus*, ki kodira serinsko proteazo, so oblikovali protismiselno RNA v dolžini 1700 bp in znižali aktivnost kimotripsina na tretjino vrednosti kontrole. V članku

D`Alia in sod. (2010) so preučevali funkcijo *glnA* gena za glutamin sintazo I pri *S. coelicolor*, pri raziskavah so oblikovali protismiselno RNA dolžine 88 bp. Demonstrirali so znižanje proteinske sinteze, rasti in produkcije antibiotika undecilprodigiozina.

Tehnologija protismiselne RNA je še posebej uporabna v primerih, kjer bi bila inaktivacija gena letalna za celice, znižanje nivoja produkcije proteina pa celica še tolerira (Wilson, 1998). Inhibitorna učinkovitost protismiselne RNA tehnike je odvisna od različnih dejavnikov: dolžine in strukture, hitrosti vezave, znotrajcelične koncentracije in odpornosti proti razgradnji izbrane antisense molekule. Protismiselna RNA mora biti dolga vsaj 5 % dolžine gena in ciljati na start kodon ter Shine-Dalgarnovo sekvenco mRNA, mesto vezave ribosoma (Rasmussen in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

Laboratorijsko delo v okviru magistrskega dela je obsegalo več sklopov:

- **Bioinformatske metode**

S pomočjo bioinformatskih metod smo s programom BLAST (Altschul in sod., 1990; Wheeler in sod., 2007) na spletni strani NCBI (NCBI, 1988) identificirali ključne gene etilmalonil-CoA poti in glioksilatnega cikla pri *Streptomyces* sp. Osredotočili smo se predvsem na vrsto *S. tsukubaensis*, ki je primer bakterije, ki asimilira acetat po EMC poti, in *S. coelicolor*, pri kateri smo našli zapis za gene EMC in glioksilatne metabolne poti.

- **Molekularno-biološke, mikrobiološke ter analitske metode**

- a) *Streptomyces tsukubaensis*

Z uporabo molekularnih metod (PCR reakcija, restrikcija, ligacija, defosforilacija, transformacija) smo pripravili konstrukta pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* in pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*, ki vsebujejo zapis za protismiselno RNA encima izocitrat dehidrogenaze. Predhodno smo od sodelavcev prejeli plazmidne konstrukte pSET152+*PermE*+emcOp* in pSET152+*PermE*+iclOp*.

V mikrobiološkem sklopu smo omenjene konstrukte in potrebne kontrolne plazmide vnesli v izbrane seve *S. tsukubaensis* s konjugativnim prenosom. Po selekciji transformant smo posamezne kolonije testirali na minimalnem gojišču z acetatom, kot edinim virom ogljika. Ugotavljali smo morebitno povrnitev sposobnosti rasti.

V sevih *S. tsukubaensis* z vstavljenim zapisom za protismiselno RNA encima ICD smo vrednotili aktivnost izocitrat dehidrogenaze. S tem smo potrdili, da smo z vnosom zaporedja *antiICD* zmanjšali količino encima izocitrat dehidrogenaze v celici. Izbrane seve *S. tsukubaensis* smo namnožili in izolirali celične proteine. Z Bradford metodo smo izmerili koncentracijo proteinov in izvedli encimski test s komercialnim kitom.

- b) *Streptomyces coelicolor*

V drugem delu molekularnobiološkega sklopa smo pripravili plazmidni konstrukt za inaktivacijo *emc* operona v bakteriji *S. coelicolor*. Izvedli smo potrebne PCR reakcije in fragmente združili v plazmidni konstrukt pKC1139+emc del+ts s pomočjo Gibson reakcije.

Mikrobiološki sklop je zajemal konjugativni prenos konstrukta pKC1139+emc del+ts v izbrani sev *S. coelicolor* in selekcijo transformant. S postopkom subkultivacij smo dosegli integracijo plazmida v genom s homologno rekombinacijo. Iskali smo takšne kolonije, ki so del vgrajenega plazmida kasneje izgubile iz kromosoma. Mutante s prekinjenim *emc* operonom smo prepoznali preko njihovega profila antibiotske odpornosti, tiosstrepton odporne in apramicin občutljive. Prekinitev operona v pridobljenih mutantah smo potrdili z reakcijo PCR na osnovi kolonije in s sekvenciranjem.

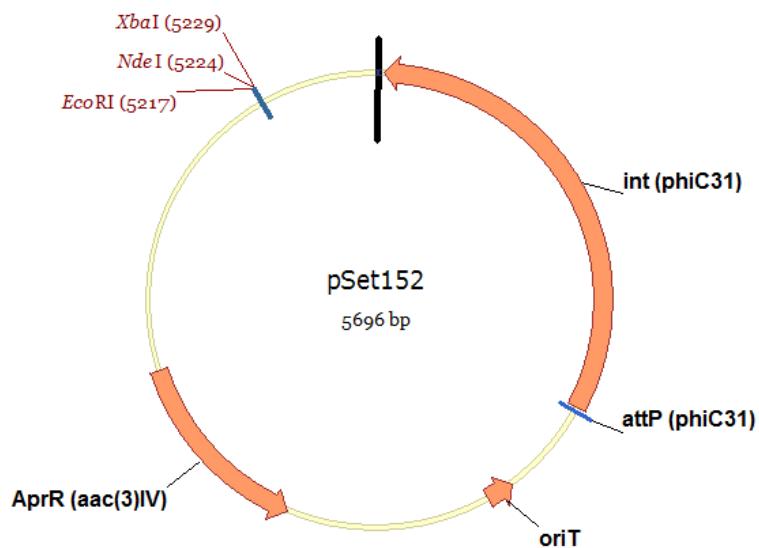
V analitskem sklopu smo pridobljeno mutanto in kontrolni sev testirali v tekočem minimalnem gojišču z glukozo in acetatom, kot edinim virom ogljika. S HPLC metodo smo spremljali porabo glukoze in acetata v gojišču.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Plazmidi

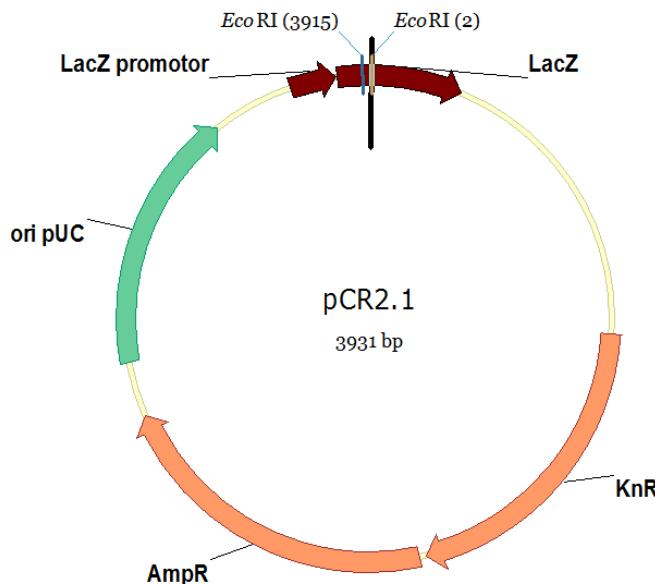
Pri molekularnobiološkem sklopu našega dela smo uporabljali plazmide pSET152 (Slika 8), pCR2.1 (Slika 9) in pKC1139 (Slika 10).

3.1.1.1 Plazmid pSET152



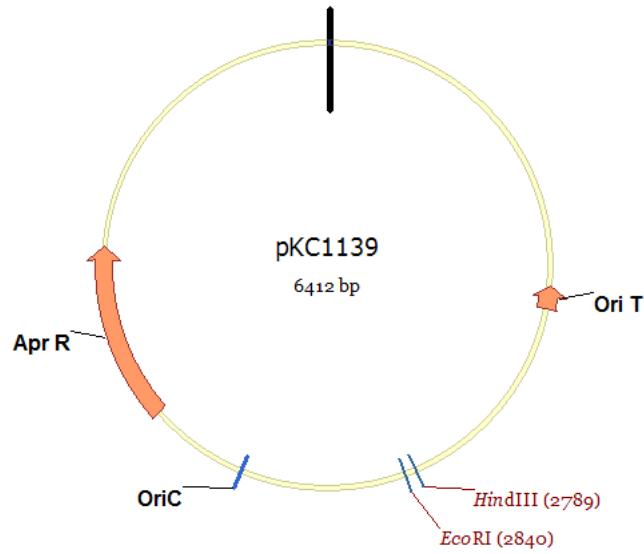
Slika 8: Shema osnovnega plazmida pSET152. *int* gen predstavlja integrago bakteriofaga Φ C31, ki omogoča integracijo plazmida v streptomicetni genom. *attP* označuje prepoznavno mesto za vstavitev v genom. *oriT* predstavlja odsek za replikacijo plazmida v *E. coli* celicah. Gen *aac(3)IV* omogoča rezistenco na antibiotik apramicin. Označena so tudi prepoznavna mesta za restrikcijske encime, ki se nahajajo v multiplem mestu za kloniranje (MCS).

3.1.1.2 Plazmid pCR2.1



Slika 9: Shema osnovnega plazmida pCR2.1. Vsebuje *ori pUC* mesto, ki označuje mesto začetka prenosa. Nosi zapis za dva gena, katerih produkti omogočajo rezistenco na kanamicin (KnR) in ampicilin (AmpR). *LacZ* predstavlja gen za β -galaktozidazo pod promotorjem *lacZ*, ki omogoča modro-beli test. Označeni sta tudi prepoznavni mesti za restriktijski encim *EcoRI*, ki se nahajata v multiplem mestu za kloniranje (MCS).

3.1.1.3 Plazmid pKC1139



Slika 10: Shema osnovnega plazmida pKC1139. Mesto *oriT* označuje odsek za replikacijo plazmida v *E. coli* celicah, *oriC* pa v streptomicetah. Rezistenco na antibiotik apramycin omogoča odsek AprR. Označena so tudi prepoznavna mesta za restriktijske encime, ki se nahajajo v multiplem mestu za kloniranje (MCS).

3.1.2 Oligonukleotidni začetniki

V PCR reakcijah (verižna reakcija s polimerazo) smo uporabljali oligonukleotidne začetnike proizvajalca Sigma-Aldrich, navedene v preglednici 2. Za oblikovanje začetnih oligonukleotidov smo uporabili orodje Primer-BLAST (Ye in sod., 2012). Določenim oligoukleotidom smo dodali restriktivna mesta za encim *XbaI* (TCTAGA) in *NdeI* (CATATG) – podprtano.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi. Vsa zaporedja so navedena od 5` - proti 3`-koncu.

Ime	Nukleotidno zaporedje	Namen
anti-icd Fw	TTTTT <u>TCTAGAGTCAAGCAATGTTGCA</u> GACGTGGAG	Pomnožitev zaporedja <i>antiICD</i>
anti-icd Rv	TTTTTT <u>CATATGCTTGTCGTAGCGGGC</u> GCGGA	Pomnožitev zaporedja <i>antiICD</i>
ecm-del leftHOM fw	TGISP4AACGACGGCCAGTGCCAAGCTT AGCGCGGCCGGCAGCCGAGC	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del leftHOM rv	TGATCCTCTAGGGTGTGCCTCCGGCG GTGAGCG	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del TS fw	GAGGCAACACCCTAGAGGATCAAGGC GAATAAC	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del TS rv	CTCCGCCGTCCCTAGAGGATCATCACT GACG	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del rightHOM fw	TGATCCTCTAGGGACGGCGGAGGCCAC ACATG	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del rightHOM rv	AAACAGCTATGACATGATTACGAATT GCCGGACTCGATCCGGGCC	Inaktivacija <i>emcOp</i>
ecm-del G 3	TACCTCAACAACGCGGTCAA	Potrditev inaktivacije <i>emcOp</i> , sekvenciranje
ecm-del G 5	CCTCCTTCAGCTTCTCCAGC	Potrditev inaktivacije <i>emcOp</i> , sekvenciranje
ecm-del G (ts) 5	CGCCTTGATCCTCTAGGGTG	Potrditev inaktivacije <i>emcOp</i>
ecm-del G (ccr) 5	ATGTTCCGGAAGCGGGTGAT	Potrditev inaktivacije <i>emcOp</i>

3.1.3 Mikroorganizmi

Pri delu smo uporabljali mikroorganizme, naštete v preglednicah 3, 4 in 5. Vir vseh sevov je podjetje Acies Bio d.o.o.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih sevov *E. coli*:

Vrsta	Tip
<i>E. coli</i> DH10β	Prilagojen sev za uporabo v molekularno bioloških laboratorijih
<i>E. coli</i> ET12567 + pUZ8002	Sev z okvarjenim sistemom za metilacijo in dodanim konjugativnim plazmidom pUZ8002

Preglednica 4: Seznam uporabljenih sevov *S. tsukubaensis*:

Vrsta	Tip
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	WT (divji tip)
<i>S. tsukubaensis</i> ΔemcOp	Sev z inaktiviranim <i>emc</i> operonom
<i>S. tsukubaensis</i> ΔemcOp + emcOp	Sev ΔemcOp z dodano konstitutivno izraženo kopijo <i>emc</i> operona
<i>S. tsukubaensis</i> ΔemcOp + iclOp	Sev ΔemcOp z dodano konstitutivno izraženo kopijo <i>icl</i> operona
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488 + antiICD	Sev WT z dodanim zaporedjem <i>antiICD</i>
<i>S. tsukubaensis</i> ΔemcOp + antiICD	Sev ΔemcOp z dodanim zaporedjem <i>antiICD</i>
<i>S. tsukubaensis</i> ΔemcOp + iclOp + antiICD	Sev ΔemcOp z dodano konstitutivno izraženo kopijo <i>icl</i> operona in zapisom za antisense RNA <i>icd</i>

Seva *S. tsukubaensis* WT in ΔemcOp (Kosec in sod., 2012) sta bila pripravljena v podjetu Acies Bio d.o.o. pred pričetkom magistrskega dela. Prav tako je bil pripravljen sev z dodano konstitutivno izraženo kopijo *emc* operona. Sev z dodano konstitutivno izraženo kopijo *icl* operona smo pripravili v okviru magistrskega dela. Prav tako smo pripravili sev z dodatno izraženo kopijo *icl* operona in zapisom za antisense RNA encima *icd*. Pripravili smo tudi vse potrebne kontrolne seve, ki v preglednici niso navedeni.

Preglednica 5: Seznam uporabljenih sevov *S. coelicolor*:

Vrsta	Tip
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	WT (divji tip)
<i>S. coelicolor</i> J801	Sev s prekinjenim genom za agarazo (<i>dagA</i> ⁻)
<i>S. coelicolor</i> ΔemcOp	Sev z inaktiviranim <i>emc</i> operonom

Sev *S. coelicolor* ΔemcOp smo pripravili v okviru magistrskega dela.

3.1.4 Gojišča

Gojišča smo pripravljali po naslednjem postopku:

Navedene sestavine smo zatehtali v čašo in dodali ustrezno količino destilirane vode. Če je bilo potrebno, smo umerili pH z dodatkom raztopin 1 M NaOH ali 1 M HCl. Tako pripravljeno gojišče smo z merilnim valjem ustrezno razdelili v steklenice (500 ali 1000 ml). Če smo pripravljali trda gojišča, smo v steklenice ločeno zatehtali agar. Avtoklavirali smo pri standardnih pogojih (121°C in 1,3 bar). Čas sterilizacije smo prilagodili tipu gojišča. Če smo pripravljali trdno gojišče smo po avtoklaviranju steklenice ohladili z mešanjem na magnetnem mešalu. Po potrebi smo pred razlivanjem dodali antibiotike v ustrezni koncentraciji, premešali in razlili na sterilne petrijeve plošče v brezprašni komori. Plošče smo posušili in jih hranili na sobni temperaturi. V primeru dodanih antibiotikov, smo plošče hranili na 4°C.

3.1.4.1 2TY (tryptone yeast extract medium)

2TY tekoče/trdno gojišče smo uporabljali za kultivacijo celic *E. coli* DH10β in ET12567.

Preglednica 6: Sestava 2TY gojišča (Sambrook in sod. 1989).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
Kazein pepton	16	Merck
Kvasni ekstrakt	10	Biolife
NaCl	5	Carlo Erba
Bakteriološki agar (za trdno gojišče)	20	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 20 minut.

3.1.4.2 MMAM

MMAM gojišče smo uporabili kot konjugacijsko gojišče za bakterijo *S. tsukubaensis*. Nanj smo nacepili konjugacijsko mešanico streptomicet in transformiranih celic *E. coli*.

Preglednica 7: Sestava MMAM gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
Koruzna namakalna vodica	5	Cargill Foods
Koruzni škrob	10	Cerestar
Kvasni ekstrakt	3	Biolife
CaCO ₃	3	Sigma
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,3	Merck
Bakteriološki agar	20	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 20 minut. pH 5,8.

3.1.4.3 SM (mannitol soya flour medium)

Trdno SM gojišče smo uporabljali za kultivacijo in sporulacijo bakterije *S. coelicolor*, ter pri konjugaciji s celicami *E. coli*.

Preglednica 8: Sestava SM gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
D-manitol	20	Carlo Erba
Sojina moka	20	Sigma – Aldrich
Bakteriološki agar	20	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 30 minut. pH 7,0.

*Po avtoklaviranju smo gojišču po potrebi dodali sterilno raztopino MgCl₂ (končna koncentracija v gojišču 100 mmol/l).

3.1.4.4 CRM

Tekoče CRM gojišče smo uporabljali za kultivacijo bakterije *S. coelicolor* pri namnoževanju za izolacijo genomske DNA ter pri postopku subkultivacij.

Preglednica 9: Sestava CRM gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
Glukoza	10	Kemika
Saharoza	103	Sigma – Aldrich
MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,12	Merck
TSB	15	Oxoid
Kvasni ekstrakt	5	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 15 minut.

3.1.4.5 MM (minimal medium)

Trdno MM gojišče smo uporabljali za preverjanje rasti streptomicot na acetatu, kot edinem virus ogljika.

Preglednica 10: Sestava MM gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	Sigma – Aldrich
K ₂ HPO ₄	0,5	Merck
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	Merck
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	Merck
Bakteriološki agar	10	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 15 minut.

**Po avtoklaviranju smo gojišču po potrebi dodali filtrirano raztopino natrijevega acetata (končna koncentracija v gojišču 2 g/l).

3.1.4.6 NMMB

Tekoče NMMB gojišče smo uporabili za preverjanje rasti streptomicet na acetatu, kot edinem viru ogljika.

Preglednica 11: Sestava NMMB gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	Sigma – Aldrich
K ₂ HPO ₄	0,5	Merck
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	Merck
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	Merck
NaH ₂ PO ₄ [12g/100ml]	6,25 ml/l	Merck
K ₂ HPO ₄ [17,4g/100ml]	8,75 ml/l	Merck
Destilirana voda	do 1 l	

*Bakteriološki agar smo dodali, če smo pripravljali trdno gojišče.

*Čas sterilizacije je bil 15 minut. pH 6,8.

3.1.4.7 NMMP

Tekoče NMMP gojišče smo uporabili za namnoževanje sevov *S. tsukubaensis* z namenom merjenje aktivnosti encima ICD.

Preglednica 12: Sestava NMMP gojišča (Kieser in sod., 2000).

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	Sigma – Aldrich
K ₂ HPO ₄	0,5	Merck
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	Merck
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	Merck
NaH ₂ PO ₄ [12g/100ml]	6,25 ml/l	Merck
K ₂ HPO ₄ [17,4g/100ml]	8,75 ml/l	Merck
PEG 4000	50	Sigma – Aldrich
Kazamino kisline	5	Becton Dickinson
Glukoza	5	Kemika
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 15 minut. pH 6,8.

3.1.4.8 ISP4

Trdno ISP4 gojišče (Atlas in Kelly, 2004) smo uporabljali za kultivacijo in sporulacijo bakterije *S. tsukubaensis*.

Preglednica 13: Sestava ISP4 gojišča.

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
Topni škrop	10	Merck
CaCO ₃	2	Sigma – Aldrich
K ₂ HPO ₄	1	Merck

NaCl	1	Carlo Erba
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	Sigma – Aldrich
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1	Merck
Mineralna raztopina (tabela)**	1 ml	
Bakteriološki agar	20	Biolife
Destilirana voda	do 1 l	

*Čas sterilizacije je bil 20 minut. pH 7,0.

**Preglednica 14: Sestava mineralne raztopine za ISP4 gojišče.

Sestavine	Količina (g)	Proizvajalec
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	Merck
MnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	Fluka
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	Merck
Destilirana voda	do 100 ml	

3.1.5 Encimi

Preglednica 15: Seznam uporabljenih encimov.

Encim	Uporaba	Proizvajalec
Phusion DNA polimeraza	PCR reakcije	Thermo Scientific
DreamTaq DNA polimeraza	Dodajanje A-repkov, PCR reakcije	Thermo Scientific
Restriktični encimi FD	Restriktične reakcije	Thermo Scientific
T4 DNA ligaza	Ligazne reakcije	Thermo Scientific
FastAP fosfataza	Reakcije defosforilacije	Thermo Scientific

3.1.6 Antibiotiki

Preglednica 16: Seznam uporabljenih antibiotikov in ustrezne koncentracije.

Antibiotik	Koncentracija v gojišču (µg/ml)	Uporaba
Ampicilin	100	Selekcija <i>E. coli</i> DH10β s prejetim plazmidom pCR2.1
Apramicin	50	Selekcija <i>E. coli</i> DH10β in streptomicot s prejetim plazmidom pSET152 in pKC1139
Kanamicin	25	Selekcija <i>E. coli</i> ET12567
Kloramfenikol	10	Selekcija <i>E. coli</i> ET12567 s konjugativnim plazmidom pUZ8002
Nalidinska kislina	25	Selekcija streptomicot
Tiostrepton	30	Selekcija streptomicot s prekinjenim <i>emc</i> operonom

*Raztopine antibiotikov smo pred uporabo filtrirali.

3.1.7 Pufrske raztopine

Preglednica 17: Seznam uporabljenih pufrov.

Pufer	Uporaba	Proizvajalec
5x Phusion GC pufer	PCR reakcije s Phusion polimerazo	Thermo Scientific
10x DreamTaq pufer	Dodajanje A-repkov, PCR reakcije z DreamTaq polimerazo	Thermo Scientific
FD Green pufer	Restriktijske reakcije s FD encimi	Thermo Scientific
10x T4 DNA ligazni pufer	Ligazne reakcije s T4 DNA ligazo	Thermo Scientific
10x FastAP pufer	Reakcije defosforilacije s FastAP fosfatazo	Thermo Scientific
6x LD DNA nanašalni pufer	Agarozna gelska elektroforeza	Thermo Scientific
50x TAE pufer	Agarozna gelska elektroforeza	
Fosfatni pufer za spiranje	Merjenje aktivnosti ICD	
Pufer za vzorce	Merjenje aktivnosti ICD	

Sestava 0,5 M založne raztopine EDTA:

- 146,1 g EDTA
- destilirana voda do 1 l

Sestava 50x TAE pufra (tris acetatni pufer z EDTA):

- 242 g TRIS baza
- 57,1 mL ledenoocetna kislina
- 100 ml 0,5 M EDTA
- destilirana voda do 1 l

Sestava 0,2 M fosfatnega pufra za spiranje:

- 17,81 g Na₂HPO₄ / do 500 ml dH₂O
- 13,80 g NaH₂PO₄ / do 500 ml dH₂O
- raztopino NaH₂PO₄ dodamo v raztopino Na₂HPO₄ do pH 7,5

Sestava pufra za vzorce:

- 25 ml 0,2 M fosfatnega pufra (končna koncentracija: 100 mM)
- 5 ml 0,2 M EDTA (končna koncentracija: 20 mM)
- 1 ml 0,1 M PMSF/etanol (končna koncentracija: 2 mM)
- destilirana voda do 50 ml

3.1.8 Ostali reagenti in raztopine

- SYBR® safe gel stain (Invitrogen),
barvilo za garozne gele
- ATP (New England Biolabs)
- dNTP (New England Biolabs)
- DMSO (Thermo Scientific)
- nuclease-free water (Thermo Scientific),
destilirana voda brez nukleaz
- Bradford reagent (Sigma – Aldrich)
- 20 % glicerol
- IPTG (Sigma – Aldrich)
- X-gal (Sigma – Aldrich)

Za ugotavljanje velikost fragmentov na agaroznih elektroforeznih gelih smo uporabili DNA velikosti standard »Gene Ruler TM DNA Ladder Mix« podjetja Thermo Scientific (Priloga A)

3.1.9 Komercialni kiti

- GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma – Aldrich),
kit za izolacijo plazmidne DNA
- GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma – Aldrich),
kit za izolacijo bakterijske genomske DNA
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega),
kit za čiščenje PCR pomnožkov ter čiščenje DNA iz agaroznega gela
- NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs),
kit za sestavljanje multiplih fragmentov DNA
- IDH Activity Assay Kit (Sigma – Aldrich),
kit za merjenje aktivnosti encima izocitrat dehidrogenaze

3.1.10 Laboratorijske aparature in oprema

- analitska tehnica (Kern)
- aparatura za izvajanje agarozne gelske elektroforeze (Bio-Rad)
- aparatura za slikanje elektroforeznih gelov (Bio-Rad)
- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezpršna komora (Iskra pio)
- centrifuge (Hettich)
- digestorij (Med-Lab)

- elektroporator (Bio-Rad)
- hladilnik, 4°C (LTH)
- HPLC aparatura (Thermo Separation Products)
- inkubator za streptomicete, 28°C in 30°C (Sutjeska)
- inkubator za *E. coli*, 37°C (Sutjeska)
- magnetna mešala (Uniequip, Tehnica)
- mikrovalovna pečica (Gorenje)
- pH meter (Uniequip)
- PCR naprava (Biometrika)
- spektrofotometer (Tecan)
- stresalniki (Infors ht, Labnet)
- tehtnica (Kern)
- ultrazvočni razbijjalnik (Sartorius)
- vodna kopel (Grant)
- vrtinčnik (Ika)
- zamrzovalna omara, -20°C (LTH, Beko)
- zamrzovalna skrinja, -80°C (Heto)

3.1.11 Laboratorijska steklovina in potrošni material

- centrifugirke (15 ml, 50 ml)
- erlenmajerice
- elektroporacijske kivete
- filtri
- koncentrator Sartorius Vivaspin (MWCO: 10 kDa)
- krioviale
- luknjači za agar plošče
- magneti za mešanje
- mikrocentrifugirke (1,5 ml, 2 ml)
- mikrotitrskie plošče
- merilne čaše
- merilni valji
- nastavki za pipete
- petrijeve plošče
- plinski gorilnik
- razmazovalne palčke
- steklenice z zamaškom
- sterilni zobotrebci in vatirane palčke

3.2 METODE

Prvi sklop našega dela je predstavljala bioinformatska analiza sevov streptomicet *S. tsukubaensis* in *S. coelicolor* ter načrtovanje plazmidnih konstruktov, ki jih bomo potrebovali pri našem delu. V drugem sklopu smo z molekularnobiološkimi metodami pripravili potrebne plazmide in jih z metodo konjugacije vnesli v izbrani sev *S. tsukubaensis* oziroma *S. coelicolor*. Kot tretji sklop, smo selekcionirane konjugante testirali za sposobnost rasti na acetatu, kot edinem viru ogljika. Glede na rezultate tretjega sklopa smo pripravili načrt nadaljnega dela in se vrnili nazaj na prvi sklop. Delo je najprej potekalo na bakteriji *S. tsukubaensis*, po izvedenih poskusih in zbranih rezultatih smo delo nadaljevali na bakteriji *S. coelicolor*.

3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo, znana tudi pod angleško kratico PCR. Je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Kopiranje poteka tako, da uporabimo dva začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna začetnemu in končnemu odseku DNA, ki ga želimo prepisati. Reakcija poteka verižno, pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. Deluje na osnovi denaturacije dvoverižne matrične DNA, sledi vezava specifičnih začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje verige DNA. Z metodo lahko pomnožimo zaporedje specifičnega gena oziroma preverimo integracijo kasete/plazmidnega konstrukta v genom.

Primer reakcijske mešanice (50 µl):

- 27 µl dH₂O
- 10 µl 5x GC pufer
- 5 µl 20 mM dNTP
- 2,5 µl 10 mM začetni oligonukleotid 1
- 2,5 µl 10 mM začetni oligonukleotid 2
- 1,5 µl DMSO
- 1 µl matrike (npr. genomska DNA, 50 – 250 ng)
- 0,5 µl polimeraze Phusion (1 U)

Reakcijski cikel:

Preglednica 18: Potek PCR reakcije.

Temperatura (°C)	Čas (minute)	Število ciklov	Namen
98	2:00	1	Začetna denaturacija
98	0:15		Denaturacija
Tm*	0:30	35	Vezava začetnih oligonukleotidov
72	t**		Podaljševanje verig DNA
72	10:00	1	Končno podaljševanje
4	-	1	Zadrževanje

*Temperatura vezave je odvisna od temperature tališča oligonukleotidov.

** Čas podvojevanja je odvisen od dolžine pomnožka.

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je standardna metoda v molekularni biologiji, ki se uporablja za ločevanje molekul nukleinskih kislin glede na njihovo velikost. To dosežemo s premikanjem negativno nabitih molekul DNA/RNA skozi agarozni gel v električnem polju. Krajše molekule se premikajo hitreje, ker se lažje prebijajo skozi pore v gelu in posledično pripotujejo dlje kot daljše molekule.

Metodo smo uporabili za ločevanje in izolacijo PCR produktov, pri restriktijskih analizah pridobljenih plazmidov in za določanje koncentracij DNA.

Za analize DNA fragmentov na elektroforezi smo uporabili 0,8% agarozni gel. Zatehtali smo ustrezno količino agaroze in dodali 1x TAE pufer ter segrevali v mikrovalovni pečici dokler se ni agara popolnoma raztopila. Mešanici smo dodali barvilo SYBR® Safe DNA gel stain, in vlili v stojalo za gel s pripravljenim glavničkom. Ko se je gel strdil smo prenesli v elektroforezno banjico z 1x TAE pufom in odstranili glavniček. PCR produktom je bilo potrebno pred nanosom na gel dodati še nanašalni pufer, ki je DNA obtežil, da se le ta usede na dno jamice. Dodali smo tudi velikostni standard, ki nam omogoča določitev velikosti našega produkta. Banjico smo priključili na električno napetost (90 V) in tok pustili teči približno 45 minut. Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV lučjo in ga fotografirali, po potrebi smo produkt tudi izrezali ter izolirali. V slednjem primeru smo za slikanje uporabili ustrezni filter, da smo DNA zaščitili pred UV svetlobo.

3.2.3 Transformacija

Transformacija je sprejem in vključitev proste DNA v genom prejemnika, v našem primeru gre za vnos DNA v bakterijo *E. coli*. Celicam, ki so sposobne sprejeti DNA iz okolja, pravimo kompetentne. Transformacijo bakterij *E. coli* smo izvedli s postopkom elektroporacije po standardnih metodah (Sambrook in sod., 2001).

Pred začetkom postopka smo si pripravili mikrocentrifugirke z 1 ml medija 2TY. Predhodno pripravljene elektrokompetentne celice so bile shranjene pri -80°C. Elektrokompetentnim celicam *E. coli* (40 µl) smo dodali 1 µl plazmida oz. 2 µl ligaijske mešanice, resuspendirali, prenesli v elektroporacijsko kiveto in jih izpostavili električnemu pulzu (2 kV, 600 Ω, 25 µF). Električni pulz v membrane povzroči tvorbo por, kar omogoča prevzem DNA v celice *E. coli*. Potem smo celice resuspendirali v predpripravljenem gojišču 2TY in jih 45 minut inkubirali v vodni kopeli pri 37°C.

Po inkubaciji smo celice centrifugirali (5000 rpm, 4 minute), odstranili večino supernatanta in jih resuspendirali v preostanku. Suspenzijo smo nacepili na 2TY plošče z ustreznimi antibiotiki, ki omogočajo selekcijo celic, ki so sprejele želeni plazmid, ter inkubirali na 37°C čez noč.

3.2.3.1 Modro-beli test

V primeru transformacije plazmidnega konstrukta na osnovi pCR2.1 smo suspenzijo nacepili na 2TY plošče z ustreznim antibiotikom (kanamicin ali ampicilin) in raztopino X-gal in IPTG. Tako pripravljeno selekcijsko gojišče omogoča izvedbo modro-belega testa. Antibiotik omogoča selekcijo celic *E. coli*, ki so sprejele plazmid pCR2.1. X-gal smo uporabili za vizualno prepoznavanje celic *E. coli*, ki so sprejele plazmid pCR2.1 z insertom. Vstavitev inserta v plazmid prekine gen *lacZ*, ki kodira encim β-galaktozidazo. Encim tako ne nastaja, posledično ni reakcije s substratom X-gal, katere produkt so modro obarvane kolonije. Celice, ki so sprejele plazmid pCR2.1 z insertom ostanejo belo obarvane. Raztopina IPTG-ja inducira transkripcijo gena za β-galaktozidazo in omogoča morebitno reakcijo.

3.2.4 Priprava plazmidov

3.2.4.1 Izolacija plazmidov

Plazmide smo izolirali iz celic *E. coli* DH10β, transformiranih z željenim konstruktom. Iz ustreznih 2TY trdnih gojišč smo kolonije prenesli v sterilne 50 mL centrifugirke s tekočim 2TY gojiščem. Dodali smo ustrezen antibiotik ter preko noči inkubirali na stresalniku pri temperaturi 37°C in 220 obr./min. Zrasle kolonije smo uporabili za izolacijo njihovih plazmidov. Izolacija je potekala s komercialnim kitom (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit). Tako izolirane plazmide smo raztopili v priloženi elucijski raztopini (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) in shranili na -20°C.

3.2.4.2 Restrikcija

Po izolaciji smo ustreznost plazmidov preverili z restrikcijo. Restrikcijsko mešanico smo naredili po naslednjem protokolu ter inkubirali 30 minut na 37°C. Nato smo mešanico nanesli na elektroforezni gel. Restrikcije smo izvajali tudi pri pripravi vektorja in inserta za ligacijo. Mešanico smo pripravili po podobnem protokolu ter inkubirali 2 uri na 37°C.

Sestava restrikcijske mešanice (preverjanje plazmidov):

- 5,6 µl dH₂O brez nukleaz
- 1 µl restrikcijskega pufra
- 0,4 µl restrikcijskega encima (0,4 U)
- 3 µl plazmida (do 0,4 µg DNA)

Sestava restrikcijske mešanice (priprava vektorja in inserta):

- 42 µl vektorja/inserta (do 3 µg DNA)
- 5 µl restrikcijskega pufra
- 3 µl restrikcijskega encima (3 U)

3.2.4.3 Ligacija

Metodo ligacije smo uporabili za vstavljanje DNA insertov v plazmidne vektorje. Pripravili smo ligacijsko mešanico in jo čez noč inkubirali na 4°C.

Sestava ligacijske mešanice:

- 11,5 µl inserta (molarno razmerje insert:vektor do 5:1)
- 1,5 µl plazmidnega vektorja (20 – 100 ng)
- 1,5 µl ligaznega pufra
- 0,5 µl ligaze (0,5 U)

3.2.4.4 Dodajanje A-repkov in kloniranje v vektor pCR2.1

Ko smo želeli fragment po PCR reakciji klonirati v vektor pCR2.1 smo izvedli reakcijo dodajanje A-repkov. Vektor je del komercialnega kita TA Cloning® Kit, ki omogoča enostopenjsko kloniranje inserta v plazmidni vektor pCR2.1. Vektor je lineariziran in ima na obeh koncih dodan enojni ostanek 3` deoksitrimina (T), kar omogoča lepljenje z inserti, ki imajo na koncih dodane ostanke 3` deoksiadenozina (A) – dodani so A-repki. Takšne inserte pripravimo z uporabo Dream Taq polimeraze, katere sposobnost je dodajanje enojnih deoksiadenozinov na 3` konec PCR produkta. Štrleči komplementarni konci vektorja in inserta omogočajo visoko uspešnost ligacije.

Sestava mešanice za dodajanje A-repkov:

- 40 µl inserta (10 – 100 ng DNA)
- 5 µl 5x Dream Taq pufra
- 4 µl 20 mM dNTP
- 1 µl polimeraze Dream Taq (5 U)

Mešanico za dodajanje A-repkov na fragment smo inkubirali 30 minut na 72°C v napravi z PCR. Po končani reakciji smo mešanico očistili čez kolono s komercialnim kitom (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System). S pridobljenim fragmentom in vektorjem pCR2.1 smo pripravili ligacijsko mešanico in jo inkubirali na 4°C čez noč.

3.2.4.5 Defosforilacija

Z metodo defosforilacije smo s koncev vektorske DNA odstranili fosfatne skupine. S tem smo preprečili, da bi se rezan vektor zalepil sam s seboj (in ne z insertom). Mešanico smo 20 minut inkubirali na 37°C in nato očistili čez kolono s komercialnim kitom (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System). Tako pripravljen vektor je bil pripravljen za ligacijo s fosforiliranim insertom.

Sestava defosforilacijske mešanice:

- 40 µl vektorja (3 µg)
- 4,8 µl pufra za fosfatazo FastAP
- 3 µl fosfataze FastAP (3 U)

3.2.4.6 Gibson reakcija

Gibson reakcija omogoča enostavno sestavljanje konstruktov brez metod klasičnega kloniranja. Je visoko učinkovita metoda sestavljanja, ki jo uporabimo, ko želimo združiti več linearnih fragmentov DNA (od 2 – 6). Deluje na principu prekrivajočih nukleotidov (15 – 80 bp) na koncih fragmentov. V mešanici je T5 eksonukleaza, ki ustvari 3' štrleče konce, kar omogoča naleganje komplementarnih fragmentov. DNA polimeraza doda manjkajoče nukleotide, DNA ligaza pa zapolni zarez (Gibson in sod., 2009).

Reakcijo smo izvedli s komercialnim kitom (NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit). Pred izvedbo reakcije je bilo potrebno skonstruirati začetne oligonukleotide, ki so vsebovali prekrivajoče nukleotide. To smo naredili s pomočjo orodja NEBuilder® Assembly Tool (NEB, 2015). Želene odseke DNA smo pomnožili z metodo PCR, vektor pa smo rezali s predhodno izbranimi restriktionskimi encimi. Pripravili smo mešanico za Gibson reakcijo in jo inkubirali 1 uro pri 50°C. Priporočena koncentracija DNA vektorja je 50 – 100 ng, optimalno molarno razmerje vektorja in inserta je 1:1 (velja v primerih, ko

sestavljam 4 ali več fragmentov). Z mešanico smo nato transformirali elektrokompetentne celice *E. coli* DH10 β .

Primer sestava mešanice za Gibson reakcijo:

- 1 μ l fragment 1 (vektor)
- 3 μ l fragment 2 (insert)
- 3 μ l fragment 3 (insert)
- 3 μ l fragment 4 (insert)
- 10 μ l 2x NEBuilder HiHi DNA Assembly Master Mix mešanice

3.2.5 Priprava spor

Spore smo hranili na -20°C v 20% raztopini glicerola. Pri nacepljanju za spore smo pripravili redčitev 10^{-1} v sterilni dH₂O. Po 100 μ l redčitve smo prenesli na plošče SM (*S. coelicolor*) ali ISP4 (*S. tsukubaensis*) in konfluentno razmazali z razmazovalno palčko. Plošče smo v laminariju posušili in inkubirali pri ustrezni temperaturi. Plošče s sporami *S. tsukubaensis* smo inkubirali 2 tedna na 28°C, plošče s sporami *S. coelicolor* pa 1 teden na 30°C. Po pretečenem času smo na ploščo dali 2 ml 20 % glicerola in z vatirano palčko postrgali spore iz plošče. Po potrebi smo spore tudi homogenizirali. Tako pripravljene smo prenesli v krioviale in hranili na -20°C do uporabe.

3.2.6 Konjugacija

Konjugacija je prenos plazmidne DNA med dvema bakterijama, ki sta v neposrednem celičnem stiku. Je tehnika, ki nam omogoča, da plazmide konstruiramo v prilagodljivih celicah, ko so celice bakterije *E. coli* in jih nato prenesemo v želen organizem, npr. v streptomiceto. Stik in prenos omogočajo strukture bakterije *E. coli*, ki se imenujejo pili. Postopek je bil izведен glede na navodila priročnika »Practical Streptomyces Genetics« (Kieser in sod., 2000).

Plazmid pSET152 je konjugativni plazmid, ki vsebuje gen za integrazo iz bakteriofaga ΦC31 in *attP* mesto, ki predstavlja mesto na plazmidu, kjer se zgodi integracija. Vsebuje tudi multiplo mesto za kloniranje (MCS), mesto za začetek prenosa (*oriT*) in rezistenco proti apramicinu (Bierman in sod., 1992). Naštete lastnosti omogočajo integracijo plazmida na mesto *attB* v streptomicetnem kromosomu. Mesto *attB* predstavlja zaporedje iz bakteriofaga ΦC31, ki ima sposobnost vključitve v genom na večih mestih. ΦC31 integraza katalizira mestno-specifično rekombinacijo med kromosomalnim *attB* in *attP* mestom na plazmidu, oblikujeta se mesti *attL* in *attR* (Sioud in sod., 2009). ΦC31 integraza spada v družino serinskih rekombinaz in se močno razlikuje od integraz iz družine λ. Mesti *attB* in *attP* integraze ΦC31 sta zelo kratki, 34 in 39 bp. Prav tako ΦC31

integraza ne potrebuje pomožnih faktorjev za integracijo. Integrazi Φ C31 in λ se razlikujeta tudi po mehanizmu rekombinacije (Combes in sod., 2002).

Promotor *PermE** (*PermE* star) smo izbrali, saj je zelo močen konstitutivni promotor iz organizma *S. erythraea*. Promotor *PermE** nima regulacije in dovoljuje nenehno transkripcijo povezanega gena. Velja za enega najmočnejših konstitutivnih promotorjev, ki se uporablajo za nativno in heterologno gensko izražanje v streptomicetah in drugih taksonomsko sorodnih bakterijah (Bibb in sod., 1985; Magdevska in sod., 2010). Promotor smo uporabili v dveh različicah. Z vezavnim mestom za ribosom (*PermE**) in brez vezavnega mesta za ribosom (*PermE*(bRBS)*), ko je bilo to potrebno.

3.2.6.1 Priprava plazmidne DNA in celic za konjugacijo

Željeni plazmid smo predhodno transformirali v celice *E. coli* ET12567 s pomožnim plazmidom pUZ8002. Mešanico smo razmazali na trdno 2TY gojišče z antibiotiki Apr+Cm+Kn. Apramicin omogoča selekcijo celic, ki so sprejele naš plazmid (pSET152 ali pKC1139), rezistanca proti kloramfenikolu je prisotna v genomu seva ET12567, rezistenco proti kanamicinu pa nosi konjugativni plazmid pUZ8002. Naslednji dan smo transformirane kolonije sterilno prenesli v 50 ml centrifugirko s 5 ml tekočega 2TY gojišča (z dodanimi antibiotiki). Preko noči smo kultivirali na stresalniku pri 37°C in 220 rpm.

Naslednje jutro smo kulturo precepili v 50 ml centrifugirko z 20 ml tekočega 2TY gojišča (z dodanimi antibiotiki). Kultivirali smo na stresalniku pri 37°C in 220 rpm. Tekom rasti celic smo merili absorbanco pri valovni dolžini 600 nm do OD vrednosti 0,4 – 0,6. Ko so celice v eksponentni fazi rasti, je konjugacija najbolj učinkovita (Kieser in sod., 2000).

3.2.6.2 Postopek konjugacije

Priprava celic *E. coli*

- centrifugirke s celicami smo centrifugirali 10 min pri 4000 rpm
- celice smo 2x sprali z 10 ml 2TY gojišča
- na koncu smo celice resuspendirali v 1 ml 2TY gojišča, tako da smo dobili štirikrat po 250 µl suspenzije celic na konjugacijo

Priprava spor *S. tsukubaensis/S. coelicolor*

- spore smo centrifugirali 2 min pri 8000 rpm v mikrocentrifugirki
- spore smo 2x sprali z 1 ml 2TY gojišča
- spore smo resuspendirali v 400 µl 2TY (100 µl suspenzije spor na konjugacijo)
- spore smo izpostavili vročinskemu šoku – 10 min smo jih segrevali na 50°C, nato pa ohladili na ledu

Združili smo 250 µl suspenzije celic *E. coli* in 100 µl suspenzije spor ter jih razmazali na trdno MMAM (*S. tsukubaensis*) ali SM MgCl₂ (*S. coelicolor*) gojišče. Pri konjugaciji z bakterijo *S. coelicolor* smo zaradi visoke uspešnosti metode pripravili tudi redčitve mešanice celic *E. coli* in spor. V gojišču 2TY smo pripravili redčitveno vrsto od 10⁻¹ do 10⁻⁴ in redčitve nacepili na plošče SM MgCl₂. Plošče smo inkubirali čez noč pri 28°C (*S. tsukubaensis*) ali 30°C (*S. coelicolor*).

V primeru konjugacije z bakterijo *S. tsukubaensis* smo plošče naslednje jutro prelili z nalidinsko kislino, jih do večera prestavili nazaj v inkubator in zvečer prelili še z apramicinom. Selekcija z apramicinom je omogočila rast le tistim sporam, ki so sprejeli želeni plazmid. Pripravili smo tudi kontrolno ploščo, na katero smo nacepili le spore *S. tsukubaensis* in prelili z apramicinom. Če na kontrolni plošči ni bilo kolonij, pomeni, da je bila konjugacija pravilno izvedena. Plošče smo inkubirali pri 28°C 7 – 14 dni in spremljali rast kolonij – konjugant.

V primeru konjugacije z bakterijo *S. coelicolor* smo plošče zjutraj prelili z nalidinsko kislino. Ko so se plošče posušile pa smo jih takoj prelili še z apramicinom. Nadaljnji koraki so bili isti, kot pri konjugaciji z bakterijo *S. tsukubaensis*, le da smo plošče inkubirali pri 30°C 7 dni.

3.2.7 Selekcija konjugant na trdnih gojiščih

Na MMAM/SM MgCl₂ ploščah so prve streptomacetne kolonije vidne nekaj dni po konjugaciji, po tednu dni pa začenjo tudi sporulirati in takrat smo posamezne kolonije prenesli na sveže gojišče z dodanimi antibiotiki.

S. tsukubaensis

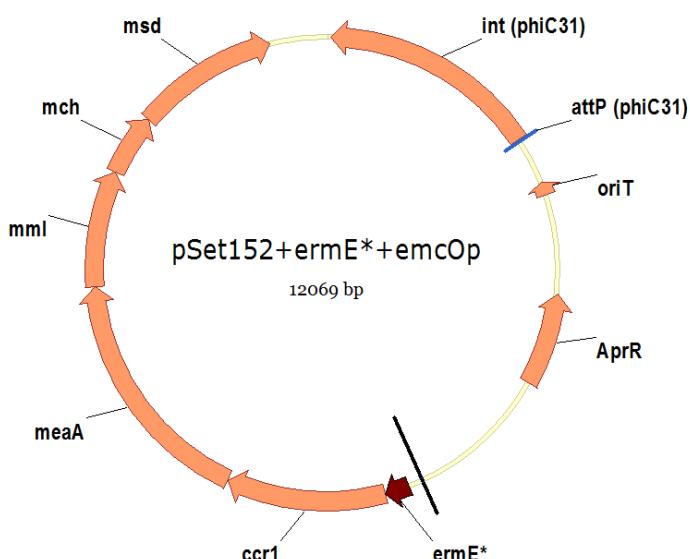
Po tednu dni smo posamezne konjugante prenesli na sveže ISP4 gojišče z dodanim antibiotikom apramicinom in nalidinsko kislino. Plošče smo inkubirali pri 28°C, dokler niso precepljene kolonije sporulirale (10 – 14 dni). Te kolonije smo nato zopet prenesli na sveže ISP4 gojišče z dodanim apramicinom. Po približno 10 dneh so bile kolonije pripravljeni za nadaljnje delo (shranjevanje spor oz. postopek subkultivacije).

S. coelicolor

Po nekaj dneh smo konjugante prenesli na sveže SM gojišče z dodanim antibiotikom apramicinom in nalidinsko kislino. Plošče smo inkubirali pri 30°C, dokler niso precepljene kolonije sporulirale (7 dni). Te kolonije smo nato zopet prenesli na sveže SM gojišče z dodanim apramicinom. Po 7 dneh so bile kolonije pripravljeni za nadaljnje delo.

3.2.8 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+emcOp

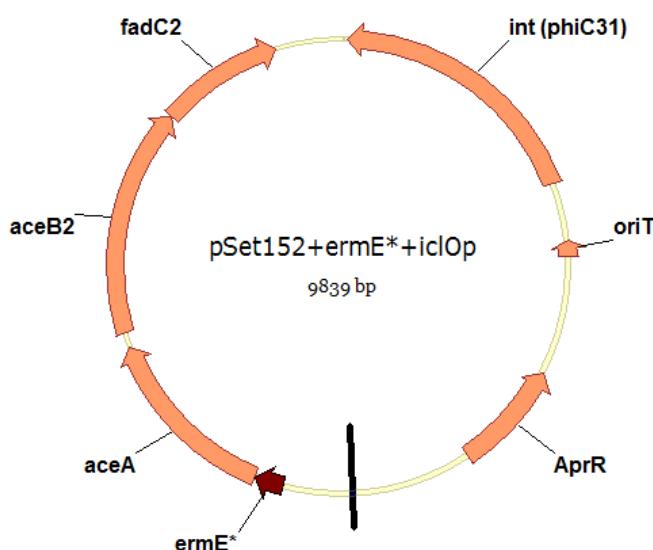
V sev $\Delta emcOp$ smo vnesli dodatno kopijo konstitutivno izraženega *emc* operona, ki je vseboval vseh 5 genov EMC metabolne poti pod promotorjem *PermE** (Slika 11). Sevu naj bi tako povrnili sposobnost rasti na acetatu. Konstrukt je bil pripravljen v okviru tekočega projekta (Blažič in sod., 2015), prav tako so bili pripravljeni sevi *S. tsukubaensis* WT + pSET152+PermE*+emcOp in *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ + pSET152+PermE*+emcOp. Pripravljena sta bila tudi ustreznna kontrolna seva (WT in $\Delta emcOp$), ki sta vsebovala le osnovni plazmid pSET152+PermE* brez *emc* operona. Pridobljena seva sta služila kot kontrola, da smo dokazali, da na rezultate vpliva vneseni konstrukt (*emc* operon) in ne plazmid sam. Omenjene seve smo testirali za rast na acetatu, kot edinem viru ogljika.



Slika 11: Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+emcOp. Geni *ccr1*, *meaA*, *mml*, *mch* in *msd* predstavljajo ključne gene EMC metabolne poti in so postavljeni pod močan konstitutivni promotor *PermE**. Odsek *AprR* omogoča rezistenco na apramicin, s čimer je omogočena selekcija konjugant.

3.2.9 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp in prenos v *S. tsukubaensis* s pomočjo konjugacije z *E. coli*

Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp (Slika 12) smo konjugirali v sev *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$. Plazmid smo transformirali v celice *E. coli* ET12567/pUZ8002 in izvedli postopek konjugacije z *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ (3.2.6). Pridobljene konjugante so bile nato pripravljenе za testiranje rasti na minimalnem gojišču z acetatom, kot opisano (3.2.12).



Slika 12: Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp. Gena *aceA* in *aceB2* predstavljata ključna gena glioksilatne poti, v istem operonu pa se nahaja tudi gen *fadC2*. Geni so postavljeni pod močan konstitutivni promotor *PermE**. Odsek *AprR* omogoča rezistenco na apramicin, s čimer je omogočena selekcija konjugant.

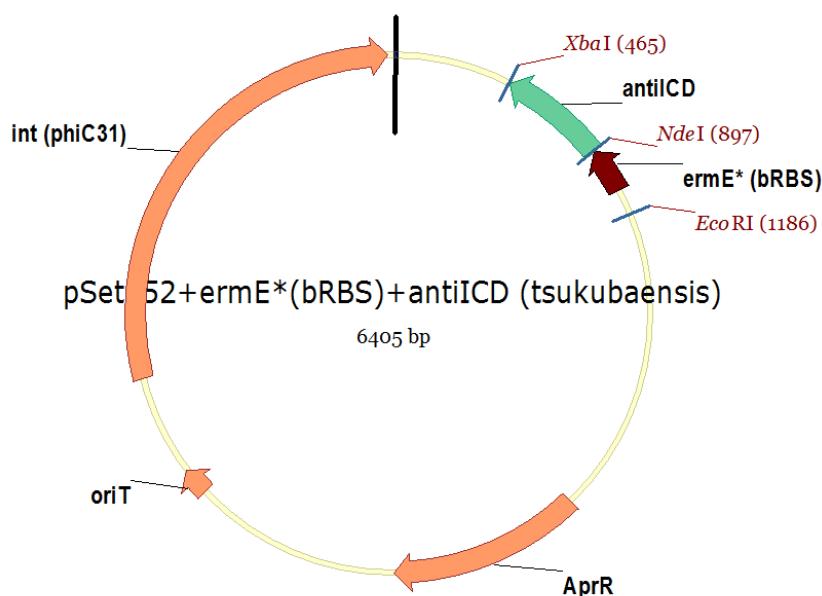
3.2.10 Priprava plazmidnega konstrukta pSET152+PermE*+iclOp+PermE* (bRBS)+antiICD in prenos v *S. tsukubaensis* s pomočjo konjugacije z *E. coli*

3.2.10.1 PCR reakcija za fragment anti-ICD

Oblikovali smo dva začetna oligonukleotida za pomnožitev fragmenta protismiselne RNA encima ICD, naleganje začetnih oligonukleotidov je prikazano na sliki C1 (Priloga C). Oligonukleotid **anti-icd Fw** je nalegal pred genom, dodano je bilo restriktijsko mesto za encim *XbaI*. Oligonukleotid **anti-icd Rv** pa je nalegal na začetku gena, dodano je bilo restriktijsko mesto za encim *NdeI*. Prepoznavna mesta za restriktijske encime smo dodali zaradi lažjega nadaljnega kloniranja. Omenjena prepoznavna mesta smo dodali tako, da se je ob kloniraju fragment obrnil v nasprotno smer, in bo produkt ob prepisovanju komplementaren zaporedju mRNA gena *icd*. Oligoukleotide smo oblikovali tako, da je produkt vseboval start kodon in Shine-Dalgarnovo zaporedje gena *icd*. Po PCR reakciji smo pričakovali produkt dolžine 416 bp. PCR reakcijo smo izvedli po klasičnem postopku (3.2.1), kot matriko smo uporabili genomsko DNA organizma *S. tsukubaensis*. Fragment *antiICD* pri velikosti 416 bp smo izrezali iz gela in očistili.

3.2.10.2 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD

Očiščen PCR produkt *antiICD* smo rezali z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XbaI*, ki imata prepoznavna mesta na koncih fragmenta. Z istima encimoma smo rezali tudi vektor pSET152+PermE*(bRBS). Vektor smo pridobili v okviru raziskav (Magdevska in sod., 2010), njegova posebnost pa je odsotnost vezavnega mesta za ribosom (RBS) na zaporedju promotorja.

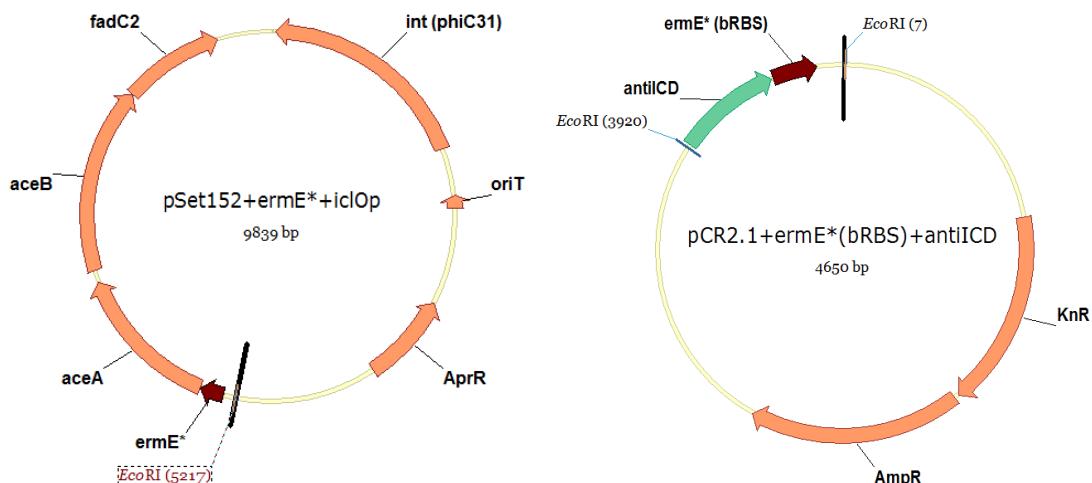


Slika 13: Shema plazmidnega konstrukta pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD.

Pripravili smo ligacijsko zmes, ki je vsebovala fragment *antiICD*, rezan *NdeI/XbaI*, in vektor pSET152+PermE*(*bRBS*) rezan z istima encimoma. Z zmesjo smo transformirali celice *E. coli* DH10 β in pridobili posamezne kolonije, iz katerih smo izolirali plazmide. Z restrikcijsko analizo z encimoma *NdeI/XbaI* smo preverili prisotnost fragmenta *antiICD* v plazmidih. Pričakovani dolžini fragmentov po restrikciji znašata 5973 bp (pSET152+PermE*(*bRBS*)) in 425 bp (*antiICD*). Plazmid, potrjen z restrikcijsko analizo smo poslali na sekvenciranje (Macrogen). Po potrditvi pravilnosti nukleotidnega zaporedja smo plazmid transformirali v celice *E. coli* DH10 β in ga namnožili, saj smo ga potrebovali za nadaljnje kloniranje. Plazmid smo sočasno transformirali tudi v celice seva *E. coli* ET12567 pUZ6002, ki smo jih uporabili za konjugacijo s sporami *S. tsukubaensis*.

3.2.10.3 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD

Kloniranja fragmenta *PermE*(bRBS)+antiICD* v vektor pSET152+PermE*+*iclOp* smo se lotili z vmesnim korakom preko plazmidnega konstrukta pCR2.1+PermE*(*bRBS*)+*antiICD*. Ta nam je omogočal izrez celotnega fragmenta z enim encimom – *EcoRI*. Vektor pCR2.1 ima levo in desno od multiplega mesta za kloniranje (MCS) prepoznavni zaporedji za restrikcijski encim *EcoRI*. Restrikcijska mesta in shema kloniranja so prikazani na sliki 14.



Slika 14: Shema kloniranja fragmenta *PermE*(bRBS)+antiICD* v vektor pSET152+*PermE*+icloP* preko pCR2.1+*PermE*(bRBS)+antiICD*. Na leví shemi je prikazan vektor in prepoznavno mesto za encim *EcoRI*, kamor smo klonirali fragment *PermE*(bRBS)+antiICD*. Na desní sliki je prikazan fragment v vektoru pCR2.1, označena sta dva prepoznavna mesta za encim *EcoRI*, s katerim smo izrezali fragment.

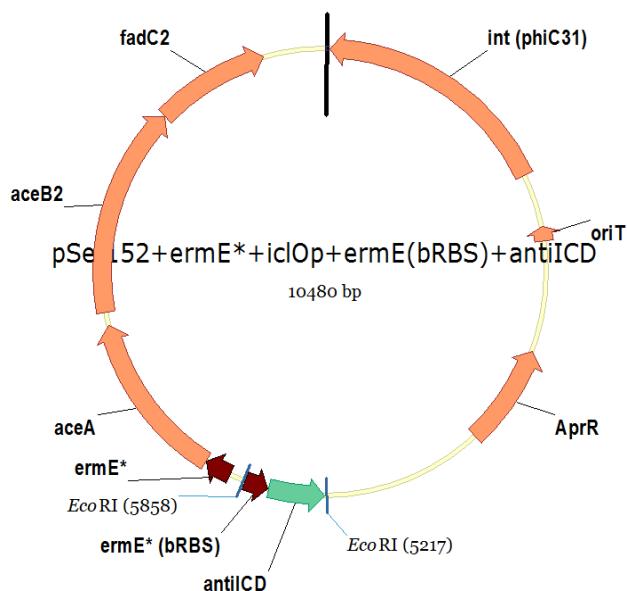
Priprava vmesnega plazmidnega konstrukta pCR2.1+*PermE*(bRBS)+antiICD*

Iz plazmidnega konstrukta pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* (Slika 13), ki smo ga pridobili v prejšnjem koraku (3.2.10.2), smo izrezali fragment *PermE*(bRBS)+antiICD*. Za izrezovanje smo uporabili restriktijska encima *EcoRI* in *XbaI*, s čimer smo dosegli izrez fragmenta *antiICD* skupaj s promotorjem *PermE*(bRBS)*. Restriktijsko mešanico smo naložili na gel, kjer smo ločili fragmenta velikosti 5684 bp (pSET152) in 721 bp (*PermE*(bRBS)+antiICD*). Fragment velikosti 721 bp smo izrezali iz gela in očistili.

Pripravili smo mešanico za dodajanje A-repkov (3.2.4.4) s fragmentom *PermE*(bRBS)+antiICD*, predhodno rezan z encimoma *EcoRI* in *XbaI*. Dream Taq polimeraza je dodala manjkajoče komplementarne nukleotide in na konci še A-repke, kar nam je omogočalo ligacijo v vektor pCR2.1. Po končani reakciji smo mešanico očistili in pripravili ligacijsko mešanico s komercialnim vektorjem pCR2.1. Po prekonočni inkubaciji na 4°C smo jo transformirali v celice *E. coli* DH10β. Mešanico smo razmazali na plošče z antibiotikom kanamicinom in dodatkom raztopin X-gal in IPTG, ki omogočata izvedbo modro-belega testa.

Naslednji dan smo iz posameznih belo obarvanih kolonij izolirali plazmide pCR2.1+*PermE*(bRBS)+antiICD* in jih potrdili z restriktionsko analizo z encimom *EcoRI*. Restriktionski encim ima na vektorju pCR2.1 dve prepoznavni mesti, reže na levi in desni strani vstavljenega fragmenta (slika 14). Po gelski elektroforezi smo pričakovali dve lisi v velikosti 3913 bp (pCR2.1) in 737 bp (*PermE*(bRBS)+antiICD*).

Priprava končnega plazmidnega konstrukta pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*



Slika 15: Shema plazmidnega konstrukta pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*. Na sliki sta označeni prepoznavni mesti za encim *EcoRI*, s katerim smo preverjali plazmide.

Ko smo z restriktionsko analizo potrdili pravilnost konstrukta pCR2.1+*PermE*(bRBS)+antiICD* (Slika 23), smo iz njega z restriktionskim encimom *EcoRI* izrezali fragment *PermE*(bRBS)+antiICD*. Šlo je za enako restriktionsko mešanico kot pri restriktionski analizi plazmidov, le v večjem merilu. Pričakovane velikosti so bile 3913 bp (pCR2.1) in 737 bp (*PermE*(bRBS)+antiICD*). Mešanico smo nanesli na agarozni gel, in po končani elektroforezi izrezali fragment *PermE*(bRBS)+antiICD* pri velikosti 737 bp (Slika 24).

Hkrati smo pripravili tudi vektor pSET152+*PermE*+iclOp*. Vektor je bilo potrebno rezati z encimom *EcoRI*, ki ima na vektorju eno prepoznavno mesto (**Error! Reference source not found.**). Po restriktiji smo mešanico očistili in vektor defosforilirali (3.2.4.5), ter s tem preprečili ligiranje praznega vektorja brez inserta.

Pripravili smo ligacijsko mešanico z vektorjem pSET152+*PermE*+iclOp* (rezan *EcoRI*) in fragmentom *PermE*(bRBS)+antiICD* (rezan *EcoRI*). Po prekonočni inkubaciji na 4°C smo

z mešanico transformirali celice *E. coli* DH10 β in iz posameznih kolonij izolirali plazmide. Z restriktijsko analizo z encimom *EcoRI* smo preverili vstavitev fragmenta v vektor. Pričakovali smo, da bo konstrukt razpadel na dva fragmenta v velikosti 9839 bp (pSET152+*PermE**+*iclOp*) in 641 bp (*PermE*(bRBS)*+*antiICD*).

Izbrali smo enega izmed pravilno sestavljenih konstruktov pSET152+*ermE**+*iclOp*+*ermE*(bRBS)*+*antiICD* (Slika 25) in ga poslali na sekvenciranje. Ko smo potrdili pravilno nukleotidno zaporedje, smo plazmid transformirali v celice *E. coli* ET12567 pUZ6002. Celice *E. coli* ET12567 pUZ6002 s kontrolnim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)*+*antiICD* (Slika 13) in pSET152+*PermE**+*iclOp*+*PermE*(bRBS)*+*antiICD* (Slika 15) smo namnožili in jih uporabili za konjugacijo s sporami *S. tsukubaensis*. Kontrolni plazmid, ki nosi zapis za *antiICD*, smo konjugirali v sev WT in $\Delta emcOp$. Plazmid z *antiICD* in glioksilatnim operonom pa smo konjugirali le v sev $\Delta emcOp$. Pridobljene konjugante so bile nato pripravljene za testiranje rasti na minimalnem gojišču z acetatom, kot edinim virom ogljika.

3.2.11 Inaktivacija genov *emc* operona bakterije *S. coelicolor*

Za prekinitev genov smo uporabljali metodo subkultivacij s pomočjo vektorja pKC1139 (Bierman in sod., 1992), ki vsebuje temperaturno občutljiv *oriC* (mesto začetka podvojevanja). Konstrukt smo naredili na tak način, da je vseboval homologije levo in desno od mesta prekinitve, ter kaseto za antibiotsko odpornost (odpornost na tiostrepton/kanamicin). Plazmidni konstrukt smo s konjugacijo vnesli v izbrani sev streptomicete in pridobili transformante. Z gojenjem pridobljenih transformant pri višji temperaturi smo pridobili kolonije, pri katerih je prišlo do integracije plazmida v genom in s tem do odpornosti na izbrani antibiotik.

3.2.11.1 Izolacija genomske DNA

Pogoj za uspešno pomnoževanje s PCR reakcijo je genomska DNA seva *S. coelicolor*, iz katerega želimo pomnožiti želeni odsek. Bakterijo *S. coelicolor* J801 smo gojili v gojišču CRM, preko noči. Iz pridobljene biomase smo s pomočjo komercialnega kita GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit izolirali genomske DNA. Po končani izolaciji smo kakovost DNA preverili tudi na agarozni gelski elektroforezi.

3.2.11.2 Priprava fragmentov s PCR reakcijo in restrikcijo

Izvedli smo tri ločene PCR reakcije, mešanico smo pripravili po osnovnem protokolu 3.2.1. Pomnožili smo levo homologijo od predvidenega mesta prekinitve, tiostreptonsko kaseto in desno homologijo od predvidenega mesta prekinitve (Preglednica 10). Uporabljeni začetni oligonukleotidi so navedeni v preglednici Preglednica 2. Kot matriko smo uporabili izolirano genomske DNA bakterije *S. coelicolor* J801 (leva in desna

homologija) oziroma plazmid pUC19+*ts* kaseta (za pomnožitev tiostreptonske kasete). Omenjeni plazmid smo pridobili od raziskovalcev podjetja Acies Bio. Naleganje začetnih oligonukleotidov na genomsko DNA je prikazano na sliki G2 (Priloga G), naleganje oligonukleotidov na plazmid pUC19+*ts* pa na sliki G3 (Priloga G).

Preglednica 19: Podatki o izvedenih PCR reakcijah.

Ime fragmenta	Začetni oligonukleotidi	Matrika	Pogoji	Pričakovana velikost
Leva homologija	ecm-del leftHOM fw	gDNA S.		1104 bp
	ecm-del leftHOM rv	<i>coelicolor</i>		
Tiostreptonska kaseta	ecm-del TS fw	Plazmid pUC19 +		1062 bp
	ecm-del TS rv	<i>ts</i>		
Desna homologija	ecm-del rightHOM fw	gDNA S.		1191 bp
	ecm-del rightHOM rv	<i>coelicolor</i>		

3.2.11.3 Restrikcija vektorja pKC1139

Pred sestavo konstrukta smo morali pripraviti tudi vektor. Rezali smo ga z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *HindIII*, ki sta vektor razrezala na dva dela, velika 51 bp in 6361 bp. Restrikcijsko mešanico smo očistili s komercialnim kitom za čiščenje. Želeli smo pridobiti fragment velik 6361 bp, ki predstavlja rezan vektor. Manjši fragment, 51 bp, se je tekom čiščenja spral iz kolone, saj ga membrana zaradi premajhne velikosti ni zadržala. pKC1139 rezan *EcoRI/HindIII* je bil pripravljen za Gibson reakcijo.

3.2.11.4 Gibson reakcija

Pred izvedbo Gibson reakcije smo ocenili koncentracije DNA posameznih fragmentov, ki smo jih pripravili. Po potrebi smo koncentracijo tudi izenačili, z dodatkom dH₂O. Koncentracijo smo ocenili z agarozno gelsko elektroforezo. V posamezno luknjico smo nanesli fragment, obarvan z barvilm 6x LD. Vse fragmente smo nanesli v dveh različnih volumnih (Slika 34, varianti a in b), da smo lahko bolje primerjali koncentracije.

Mešanico za Gibson reakcijo smo pripravili na ledu:

- 3 µl fragmenta – leva homologija
- 3 µl fragmenta – *ts* kaseta
- 3 µl fragmenta – desna homologija
- 1 µl fragmenta – pKC1139 (*EcoRI/HindIII*)
- 10 µl komercialne Gibson mešanice

Skupni volumen je znašal 20 µl. Mešanico smo inkubirali v napravi za PCR, in sicer 1 uro pri 50°C. Po izvedbi reakcije smo 2 µl mešanice transformirali v celice *E. coli* DH10β in razmazali na plošče 2TY+Apr. Antibiotik apramicin je omogočal selekcijo *E. coli* celic, ki so sprejele plazmid.

3.2.11.5 Izolacija in preverjanje konstrukta ter prenos pKC1139+emc del+ts plazmida v *S. coelicolor* s pomočjo konjugacije z *E. coli*

Plazmid pKC1139+emc del+ts smo nato namnožili. Posamezne kolonije celic *E. coli* DH10 β , dobljene iz plošče 2TY+Apr smo inkubirali v tekočem gojišču z apramicinom in iz prekonočne kulture izolirali plazmidno DNA. Izolacija je potekala s komercialnim kitom, plazmidno DNA pa smo preverili s pomočjo restriktijske analize z encimi *EcoRI/HindIII/NdeI*. Encimi se na nahajajo na specifičnih mestih, *HindIII* na začetku inserta, *EcoRI* na koncu inserta in *NdeI* znotraj tiostreptonske kasete (Slika 31). Izbrani plazmid smo poslali na sekvenciranje k zunanjemu partnerju (Macrogen). Prejete sekvence smo analizirali in potrdili pravilnost nukleotidnega zaporedja.

Izbrani konstrukt pKC1139+emc del+ts (Slika 35) smo transformirali v celice *E. coli* ET12567 s konjugativnim plazmidom. Selekcijo celic smo izvedli na gojišču 2TY+Apr+Kn+Cm. V naslednjem koraku smo namnožene celice *E. coli* ET12567 z izbranim konstruktom konjugirali s sevom *S. coelicolor* J801 (3.2.6.2). Konjugacijsko mešanico smo morali pred razmazovanjem na plošče ustrezno redčiti (od 10^{-1} do 10^{-4}), tako da smo dosegli posamezne kolonije, saj je imel postopek konjugacije visoko uspešnost. Tako pripravljene konjugante (3.2.7) so bile pripravljene za postopek subkultiviranja.

3.2.11.6 Postopek subkultivacije (*S. coelicolor*)

Priprava inokuluma za subkultivacijo

Pridobljene konjugante smo namnožili v tekočem CRM gojišču, dodan je bil antibiotik apramicin, ki je omogočal selekcijo celic, ki so vsebovale plazmid. Transformante smo z luknjačem inkolirali v 50 ml falkonke s 5 ml CRM gojišča (dodan apramicin za selekcijo plazmida) in stresali 2 dni pri 30°C.

Integracija v genom s primarno rekombinacijo

Po 24 urah inkubacije smo nagojeno biomase precepili v sveže CRM+Apr gojišče, in temperaturo gojenja povišali iz 30°C na 37°C. Po dveh dneh smo biomaso ponovno prenesli v sveže CRM+Apr gojišče in gojili dva dni pri 37°C. Z višjo temperaturo smo dosegli, da se plazmid pKC1139+emc del+ts ne more več podvojevati, saj vsebuje temperaturno občutljiv *oriC*. Le v primeru dogodka primarne rekombinacije se plazmid integrira v genom, in tako ohrani sposobnost podvojevanja in posledično bakteriji omogoča odpornost proti apramicinu. Ves čas smo izvajali selekcijski pritisk z antibiotikom, s čimer smo zagotovili, da iz populacije izberemo le celice, ki so plazmid integrirale v svoj genom.

Izločitev dela plazmida iz genoma s sekundarno rekombinacijo

Nagojeno biomaso smo nato precepili v gojišče CRM brez antibiotika in gojili pri 37°C. Vsakih 24 ur smo postopek ponovili – biomaso ponovno precepili v sveže CRM gojišče brez antibiotika. Izvedli smo 6 subkultivacij, s tem smo iz celic izločili plazmid, saj se pri visokih temperaturah ne more podvojevati. Biomaso 4., 5. in 6. subkultivacije smo razmazali na SM plošče z antibiotikom tiostreptonom, ki je omogočal selekcijo celic, ki so plazmid integrirale v genom in inkubirali 7 dni pri 30°C ter pobrali spore. Pobrane spore smo homogenizirali, pripravili redčitve v destilirani vodi in jih nacepili na SM Ts gojišče. Po približno 7 dneh, ko so kolonije dobro sporulirale, smo jih pečatili na gojišče SM Ts in SM Ts Apr. Po nekaj dneh smo pregledali plošče in iskali apramicin občutljive kolonije

3.2.11.7 Potrditev sekundarnih rekombinant z metodo PCR na osnovi kolonije

Pridobljene kolonije s profilom Ts+ in Apr– (tiostrepton odporne, apramicin občutljive) smo preverili z metodo PCR na osnovi kolonije. Za namen reakcije smo oblikovali 3 začetne oligonukleotide (Preglednica 2). Prvi nalega v genomu tako na kontrolni DNA kot na rekombinantni DNA, drugi nalega le na rekombinantni DNA, tretji pa le na kontrolni DNA. Glede na velikost pomnožka smo lahko nato sklepali, ali ima izbrana kolonija pravilno prekinjen gen, ustrezne PCR pomnožke smo za dodatno potrditev poslali na sekveniranje.

Oblikovanje začetnih oligonukleotidov

Z namenom potrjevanja inaktivacije *emc* operona, smo oblikovali tri začetne oligonukleotide (Preglednica 2). Naleganje oligonukleotidov na genom seva *S. coelicolor* J801 je prikazano je prikazano na sliki H1 (Priloga H), na genomu mutante pa na sliki H2 (Priloga H).

Za PCR reakcijo na osnovi kolonije smo uporabili kombinacijo treh primerjev:

- **ecm-del G 3** – nalega v genomu, levo od mesta prekinitve
- **ecm-del G (ccr) 5** – nalega na zaporedju *ccr* gena, na genomu mutante ne nalega
- **ecm-del G (ts) 5** – nalega na zaporedju *ts* gena, na genomu J801 ne nalega

V primeru, da imamo še vedno sev divjega tipa, bi nalegala le dva začetna oligonukleotida, **ecm-del G 3** in **ecm-del G (ccr) 5**. V tem primeru bi bila velikost PCR pomnožka 2883 bp. V primeru, da smo uspešno pridobili mutanto, bi prav tako nalegala le dva začetna oligonukleotida, **ecm-del G 3** in **ecm-del G (ts) 5**. Velikost PCR pomnožka bi bila 1559 bp.

Priprava celičnih lizatov

Pridobljenim kolonijam smo postrgali micelij in ga resuspendirali v 20 µl dH₂O. Tako pripravljeno mešanico smo v PCR napravi segrevali 5 minut na 95°C in zamrznili na -20°C.

Primer mešanice za PCR reakcijo na osnovi kolonije (20 µl):

- 8 µl dH₂O
- 2 µl 10x Dream Taq pufer
- 2 µl 20 mM dNTP
- 0,7 µl 10 mM začetni oligonukleotid 1
- 0,7 µl 10 mM začetni oligonukleotid 2
- 0,7 µl 10 mM začetni oligonukleotid 3
- 0,8 µl DMSO
- 5 µl celičnega lizata
- 0,2 µl polimeraze Dream Taq (1 U)

Reakcijski cikel:

Preglednica 20: Pотek PCR reakcije na osnovi kolonije.

Temperatura (°C)	Čas (minute)	Število ciklov	Namen
95	10:00	1	Začetna denaturacija
95	0:30		Denaturacija
Tm*	0:30	35	Vezava začetnih oligonukleotidov
72	t**		Podaljševanje verig DNA
72	10:00	1	Končno podaljševanje
4	-	1	Zadrževanje

*Temperatura vezave je odvisna od temperature tališča oligonukleotidov.

** Čas podvojevanja je odvisen od dolžine pomnožka.

3.2.11.8 Potrditev sekundarnih rekombinant s sekvenciranjem

Po potrditvi kolonij s PCR metodo smo uspešno inaktivacijo operona potrdili še s sekvenciranjem. S komercialnim kitom GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit smo izolirali genomsko DNA predhodno potrjenih kolonij. Oblikovali smo začetne oligonukleotide, ki so nalegali levo in desno od prekinitvene kasete. Izvedli smo ločeno PCR reakcijo z začetnima oligonukleotidoma (Preglednica 2):

- **ecm-del G 3** – nalega v genomu, levo od mesta prekinitve
- **ecm-del G 5** – nalega na zaporedju *meaA* gena v *emc* operonu, desno od mesta prekinitve

Naleganje oligonukleotidov na genomu seva *S. coelicolor* J801 je prikazano je prikazano na sliki H1 (Priloga H), na genomu mutante pa na sliki H2 (Priloga H). Odsek smo pomnožili s PCR reakcijo in uspešnost potrdili z gelsko elektroforezo.). Mešanico smo pripravili po osnovnem protokolu 3.2.1. Pričakovana velikost je produkta je bila 4016 bp. PCR reakcijo smo izvedli tudi na sevu divjega tipa, kjer smo pričakovali velikost 4289 bp. Dobljeni pomnožek smo iz agaroznega gela izrezali in očistili s komercialnim kitom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, ter poslali na sekvenciranje.

3.2.12 Testiranje rasti *Streptomyces tsukubaensis* na minimalnem gojišču z acetatom

Sposobnost sevov *S. tsukubaensis*, da rastejo na acetatu, kot edinem viru ogljika, smo testirali na trdnih ploščah z gojiščem MM. Gre za minimalno gojišče, ki ne vsebuje vira ogljika. Za naše potrebe smo po avtoklaviranju v gojišče dodali raztopino natrijevega acetata v koncentraciji 2 g/l. Natrijev acetat smo predhodno zatehtali in raztopili destilirani vodi, ter filtrirali. Raztopino smo pripravili v založni koncentraciji 50 g/l. Po pripravi plošč smo nacepili seve, ki smo jih želeli testirati. Spremljali smo njihovo rast, ter jih po 10-14 dneh rasti fotografirali.

3.2.13 Gojenje in vzorčenje sevov *Streptomyces tsukubaensis* v tekočem gojišču

Za merjenje aktivnosti encima ICD smo pripravili 3 različne seve bakterije *S. tsukubaensis*:

- *S. tsukubaensis* WT + pSET152+*PermE**
- *S. tsukubaensis* WT + pSET152+*PermE**(*bRBS*)+*antiICD*
- *S. tsukubaensis* Δ*emcOp* + pSET152+*PermE**+*iclOp*+*PermE**(*bRBS*)+*antiICD*

Na trdnem gojišču ISP4 z dodatkom ustreznih antibiotikov smo namnožili kulturo (spore), ob pobiranju smo jih homogenizirali s homogenizatorjem. Pripravili smo redčitveno vrsto vsakega seva in prešteli kolonijske enote (CFU/ml). Po potrebi smo spore ustrezeno redčili, da smo izenačili inokulum, torej število spor, oziroma fragmentov micelija, ki tvori kolonije (CFU).

Z namenom merjenja aktivnosti encima izocitrat dehidrogenaze, smo izbrane seve *S. tsukubaensis* gojili v tekočem gojišču na stresalniku v dveh ponovitvah. Seve smo gojili v erlenmajericah pri 28°C in 220 rpm. Uporabili smo tekoče gojišče NMMP z inertnimi kovinskimi spiralami, ki omogočajo homogeno rast z mehanskim razbijanjem peletov. V 45 ml gojišča NMMP smo nacepili 200 µl spor izbranega seva. Predhodno smo z metodo CFU (ang. colony forming units) prešteli število kolonijskih enot bakterij in tako izenačili inokulum izbranih sevov.

Vzorčili smo v časovnih točkah 0, 21, 24, 27, 29, 32, 34, 45 in 49 h. Ob vsakem vzorčenju smo odvzeli 200 µl vzorca za merjenje optične gostote kulture pri 600 nm s

spektrofotometrom. Ob vsaki časovni točki smo odvzeli še dodatne 3 ml kulture, namenjene za meritve pH vrednosti in izolacijo celičnih proteinov.

3.2.14 Izolacija celičnih proteinov

Vzorec kulture iz koraka 3.2.13 smo centrifugirali 5 minut na 8000 rpm. Supernatant smo odlili in vzorcem dodali pufer za spiranje. Ponovno smo centrifugirali 5 minut na 8000 rpm, odlili supernatant in dolili 1 ml pufra za vzorce. Mešanico smo resuspendirali in celice razbili z ultrazvokom (4x 15 s 30 s intervali), na ledu. Po razbitju celic smo nadaljevali s centrifugiranjem na 4°C, 30 minut pri 14.000 rpm. 500 µl supernatanta smo prenesli na membrano koncentratorja Sartorius Vivaspin (MWCO: 10 kDa) in centrifugirali 15 minut na 14.000 rpm. Vzorce smo ves čas hranili na ledu zaradi zaviranja neželene proteolize. Vzorce smo shranili na -80°C za kasnejšo analizo.

3.2.15 Merjenje koncentracije proteinov z Bradford metodo

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo izmerili z Bradford metodo (Bradford, 1976). Najprej smo pripravili raztopino za merjenje, Bradfordov reagent proizvajalca Bio-Rad smo redčili z vodo v razmerju 1:4. Pripravili smo umeritveno krivuljo z redčitvami govejega serumskega albumina (Sigma-Aldrich) s koncentracijami od 0,2 do 1,2 mg/ml. Umeritvena krivulja je prikazana na sliki B1 (Priloga B). V luknjice mikrotitrskih ploščice smo nanesli 200 µl redčenega Bradfordinovega reagenta in 8 µl vzorca. Mešanico smo 10 minut inkubirali pri sobni temperaturi in nato izmerili absorbanci pri valovni dolžini 595 nm. Na podlagi izmerjenih absorbanc umeritvene krivulje smo določili koncentracijo proteinov v naših vzorcih. V primeru, da se izmerjena absorbanca ni nahajala v linearinem območju umeritvene krivulje, smo vzorec ustrezno redčili in ponovili meritev.

3.2.16 Merjenje aktivnosti encima ICD

Aktivnost encima izocitrat dehidrogenaze smo merili z encimskim testom, s pomočjo komercialnega kita IDH Activity Assay Kit podjetja Sigma-Aldrich. Encimski test temelji na spremembi barve, ki je v sorazmerju s količino encimske aktivnosti. Kot substrat za encim ICD v reakcijo vstopa izocitrat, izstopa paobarvan produkt, katerega absorbanci izmerimo pri 450 nm. Encimski test se izvaja v mikrotitrskih ploščicah. Pred začetkom eksperimenta je bilo potrebno pripraviti umeritveno krivuljo z NADH standardom iz katere smo kasneje odčitali potrebne podatke. Pri eksperimentu smo uporabljali kofaktor NADP⁺.

Vzorce smo pred eksperimentom redčili z IDH pufrom (sestavni del IDH Activity Assay kita), ki vsebuje kovinske ione kot kofaktorje. Glede na izmerjeno koncentracijo proteinov smo določili potrebno redčitev za vsak vzorec (Priloga E, F) v območju od 20 – 200x redčitve. Poskus smo izvedli po navodilih proizvajalca, čas meritve je bil 10 minut. Iz dobljenih absorbanc (Priloga D, preglednica D1) smo izračunali koncentracijo NADPH iz umeritvene krivulje (Priloga D, slika D1), upoštevali smo ustrezni faktor redčitve.

Aktivnost encima ICD smo izračunali glede na priložena navodila proizvajalca. Ena enota ICD je definirana kot količina encima, ki generira 1 µmol NADH/NADPH na minuto pri pogojih pH 8, T=37°C. Rezultat smo normalizirali na koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu in specifično aktivnost encima izrazili v enotah nmol/min/mg (Slika 29). S tem smo izključili možnost vpliva količine biomase na aktivnost encima (Priloga F).

3.2.17 Testiranje rasti *Streptomyces coelicolor* na minimalnem gojišču z acetatom

Rast sevov *S. coelicolor* smo testirali v tekočem gojišču, z metodo HPLC smo merili porabo glukoze in acetata. Nismo se odločili za testiranje na trdnih gojiščih, saj smo v predhodnih poskusih (rezultati niso predstavljeni) zaznali rast sevov tudi na minimalnem gojišču brez vira ogljika. Najverjetnejše je bila rast posledica razgradnje agarja, saj je bakterija *S. coelicolor* poznana po tem, da proizvaja encime za razgradnjo agarja, ki ga koristi kot vir ogljika.

3.2.17.1 Gojenje in vzorčenje sevov *S. coelicolor* v tekočem gojišču

Z namenom merjenja porabe glukoze in acetata s HPLC metodo, smo izbrane seve *S. coelicolor* gojili v tekočem gojišču na stresalniku. Seve smo gojili v erlenmajericah pri 30°C in 220 rpm. Uporabili smo tekoče minimalno gojišče NMMB, ki smo mu pred izvedbo poskusa dodali glukozo (koncentracija 1 g/l) in natrijev acetat (koncentracija 2 g/l). V 40 ml gojišča NMMB+glukoza+acetat smo nacepili 200 µl spor izbranega seva. Predhodno smo z metodo CFU (ang. colony forming units) prešteli število kolonijskih enot bakterij in tako izenačili inokulum izbranih sevov.

Kulturo smo vzorčili v več časovnih točkah od 0 – 192 h. Ob vsakem vzorčenju smo odvzeli 1 ml vzorca in ga centrifugirali pri 14.000 rpm 10 minut. 400 µl supernatanta smo odpipetirali v viale za analizo na aparaturi HPLC.

3.2.17.2 HPLC analiza

Porabo acetata in glukoze smo v zadnjem koraku analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – HPLC. Gre za analitsko metodo s katero je mogoče ločiti, identificirati in kvantificirati posamezne spojine v mešanici. Glavne komponente sistema HPLC so: črpalka, injektor, rezervoar z mobilno fazo, kolona z detektorjem in rekorder. Sistem deluje tako, da črpalka omogoča prehod mobilne faze in analita preko kolone. Kolona predstavlja glavno komponento sistema HPLC, v kateri je stacionarna faza. Zadnjo stopnjo predstavlja detektor, ki meri absorbcijo UV-svetlobe. Povezan je z rekorderjem, ki izriše elucijski diagram, ki prikazuje količino molekul pri določeni valovni dolžini svetlobe.

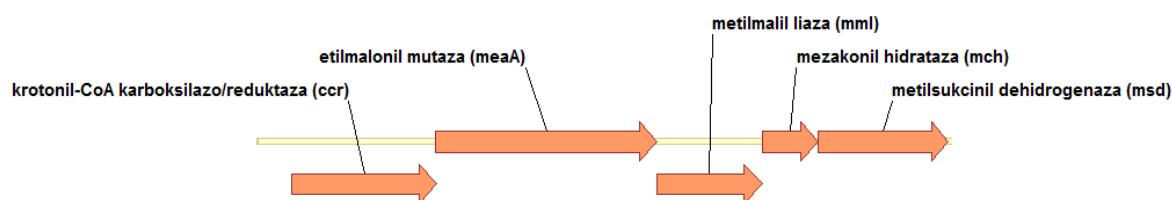
Vsebnost glukoze in acetata je bila izmerjena na aparaturi HPLC (Thermo separation products) z RI detektorjem. Uporabili smo kolono Phenomenex Rezex RFQ 100x7.8, ki

ima velikost delcev 8 µm. Za mobilno fazo smo uporabili 5 mM H₂SO₄, pretok pa je bil 0,6 ml/min. Temperatura kolone je bila 36°C.

4 REZULTATI

4.1 BIOINFORMATSKA ANALIZA SEVA *Streptomyces tsukubaensis*

Z bioinformatsko analizo genoma seva *S. tsukubaensis* NRRL18488 smo preverili ali pri organizmu obstajajo geni, ki omogočajo asimilacijo acetata. S predhodnjim znanjem o dveh različnih metabolnih poteh za asimilacijo acetata smo skušali določiti ali organizem asimilira acetat s pomočjo glioksilatnega cikla ali po poti EMC. Analizo smo izvedli s programom BLAST (Altschul in sod., 1990), na spletni strani NCBI (Wheeler in sod., 2007). V genomu bakterije smo najprej poskusili identificirati glioksilatno pot, genske homologe izocitrat liazo in malat sintazo. Ugotovili smo, da v organizmu ni prisotnega zapisa za gen za ključni encim izocitrat liazo. Našli pa smo genski homolog, ki verjetno kodira malat sintazo. V nadaljevanju smo poskusili določiti gene poti EMC. V genomu smo našli vseh pet genskih homologov, ki naj bi skupaj zagotavljali funkcionalno pot EMC (Goranovič in sod., 2010). Poiskali smo genske homologe za metilsukcinil dehidrogenazo (*msd*), mezakonil hidratazo (*mch*), metilmalil liazo (*mml*), etilmalonil mutazo (*meaA*) in krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo (*ccr*). Iskane genske homologe smo našli v istem odseku genoma, saj tvorijo operon. Iz spletnne strani NCBI smo prevzeli sekvenco želenega odseka seva *S. tsukubaensis* NRRL18488 in s pomočjo programa Vector NTI (Life Technologies, 2008) anotirali celoten EMC operon bakterije *S. tsukubaensis*, prikazan na Slika 16.



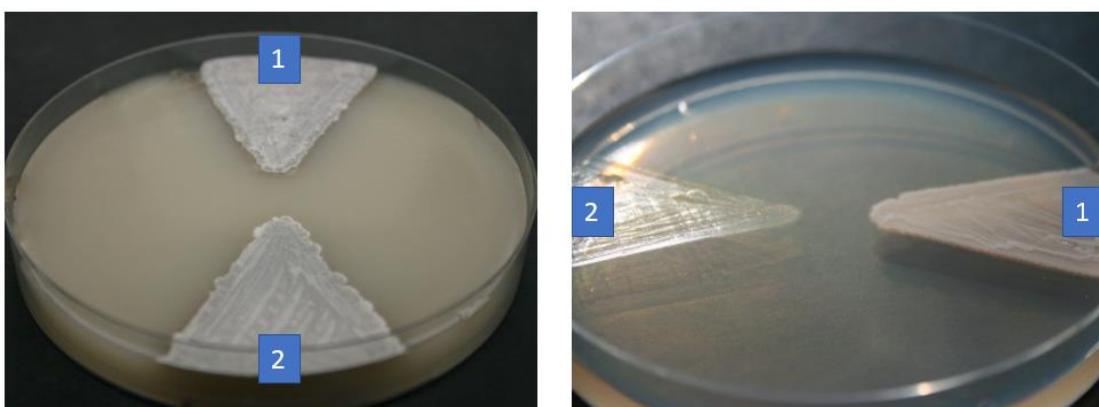
Slika 16: Organizacija genov *emc* operona bakterije *S. tsukubaensis* NRRL 18488.

Podatki, poiskani s pomočjo programa BLAST, se ujemajo z ugotovitvami, ki smo jih navedli v pregledu objav. Organizem nima funkcionalne glioksilatne poti, saj v genomu nima zapisa za izocitrat liazko. Acetat zato najverjetneje asimilira po poti EMC.

4.2 TEST RASTI NA ACETATU

Uporabili smo sev bakterije *S. tsukubaensis*, s prekinjenim *emc* operonom, *ΔemcOp* (Blažič in sod., 2015). Operon je bil prekinjem s pomočjo antibiotične kasete, ki nosi zapis za odpornost na tiostrepton. Ker ima kaseto za tiostreptonsko rezistenco po zaključku gena še terminator, prepisovanje genov navzdol v operonu verjetno ni več aktivno, posledično noben izmed 5 genov v operonu ni več aktiven. Pričakovali smo, da sev nima več funkcionalne metabolne poti EMC in ne more rasti na acetatu kot edinem viru ogljika.

Na plošče MM z acetatom smo nacepili sev s prekinjenim *emc* operonom in kontrolni sev - WT. Kontrolni sev je predstavljal *S. tsukubaensis* NRRL18488, ki je bil tudi izvorni sev, v katerem se je prekinjala EMC metabolna pot.



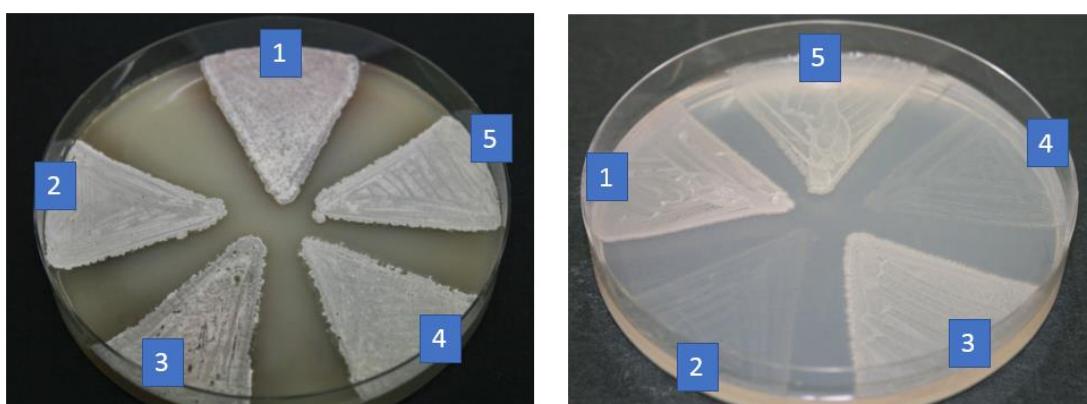
Slika 17: Rezultati testiranja rasti sevov *S. tsukubaensis* na acetatu. Na levi sliki je prikazana rast izbranih sevov na ISP4 gojišču, na desni sliki pa na minimalnem gojišču MM+acetat. S številko 1 je označen sev divjega tipa – WT, s številko dva pa sev $\Delta emcOp$.

Po 10 – 14 dneh inkubacije smo si plošče pozorno ogledali in ugotovili, da sev s prekinjenim *emc* operonom ne raste na minimalnem gojišču z acetatom (Slika 17). Pri kontrolnem sevu *S. tsukubaensis* NRRL 18488, ki ima funkcionalno etilmalonil-CoA metabolno pot, smo opazili normalno rast. Na ploščah s kompleksnim ISP4 gojiščem sta oba seva dobro rasla in po 10 dneh razvila tudi spore.

4.3 POVRNITEV RASTI NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO *emc* OPERONA

Testirani sevi in rezultati (v oklepaju):

1. *S. tsukubaensis* WT (raste na MM+acetat)
2. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ (ne raste na MM+acetat)
3. *S. tsukubaensis* WT + pSET152+PermE* (raste na MM+acetat)
4. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ + pSET152+PermE* (ne raste na MM+acetat)
5. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ + pSET152+PermE*+emcOp (povrnitev sposobnosti rasti na MM+acetat s komplementacijo *emc* operona)



Slika 18: Rezultati testiranja rasti sevov *S. tsukubaensis* na acetatu. Na levi sliki je prikazana rast izbranih sevov na kompleksnem ISP4 gojišču, na desni sliki pa na minimalnem gojišču MM+acetat. S številko 1 je označen sev divjega tipa - WT, s št. 2 sev *ΔemcOp*, s št. 3 kontrolni sev WT + pSET152+*PermE**, s št. 4 kontrolni sev *ΔemcOp* + pSET152+*PermE** in s št. 5 sev *ΔemcOp* + pSET152+*PermE**+*emcOp*.

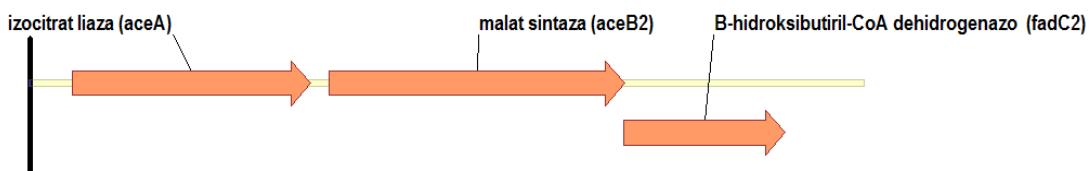
Po 10 – 14 dneh inkubacije smo preučili nacepljene plošče in ugotovili, da se rezultati skladajo s pričakovanji, kot je opisano v Blažič in sod., 2015. Seva *ΔemcOp* in *ΔemcOp* + pSET152+*PermE** na ploščah z acetatom, kot edinim virom ogljika, ne rasteta. Testiranim sevom s komplementiranim *emc* operonom, se je povrnila sposobnost rasti na minimalnem gojišču z acetatom. Opazili smo normalno rast, ki je skoraj enaka kot rast seva WT, ki ima funkcionalno metabolno pot za asimilacijo acetata. Na kompleksnem gojišču ISP4 med sevi ni bilo mogoče opaziti razlik v rasti.

4.4 POVRNITEV RASTI *S. tsukubaensis ΔemcOp* NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO *icl* OPERONA IZ *S. coelicolor*

Pokazali smo, da sev s prekinjenimi geni metabolne poti EMC ne raste na minimalnem gojišču z acetatom. Prav tako smo pokazali, da lahko s komplementacijo *emc* operona sevu povrnemo sposobnost rasti na acetatu. Glede na podatke iz literature ugotavljamo, da za asimilacijo acetata pri streptomicetah obstajata dve različni metabolni poti. Zanimalo nas je ali lahko okvarjeno metabolno pot EMC nadomestimo s heterologno čezmerno izraženo potjo glioksilatnega cikla iz seva *S. coelicolor*. Sev *S. tsukubaensis* v svojem genomu nima zapisa za gene glioksilatnega cikla, zato smo ključne gene poti iskali v drugih streptomicetah. V genomu *S. tsukubaensis* smo sicer našli zapis za homolog gena za malat sintazo (*aceB1*), vendar naj ta ne bi sodelovala v glioksilatnem ciklu primarnega metabolizma. Tudi pri *E. coli* je proučen primer, da v genomu obstajata dva homologa malat sintaze – *aceB*, ki sodeluje v glioksilatnem ciklu, in *glcB*, ki sodeluje pri rasti na glikolatu (Chan in Sim, 1998).

Bioinformatska analiza je pokazala, da najdemo ključne gene glioksilatnega cikla v organizmu *S. coelicolor*. Našli smo genska homologa za encim izocitrat liazko (*aceA*) in

malat sintazo (*aceB2*), kar se ujema z ugotovitvami drugih raziskovalcev (Bentley in sod., 2002; Loke in Sim, 2000). Organizacijo genov *icl* operona prikazuje Slika 19.



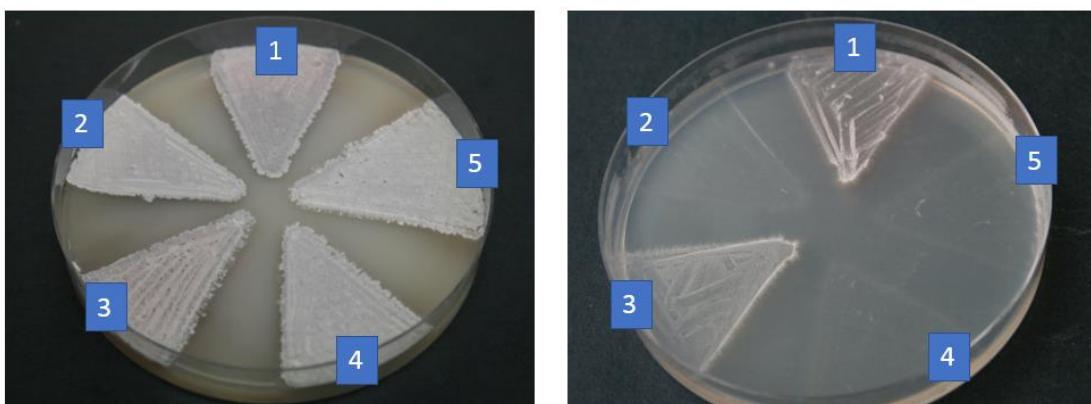
Slika 19: Organizacija genov *icl* operona bakterije *S. coelicolor*.

V operonu je poleg teh dveh ključnih genov še tretji gen, ki kodira zapis za encim β -hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo (*fadC2*). Encim pripada skupini oksidoreduktaz in sodeluje pri β -oksidaciji maščobnih kislin. Katalizira konverzijo β -hidroksibutiril-CoA v acetoacetil-CoA, ta pa se pretvorí v acetil-CoA, ki predstavlja intermedijat glioksilatnega cikla in se med drugim porabi za nastanek biomase (Taylor in sod., 2010). Med encimom β -hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo in glioksilatnim cikлом smo predvideli genetsko in metabolno povezavo. Gen *fadC2*, ki verjetno kodira encim 3-hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo, leži na istem operonu kot izocitrat liaza in malat sintaza. Prav tako pa smo med encimom, ki ga zapisuje gen *fadC2*, in glioksilatnim cikлом našli metabolno povezavo preko molekule acetil-CoA, ki nastane pri β -oksidaciji maščobnih kislin in se porablja kot substrat v glioksilatnem ciklu. Zato smo se odločili, da bomo pri pripravi konstrukta v plazmidu pSET152 poleg ključnih genov poti ICL, vnesli tudi gen *fadC2*, čeprav za samo funkcionalnost glioksilatnega cikla glede na podatke literature verjetno ni potreben.

4.4.1 Plazmidni konstrukt pSET152+*PermE**+*iclOp* z zapisom za glioksilatni cikel iz *S. coelicolor*

Testirani sevi in rezultati (v oklepaju):

1. *S. tsukubaensis* WT (raste na MM+acetat)
2. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ (ne raste na MM+acetat)
3. *S. tsukubaensis* WT + pSET152+*PermE** (raste na MM+acetat)
4. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ + pSET152+*PermE** (ne raste na MM+acetat)
5. *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ + pSET152+*PermE**+*iclOp* (sposobnosti rasti na MM+acetat se ne povrne)



Slika 20: Rezultati testiranja rasti sevov *S. tsukubaensis* na minimalnem gojišču z acetatom. Na levi sliki je prikazana rast izbranih sevov na kompleksnem ISP4 gojišču, na desni sliki pa na minimalnem gojišču MM+acetat. S številko 1 je označen sev divjega tipa - WT, s št. 2 sev *ΔemcOp*, s št. 3 kontrolni sev WT + pSET152+*PermE**, s št. 4 kontrolni sev *ΔemcOp* + pSET152+*PermE** in s št. 5 sev *ΔemcOp* + pSET152+*PermE**+*iclOp*.

Nacepljene plošče smo preučili po 10 – 14 dneh inkubacije (Slika 20). Ugotovili smo, da se rezultati ne skladajo z našimi pričakovanji, saj sev *ΔemcOp* + pSET152+*PermE**+*iclOp* na minimalnem gojišču z acetatom ni zrasel. Rast kontrolnih sevov je bila v skladu s pričakovanimi rezultati. Na kompleksnem gojišču ISP4 med sevi ni bilo opaziti večjih razlik v rasti.

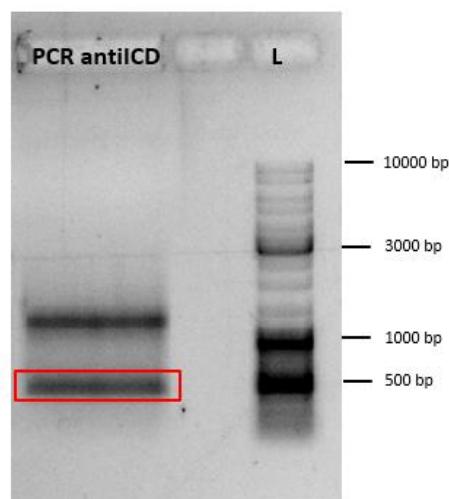
4.5 POVRNITEV RASTI NA ACETATU S KOMPLEMENTACIJO *icl* OPERONA IZ *Streptomyces coelicolor* IN PROTISMISELNE RNA GENA ZA ENCIM ICD

Pričakovali smo, da bo sev *S. tsukubaensis* s prekinjeno potjo EMC in heterologno izraženim glioksilatnim cikлом lahko asimiliral acetat. Ker so rezultati pokazali, da heterologno izražanje genov glioksilatnega cikela v sevu *S. tsukubaensis* *ΔemcOp* ni uspelo nadomestiti metabolne poti EMC, smo predvidevali, da je težava v regulaciji. Kot smo navedli že v pregledu objav (2.2.3.1), je pri bakteriji *E. coli* metabolni tok skozi glioksilatni cikel reguliran na nivoju kontrole delovanje že izraženega encima, preko fosforilacije encima izocitrat dehidrogenaze. Sistem IDHKP/IDH uravnava razdelitev toka ogljika med Krebsovim in glioksilatnim ciklom. Kako poteka regulacija izocitrat dehidrogenaze pri streptomicetah, še ni znano.

Da bi preverili potencialen vpliv regulacije izražanja ICD in vpliv na pretok preko poti ICL, smo želeli znižati izražanje izocitrat dehidrogenaze in tako potencialno povečati fluks ogljika v glioksilatni cikel. Izocitrat dehidrogenaza je ključni encim Krebsovega cikla, le-ta pa predstavlja centralno pot aerobnega metabolizma in je skupen vsem organizmom. Po podatkih spletnne baze esencialnih genov (Zhang in sod., 2004) je gen *icd* za encim izocitrat dehidrogenazo klučen za rast pri številnih prokariontih in evkarijontih. Zaradi sodelovanja encima v Krebsovem ciklu smo predvidevali, da bi bila popolna inaktivacija gena *icd* tudi pri streptomicetah letalna. Z uporabo tehnologije protismiselne RNA smo nameravali

znižati nivo translacije mRNA encima IDH in posledično znižati koncentracijo proteina v celici. Predvidevali smo, da se bo tok izocitrata zato preusmeril v glioksilatni cikel.

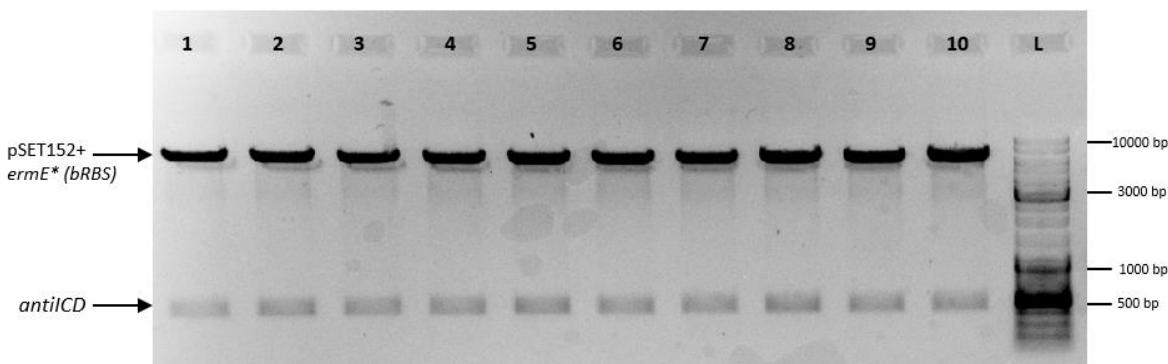
4.5.1 PCR reakcija za fragment anti-ICD



Slika 21: Fotografija gela elektroforeze, s katero smo preverili uspešnost PCR reakcije za fragment antiICD. Velikostna lestvica je označena z L. Lisa produkta je dobro vidna in ustreza pričakovani velikosti 416 bp. Pri velikosti 1200 bp vidimo dodatno liso, ki predstavlja nespecifičen produkt PCR reakcije.

Po pregledu fotografije gela (Slika 21) smo ugotovili, da je bila reakcija uspešna, vendar smo poleg želenega fragmenta pomnožili še nespecifičen produkt.

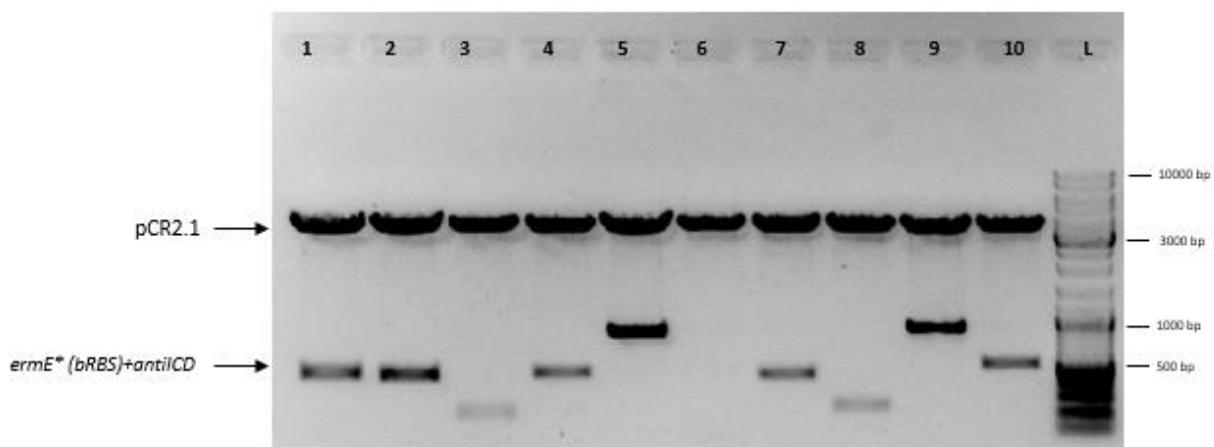
4.5.2 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD



Slika 22: Fotografija gela, s katerim smo ločevali fragmente po restriktiji plazmidov pSET152+PermE*(bRBS)+antiICDz encimoma *NdeI/XbaI*. Velikostna lestvica je označena z L, v jamicah od 1-10 so nanešene restriktijske mešanice. Zgornje lise predstavljajo plazmid pSET152+PermE*(bRBS), spodnje pa fragment antiICD.

Po pregledu fotografije gela (Slika 22) smo ugotovili, da so vsi plazmidi (1-10) pravi, saj velikosti obeh lis ustrezata pričakovanim - 5973 bp (pSET152+PermE*(bRBS)) in 425 bp (antiICD).

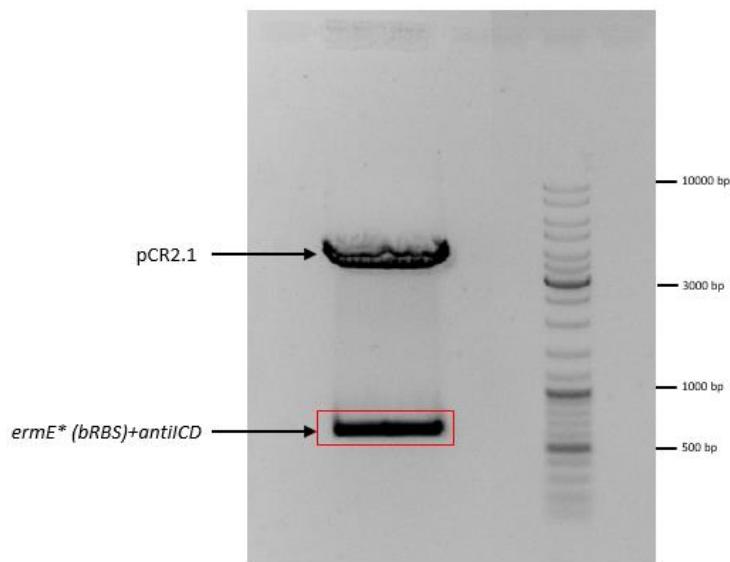
4.5.3 Plazmidni konstrukt pCR2.1+PermE*(bRBS)+antiICD



Slika 23: Fotografija elektroforeznega gela, kjer smo analizirali fragmente po restrikciji plazmidov pCR2.1+PermE*(bRBS)+antiICD z encimom EcoRI. Velikostna lestvica je označena z L. V jamicah od 1-10 so nanešene restrikcijske mešanice. Slika kaže, da so pričakovani plazmidni konstrukt vsebovale le kolonije 1, 2, 4 in 7. V omenjenih luknjicah smo dobili lise, ki ustrezajo velikosti 3913 bp in 737 bp.

Po pregledu fotografije gela na sliki 23 smo ugotovili, da so pričakovani plazmidni konstrukt pCR2.1+PermE*(bRBS)+antiICD vsebovale le kolonije 1, 2, 4 in 7. V omenjenih luknjicah smo dobili lise, ki ustrezajo velikosti 3913 bp in 737 bp.

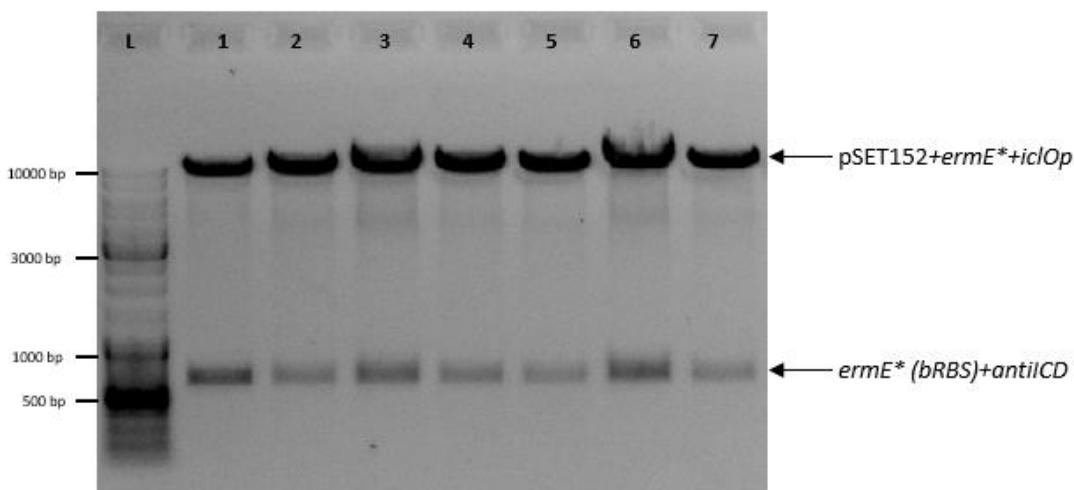
4.5.4 Priprava fragmenta PermE*(bRBS)+antiICD



Slika 24: Fotografija elektroforeznega gela za pripravo fragmenta PermE*(bRBS)+antiICD. Nanešena je restrikcijska mešanica pCR2.1+PermE*(bRBS)+antiICD z encimom EcoRI.

Fotografija gela na sliki 24 prikazuje, da smo fragment PermE*(bRBS)+antiICD uspešno izrezali iz plazmida pCR2.1+PermE*(bRBS)+antiICD. Spodnja lisa pri velikosti 737 bp predstavlja pravilen fragment, ki smo ga izrezali in nato očistili.

4.5.5 Plazmidni konstrukt pSET152+PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD



Slika 25: Slika elektroforeznega gela, s katerim smo preverjali plazmidne konstrukte pSET152+PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD rezane z encimom EcoRI. Velikostna lestvica je označena z L. V luknjicah od 1-7 so nanešene restriktionske mešanice. Pri vseh kolonijah smo dobili oba pričakovana fragmenta, vsi plazmidni konstrukti so se izkazali za pravilne.

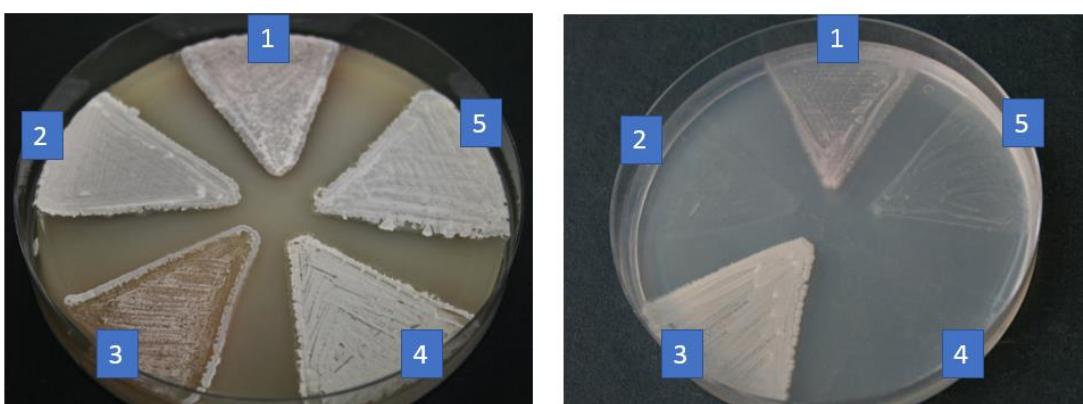
Fotografija gela na sliki 25 prikazuje, da so se vsi plazmidni konstrukti (1-7) izkazali za pravilne, saj smo pri vseh kolonijah dobili oba pričakovana fragmenta - dva fragmenta v velikosti 9839 bp (pSET152+PermE*+iclOp) in 641 bp (PermE*(bRBS)+antiICD) (**Error! Reference source not found.**).

4.5.6 Testiranje povrnitve rasti na acetatu

Pripravili smo gojišče MM z acetatom in na plošči nacepili pridobljene konjugante in ustrezne kontrole (našteto spodaj). Ugotavljalni smo, ali se bo konjugantam z vnešenimi geni glioksilatne poti in zapisom antiICD povrnila sposobnost rasti na minimalnem gojišču z acetatom. Pri konjugantah z vnešenim kontrolnim plazmidom pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD nismo pričakovali razlik v sposobnosti rasti na minimalnem gojišču z acetatom.

Testirani sevi in rezultati (v oklepaju):

1. *S. tsukubaensis* WT (raste na MM+acetat)
2. *S. tsukubaensis* ΔermCOp (ne raste na MM+acetat)
3. *S. tsukubaensis* WT + pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD (raste na MM+acetat)
4. *S. tsukubaensis* ΔermCOp + pSET152+PermE*(bRBS)+antiICD (ne raste na MM+acetat)
5. *S. tsukubaensis* ΔermCOp + pSET152+PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD (raste na MM+acetat)

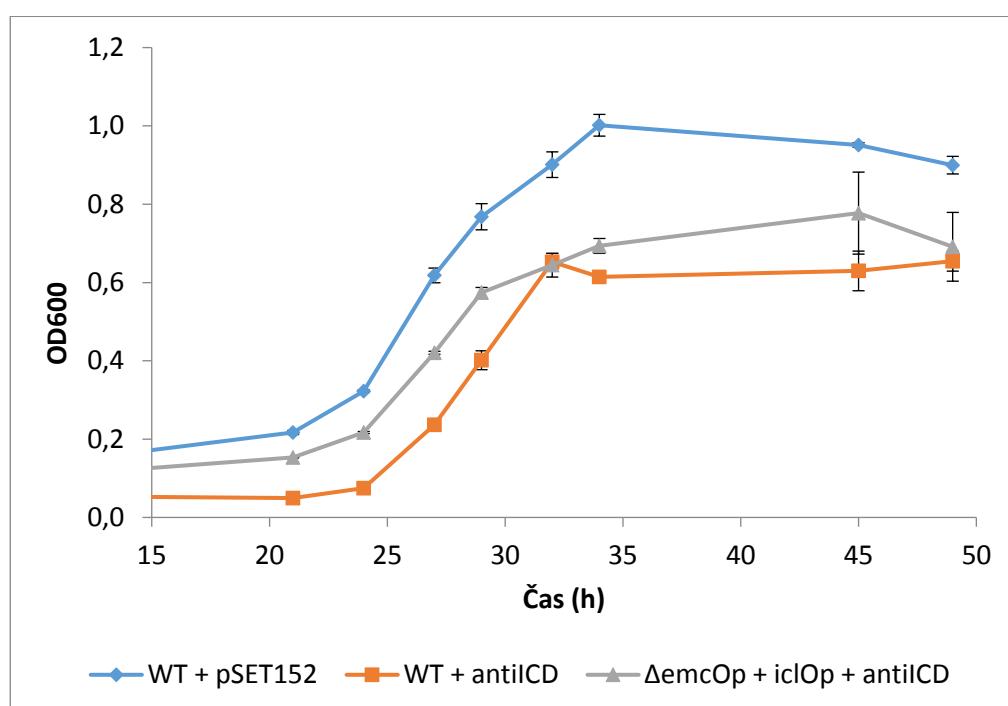


Slika 26: Rezultati testiranja rasti sevov *S. tsukubaensis* na acetatu. Na levi sliki je prikazana rast izbranih sevov na ISP4 gojišču, na desni sliki pa na minimalnem gojišču MM+acetat. 1. sev divjega tipa - WT, št. 2 sev $\Delta emcOp$, št. 3 kontrolni sev WT + pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD*, s št. 4 kontrolni sev $\Delta emcOp$ + pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* in s št. 5 sev $\Delta emcOp$ + pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*.

Po približno 14 dneh inkubacije smo pregledali plošče in ocenili rast sevov (Slika 26). Sev WT in WT z vnešenim kontrolnim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* sta na ploščah MM+acetat zrasla normalno, vendar je bilo med njima opaziti razliko v hitrosti rasti in barvi – sev WT z vnešenim kontrolnim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* je v primerjavi v sevom WT rastel boljše in je bil bolj pigmentiran. Sev $\Delta emcOp$ in $\Delta emcOp$ s kontrolnim plazmidom na ploščah nista zrasla. Opazili smo, da vnos zaporedja *antiICD* na plazmidu pSET152 pod promotorjem *PermE** sicer vpliva na rast pri sevu WT, ne vpliva pa na povrnitev sposobnosti asimilacije acetata pri sevu $\Delta emcOp$. Sevu $\Delta emcOp$ z vnešeno glioksilatno potjo in zaporedjem *antiICD* se je delno povrnila sposobnost rasti na acetatu, kot edinem viru ogljika. Sevi z vnešemo glioksilatno potjo in zaporedjem *antiICD* so omejeno zrasli na ploščah MM+acetat. Opazili smo slabšo rast v primerjavi s sevom WT. Na kopleksnem ISP4 gojišču so vsi sevi rasli primerljivo dobro, razen sev WT z vnešem kontrolnim plazmidom z zaporedjem *antiICD*, ki je rastel slabše kot vsi ostali testirani sevi, prikazani na sliki 26.

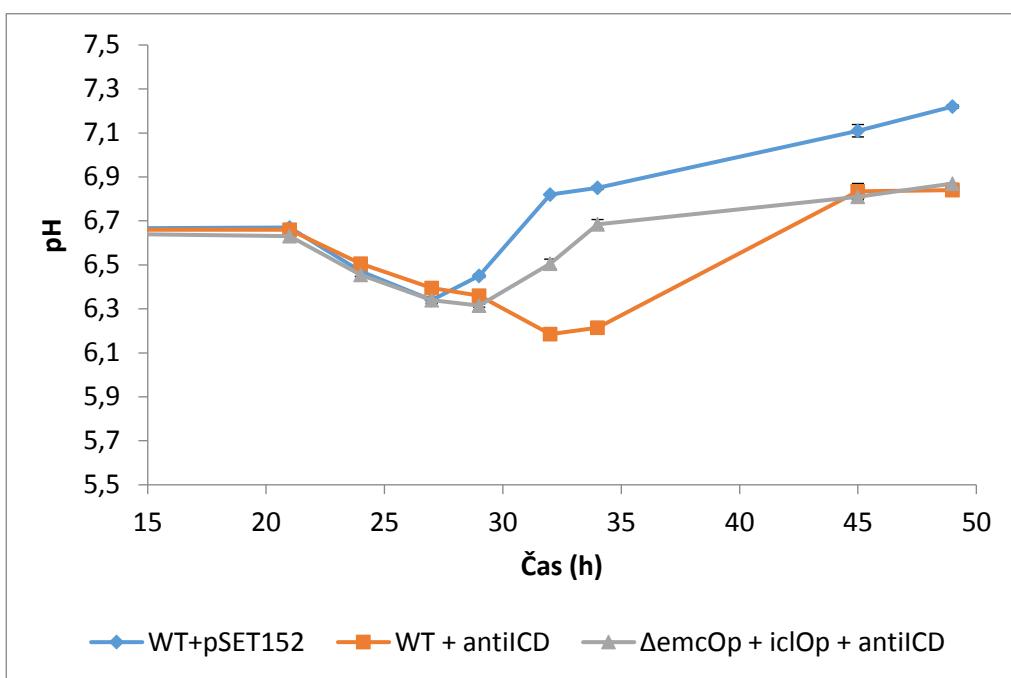
4.6 MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMA IZOCITRAT DEHIDROGENAZE

V prejšnjem koraku smo pokazali, da vnos zaporedja protismiselne RNA encima izocitrat dehidrogenaze sevu delno povrne sposobnost rasti na acetatu preko glikosilatne metabolne poti. Želeli smo dodatno potrditi, da smo zmanjšali izražanje encima ICD z vnosom zaporedja *antiICD*, in posledično zmanjšali tudi aktivnost encima. S tem pa verjetno preusmerili fluks ogljika v glioksilatno metabolno pot in sevu omogočili rast na acetatu, kot edinem viru ogljika.



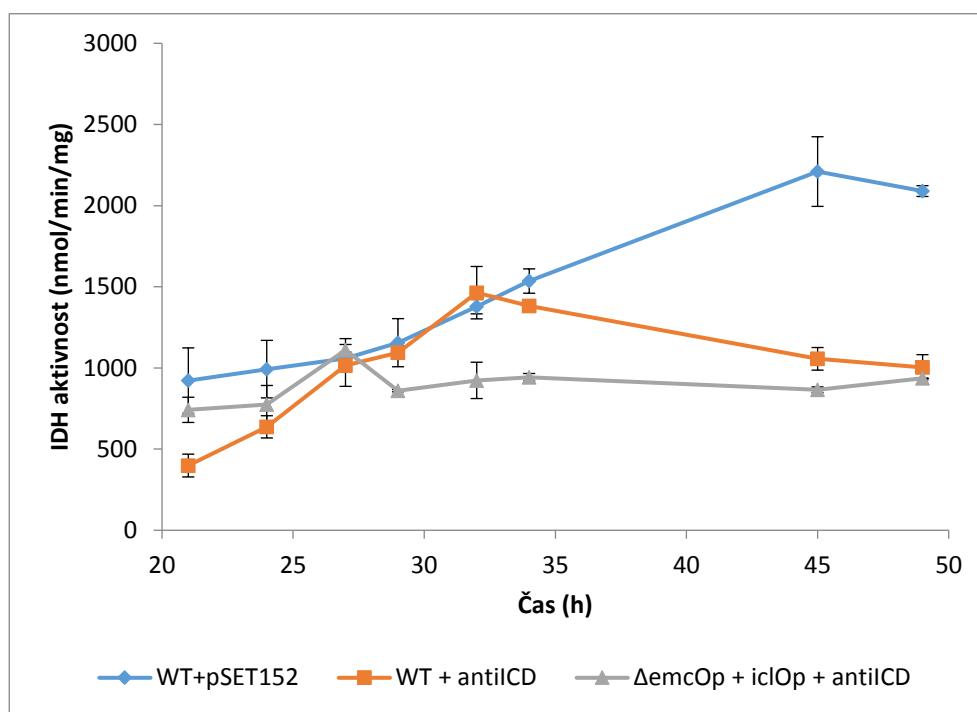
Slika 27: Spremljanje optične gostote pri 600 nm v odvisnosti od časa. Prikazane so povprečne vrednosti s standardnim odklonom za tri izbrane seve. Vse krivulje prikazujejo organizem *S. tsukubaensis*, modra krivulja prikazuje sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE**, oranžna krivulja sev WT z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* in siva krivulja sev $\Delta emcOp$ z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*.

Iz grafa (Slika 27) smo razbrali, da vsi izbrani sevi rastejo dobro. Sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE** raste hitreje v primerjavi s sevoma, ki vsebujejo zapis za *antiICD*. Sev WT s plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* raste najpočasneje. Počasneje v primerjavi s sevom WT raste tudi sev $\Delta emcOp$ z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*. Glede na rezultate smo ocenili, da sevi rastejo dobro in dovolj primerljivo, da jih lahko uporabimo za nadaljnje eksperimente merjenja encimske aktivnosti.



Slika 28: Spremljanje pH vrednosti v odvisnosti od časa. Prikazane so povprečne vrednosti s standardnim odklonom za tri izbrane seve. Vse krivulje prikazujejo kulturo *S. tsukubaensis*, modra krivulja prikazuje sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE**, oranžna krivulja sev WT z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* in modra krivulja sev *ΔemcOp* z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*.

Graf (Slika 28) prikazuje spremeljanje pH vrednosti v odvisnost od časa. Graf se ujema s prejšnjimi ugotovitvami, da sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE** raste najhitreje, sev WT z plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* pa najpočasneje. Pri omenjenem sevu (oranžna krivulja na sliki 28) smo izmerili nižji pH, glede na rezultate sklepamo, da je prišlo do akumulacije kislin. Sev *ΔemcOp* z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD* je rastel rahlo slabše kot sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE**. Glede na rezultate smo ocenili, da sevi rastejo dobro in dovolj primerljivo, da jih lahko uporabimo za nadaljnje eksperimente merjenja encimske aktivnosti.

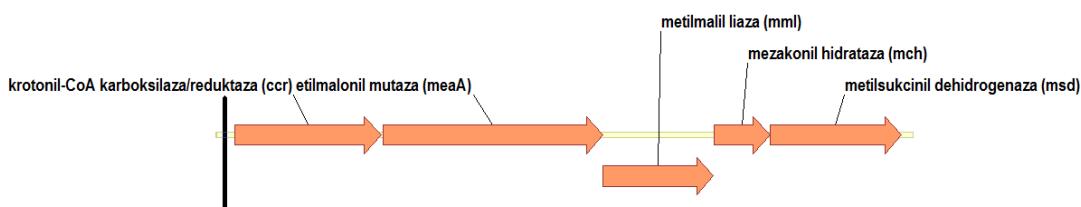


Slika 29: Prikaz aktivnosti encima izocitrat dehidrogenaze v odvisnosti od časa. Prikazane so povprečne vrednosti s standardnim odklonom za tri izbrane seve. Vse krivulje prikazujejo kulturo *S. tsukubaensis*, modra krivulja prikazuje sev WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE**, oranžna krivulja sev WT z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* in siva krivulja sev Δ emcOp z vstavljenim plazmidom pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)+antiICD*.

Slika 29 prikazuje graf aktivnosti encima ICD v odvisnosti od časa za izbrane seve *S. tsukubaensis*. Najvišjo vrednost encimske aktivnosti smo izmerili v sevu WT z vstavljenim praznim plazmidom pSET152+*PermE**, v času 45 h. Encimska aktivnost je s časom naraščala. Pri sevih z zapisom *antiICD* smo izmerili nizke vrednosti encimske aktivnosti, aktivnost encima ICD pa je po času 32 h začela padati. V 45 h smo v sevu WT izmerili več kot dvakrat višjo encimsko aktivnost ICD kakor pri sevih z vključeno *antiICD*.

4.7 BIOINFORMATSKA ANALIZA *emc* OPERONA SEVA *Streptomyces coelicolor*

Genom bakterije *S. coelicolor* J801 smo preučili na podoben način, kot smo pred tem naredili že pri bakteriji *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Z bioinformatsko analizo smo preverili prisotnost genov, ki omogočajo asimilacijo acetata. Iz literature je znano, da so v genomu bakterij genski homologi, ki kodirajo glioksilatni cikel. Zanimalo nas je ali ima bakterija *S. coelicolor* tudi gene za EMC metabolno pot. V *emc* operonu smo našli vseh pet ključnih genov EMC metabolne poti, tako kakor pri bakteriji *S. tsukubaensis*. Iskali smo tudi morebitne druge homologe *ccr* gena, ki pa jih nismo našli.



Slika 30: Organizacija *emc* operona bakterije *S. coelicolor*.

Podatki, ki smo jih dobili z bioinformatsko analizo, se skladajo z ugotovitvami, ki smo jih predhodno navedli v pregledu objav. Bakterija *S. coelicolor* ima v genomu zapis za gene glioksilatnega cikla (Slika 19) in poti EMC (Slika 30). Ugotovitve kažejo, da ima sev dve funkcionalni metabolni poti za asimilacijo acetata.

4.8 PREKINJANJE *emc* OPERONA SEVA *Streptomyces coelicolor*

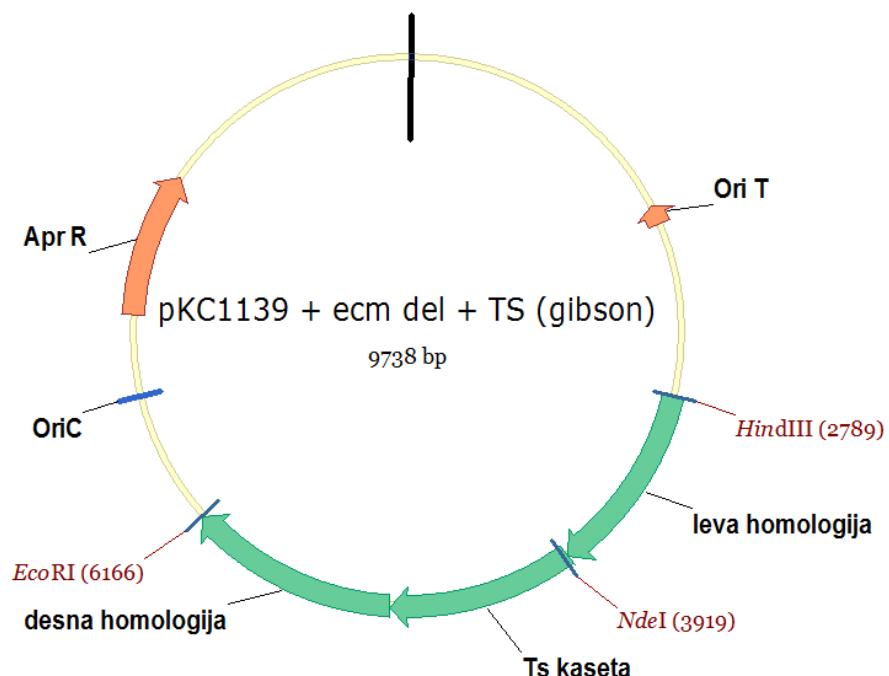
Z bioinformatsko analizo smo ugotovili, da ima bakterija *S. coelicolor* kar dve metabolni poti za asimilacijo acetata. Zanimalo nas je ali sta obe poti funkcionalni in katera je primarna pot za asimilacijo acetata. Iz rezultatov opisanih v poglavju 4.5 smo predvidevali, da bi geni izocitrat liaza in malat sintaza iz *S. coelicolor* lahko omogočili funkcionalno glioksilatno metabolno pot. Hipotezo smo žeeli preveriti. V bakteriji *S. coelicolor* smo inaktivirali gene metabolne poti EMC in testirali rast seva na minimalnem gojišču z acetatom.

4.8.1 Načrtovanje konstrukta za inaktivacijo operona

Za inaktivacijo *emc* operona smo pripravili konstrukt na osnovni vektorja pKC1139, ki vsebuje temperaturno občutljivo mesto *oriC* (Slika 31). Konstrukt je pripravljen iz štirih fragmentov (Preglednica 21), ki smo jih sestavili z Gibson reakcijo:

Preglednica 21: Fragmenti, s katerimi smo pripravili konstrukt za inaktivacijo operona.

Ime fragmenta	Opis	Način priprave
pKC1139	Vektor	Restrikcija z <i>EcoRI/HindIII</i>
Leva homologija	Homologno zaporedje dolgo 1100 bp. Nalega levo od mesta prekinitve (gen <i>ccr</i> – priloga G, slika G2).	PCR
Tiosstreptonska kaseta	Omogoča selekcijo mutant.	PCR
Desna homologija	Homologno zaporedje dolgo 1200 bp. Nalega desno od mesta prekinitve (gen <i>meaA</i> – priloga G, slika G2).	PCR

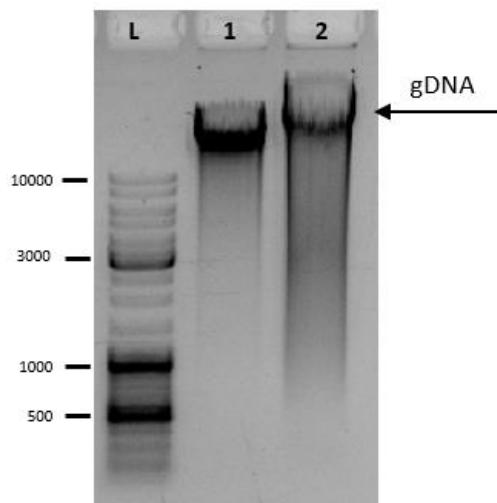


Slika 31: Konstrukt za inaktivacijo *emc* operona.

4.8.2 Oblikovanje začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide, s katerimi smo pomnožili želene odseke DNA, smo oblikovali z orodjem NEBuilder® Assembly Tool, ki ga dobimo na spletu (NEB, <http://nebuilder.neb.com/>). V orodje smo vnesli zahtevane podatke in dodali zaporedja naših želenih fragmentov (Preglednica 21). Oblikovali smo 3 pare začetnih oligonukleotidov (Priloga G, slika G1).

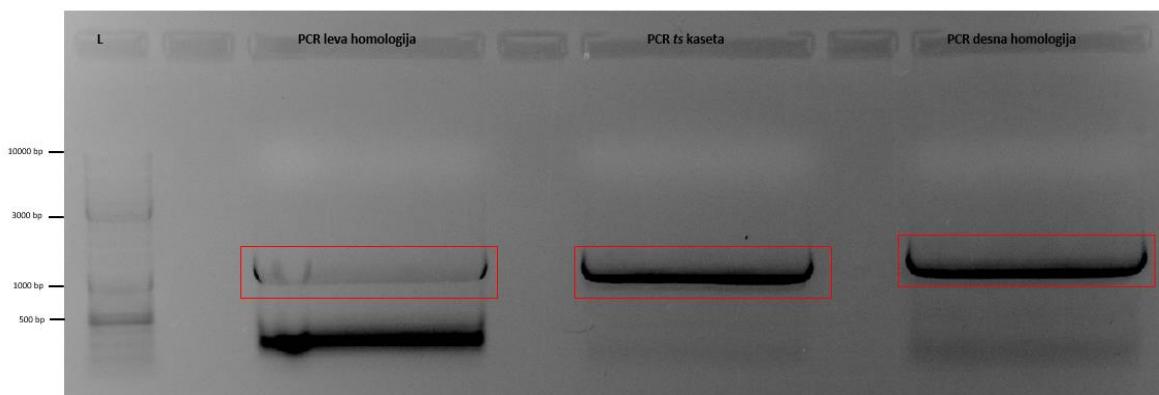
4.8.3 Izolacija genomske DNA



Slika 32: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo preverili kakovost izolacije genomske DNA. V luknjicah 1 in 2 sta nanešena vzorca gDNA organizma *S. coelicolor* J801 obarvana z barvilom 6x LD. Velikostna lestvica je označena z L.

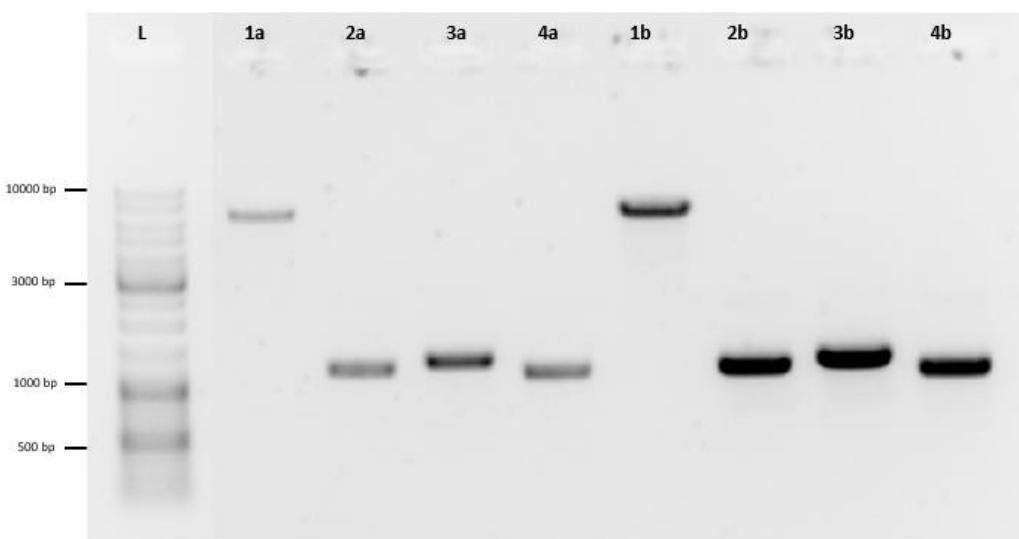
Na sliki 32 vidimo, da smo genomsko DNA uspešno izolirali. V vzorcu 1 je bila kakovost izolacije boljša, DNA je bila manj razgrajena. Iz fotografije vidimo, da je bilo v vzorcu 1 manj neželene RNA in višja koncentracija gDNA. Za nadaljnje delo smo zato izbrali vzorec 1.

4.8.4 Priprava fragmentov s PCR reakcijo in restrikcijo



Slika 33: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo preverili produkte PCR reakcije. Velikostna lestvica je označena z L. Na fotografiji (pri velikosti približno 1000 bp) so vidne tri lise pomnoženih fragmentov v zaporedju: leva homologija, ts kaseta in desna homologija (rdeče uokvirjeno).

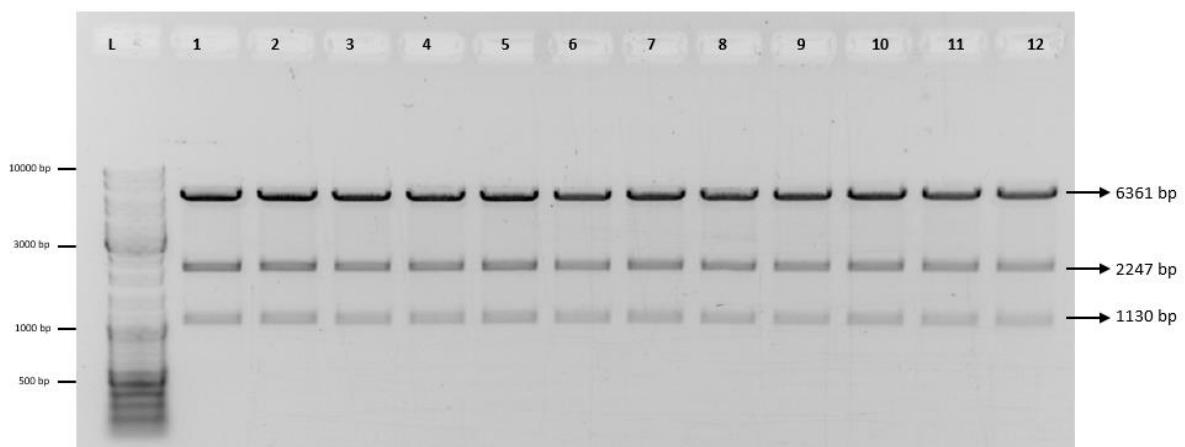
Iz slike Slika 33 smo sklepali, da smo uspešno pomnožili vse tri želene fragmente. Velikosti PCR produktov ustrezajo predvidenim dolžinam odsekov (Preglednica 19), ki smo jih želeli pridobiti. Ustrezne produkte smo izrezali iz gela in jih očistili.



Slika 34: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo preverili koncentracije fragmentov pred Gibson rekacijo. Velikostna lestvica je označena z L. V lunknjicah št. 1 je nanešen rezan vektor pKC1139, v lunknjicah št. 2 leva homologija, v lunknjicah št. 3 desna homologija in v lunknjicah št. 4 *ts* kaseta. Varianti a in b označujejo različen volumen vzorca. Varianta a: 1 μ l vzorca, varianta b: 3 μ l vzorce.

Iz slike Slika 34 smo ocenili, da je koncentracija DNA v vseh vzorcih približno enaka in dosega dovolj visoke vrednosti za uspešno izvedbo Gibson reakcije.

4.8.5 Izolacija in preverjanje konstrukta pKC1139+emc del+*ts*



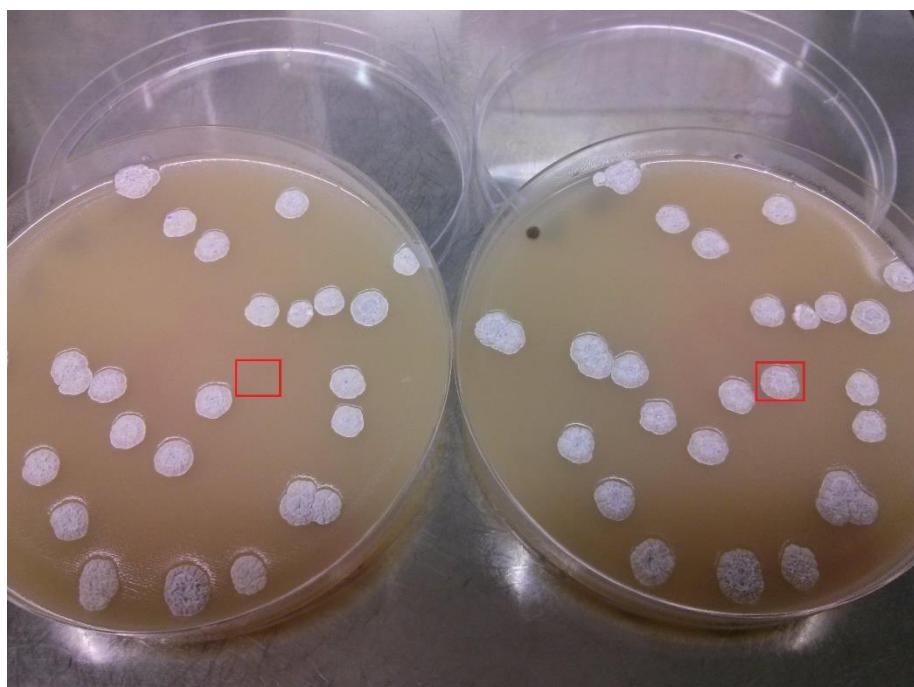
Slika 35: Fotografija agaroznega elektroforetskega gela, na katerem smo ločevali fragmente po restriktijski analizi plazmida pKC1139+emc del+*ts* encimi *EcoRI/HindIII/NdeI*. Velikostna lestvica je označena z L. Lise oštevilčene od 1-12 predstavljajo rezano plazmidno DNA. Velikosti lis se ujemajo z našimi izračuni.

Pričakovali smo, da bo plazmid po restriktiji razpadel na tri fragmente dolžin 6361 bp (pKC1139), 2247 bp (desna homologija od mesta prekinitve gena in del *ts* kasete) in 1130 bp (leva homologija od mesta prekinitve gena in preostanek *ts* kasete). Iz slike 35 smo ugotovili, da vseh 12 restriktijskih vzorcev ustreza želenemu konstruktu pKC1139+emc

del+ts. Izbrani plazmid smo poslali na sekvenciranje k zunanjemu partnerju (Macrogen). Prejete sekvence smo analizirali in potrdili pravilnost nukleotidnega zaporedja.

4.8.6 Postopek subkultivacij in iskanje sekundarnih rekombinant

Pričakovali smo, da se je tekom šestih subkultivacij zgodil dogodek sekundarne rekombinacije, ki omogoča izločitev dela plazmida iz genoma, in s tem prekinitev *emc* operona. Takšne kolonije bi bile občutljive na apramicin, saj se iz genoma izloči del plazmida, ki nosi zapis za odpornost proti apramicinu. Prav tako so Ts-odporne, saj del, ki nosi zapis za odpornost proti tiostreptonu, ostane v genomu.

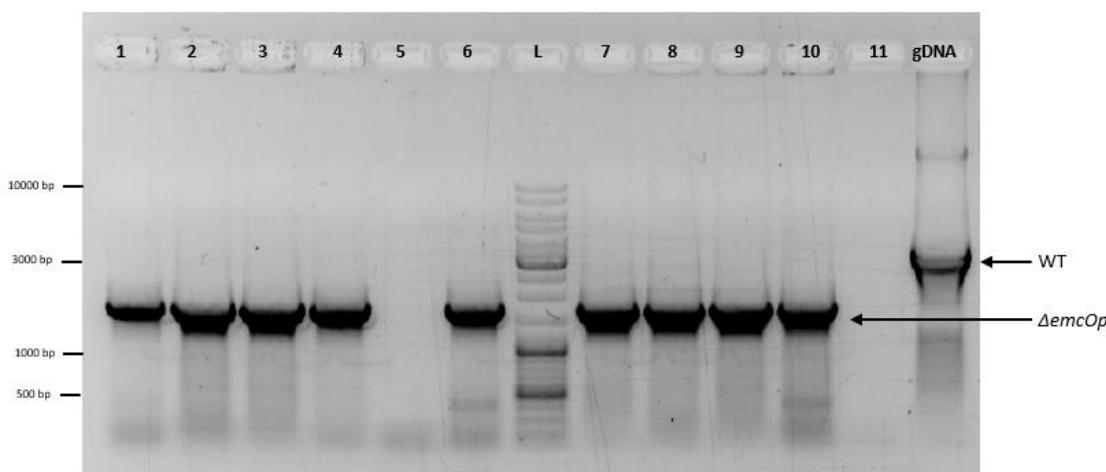


Slika 36: Rezultati pečatenja. Na levi plošči gojišče SM+Ts+Apr, na desni plošči gojišče SM+Ts. Kolonija z ustreznim profilom je označena z rdečim kvadratom.

Ob pregledu plošč smo iskali na apramicin občutljive in na tiostrepton odporne kolonije. V povprečju smo na vsaki plošči našli približno eno ustrezeno kolonijo, kar kaže na to, da je bila metoda subkultivacij uspešna (Slika 36). Izbrane kolonije smo prenesli na gojišče SM+Ts.

4.8.7 Potrjevanje sekundarnih rekombinant s PCR reakcijo na osnovi kolonije

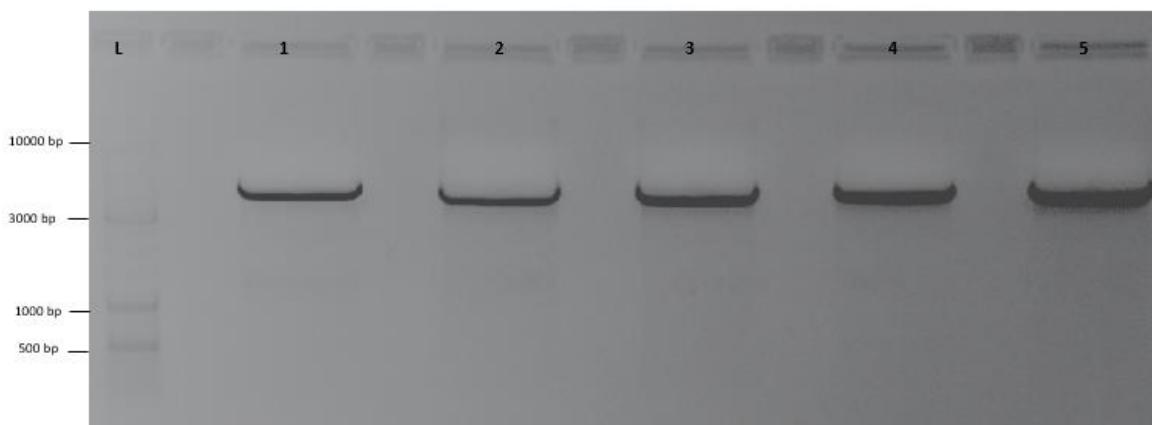
Po selekciji kolonij, ki smo jih dobili s postopkom pečatenja, smo izvedli PCR reakcijo na osnovi kolonije. Z reakcijo smo želeli potrditi, da smo v genomu uspešno inaktivirali *emc* operon.



Slika 37: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo potrjevali sekundarne rekombinante. Velikostna lestvica je označena z L. V zadnji luknjici je nanešena kontrolna gDNA divjega tipa, ustreza pričakovani velikosti 2883 bp. V luknjicah od 1 – 11 so nanešeni produkti, ki predstavljajo naše mutante. V večini vse lise ustrezajo velikosti 1559 bp (razen v luknjici 5 in 11).

Iz fotografije gela na sliki 37 smo ugotovili, da smo *emc* operon uspešno inaktivirali. V večini vse lise ustrezajo velikosti 1559 bp (razen v luknjici 5 in 11). V primeru, da bi imeli še vedno sev divjega tipa, bi bila velikost PCR pomnožka 2883 bp (zadnja luknjica – gDNA).

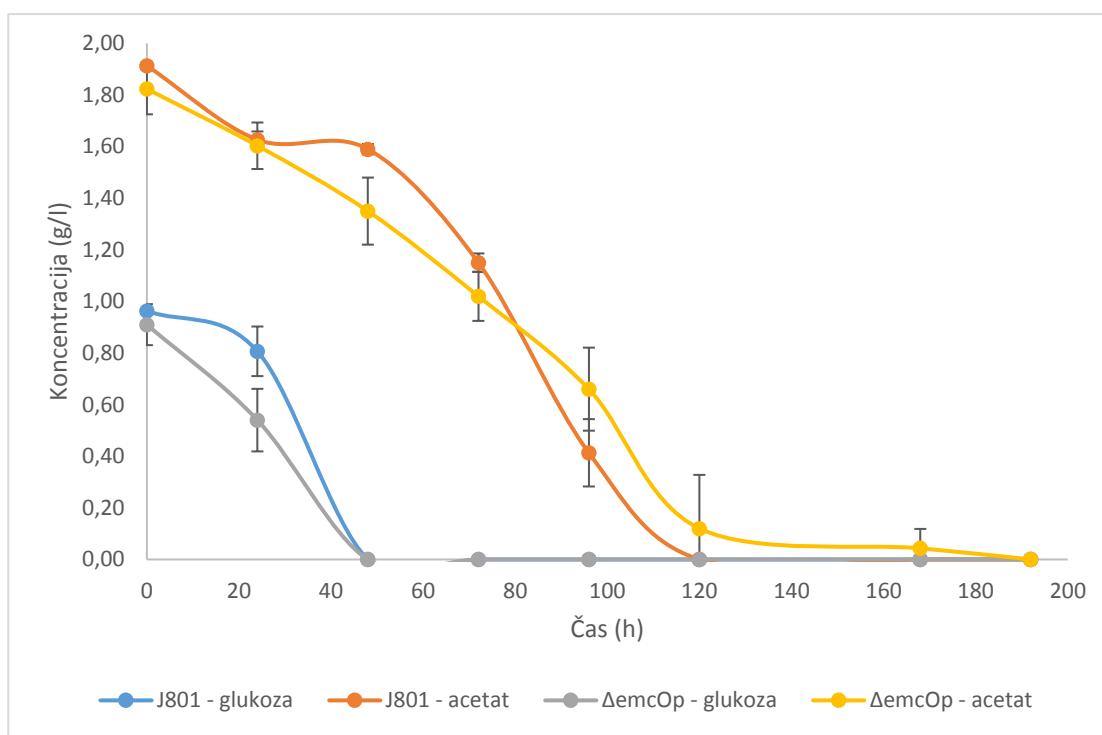
4.8.8 PCR reakcija za sekvenciranje



Slika 38: Fotografija agaroznega gela po elektroforezi, s katero smo potrjevali sekundarne rekombinante. Velikostna lestvica je označena z L. V luknjici 1 je nanešen kontrolni sev, velikost lise ustreza pričakovani velikosti 4289 bp. V luknjicah od 2 – 5 so nanešene mutante, velikost lise ustreza pričakovani velikosti 4016 bp.

Kot je razvidno iz slike 38, so bile PCR reakcije uspešne na vseh izbranih sevih. Pridobljene produkte smo izrezali iz gela in očistili. Poslali smo jih na sekvenciranje (Macrogen). Po prejemu rezultatov smo le-te analizirali in potrdili pravilnost sekvenc tako divjega tipa, kot mutant.

4.9 TESTIRANJE RASTI NA ACETATU



Slika 39: Izmerjena vsebnost glukoze in acetata v različnih časovnih točkah za seve *S. coelicolor* J801 in $\Delta emcOp$. Prikazane so povprečne vrednosti s standardnimi odkloni.

Slika 39 prikazuje porabo glukoze in acetata pri sevih J801 in $\Delta emcOp$ v minimalnem gojišču NMMB. Oba seva sta kot vir ogljika najprej porabila glukozo, po 48 h je izmerjena koncentracija glukoze padla na 0 g/l. Ko je v gojišču zmanjkalo glukoze sta seva za rast začela porabljati acetat. Sev J801 je acetat porabil v 120 h, sev $\Delta emcOp$ pa v 192 h. Dobljeni podatki kažejo na to, da je sev $\Delta emcOp$ še vedno sposoben asimilirati acetat, najverjetneje po nativni glikosilatni poti.

5 RAZPRAVA

Aerobni mikroorganizmi, ki so sposobni rasti na acetatu ali na drugih spojinah, ki vstopajo v centralni metabolizem na stopnji acetil-CoA, za asimilacijo najpogosteje uporabljajo glioksilatno pot (Slika 3, 2.2.3.1). Ključna gena poti sta izocitrat liaza in malat sintaza, ki skupaj z encimi Krebsovega cikla katalizirajo nastanek sukcinil-CoA iz dveh molekul acetil-CoA (Akopants in sod., 2006; Han in Reynolds, 1997). Genetske, bioinformatske in biokemijske raziskave kažejo, da so zapisi za ključna gena glioksilatnega cikla prisotni tudi v streptomacetnih genomih, čeprav do sedaj še ni bilo raziskav, ki bi dokazale vlogo genov pri asimilaciji acetata pri streptomacetnih vrstah (Akopants in sod., 2006).

Asimilacija acetata lahko poteka po alternativni poti etilmalonil-CoA (Slika 5, 2.2.3.2), ki je centralna pot metabolismu ogljika pri mnogih α -proteobakterijah, kot so *Rhodobacter sphaeroides* in *Methylobacterium extorquens* pa tudi pri aktinomicetah, kot so *Streptomyces* spp. Glavna funkcija poti EMC je pretvorba intermediata acetil-CoA v druge prekurzorske metabolite, ki se uporabljajo za biosintezo celičnega ogljika. EMC pot, za razliko od glioksilatnega cikla, vsebuje veliko unikatnih CoA-estrskih intermediatov (Slika 6).

Zaradi izjemnega medicinskega in industrijskega pomena streptomacetnih vrst, so naše raziskave potekale na bakterijah *S. tsukubaensis* in *S. coelicolor*, ki pripadata streptomacetam, in kot večina ostalih bakterij iz tega rodu proizvajata sekundarne metabolite, številni so tudi medicinsko uporabni, predvsem kot antibiotiki (Madigan in sod., 2009). Streptomicete izločajo tudi številne ekstracelularne hidrolitične encime, ki jim omogočajo razgradnjo lignoceluloznih materialov, številni izmed omenjenih encimov so komercialno zanimivi (Borodina in sod., 2005).

Za izbor omenjenih bakterijskih vrst za naše raziskave obstaja več razlogov. Analiza genomov je pokazala, da vsebuje bakterija *S. tsukubaensis* le zapis za gene alternativne poti EMC, *S. coelicolor* pa za obe poti asimilacije acetil-CoA – tako zapis za gene glioksilatne poti, kot tudi poti EMC. Razlog za izbor predstavlja tudi dejstvo, da je *S. coelicolor* modelni organizem rodu streptomacet in genetsko najbolj raziskana v svoji skupini (Bentley in sod., 2002). *S. tsukubaensis* pa predstavlja industrijsko zelo pomemben organizem, najpomembnejša spojina, ki jo proizvaja, je FK506 (takrolimus). Je sekundarni metabolit z močnim imunosupresivnim delovanjem, trenutno registriran za uporabo v medicini po transplantacijah organov (Goranovic in sod., 2010).

Raziskave asimilacije acetil-CoA se osredotočajo tako na razumevanje vloge asimilacije acetata v primarnem in tudi v sekundarnem metabolizmu. Raziskave prav tako nakazujejo morebitne povezave primarnega in sekundarnega metabolizma molekule acetil-CoA, saj pot EMC asimilacije acetata številne bakterije uporabljalne ne le za biosintezo celičnih komponent, temveč tudi za zagotavljanje prekurzorjev za sintezo bioaktivnih učinkovin

sekundarnega metabolizma. Pri *S. tsukubaensis* je biosinteza sekundarnega metabolita FK506 povezana s potjo EMC preko skupnega intermediata etilmalonil-CoA, ki nastaja s pomočjo ključnega encima poti EMC – krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo. Metabolit etilmalonil-CoA rabi kot podaljševalna enota za biosintezo poliketidnih antibiotikov (Blažič in sod., 2015). Encim Ccr tako povezuje centralni ogljikov metabolizem s sekundarnim. Li in sod. (2004) so preučevali vpliv *ccr* gena pri sintezi poliketidov monenzina A in B pri *Streptomyces cinnamonensis*. Ugotovili so, da monenzin A za svojo biosintezo potrebuje podaljševalno enoto etilmalonil-CoA, ki je produkt reakcije encima Ccr, medtem kot monenzin B te podaljševalne enote ne potrebuje.

V obsegu magistrske naloge smo žeeli preučiti vlogo genskih homologov EMC in glikosilatne poti, ki sodelujejo pri asimilaciji acetata v primarnem metabolizmu. Zanimala nas je vloga omenjenih genov, ki sodelujejo v reakcijah glikosilatnega cikla in poti EMC. Pričakovali smo, da *S. tsukubaensis* z inaktiviranim *emc* operonom ne bo sposoben rasti na acetatu kot edinem viru ogljika, saj acetat najverjetneje asimilira po EMC poti, glede na to da nima zapisa za gene glikosilatnega cikla (4.1). V genomu *S. tsukubaensis* NRRL 18488 smo sicer našli zapis za homolog gena malat sintaze (*aceB1*), vendar le-ta verjetno ne sodeluje v primarnem metabolizmu, temveč v sekundarnem. Zapis za homolog *aceB1* so odrili tudi v sevih *S. coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamonensis* (Akopants in sod., 2006). Slika 17 potrjuje, da sev $\Delta emcOp$ ne raste na minimalnem gojišču z acetatom kot edinim virom ogljika. S tem smo dokazali našo trditev, da sev za asimilacijo acetata uporablja le pot EMC.

Ob nacepljanju sevov *S. tsukubaensis* na minimalno gojišče z acetatom smo seve hkrati nacepili tudi na kompleksno gojišče ISP4, kjer smo kot vir ogljika dodali škrob. Le-ta se po razgradnji z ekstracelularnimi encimi razgradi do glukoze, ta pa se pretvori po poteh glikolize ali pentozna fosfatna poti. Zaradi metabolizma ogljika po teh poteh, pot EMC na kompleksnem ISP4 gojišču ni potrebna. Sklepali smo, da bodo na ISP4 gojišču vsi sevi rasli enako dobro, kar prikazujejo in tudi potrjujejo rezultati na slikah 17, 18, 20.

Za dodatno potrditev, da sev $\Delta emcOp$ ne raste na minimalnem gojišču z acetatom zaradi prekinjenega operona *emc*, smo mu povrnili sposobnost rasti na acetatu z vnosom dodatne kopije konstitutivno izraženega operona *emc* (Slika 18), katerega geni naj bi komplementirali inaktivirano nativno pot EMC. Pripravili smo tudi kontrolni sev WT in $\Delta emcOp$ s praznim plazmidom pSET152+*PermE**, ki bakteriji daje rezistenco na apramicin. Prisotnost antibiotika v gojišču lahko fiziološko obremeniti mikroorganizem in posledično podaljša fazo prilaganja, s tem pa upočasni rast. Zato smo v vseh nadaljnjih eksperimentih kot dodatno kontrolo uporabili ustrezni sev z osnovnim plazmidom pSET152+*PermE**, ki je predstavljal bolj zanesljivo metodo primerjave. Z vnosom vseh 5 genov operona *emc* pod kontrolo konstitutivnega promotorja *PermE** smo sevu $\Delta emcOp$ uspešno povrnili sposobnost rasti na acetatu kot edinem viru ogljika (Slika 18). Vsi

testirani sevi so na kompleksnem ISP4 gojišču rasli enako dobro, saj je v gojišču kot vir ogljika dodan škrob, ki se ne presnavlja po poti EMC.

V nadaljevanju smo želeli sevu $\Delta emcOp$ povrniti sposobnost rasti na acetatu z vnosom genov glioksilatne poti *S. coelicolor* v obliki dodatne kopije konstitutivno izraženega *icl* operona (Slika 12). V plazmidni konstrukt smo vključili še tretji gen, β -hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo (*fadC2*), ki je v genomu *S. coelicolor* na istem operonu kot gena za ICL in encim MS. Encim β -hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo je z glioksilatnim cikлом povezan preko intermediata acetil-CoA, povezava je podrobnejše opisana v poglavju 4.4. Izražanje vseh treh genov operona *icl* je bilo pod kontrolo močnega konstitutivnega promotorja *PermE**. Plazmidni konstrukt smo konjugirali v sev z inaktivirano potjo EMC in testirali rast sevov na kompleksnem ISP4 gojišču in na minimalnem gojišču z acetatom. Kljub komplementaciji s ključnimi geni glioksilatne poti iz *S. coelicolor*, sevu nismo uspeli povrniti rasti na acetatu kot edinem viru ogljika (Slika 20). Na kompleksnem gojišču ISP4 med sevi ni bilo opaziti razlik v rasti, kar je bilo v skladu s pričakovanji. Možna razloga je, da so omenjeni geni funkcionalni, vendar je potrebna primerna regulacija. Pri bakteriji *E. coli* se tok v glioksilatni cikel uravnava preko sistema IDHKP/IDH (Slika 4), ki skrbi za delitev pretoka ogljika med Krebsovim in glioksilatnim cikлом (2.2.3.1). Kako poteka regulacija pri streptomicetah še ni raziskano.

Z znižanjem izražanja izocitrat dehidrogenaze smo želeli povečati tok ogljika v glioksilatni cikel in tako sevu omogočiti rast preko asimilacije acetata po komplementirani glioksilatni poti. Najverjetnejše bi bila popolna inaktivacija gena *icd* za gostitelja letalna, zato smo se odločili za zmanjšanje izražanje z uporabo tehnologije protismiselne RNA (2.3). Uspešno smo izvedli PCR reakcijo, s katero smo pomnožili fragment *antiICD*, ki predstavlja protismiselno RNA za mRNA *icd* gena. Produkt smo klonirali v vektor pSET152+*PermE*(bRBS)* brez *icl* operona (Slika 13), in nato preko vmesnega plazmidnega konstrukta pCR2.1+*PermE*(bRBS)+antiICD* (Slika 14) v končni konstrukt pSET152+*PermE*+iclOp+PermE*(bRBS)*, ki že vsebuje zapis za ključne gene glioksilatne poti (Slika 15). Ustvarjene plazmidne konstrukte smo konjugirali v *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ in WT. Kot kontrolni plazmid smo v tem poskusu obravnavali pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD*, ki nosi zapis za protismiselno RNA. Kontrolni plazmid pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* smo konjugirali v WT sev, ker smo želeli preveriti, če zapis *antiICD* vpliva na rast seva. Kontrolni plazmid pSET152+*PermE*(bRBS)+antiICD* smo konjugirali tudi v $\Delta emcOp$ sev, kjer smo želeli pokazati, da sam zapis *antiICD* (brez genov glioksilatnega cikla) ne vpliva na povrnitev sposobnosti rasti na acetatu. Ko smo testirali rast pridobljenih sevov na kompleksnem gojišču ISP4 (Slika 26) smo opazili, da sev WT s kontrolnim plazmidom, ki nosi zapis za protismiselno RNA *antiICD*, raste slabše kot ostali. Omenjeni sev je na minimalnem gojišču rastel dobro. Najverjetnejše je zaradi inhibicije izocitrat dehidrogenaze prišlo do upočasnitve Krebsovega cikla, s tem se je upočasnila rast seva na kompleksnem gojišču. Na minimalnem gojišču z acetatom pa je ta inhibicija omogočala večji tok skozi pot EMC in s tem dobro rast seva.

Pri vrednotenju rasti sevov na minimalnem gojišču z acetatom smo opazili omejeno rast seva $\Delta emcOp$ z vnešenim *icl* operonom in zapisom *antiICD*. V primerjavi s kontrolnimi sevi (št. 1 in 3 na sliki 26) je rast sicer slabša, vendar dobro opazna. S tem smo potrdili naše domneve, da so geni glioksilatnega cikla *aceA*, *aceB2* in *fadC2* iz *S. coelicolor* funkcionalni, da pa se verjetno niso izražali dovolj močno. Zaporedje protismiselne RNA zapisa *antiICD* se je v celici predvidoma prepisalo v mRNA, ki je bila komplementarna delu mRNA *icd* gena. Predvidoma je prišlo do vezave, s tem je bila oslabljena translacija v protein, posledično je bilo v celici manjša koncentracija encima izocitrat dehidrogenaze. Predvidevamo, da se je tok ogljika iz Krebsovega cikla preusmeril v glioksilatni cikel, ki je omogočil sintezo celičnih komponent in s tem rast seva.

V izbranih sevih (3.2.13) smo želeli dodatno potrditi, da smo z vnosom protismiselne RNA res znižali aktivnost encima izocitrat dehidrogenaze. Seve smo namnožili v minimalnem tekočem gojišču in vzorčili v različnih časovnih točkah. Rast sevov smo spremljali tudi z merjenjem optične gostote in spremembo pH. Ocenili smo, da izbrani sevi rastejo primerljivo dobro (Sliki 27 in 28), in da so kljub minimalnim razlikam v hitrosti rasti primerni za nadaljnje poskuse merjenja encimske aktivnosti, saj bomo izmerjeno encimsko aktivnost normalizirali na količino proteinov v vzorcih. Iz odvzetih vzorcev smo izolirali celične proteine in določilo njihovo koncentracijo z Bradfordovo metodo. Tako določena koncentracija proteinov v posameznem vzorcu nam je omogočila normalizacijo encimske aktivnosti ICD, in s tem izključitev možnosti vpliva količine biomase na rezultat aktivnosti encima. Iz grafa na sliki 29 je razvidno, da smo najvišjo vrednost encimske aktivnosti izmerili v WT sevu z vstavljenim praznim pSET152+*PermE** plazmidom, ki nima zapisa za protismiselno RNA *antiICD*. Pri sevih z zapisom za *antiICD* smo izmerili nižje vrednosti encimske aktivnosti, v času 45 h je bila v WT sevu izmerjena kar dvakrat višja encimska aktivnost kot pri sevih z *antiICD*. Nizka encimska aktivnost je bila neodvisna od prisotnosti glioksilatnega cikla. S tem smo dokazali, da je vnos protismiselne RNA v obliki *antiICD* zapisa res znižal translacijo mRNA gena *icd*, in tako zmanjšal koncentracijo ICD encima v celici.

S prenosom ključnih genov glioksilatnega cikla iz *S. coelicolor* v *S. tsukubaensis* smo pokazali, da so geni funkcionalni, in da sevu *S. tsukubaensis* z inaktivirano potjo EMC omogočajo rast na acetatu kot edinem viru ogljika. Glede na podatke o obstoju obeh metabolnih poti za asimilacijo acetata v *S. coelicolor* nas je zanimalo, če sta res obe poti funkcionalni. Pripravili smo konstrukt za inaktivacijo operona *emc* v *S. coelicolor*, postopek je opisan v poglavju 4.8, in ga konjugirali v *S. coelicolor* J801. Konjugante smo subkultivirali, s čimer smo dosegli najprej primarno rekombinacijo in vgraditev plazmida v genom, kasneje pa sekundarno rekombinacijo in prekinitev operona *emc*. Konstrukt za inaktivacijo je bil oblikovan tako, da ob prekiniti operona *emc* v genomu ostane prisoten zapis za odpornost proti tiostreptonu, s čimer je omogočena selekcija (Slika 36). Inaktivacijo operona *emc* smo uspešno potrdili s PCR reakcijo na osnovi kolonije, kar dokazuje razlika v velikosti PCR produktov (Slika 37). Odsek genoma, kjer je prišlo do

prekinitve operona *emc* smo pomnožili s PCR reakcijo (Slika 38). Produkte smo poslali na sekvenciranje, pridobljena zaporedja smo preverili (rezultati niso prikazani) in potrdili uspešno prekinitev operona za pot EMC v *S. coelicolor*. Vpliva prekinitve operona *emc* na rast organizma nismo zaznali. $\Delta emcOp$ sev je na kompleksnem SM gojišču rastel enako hitro kot WT sev, ravno tako je primerljivo sporuliral.

Literatura navaja (Temuujin in sod., 2011), da je *S. coelicolor* ena izmed redkih bakterijskih vrst, ki lahko razgrajuje agar in uporablja razgradne produkte kot edini vir ogljika. V genomu so odkrili zapis za DagA ekstracelularno endo-agarazo (Bibb in sod., 1987), in DagB, ki deluje kot eks- in endo-agaraza (Bentley in sod., 2002; Temuujin in sod., 2012). Pred začetkom raziskav smo pridobili sev *S. coelicolor* J801, ki ima prekinjen zapis za DagA agarazo in naj ne bi uporabljal agaroze v gojišču kot vir ogljika. Sev smo testirali za rast na agarazi kot edinem viru ogljika. Primerjali smo rast kontrolnega seva *S. coelicolor* A3(2) in *dagA*- seva ter ugotovili, da se seva po rasti bistveno ne razlikuje (rezultati niso prikazani). Vzrok za to bi lahko bila genetska nestabilnost seva, saj je zapis za DagA prekinjen s transpozonom. Možno je tudi, da v genomu obstajajo še druge agaraze, ki omogočajo izkoriščanje agaroze kot vira ogljika. Primer je agaraza DagB, ki so jo odkrili pred kratkim (Temuujin in sod., 2012), in naj bi v *S. coelicolor* sodelovala z DagA agarazo pri razgradnji agaroze. Testirali smo tudi rast na bakterijskem ekstracelularnem polisaharidu gellanu (Phytigel™), ki se ga uporablja kot nadomestek agarja, predvsem pri delu z rastlinskimi tkivnimi kulturami. Gre za polisaharid glukoronske kisline, ramnoze in glukoze. Za razgradnjo je potreben specifičen encim gelan liaza. Po podatkih (Muchova in sod., 2009) je bil encim sicer opisan, a le v sevih *Bacillus* sp., *Sphingomonas* sp., *Geobacillus stearothermophilus*. glede na bioinformacijske podatke v BLAST-u (Altschul in sod., 1990) sev *S. coelicolor* A3(2) sev v genomu nima zapisa za homolog gelan liaze in zato naj polisaharida ne bi razgrajeval in uporabljal kot vir ogljika. Na ploščah z gelanom smo testirali rast sevov *S. coelicolor* A3(2), J801 in $\Delta emcOp$, ter ugotovili, da vsi sevi razgrajujejo polisaharid gelan, in ga uporablja kot vir ogljika za rast (rezultati niso prikazani). Odločili smo se, da bomo rast na acetatu kot edinem viru ogljika, testirali v tekočem minimalnem gojišču, saj nismo našli primerenega strjevalnega agensa. Sev $\Delta emcOp$ smo skupaj s kontrolnim sevom namnožili v tekočem minimalnem gojišču in s HPLC metodo spremljali porabo glukoze in acetata v gojišču. Iz slike 39 je razvidno, da oba seva v 48 h porabita vso glukozo. Med njima ni bilo večjih razlik v hitrosti porabe le-te, saj mutacija v operonu *emc* na presnovo glukoze ne vpliva, ker se ta ne presnavlja po poti EMC. Iz grafa je razvidno, da sta oba seva porabila ves acetat v roku 192 h. Opazili smo, da se je pri sevu $\Delta emcOp$ to zgodilo malo kasneje kakor v sevu J801. S tem poskusom smo pokazali, da je sev s prekinjeno EMC metabolno potjo še vedno sposoben asimilirati acetat. Najverjetnejše se acetat preusmeri v nativno glioksilatno pot.

6 SKLEPI

Po pregledu rezultatov smo prišli do naslednjih sklepov:

- Sev *S. tsukubaensis*, s prekinjenim operonom za metabolno pot EMC, ni sposoben rasti na acetatu kot edinem viru ogljika. Pokazali smo, da sev za asimilacijo acetata uporablja le pot etilmalonil-CoA. S tem smo potrdili našo hipotezo, da sev z inaktiviranim *emc* operonom ni sposoben rasti na acetatu kot edinem viru ogljika.
- Vnos dodatne kopije konstitutivno izraženega operona *emc* v *S. tsukubaensis* z inaktiviranim operonom *emc* sevu povrne sposobnost rasti na acetatu kot edinem viru ogljika.
- Vnos ključnih genov glioksilatnega cikla iz *S. coelicolor* v *S. tsukubaensis* z inaktiviranim operonom *emc* sevu ne povrne sposobnosti rasti na acetatu kot edinem viru ogljika, s čimer nismo potrdili naše hipoteze.
- Vnos ključnih genov glioksilatnega cikla z dodanim zapisom za protismiselno RNA encima izocitrat dehidrogenaze iz *S. coelicolor* v *S. tsukubaensis* z inaktiviranim operonom *emc* sevu delno povrne sposobnost rasti na acetatu, kot edinem viru ogljika. S tem smo delno potrdili našo hipotezo, da je s čezmernim heterolognim izražanjem genov glioksilatnega cikla možno ponovno vzpostaviti rast na acetatu, kot edinem viru ogljika.
- Pokazali smo, da so ključni geni glioksilatnega cikla zapisani v genomu *S. coelicolor* aktivni, in najverjetneje v sevu obstaja funkcionalna glioksilatna metabolna pot za asimilacijo acetata.
- Uspešno smo uporabili metodo protismiselne RNA pri *S. tsukubaensis*, s katero smo znižali izražanje gena za encim izocitrat dehidrogenazo, in posledično njegovo aktivnost v celici.
- Uspešno smo prekinili operon *emc* v *S. coelicolor* in pokazali, da je sev še vedno sposoben asimilirati acetat, najverjetneje po nativni glioksilatni poti.

7 POVZETEK

Streptomicete so aerobne bakterije reda *Actinomycetales*, ki proizvajajo številne sekundarne metabolite. Izredno kompleksen pa je tudi njihov primarni metabolizem, saj lahko za rast uporablja širok nabor virov ogljika, med drugim so sposobne asimilacije spojin z dvema C atomoma, kot je npr. acetat in tudi drugih spojin, ki nastanejo po razgradnji maščobnih kislin in drugih substratov ter v celični metabolizem vstopajo na stopnji acetil-CoA. Asimilacija spojin, ki v metabolizem vstopajo na nivoju intermediata acetil-CoA, lahko pri bakterijah poteka po dveh poteh: z glioksilatnim ciklom, ki predstavlja klasično anaplerotsko reakcijo Krebsovega cikla, in po nedavno odkriti poti etilmalonil-CoA (EMC).

Za naše raziskave smo izbrali dva streptomicetna seva, *S. tsukubaensis*, ki ima v genomu zapis za metabolno pot EMC, in *S. coelicolor*, ki ima v genomu polega zapisa za pot EMC še gene glioksilatnega cikla. Potrdili smo, da *S. tsukubaensis* z inaktiviranim *emc* operonom ni sposoben porabljati acetat kot edini vir ogljika, saj je prekinjena njegova edina možna pot asimilacije. S povrnitvijo vseh petih ključnih genov *emc* operona, pa se sevu povrne sposobnosti rasti na acetatu.

Zanimalo nas je, ali bi lahko v sev *S. tsukubaensis* $\Delta emcOp$ prenesli ključne gene glioksilatne metabolne poti iz bakterije *S. coelicolor*, in mu s tem ponovno omogočili rast na acetatu. Do sedaj ni bilo znano, ali je glioksilatni cikel v *S. coelicolor* sploh funkcionalen. Ugotovili smo, da prenos ključnih genov za izocitrat liaz, malat sintazo in β -hidroksibutiril-CoA dehidrogenazo ni zadostoval za vzpostavitev delajoče glioksilatne poti v sevu *S. tsukubaensis*. Sklepali smo, da gre za funkcionalne gene, vendar je težava v uravnavanju delitve pretoka ogljika med Krebsovim in glioksilatnim ciklom.

Z uporabo metode protismiselne RNA smo znižali aktivnost encima izocitrat dehidrogenaze, ki skrbi za regulacijo na stiku omenjenih metabolnih poti. Iz rezultatov je razvidno, da se je sevu z vstavljenim operonom *icl* in *antiICD* zaporedjem, skoraj delno povrnila sposobnost rasti na minimalnem gojišču, ki kot vir ogljika vsebuje le acetat. S tem smo pokazali, da je glioksilatna pot asimilacije acetata v *S. coelicolor* najbrž funckionalna, in da jo je možno prenesti tudi v sorodne organizme, v našem primeru *S. tsukubaensis*. Ovrednotili smo tudi delovanje metode protismiselne RNA v organizmu *S. tsukubaensis*, saj smo s testi encimske aktivnosti dokazali, da smo v sevih z zapisom za *antiICD* uspeli znižati aktivnost encima izocitrat dehidrogenaze za polovico.

Vlogo gliokslatnega cikla in metabolne poti EMC smo žeeli preučiti še pri *S. coelicolor*, in pokazati, da je v sevu prisotna funkcionalna glioksilatna pot. Konstruirali smo mutanto s prekinjenim operonom *emc* in testirali njegovo sposobnost asimilacije acetata preko glioksilatnega cikla. Rezultati eksperimentov so potrdili, da je sev kljub nedelujoči metabolni poti EMC zmožen asimilacije acetata, najverjetneje po nativni glioksilatni metabolni poti.

8 VIRI

- Akopants K., Florova G., Li C., Reynolds K. A. 2006. Multiple pathways for acetate assimilation in *Streptomyces cinnamonensis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 2: 141-150
- Alber B. E. 2011. Biotechnological potential of the ethylmalonyl-CoA pathway. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 1: 17-25
- Alber B. E., Spanheimer R., Ebenau-Jehle C., Fuchs G. 2006. Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides*. Molecular Microbiology, 61, 2: 297-309
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410
- Arnvig K. B., Young D. B. 2009. Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology, 73, 3: 397-408
- Atlas R. M., Kelly L. 2004. Handbook of microbiological media. 3. izdaja. Boca Raton, CRC Press: 2045 str.
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A.-M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E. , Quail M. A., Kieser H., Harper D. , Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L. , Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D. , Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorek A. , Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 417, 6885: 141-147
- János B. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. The Journal of Antibiotics, 58, 1: 1-26
- Bibb M. J., Janssen G. J., Ward J. M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. Gene, 38, 1405: 215-226
- Bibb M. J., Jones G. H., Joseph R., Buttner M. J., Ward J. M. 1987. The Agarase Gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Affinity Purification and Characterization of the Cloned Gene Product. Journal of General Microbiology, 133: 2089-2096
- Bierman M., Logan R., O`Brien K., Seno E. T., Nagaraja Rao R., Schoner B. E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia*. Gene, 116: 43-49
- Blažič M., Kosec G., Baebler S., Gruden K., Petković H. 2015. Roles of the crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologues in acetate assimilation and biosynthesis of

- immunosuppressant FK506 in *Streptomyces tsukubaensis*. Microbial Cell Factories, 14, 1: 164-170
- Borodina I., Krabben P., Nielsen J. 2005. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor*. Genome Research, 15, 820-829
- Borodina I., Scholler C., Eliasson A., Nielsen J. 2005. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active entner-doudoroff pathway. Applied and Environmental Microbiology, 71, 5: 2294-302
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254
- Chan M., Sim T.-S. 1998. Malate synthase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585: cloning, molecular characterization and its control by acetate. Microbiology, 144: 3229-3237
- Chan Y. A., Podevels A. M., Kevany B. M., Thomas M. G. 2009. Biosynthesis of Polyketide Synthase Extender Units. Natural Product Reports, 26, 1: 90-114
- Choi E.-Y., Eun A. O., Jong-Hee K., Kang D.-K., Hong S.-K. 2007. Distinct Regulation of the *sprC* Gene Encoding *Streptomyces griseus* Protease C from Other Chymotrypsin Genes in *Streptomyces griseus* IFO13350. Journal Of Microbiology and Biotechnology, 17, 1: 81-88
- Combes P., Till R., Bee S., Smith M. C. M. 2002. The *Streptomyces* Genome Contains Multiple Pseudo-attB Sites for the C31-Encoded Site-Specific Recombination System. Journal of Bacteriology, 184, 20: 5746-5752
- D'Alia D., Nieselt K., Steigle S., Muller J., Verburg I., Takano E. 2010. Noncoding RNA of glutamine synthetase I modulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology, 192, 4: 1160-1164
- Demain Arnold L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. International Microbiology, 1: 259-264
- Erb T. J., Berg I. A., Brecht V., Muller M., Fuchs G., Alber B. E. 2007. Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 25: 10631-10636
- Erb T. J., Brecht V., Fuchs G., Muller M., Alber B. E. 2009. Carboxylation mechanism and stereochemistry of crotonyl-CoA carboxylase/reductase, a carboxylating enoyl-thioester reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 22: 8871-8876

- Erb T. J., Fuchs G., Alber B. E. 2009. (2S)-Methylsuccinyl-CoA dehydrogenase closes the ethylmalonyl-CoA pathway for acetyl-CoA assimilation. *Molecular Microbiology*, 73, 6: 992-1008
- Flärdh Klas, Buttner Mark J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 1: 36-49
- Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., 3rd, Smith H. O. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6, 5: 343-345
- Goranovic D., Kosec G., Mrak P., Fujs S., Horvat J., Kuscer E., Kopitar G., Petkovic H. 2010. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 19: 14292-14300
- Han L., Reynolds K. A. 1997. A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in *streptomycetes*. *Journal of Bacteriology*, 179, 16: 5157-5164
- Haydock S. F., Appleyard A. N., Mironenko T., Lester J., Scott N., Leadlay P. F. 2005. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. *Microbiology*, 151, 10: 3161-3169
- Haydock S. F., Mironenko T., Ghoorahoo H. I., Leadlay P. F. 2004. The putative elaiophylin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin. *Journal of Biotechnology*, 113, 1-3: 55-68
- Huttner S., Mecke D., Frohlich K. U. 1997. Gene cloning and sequencing, and enzyme purification of the malate synthase of *Streptomyces arenae*. *Gene*, 188, 2: 239-46
- Jung W. S., Kim E., Yoo Y. J., Ban Y. H., Kim E. J., Yoon Y. J. 2014. Characterization and engineering of the ethylmalonyl-CoA pathway towards the improved heterologous production of polyketides in *Streptomyces venezuelae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 3701-3713
- Karray F., Darbon E., Oestreicher N., Dominguez H., Tophile K., Gagnat J., Blondelet-Rouault M. H., Gerbaud C., Pernodet J. L. 2007. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology*, 153, 12: 4111-4122
- Khomyakova M., Bukmez O., Thomas L. K., Erb T. J., Berg I. A. 2011. A methylaspartate cycle in haloarchaea. *Science*, 331, 6015: 334-337
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, The John Innes Foundation: 613 str.

- Kornberg H. L., Madsen N. B. 1958. The metabolism of C2 compounds in microorganisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle. *Biochemical Journal*, 68, 3: 549-557
- Kosec G., Goranovic D., Mrak P., Fujs S., Kuscer E., Horvat J., Kopitar G., Petkovic H. 2012. Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506. *Metabolic Engineering*, 14, 1: 39-46
- Lefers M., 2004. Hedgehog signaling glossary. Chicago, Northwestern University. (26. nov. 2004)
http://groups.molbiosci.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-C/constitutive_promoter.html (januar 2015): 1 str.
- Lewin A., Baus D., Kamal E., Bon F., Kunisch R., Maurischat S., Adonopoulou M., Eich K. 2008. The mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) from *Mycobacterium bovis* BCG influences various growth characteristics. *BMC Microbiology*, 8: 91
- Chaoxuan L., Roegge K., Kelly L. W. 2009. Analysis of the Indanomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 10, 6: 1064-1072
- Thermo Fisher Scientific, Life Technologies. 2008. Vector NTI. Carlsbad, California, USA.
<https://www.thermofisher.com/si/en/home.html> (3. jan. 2015)
- Loke P., Sim T. S. 2000. Molecular cloning, heterologous expression, and functional characterisation of a malate synthase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 8: 764-769
- Lorenz M. C., Fink G. R. 2002. Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryotic Cell*, 1, 5: 657-662
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2009. Brock biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 1152 str.
- Magdevska V., Gaber R., Goranovic D., Kuscer E., Boakes S., Duran Alonso M. B., Santamaria R. I., Raspor P., Leadlay P. F., Fujs S., Petkovic H. 2010. Robust reporter system based on chalcone synthase *rppA* gene from *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 2: 111-119
- Man S., Cheng R., Miao C., Gong Q., Gu Y., Lu X., Han F., Yu W. 2011. Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 39, 8: 50
- Muchova M., Ruzicka J., Julinova M., Dolezalova M., Houser J., Koutny M., Bunkova L. 2009. Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge. *Water Science and Technology*, 60, 4: 965-973

- NCBI. 1988. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine, National Institutes of Health, Rockville Pike, Bethesda, USA.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (3. jan. 2015)
- NEB. 2015. New England BioLabs. NEBuilder Assembly Tool. Ipswich, Massachusetts, USA.
<http://nebuilder.neb.com/> (6. feb. 2015)
- Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 21: 12215-12220
- Palaniappan N., Kim B. S., Sekiyama Y., Osada H., Reynolds K. A. 2003. Enhancement and selective production of phoslactomycin B, a protein phosphatase IIa inhibitor, through identification and engineering of the corresponding biosynthetic gene cluster. Journal of Biological Chemistry, 278, 37: 35552-35557
- Panek J., Bobek J., Mikulik K., Basler M., Vohradsky J. 2008. Biocomputational prediction of small non-coding RNAs in *Streptomyces*. BMC Genomics, 9: 217
- Quade N., Huo L., Rachid S., Heinz D. W., Muller R. 2012. Unusual carbon fixation gives rise to diverse polyketide extender units. Nature Chemical Biology, 8, 1: 117-124
- Rasmussen L. C., Sperling-Petersen H. U., Mortensen K. K. 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. Microbial Cell Factories, 6: 24
- Sambrook J., Russell, D.W.. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. izdaja. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2100 str.
- Sharbati S., Schramm K., Rempel S., Wang H., Andrich R., Tykiel V., Kunisch R., Lewin A. 2009. Characterisation of porin genes from *Mycobacterium fortuitum* and their impact on growth. BMC Microbiology, 9: 31
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Current Opinion in Chemical Biology, 7, 2: 285-295
- Shinar G., Rabinowitz J. D., Alon U. 2009. Robustness in glyoxylate bypass regulation. PLoS Computational Biology, 5, 3: e1000297, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000297: 8 str.
- Sioud S., Aigle B., Karray-Rebai I., Smaoui S., Bejar S., Mellouli L. 2009. Integrative gene cloning and expression system for *Streptomyces* sp. US 24 and *Streptomyces* sp. TN 58 bioactive molecule producing strains. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, 6: 464986, doi: 10.1155/2009/464986: 10 str.

- Taylor R. C., Brown A. K., Singh A., Bhatt A., Besra G. S. 2010. Characterization of a beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 156, 7: 1975-1982
- Temuujin U., Chi W. J., Chang Y. K., Hong S. K. 2012. Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type beta-agarase-producing neoagarobiose. *Journal of Bacteriology*, 194, 1: 142-149
- Temuujin U., Chi W. J., Lee S. Y., Chang Y. K., Hong S. K. 2011. Overexpression and biochemical characterization of DagA from *Streptomyces coelicolor* A3(2): an endo-type beta-agarase producing neoagarotetraose and neoagarohexaose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 4: 749-759
- Tezuka T., Hara H., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2009. Identification and gene disruption of small noncoding RNAs in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 191, 15: 4896-4904
- ThermoFisher Scientific. 2016. GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp. Burlington, ThermoFisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0334> (17. feb. 2016)
- Uguru G. C., Mondhe M., Goh S., Hesketh A., Bibb M. J., Good L., Stach J. E. 2013. Synthetic RNA Silencing of Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PloS One*, 8, 6: e67509, doi: 10.1371/journal.pone.0067509: 8 str.
- Wheeler D. L., Barrett T., Benson D. A., Bryant S. H., Canese K., Chetvernin V., Church D. M., DiCuccio M., Edgar R., Federhen S., Geer L. Y., Kapustin Y., Khovayko O., Landsman D., Lipman D. J., Madden T. L., Maglott D. R., Ostell J., Miller V., Pruitt K. D., Schuler G. D., Sequeira E., Sherry S. T., Sirotnik K., Souvorov A., Starchenko G., Tatusov R. L., Tatusova T. A., Wagner L., Yaschenko E. 2007. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 35, Database issue: D5-12, doi: 10.1093/nar/gkr1184: 16 str.
- Wilson M. C., Moore B. S. 2012. Beyond ethylmalonyl-CoA: the functional role of crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologs in expanding polyketide diversity. *Natural Product Reports*, 29, 1: 72-86
- Wilson T. 1998. Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology*, 144: 2687-2695
- Wolfe A. J. 2005. The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 1: 12-50
- Wu K., Chung L., Revill W. P., Katz L., Reeves C. D. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene*, 251: 81-90

Ye J. , Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 13, 134: 1-11

Zhang R., Ou H.-Y., Zhang C.-T. 2004. DEG: a database of essential genes. Nucleic Acids Research, 32: 271-272

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Hrvoju Petkoviću za pomoč, nasvete in vse potrebne popravke pri izdelavi magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi somentorju dr. Marku Blažiču za predanost svoji vlogi in za vso pomoč, ki mi jo je namenil. Hvala za vse nasvete, tako strokovne, kot življenske. Upam, da se bo čas in trud, ki si ga vložil v moje izobraževanje, kmalu povrnil.

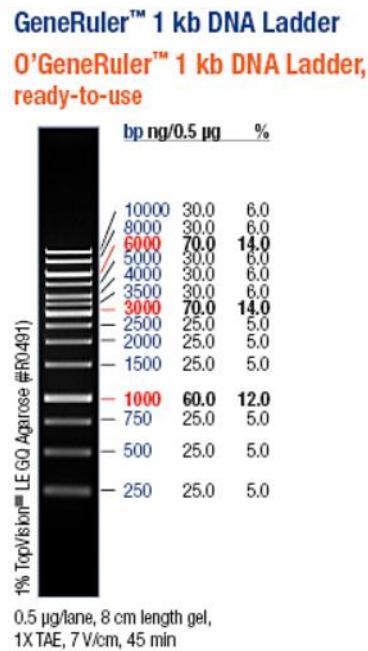
Zahvala gre tudi podjetju Acies Bio d.o.o., ki mi je omogočilo delo na omenjenem projektu in vsem zaposlenim, ki so mi pomagali pri nastanku magistrskega dela. Rada bi se zahvalila ekipi v analitskem laboratoriju, predvsem Aljažu Križaju za pomoč pri izvedbi HPLC meritev.

Zahvaljujem se predvsem svojim staršem, za moralno in finančno podporo v času celotnega študija in priprave magistrskega dela. Svoje naloge boljše ne bi mogla opraviti.

Na koncu pa se zahvaljujem še svojemu bodočemu možu, Deanu, ki mi je stal ob strani tudi takrat, ko stvari niso potekale po načrtu, in mi je pomagal po svojih najboljših močeh.

PRILOGA A

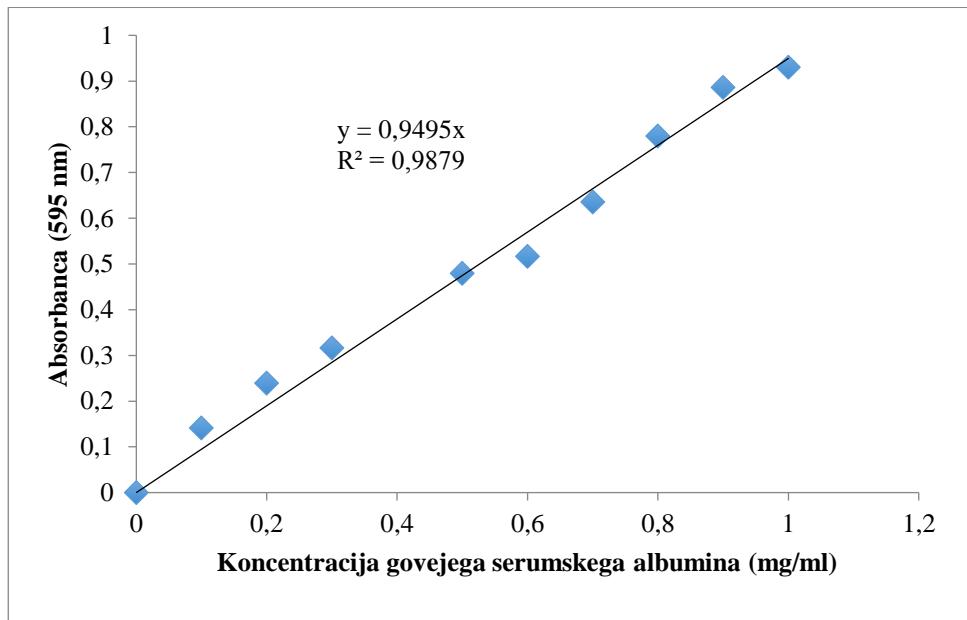
DNA velikostni standard



Slika A1: DNA velikostni standard »Gene Ruler TM DNA Ladder Mix« (ThermoFisher Scientific, 2016).

PRILOGA B

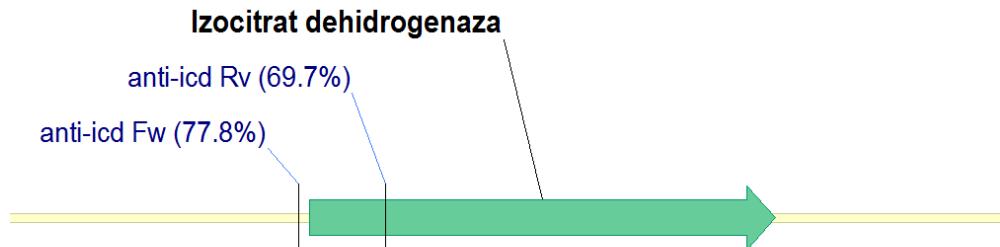
Umeritvena krivulja Bradford reakcije



Slika B1: Umeritvena krivulja Bradford reakcije z govejim serumskim albuminom v različnih koncentracijah.

PRILOGA C

Naleganje začetnih oligonukleotidov na genu *icd*



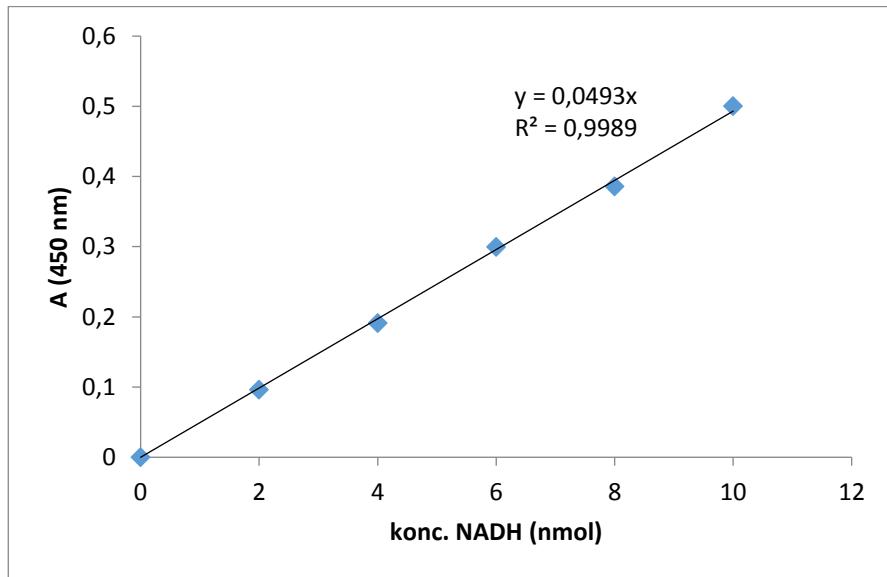
Slika C1: Naleganje začetnih **anti-icd Fw** in **anti-icd Rv** oligonukleotidov na genu *icd*.

PRILOGA D

Umeritvena krivulja standarda NADH za test ICD encimske aktivnosti

Preglednica D1: Izmerjene absorbance pri različnih koncentracijah NADH

konz. NADH (nmol)	A (450 nm)
0	0
2	0,0964
4	0,1914
6	0,2999
8	0,3859
10	0,5004



Slika D1: Umeritvena krivulja standarda NADH za test ICD encimske aktivnosti.

PRILOGA E

Test encimske aktivnosti izocitrat dehidrogenaze v *S. tsukubaensis*

t (meritve)	10 minut	Čas	Absorbance					Konc. NADPH	Faktor redčitve
A (slepa)	0,0660	(h)	t=0	t=0 (-slepa)	t=10	t=10 (-slepa)	ΔA	(nmol)	(x)
Št. vzorca	Sev								
1	WT	21	0,0941	0,0281	0,4067	0,3407	0,3126	6,341	50
2	WT	21	0,1084	0,0424	0,4586	0,3926	0,3502	7,103	50
3	WT + antiICD	21	0,0912	0,0252	0,1426	0,0766	0,0514	1,043	50
4	WT + antiICD	21	0,0778	0,0118	0,1971	0,1311	0,1193	2,420	20
5	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	21	0,1287	0,0627	0,4011	0,3351	0,2724	5,525	30
6	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	21	0,1097	0,0437	0,3792	0,3132	0,2695	5,467	30
7	WT	24	0,1572	0,0912	0,5785	0,5125	0,4213	8,546	50
8	WT	24	0,1112	0,0452	0,603	0,5370	0,4918	9,976	50
9	WT + antiICD	24	0,1245	0,0585	0,3363	0,2703	0,2118	4,296	30
10	WT + antiICD	24	0,1354	0,0694	0,3889	0,3229	0,2535	5,142	20
11	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	24	0,1	0,0340	0,3866	0,3206	0,2866	5,813	50
12	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	24	0,1042	0,0382	0,4481	0,3821	0,3439	6,976	40
13	WT	27	0,123	0,0570	0,6831	0,6171	0,5601	11,361	150
14	WT	27	0,1189	0,0529	0,6521	0,5861	0,5332	10,815	130
15	WT + antiICD	27	0,122	0,0560	0,601	0,5350	0,4790	9,716	50
16	WT + antiICD	27	0,1214	0,0554	0,4884	0,4224	0,3670	7,444	50
17	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	27	0,1256	0,0596	0,6016	0,5356	0,4760	9,655	80
18	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	27	0,1295	0,0635	0,5906	0,5246	0,4611	9,353	70
19	WT	29	0,1304	0,0644	0,7508	0,6848	0,6204	12,584	200
20	WT	29	0,1151	0,0491	0,6063	0,5403	0,4912	9,963	190
21	WT + antiICD	29	0,1176	0,0516	0,5739	0,5079	0,4563	9,256	90
22	WT + antiICD	29	0,1243	0,0583	0,5843	0,5183	0,4600	9,331	80
23	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	29	0,1133	0,0473	0,5142	0,4482	0,4009	8,132	130
24	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	29	0,1103	0,0443	0,5419	0,4759	0,4316	8,755	130
25	WT	32	0,1536	0,0876	0,9028	0,8368	0,7492	15,197	200
26	WT	32	0,1366	0,0706	0,8199	0,7539	0,6833	13,860	190
27	WT + antiICD	32	0,1576	0,0916	0,9439	0,8779	0,7863	15,949	170
28	WT + antiICD	32	0,1369	0,0709	0,7494	0,6834	0,6125	12,424	130
29	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	32	0,1277	0,0617	0,6304	0,5644	0,5027	10,197	160
30	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	32	0,1107	0,0447	0,5325	0,4665	0,4218	8,556	160
31	WT	34	0,1624	0,0964	1,0297	0,9637	0,8673	17,592	200
32	WT	34	0,1542	0,0882	0,9873	0,9213	0,8331	16,899	140
33	WT + antiICD	34	0,1366	0,0706	0,7943	0,7283	0,6577	13,341	180
34	WT + antiICD	34	0,1365	0,0705	0,8042	0,7382	0,6677	13,544	170

Se nadaljuje...

Nadaljevanje Priloge E: Test encimske aktivnosti izocitrat dehidrogenaze v *S. tsukubaensis*

35	<i>AemcOp + iclOp + antiICD</i>	34	0,1099	0,0439	0,5423	0,4763	0,4324	8,771	170
36	<i>AemcOp + iclOp + antiICD</i>	34	0,1169	0,0509	0,5947	0,5287	0,4778	9,692	170
37	WT	45	0,1882	0,1222	1,3296	1,2636	1,1414	23,152	120
38	WT	45	0,1704	0,1044	1,1617	1,0957	0,9913	20,108	120
39	WT + <i>antiICD</i>	45	0,12	0,0540	0,6477	0,5817	0,5277	10,704	160
40	WT + <i>antiICD</i>	45	0,1191	0,0531	0,6049	0,5389	0,4858	9,854	130
41	<i>AemcOp + iclOp + antiICD</i>	45	0,12	0,0540	0,5766	0,5106	0,4566	9,262	200
42	<i>AemcOp + iclOp + antiICD</i>	45	0,1101	0,0441	0,5734	0,5074	0,4633	9,398	140
43	WT	49	0,1741	0,1081	1,2018	1,1358	1,0277	20,846	120
44	WT	49	0,1506	0,0846	1,0072	0,9412	0,8566	17,375	130
45	WT + <i>antiICD</i>	49	0,1233	0,0573	0,6624	0,5964	0,5391	10,935	150
46	WT + <i>antiICD</i>	49	0,1237	0,0577	0,5785	0,5125	0,4548	9,225	120
47	<i>AemcOp + iclOp + antiICD</i>	49	0,1168	0,0508	0,5598	0,4938	0,4430	8,986	120

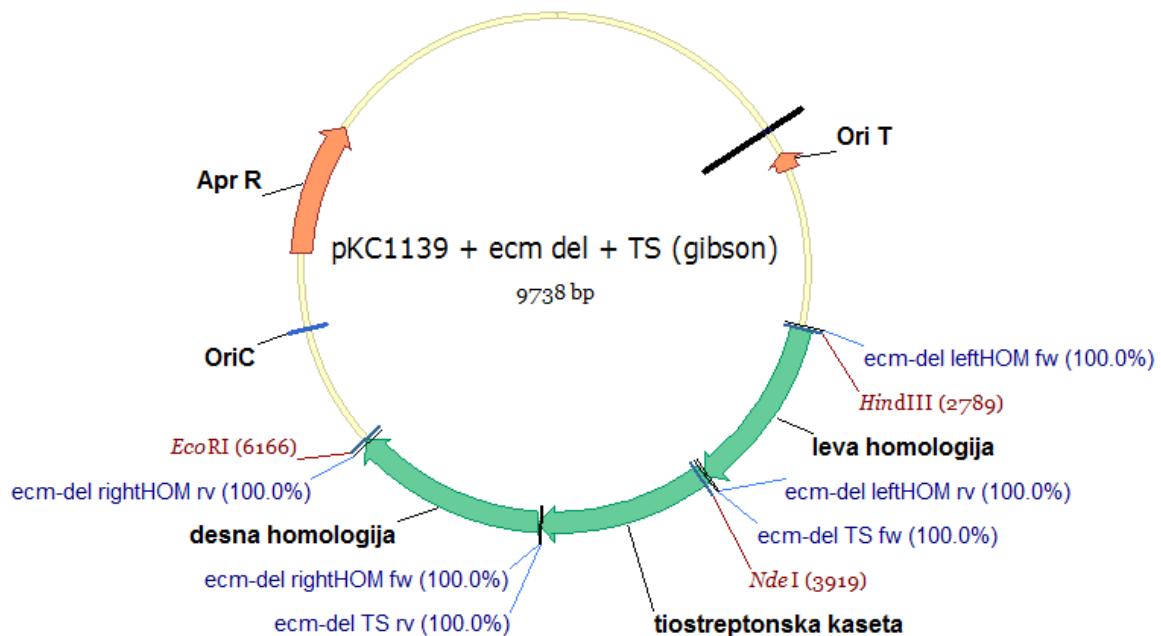
PRILOGA F

Test encimske aktivnosti izocitrat dehidrogenaze v *S. tsukubaensis*

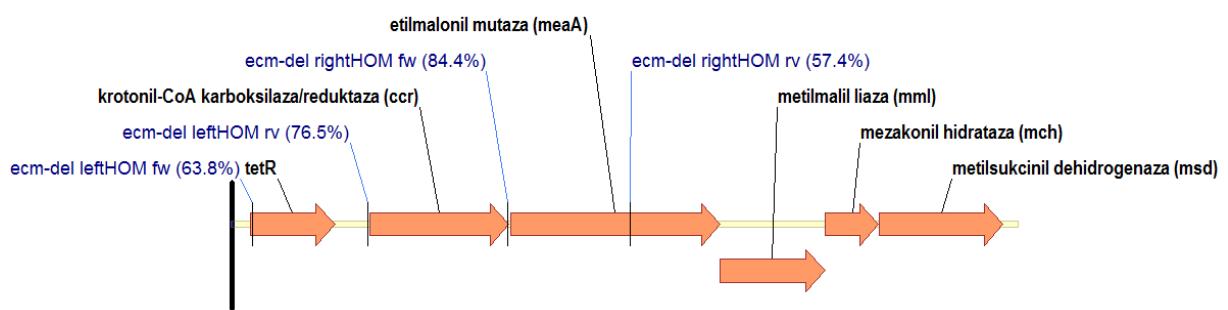
Št. vzorca	Sev	Aktivnost ICD	Konc. proteinov	Aktivnost ICD
		(nmol/min/ml)	(mg/ml)	(nmol/min/mg)
1	WT	634,1	0,81	779,2
2	WT	710,3	0,67	1064,5
3	WT + antiICD	104,3	0,23	448,5
4	WT + antiICD	96,8	0,28	349,1
5	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	331,5	0,48	687,1
6	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	328,0	0,41	797,0
7	WT	854,6	0,99	867,3
8	WT	997,6	0,89	1118,0
9	WT + antiICD	257,8	0,38	685,6
10	WT + antiICD	205,7	0,35	588,7
11	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	581,3	0,84	690,9
12	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	558,1	0,65	857,6
13	WT	3408,3	3,14	1086,1
14	WT	2812,0	2,72	1032,8
15	WT + antiICD	971,6	0,88	1107,0
16	WT + antiICD	744,4	0,81	924,5
17	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	1544,8	1,33	1160,2
18	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	1309,4	1,24	1060,2
19	WT	5033,7	3,99	1260,6
20	WT	3786,1	3,60	1050,9
21	WT + antiICD	1666,0	1,48	1123,8
22	WT + antiICD	1492,9	1,40	1066,1
23	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2114,3	2,47	855,1
24	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2276,2	2,63	865,0
25	WT	6078,7	4,52	1346,2
26	WT	5266,8	3,74	1408,7
27	WT + antiICD	5422,8	3,44	1578,0
28	WT + antiICD	3230,2	2,39	1349,6
29	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	3263,0	3,25	1002,7
30	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2737,8	3,24	844,5
31	WT	7036,9	4,75	1482,5
32	WT	4731,6	2,98	1588,4
33	WT + antiICD	4802,7	3,50	1371,6
34	WT + antiICD	4604,8	3,31	1392,7
35	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2982,1	3,22	926,9
36	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	3295,2	3,43	959,3
37	WT	5556,5	2,35	2361,8
38	WT	4825,8	2,34	2058,3
39	WT + antiICD	3425,2	3,10	1105,6
40	WT + antiICD	2562,0	2,54	1007,2
41	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	3704,7	4,34	853,9
42	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2631,3	3,00	878,0
43	WT	5003,0	2,37	2113,3
44	WT	4517,6	2,19	2066,4
45	WT + antiICD	3280,5	3,10	1059,1
46	WT + antiICD	2214,0	2,33	949,2
47	<i>ΔemcOp + iclOp + antiICD</i>	2156,6	2,30	936,2

PRILOGA G

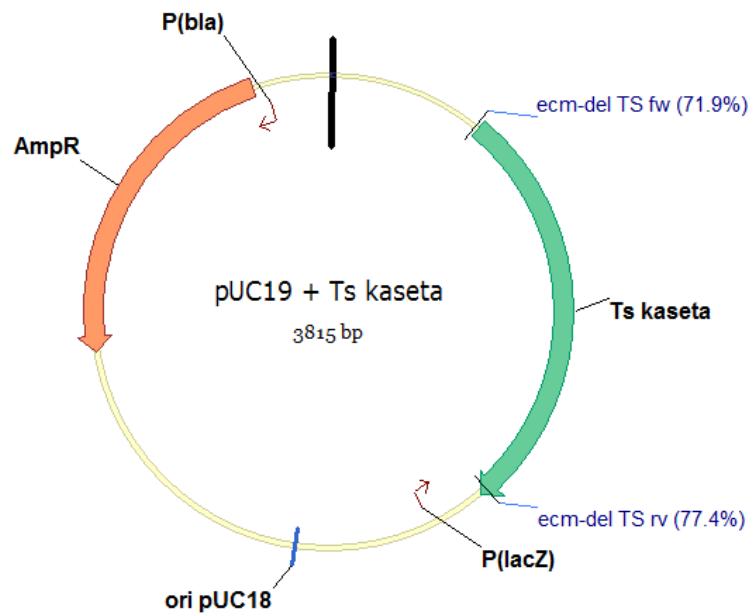
Naleganje začetnih oligonukleotidov pri oblikovanju konstrukta za inaktivacijo *emc* operona *S. coelicolor*



Slika G1: Naleganje začetnih oligonukleotidov na končnem konstruktu pKC1139+emc del+ts.



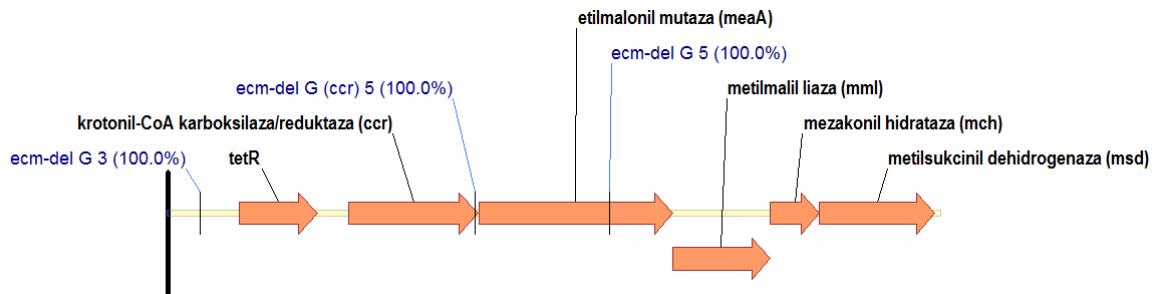
Slika G2: Naleganje začetnih oligonukleotidov na segment gDNA *S. coelicolor*.



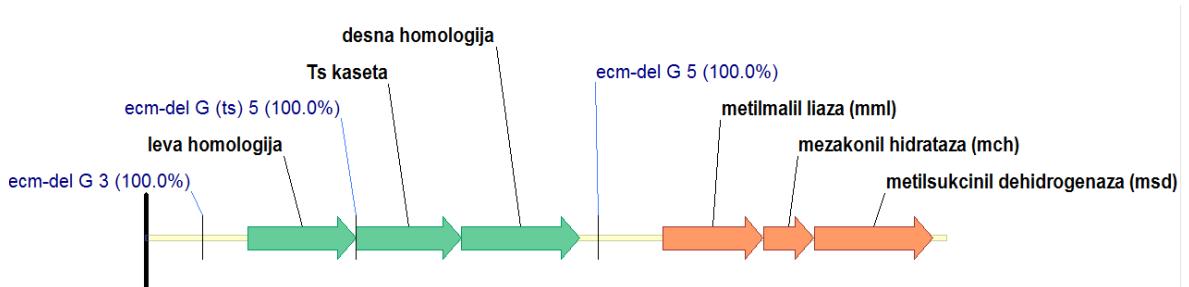
Slika G3: Naleganje začetnih oligonuleotidov na plazmidu pUC19 + Ts kaseta.

PRILOGA H

Naleganje začetnih oligonukleotidov pri potrjevanju inaktivacije *emc* operona *S. coelicolor*



Slika H1: Naleganje začetnih oligonukleotidov na sevu J801. Velikost PCR pomnožka v primeru divjega tipa: 2883 bp.



Slika H2: Naleganje začetnih oligonukleotidov na genomu mutante *ΔemcOp*. Velikost PCR pomnožka v primeru mutante: 1559 bp.

PRILOGA I

Merjenje koncentracije glukoze, acetata v gojišču NMMB s sevi *S. coelicolor*

Št. vzorca	t (h)	Sev	Glukoza (g/l)	Acetat (g/l)
1	0	-	1	2
2	0	WT	0,97	1,93
3	0	WT	0,96	1,91
4	0	WT	0,96	1,9
5	0	<i>ΔemcOp</i>	0,97	1,88
6	0	<i>ΔemcOp</i>	0,82	1,71
7	0	<i>ΔemcOp</i>	0,94	1,88
8	24	WT	0,72	1,64
9	24	WT	0,79	1,59
10	24	WT	0,91	1,65
11	24	<i>ΔemcOp</i>	0,41	1,51
12	24	<i>ΔemcOp</i>	0,56	1,69
13	24	<i>ΔemcOp</i>	0,65	1,61
14	48	WT	0	1,59
15	48	WT	0	1,57
16	48	WT	0	1,61
17	48	<i>ΔemcOp</i>	0	1,48
18	48	<i>ΔemcOp</i>	0	1,35
19	48	<i>ΔemcOp</i>	0	1,22
20	72	WT	0	1,16
21	72	WT	0	1,11
22	72	WT	0	1,18
23	72	<i>ΔemcOp</i>	0	1,03
24	72	<i>ΔemcOp</i>	0	0,92
25	72	<i>ΔemcOp</i>	0	1,11
26	96	WT	0	0,56
27	96	WT	0	0,31
28	96	WT	0	0,37
29	96	<i>ΔemcOp</i>	0	0,53
30	96	<i>ΔemcOp</i>	0	0,61
31	96	<i>ΔemcOp</i>	0	0,84
32	120	WT	0	0
33	120	WT	0	0
34	120	WT	0	0
35	120	<i>ΔemcOp</i>	0	0
36	120	<i>ΔemcOp</i>	0	0
37	120	<i>ΔemcOp</i>	0	0,36
38	168	WT	0	0
39	168	WT	0	0
40	168	WT	0	0
41	168	<i>ΔemcOp</i>	0	0
42	168	<i>ΔemcOp</i>	0	0
43	168	<i>ΔemcOp</i>	0	0,13
44	192	WT	0	0
45	192	WT	0	0
46	192	WT	0	0
47	192	<i>ΔemcOp</i>	0	0
48	192	<i>ΔemcOp</i>	0	0
49	192	<i>ΔemcOp</i>	0	0