

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Larisa NICOLETTI

**KONSTRUKCIJA PLAZMIDOV ZA
UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV
OPERONA *emc* BAKTERIJ *Streptomyces rimosus*
in *Streptomyces tsukubaensis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Larisa NICOLETTI

**KONSTRUKCIJA PLAZMIDOV ZA UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI
PROMOTORJEV OPERONA *emc*
BAKTERIJ *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces tsukubaensis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**CONSTRUCTION OF PLASMIDS FOR EVALUATION OF *emc*
OPERON PROMOTER ACTIVITY OF *Streptomyces rimosus* and
*Streptomyces tsukubaensis***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija je za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Hrvoja Petkovića, za somentorico asist. dr. Martino Avbelj in za recenzentko prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: asist. dr. Martina Avbelj
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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.

Larisa Nicoletti

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 602.3:579.873.7:577.2(043.2)
KG plazmidi/promotorji/aktivnost promotorjev/*Streptomyces*/operon *emc*/ metabolna pot etilmalonil-CoA
AV NICOLETTI, Larisa
SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)/ AVBELJ, Martina (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program druge stopnje Biotehnologija
LI 2016
IN KONSTRUKCIJA PLAZMIDOV ZA UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV OPERONA *emc* BAKTERIJ *Streptomyces rimosus* IN *Streptomyces tsukubaensis*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XII, 56 str., 16 pregl., 19 sl., 42 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Metabolna pot etilmalonil-CoA (EMC) omogoča bakterijam rodu *Streptomyces* rast na substratih z dvema ogljikovima atomoma kot edinemu viru ogljika. Zapisi za encime metabolne poti EMC in zapis za regulatorni protein iz družine TetR so, skupaj z dvema mestoma vezave regulatornega proteina, organizirani v operon *emc*. Kljub temu, da je organizacija operona *emc* poznana, način uravnavanja izražanja genov v operonu *emc* in usklajevanje izražanja genov z ostalimi potmi primarnega in sekundarnega metabolizma še nista podrobno raziskana. Znano je, da regulatorni protein iz družine TetR uravnava izražanje zapisa za encim EMC-poti – krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr) ter, da vir ogljika vpliva na aktivnost promotorske regije operona *emc* (*Pemc*). S postopki molekuleskega kloniranja smo konstruirali plazmide pLN-1, pLN-2 in pLN-3 za spremeljanje aktivnosti promotorjev operona *emc*. V vektor, tik pred poročevalski gen *xylE* z zapisom za encim katehol-2,3-deoksigenazo, smo vstavili *Pemc* iz bakterij vrste *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces tsukubaensis*. Rekombinantne plazmide smo s transformacijo vnesli v kompetentne celice sevov *S. rimosus* M4018 in *S. rimosus* R7. Transformante smo gojili v gojiščih TSB in GOTC ter spektrofotometrično spremeljali aktivnost promotorjev *Pemc*. Ugotovili smo, da sestava gojišča vpliva na aktivnost *Pemc*. Na aktivnost promotorja verjetno vplivajo tudi številni drugi endogeni in eksogeni dejavniki, ki ostajajo predmet prihodnjih raziskav.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 602.3:579.873.7:577.2(043.2)
CX plasmids/promotor/promotor activity/*Streptomyces*/operon *emc*/ ethymalonil-CoA pathway
AU NICOLETTI, Larisa
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)/ AVBELJ, Martina (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology
PY 2016
TI CONSTRUCTION OF PLASMIDS FOR EVALUATION OF *emc* OPERON PROMOTER ACTIVITY OF *Streptomyces rimosus* AND *Streptomyces tsukubaensis*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 56 p., 16 tab., 19 fig., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Streptomyces spp.* are able to grow on C2 molecules as sole carbon source using ethymalonil-CoA pathway (EMC). Genes encoding EMC pathway and TetR family regulatory protein with its two binding sites are localized in the *emc* operon. Despite the known genomic organization of the *emc* operon regulation of genes in operon and coordination of gene expression with primary and secondary metabolism remains unknown. It is known that TetR family regulator regulate the expression of an enzyme of the EMC pathway – crotonyl-CoA carboxylase/reductase (Ccr) and that source of carbon influence the *emc* operon promoter activity (*Pemc*). Plasmids pLN-1, pLN-2 and pLN-3 were constructed for the purpose of evaluating *Pemc* activity. The *Pemc*, originating from *Streptomyces rimosus* and *Streptomyces tsukubaensis*, were cloned into the vector just before the *xylE* reporter gene, encoding the enzyme catechol 2,3-dioxygenase. Recombinant plasmids were transferred into competent cells of *S. rimosus* M4018 in *S. rimosus* R7. Transformants were grown in TSB and GOTC media and *Pemc* promoter activity was measured spectrophotometrically. Results showed influence of media composition on activity of *Pemc*. Other exogenous and endogenous factors likely influence the promoter activity; therefore, further studies are required.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Streptomyces</i>	3
2.1.1 Taksonomija	3
2.1.2 Morfologija in življenjski cikel	4
2.1.3 Ekologija	5
2.1.3.1 Metabolizem bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	5
2.1.4 Primarni metabolizem	5
2.1.4.1 Glioksilatni cikel	6
2.1.4.2 Pot etilmalonil-CoA	7
2.1.5 Sekundarni metabolizem	10
2.2 GENOM BAKTERIJ RODU <i>Streptomyces</i>	10
2.2.1 Genomska DNA	10
2.2.2 Plazmidna DNA	11
2.2.3 Operon <i>emc</i>	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 SHEMA DELA	13
3.2 MATERIALI	14
3.2.1 Kemikalije	14
3.2.2 Raztopine in pufri	14
3.2.3 Komercialni kompleti	16

3.2.3.1	Komplet za izolacijo genomske DNA	16
3.2.3.2	Komplet za izolacijo plazmidne DNA.....	16
3.2.3.3	Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela	17
3.2.4	Gojišča	17
3.2.5	Antibiotiki.....	18
3.2.6	Restrikcijski encimi	19
3.2.7	Ligacijski encim	19
3.2.8	Standarda za določanje velikosti DNA fragmentov	19
3.2.9	Bakterijski sevi.....	20
3.2.9.1	Sevi bakterije <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.9.2	Sevi bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	20
3.2.10	Plazmidi	21
3.2.10.1	pVM1	21
3.2.10.2	pXE01	22
3.2.10.3	pLN-1.....	22
3.2.10.4	pLN-2.....	22
3.2.10.5	pLN-3.....	23
3.3	LABORATORIJSKA OPREMA	23
3.4	METODE.....	24
3.4.1	Metode uporabljene za pomnoževanje promotorske regije <i>Pemc</i> v verižni reakciji s polimerazo (PCR).....	24
3.4.1.1	Izolacija genomske DNA za PCR.....	24
3.4.1.2	Izbira začetnih oligonukleotidov	24
3.4.1.3	Optimizacija pogojev verižne rekacije s polimerazo.....	25
3.4.2	Agarozna gelska elektroforeza	26
3.4.3	Izolacija in čiščenje DNA iz agaroznega gela	26
3.4.4	Molekulsко kloniranje promotorskih zaporedij <i>Pemc-SR</i> in <i>Pemc-ST</i> v klonirni vektor pMV1	27
3.4.4.1	Vključitev <i>Pemc-SR</i> in <i>Pemc-ST</i> v klonirni vektor pVM1	27
3.4.4.2	Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5 α po metodi SEM.....	27
3.4.4.3	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5 α	28
3.4.4.4	Preverjanje uspešnosti vključitve <i>Pemc</i> v vektor pMV1	28

3.4.5	Molekulsко kloniranje promotorskih zaporedij <i>Pemc-SR</i> in <i>Pemc-ST</i> v integrirni vektor pXE01	29
3.4.5.1	Vključitev <i>Pemc-SR1</i> , <i>Pemc-SR2</i> , <i>Pemc-ST</i> v integrirni vektor pXE01	29
3.4.5.2	Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH10 β	30
3.4.5.3	Elektroporacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH10 β	31
3.4.5.4	Preverjanje uspešnosti vključitve <i>Pemc</i> v vektor pXE01	31
3.4.6	Priprava nemetiliranih plazmidov pLN-1, pLN-2 in pLN-3, primernih za vnos v streptomice	31
3.4.6.1	Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> ET12567	31
3.4.6.2	Elektroporacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> ET12567	32
3.4.6.3	Izolacija nemetilirane plazmidne DNA	32
3.4.7	Vnos plazmidov za ugotavljanje aktivnosti promotorjev v celice <i>S. rimosus</i>	32
3.4.7.1	Priprava kompetentnih celic <i>S. rimosus</i> R7 in M4018	32
3.4.7.2	Elektroporacija kompetentnih celic sevov <i>S. rimosus</i> R7 in M4018.....	33
3.4.7.3	Selekcija transformant <i>S. rimosus</i> R7 in M4018	33
3.4.8	Merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenazne XylE	34
3.4.9	Iskanje palindromskih zaporedij s pomočjo spletnega orodja EMBOSS explorer	35
4	REZULTATI	36
4.1	OPTIMIZACIJA METODE PCR ZA USPEŠNO NAMNOŽITEV PROMOTORSKIH REGIJ <i>Pemc</i>	36
4.1.1	Pomnožki PCR <i>Pemc</i> bakterije <i>S. rimosus</i> M4018	36
4.1.2	Pomnožki PCR <i>Pemc</i> bakterije <i>S. tsukubaensis</i> NRRL18488	37
4.2	KONSTUKCIJA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z VKLJUČKI <i>Pemc</i>	37
4.2.1	Konstrukcija klonirnega plazmida pVM1 z vključki <i>Pemc-SR1</i>, <i>Pemc-SR2</i> in <i>Pemc-ST</i>	37
4.2.2	Konstrukcija integrirnega plazmida pXE01 z vključki <i>Pemc-SR1</i>, <i>Pemc-SR2</i> in <i>Pemc-ST</i>	39
4.2.2.1	Elektroporacija <i>S. rimosus</i> R7 in M4018.....	40
4.3	VREDNOTENJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV <i>emc</i> sevov <i>S. rimosus</i> M4018 IN <i>S. tsukubaensis</i> NRRL18488 Z REPORTERSKIM GENOM <i>xylE</i>	42

4.3.1	Vrednotenje aktivnosti promotorjev <i>Pemc-SR1</i>, <i>Pemc-SR2</i> in <i>Pemc-ST</i> v gojišču GOTC	43
4.3.2	Vrednotenje aktivnosti promotorjev <i>Pemc-SR1</i>, <i>Pemc-SR2</i> in <i>Pemc-ST</i> v gojišču TSB	44
4.3.3	Iskanje palindromskih zaporedij	45
5	RAZPRAVA	47
6	SKLEPI	51
7	POVZETEK	52
8	VIRI	53
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava uporabljenih gojišč	17
Preglednica 2: Uporabljeni antibiotiki.....	19
Preglednica 3: Uporabljene restrikcijske endonukleaze	19
Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi <i>E. coli</i>	20
Preglednica 5: Uporabljeni bakterijski sevi rodu <i>Streptomyces</i>	21
Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.	24
Preglednica 7: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje DNA v PCR	25
Preglednica 8: Program pomnoževanja DNA v PCR.....	26
Preglednica 9: Restrikcijska zmes za rezanje DNA pred ligacijo v pMV1.....	27
Preglednica 10: Zmes reagentov za ligacijo produkta PCR v vektor	27
Preglednica 11: Restrikcijska zmes za preverjanje uspešnosti vključitve vključka v plazmidni vektor	29
Preglednica 12: Restrikcijska zmes za rezanje DNA pred ligacijo v pXE01.....	30
Preglednica 13: Zmes reagentov za ligacijo produkta PCR v vektor.....	30
Preglednica 15: Transformante seva R7 in M4018 izbrane za vrednotenje aktivnosti promotorjev operona <i>emc</i>	42
Preglednica 16: Palindromska zaporedja promotorskih regij operona <i>emc</i>	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska uvrstitev bakterije <i>Streptomyces rimosus</i> in <i>Streptomyces tsukubaensis</i> (LPSN, 2016)	3
Slika 2: Življenjski krog streptomicet (Bush in sod., 2015: 2).....	4
Slika 3: Krebsov cikel in gliksilatni cikel (povzeto po Dunn in sod. 2009: Erb in sod., 2007; Kim in sod., 2004).....	7
Slika 4: Shema metabolne poti etilmalonil-CoA (Blažič, 2014: 11).....	9
Slika 5: Prikaz organizacije operona <i>emc</i> pri bakteriji seva <i>Streptomyces tsukubaensis</i> (Blažič in sod., 2015: priloga 1)	12
Slika 6: Shematski prikaz poteka dela.....	13
Slika 7: Shema vektorja pVM1 (Magdevska, 2010: 40).	21
Slika 8: Shema vektorja pXE0.....	22
Slika 9: Encimska pretvorba brezbarvnega katehola v rumenoobarvan 2-hidroksimukonski-seamialdehid (Magdevska, 2011: 40).....	34
Slika 10: Agarozni gel po elektroforezi pomnožkov PCR promotorja operona <i>emc</i> pri bakteriji <i>S. rimosus</i> M4018.....	36
Slika 11: Agarozni gel po elektroforezi pomnožkov PCR promotorja operona <i>emc</i> pri bakteriji <i>S. tsukubaensis</i> NRRL18488.....	37
Slika 12: Agarozni gel po elektroforezi cepljenih vektorjev pVM1 z vključki <i>Pemc-SR</i> in <i>Pemc-ST</i>	38
Slika 13: Poravna dobljenih nukleotdnih zaporedij <i>Pemc-SR1</i> in <i>Pemc-SR2</i> s promotorjem operona <i>emc</i> seva <i>S. rimosus</i> M4018.	39
Slika 14: Poravna dobljenih nukleotdnih zaporedij <i>Pemc-ST</i> s promotorjem operona <i>emc</i> seva <i>S. tsukubaensis</i> NRRL18488	39
Slika 15: Agarozni gel po elektroforezi cepljenih vektorjev pXE01 z vključki <i>Pemc-SR1</i> , <i>Pemc-SR2</i> in <i>Pemc-ST</i>	40
Slika 16: Rast bakterij <i>S. rimosus</i> 4018 na trdnem gojišču SM pred (A) in po (B) transformaciji s plazmidi pLN-1, pLN-2, pLN-3	41
Slika 17: Rast bakterij <i>S. rimosus</i> R7 na trdnem gojišču SM pred (A) in po transformaciji s plazmidi pLN-1, pLN-2, pLN-3 (B in C)	42
Slika 18: Aktivnost encima katehol 2,3-dioksigenaza pri transformantah <i>S. rimosus</i> R7 in <i>S. rimosus</i> M4018 kultiviranih v gojišču GOTC po 24 h, 48 h in 72 h pri 30 °C	44
Slika 19: Aktivnost encima katehol 2,3-dioksigenaza pri transformantah <i>S. rimosus</i> R7 in <i>S. rimosus</i> M4018 kultiviranih v gojišču TSB po 24 h kultivaciji pri 30 °C.	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp -	Ampicilin
Apr -	Apramicin
bp -	bazni par
CCK -	cikel citronske kislina
Cm -	kloramfenikol
CoA -	koencim A
dH ₂ O -	deionizirana voda
DMSO -	dimetil sulfoksid
dNTP -	deoksiribonukleozidni-trifosfati
ED -	Entner–Doudoroffova pot glukoze
EDTA -	etilendiaminotetraocetna kislina
EMC -	etilmalonil-CoA
EMP -	pot etilmalonil-CoA
G-	po Gramu negativne bakterije
G+	po Gramu pozitivne bakterije
GC -	bazni par gvanin–citozin
LD	nanašalni pufer (angl. <i>loading dye</i>)
LPSN -	zbirka imen prokariontov z nomenklaturo (angl. <i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>)
Mbp -	mega bazni par
OD -	optična gostota
OTC -	oksitetracilkin
PCR -	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PP -	pot pentoze fosfata
rRNA -	ribosomska RNA
TIR -	končne obrnjene ponovitve (angl. <i>inverted terminal repeats</i>)
Tm -	temperatura tališča (angl. <i>melting temperature</i>)
Ts	tiostrepton
WT	divji tip (angl. <i>wild type</i>)

1 UVOD

Bakterije rodu *Streptomyces* so v biotehnologiji znane predvsem kot proizvajalke antibiotika oksitetraciklina (OTC). So nepatogene bakterije, ki jih je mogoče dokaj enostavno in učinkovito transformirati. Dobro so poznane metode genske manipulacije, pogoji gojenja ter proizvodni procesi na industrijskem nivoju. Večino orodij za genetske manipulacije z omenjenim mikroorganizmom so odkrili med raziskovanjem genov za biosintezo OTC (Petkovič in sod., 2006).

Erb in sod. so leta 2007 odkrili, da so nekatere vrste streptomacet zmožne rasti na acetatu kot edinem viru ogljika kljub odsotnosti zapisa za izocitrat liazu, ki je ključni encim glioksilatnega cikla. Ugotovili so, da asimilacija acetata poteka po metabolni poti etilmalonil-CoA (EMC). Večina genov, katerih produkti so vpleteni v metabolno pot EMC, se nahajajo v operonu *emc*. V operonu *emc* je tako zapis za šest encimov metabolne poti EMC: (i) krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (Ccr), (ii) etilmalonil-CoA/metilmalonil-CoA epimeraza (Epi), (iii) (2R) etilmalonil-CoA mutaza (Ecm), (iv) (2S)metilsukcinil-CoA dehidrogenaza (Mcd) in (v) mezakonil-CoA hidrataza (Mch) ter (vi) 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenaza (Had). Poleg zapisa za teh 6 encimov ima operon *emc* tudi zapis za regulatorni protein iz družine TetR-regulatornih proteinov in dve vezavni mesti za zapisan regulatorni protein (Blažič in sod., 2015). Regulatorni protein iz družine TetR se domnevno veže na promotorsko regijo operona *emc* in s tem uravnava izražanje genov tega operona. Drugi način uravnavanja izražanja genov operona *emc* je odvisen od tipa vira ogljika. Ugotovili so, da acetat kot edini vir ogljika inducira izražanje genov metabolne poti EMC, medtem ko enostavni viri sladkorjev (npr. glukoza) inhibirajo izražanje operona *emc* (Blažič in sod., 2015; Okubo in sod., 2010; Smejkalová in sod., 2010).

Med potjo EMC nastajajo številni biotehnološko zanimivi intermediati. Eden izmed njih je 3-hidroksipolibutiril-CoA, ki je prekuzor za sintezo polimera polihidroksibutirata (Erb in sod., 2007). Tudi encimi omenjene metabolne poti so biotehnološko zanimivi. Primer takšnega encima je krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza, ki sodeluje pri sintezi gradbene enote etilmalonil-CoA v biosintezi poliketidov. Blažič in sod. (2015) so dokazali, da gen *ccr1*, ki kodira krotonil CoA karboksilazo/reduktazo, enega od encimov EMC poti, lahko sodeluje tudi pri biosintezi etilmalonata, ki se uporabi pri sintezi sekundarnega metabolita poliketida FK506.

Kljub temu da so nukleotidna zaporedja genov operona *emc* znana, je kompleksen mehanizem uravnavanja izražanja genov tega operona še vedno slabo raziskan. Boljše poznavanje regulatornih poti, ki posredno ali neposredno vplivajo na izražanje genov operona *emc*, bi pripomoglo k izboljšanju že obstoječih industrijskih sevov streptomacet, večjemu donosu sekundarnih metabolitov in oblikovanju novih sevov za industrijsko proizvodnjo produktov in encimov metabolne poti EMC (Blažič in sod., 2015).

1.1 NAMEN DELA

V zadnjih letih smo priča velikemu napredku na področju poznavanja genskih zapisov za encime metabolne poti EMC, kateri so zapisani v operonu *emc*. Kljub temu je uravnavanje njihovega izražanja še vedno slabo poznano. V okviru magistrskega dela smo se osredotočili na aktivnost promotorske regije operona *emc* iz *Streptomyces rimosus* (*S. rimosus*) in *Streptomyces tsukubaensis* (*S. tsukubaensis*), katere zaporedje DNA je pri streptomicetah že poznano.

Namen magistrskega dela je bila konstrukcija plazmidov za ugotavljanje aktivnosti promotorjev operona *emc* bakterij *S. rimosus* M4018 in *S. tsukubaensis* NRRL18488 s pomočjo poročevalskega gena *xylE* za katehol oksigenazo XylE v sevu divjega tipa *S. rimosus* R7.

1.2 HIPOTEZE

Glede na dosedanje raziskave nukleotidnega zaporedja operona *emc*, regulacije izražanja genov operona *emc* ter poznavanja metod molekulskega kloniranja lahko trdimo:

- Z bioinformacijsko analizo zaporedij DNA je mogoče določiti promotorsko regijo pri sevih *S. tsukubaensis* NRRL18488 in *S. rimosus* M4018.
- S pomočjo PCR bomo lahko pomnožili promotorsko regijo operona *emc* pri bakterijah *S. tsukubaensis* in *S. rimosus*.
- Z molekularno-biološkimi metodami bomo pripravili poročevalski sistem na osnovi katehol oksigenaze XylE, ki se izraža v odvisnosti od aktivnosti promotorskih regij operona *emc* pri bakterijah *S. tsukubaensis* in *S. rimosus*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Streptomyces*

2.1.1 Taksonomija

Nitasate bakterije rodu *Streptomyces* uvrščamo v red *Actinomycetales*, družino *Streptomycetaceae*. Rod *Streptomyces* sta predlagala Waksman in Henrici (1943) in ga taksonomsko uvrstila v družino *Streptomycetaceae* glede na morfologijo in kemijsko sestavo celične stene (Anderson in Wellington, 2001).

Streptomicete imajo zelo raznolik, bogat in kompleksen sekundarni metabolizem. Tvorijo strukturno raznolike sekundarne metabolite, med katerimi jih je veliko biotehnološko zanimivih. Zaradi velikega industrijskega pomena so v preteklosti poimenovali in patentirali preko 3000 streptomicetnih vrst, med katerimi je bilo veliko sinonimov. Za preprečitev čezmerne specifikacije, so leta 1964, v okviru projekta, »International Streptomyces Project« (ISP) prvič postavili standardne kriterije za razvrščanje sevov v taksonomske enote. Oblikovali so se prvi taksonomski sistemi, ki so v začetku temeljili na fenotipskih podobnosti oziroma razlikah med bakterijami znotraj rodu (morfologija, barva, nagubanost spor in tvorba melanina) ter sposobnostjo fermentacije različnih virov ogljika. Razvoj hitrih, občutljivih in relativno zanesljivih analitskih metod je omogočil kemotaksonomsko klasifikacijo streptomicet. Temelj razvrščanja so bile analize maščobnih kislin, fagna tipizacija, biokemijski testi, proteinsko profiliranje, analiza celic itd. (Anderson in Wellington, 2001). V zadnjem obdobju je bil ključen kriterij za razvrščanje homologija molekul 16 rRNA v kombinaciji z analizo maščobnih kislin celične stene (Anderson in Wellington, 2001). Danes je opisanih preko 500 vrst bakterij rodu *Streptomyces* (Madigan in sod., 2008).

domena: BACTERIA

deblo: *Actinobacteria*

razred: *Actinobacteria*

podrazred: *Actinobacteridae*

red: *Actinomycetales*

podred: *Streptomycineae*

družina: *Streptomycetaceae*

rod: *Streptomyces*

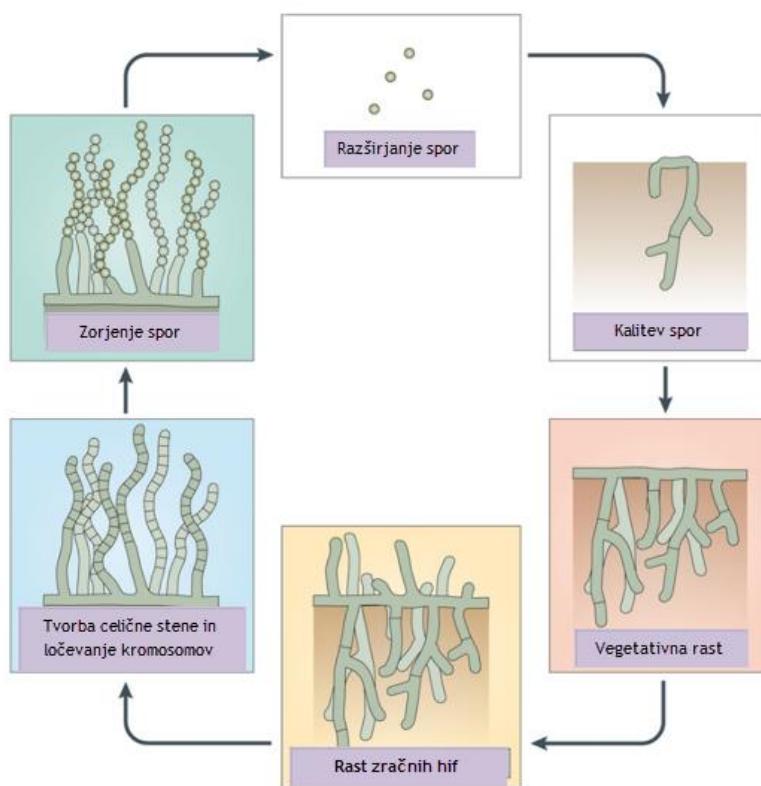
vrsta: *Streptomyces rimosus*

vrsta: *Streptomyces tsukubaensis*

Slika 1: Taksonomska uvrstitev bakterije *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces tsukubaensis* (LPSN, 2016).

2.1.2 Morfologija in življenjski cikel

Življenjski cikel večceličnega micelija streptomicet, se začne s kalitvijo spore, pri čemer nastane filament. Filamenti imajo premer 0,5–1 µm, so različnih dolžin in med vegetativno rastjo pogosto brez prečnih celičnih sten. Rastejo iz koncev in se razvejajo v kompleksen t. i. substratni micelij. S staranjem kolonij in pod ustreznimi pogoji kulitvacije se tvorijo zračne hife, ki tvorijo t. i. zračni micelij. V tej stopnji življenjskega cikla nitastih bakterij se inducira biosinteza sekundarnih metabolotov (Chater in sod., 2010). Na koncih zračnega micelija z delitvijo protoplazme in tvorbo prečnih celičnih sten nastanejo verige spor. Dozorele spore, ki so lahko pigmentirane, se rapršijo ter ob ugodnih pogojih začnejo krog nove generacije. Spore streptomicet se precej razlikujejo od endospor bakterij rodov *Bacillus* in *Clostridium*. Slednje nastanejo s celično diferenciacijo, medtem ko spore streptomicet nastanejo s tvorbo celične stene v večceličem sporoforu. Ureditev in oblika zračnih filamentov se pogosto uporablja pri razvrščanju bakterij debla *Actinobacteria* do rodu in vrste (Barka in sod, 2016).



Nature Reviews | Microbiology

Slika 2: Življenjski krog streptomicet (Bush in sod., 2015: 2).

2.1.3 Ekologija

Streptomicete so po Gramu pozitivne, aerobne bakterije z visokim deležem baznih parov GC (69–78 %) (Anderson in Wellington, 2001). So mezofilni organizmi z optimalno rastjo pri 25–30 °C in nevtralnem pH (6,0–9,0). Povečini so saprotrofi, ki večino svojega življenjskega kroga preživijo kot semi-dormantne spore, še posebej v okolju z omejenimi hranili. So splošno razširjeni mikroorganizmi. V tleh imajo zelo pomembno vlogo, saj vežejo hranila in izločajo številne hidrolitične encime, ki razgrajujejo polisaharide ter ostale makromolekule (Barka in sod. 2016).

Streptomicete so ključne pri kroženju ogljika v tleh, saj razgrajujejo netopne ostanke ostalih organizmov. To so lignocelulozni materiali in hitin, kar pa predstavlja večinski del ogljika na zemlji. Zaradi svojega kompleksnega sekundarnega metabolizma, imajo pomembno vlogo za medicino, saj proizvajajo številne antibiotike in ostale biološko aktivne učinkovine (protitumorske učinkovine, imunosupresanti itd.) (Bentley in sod, 2002).

2.1.3.1 Metabolizem bakterij rodu *Streptomyces*

Streptomicete so kemoorganotrofi z oksidativnim tipom metabolizma. Zanje so značilni veliki genomi (> 8 Mbp) in velik nabor različnih genov, kar se odraža v veliki raznolikosti metabolizma streptomicet. Za rast lahko izrabljajo številne substrate, kot so enostavni sladkorji, alkoholi, aminokisline, aromatske spojine itd (Hodgson, 2000). Velikokrat imajo zapis za zunajcelične encime, ki razgrajujejo substrate in jih potem preko celičnih transporterjev prenašajo v celico (Chater in sod., 2010).

2.1.4 Primarni metabolizem

Primarni metabolizem lahko razdelimo na metabolne poti katabolnih in anabolnih reakcij. S primarnim metabolizmom, imenovanim tudi centralni metabolizem, celica dobi vse potrebne celične gradnike (proteine, nukleinske kisline, lipide, polisaharide in rezervne snovi), potrebne za rast, razvoj in razmnoževanje, ter tudi zagotovi vse potrebne prekurzorje sekundarnih metabolitov (Kieser in sod., 2000).

Streptomicete imajo lahko zapis za različne metabolne poti, zato so zmožne izkoriščati raznolike vire ogljika. Njihove poti primarnega metabolizma so posledično raznolike (Kieser in sod., 2000). Streptomicete za razgradnjo glukoze najpogosteje uporabljajo glikolizo oz. Embden-Mayerhof-Parnasovo (EMP) pot ter pot pentoze fosfata (PP). Nekatere vrste bakterij rodu *Streptomyces* v eksponencialni fazì rasti uporabljajo pot EMP in kasneje zaradi potreb sekundarnega metabolizma preklopijo na pot PP (Kieser in sod., 2000). Dolgo je veljalo, da streptomicete ne uporabljajo Entner–Doudoroffove poti (ED),

ki je značila predvsem za po Gramu negativne bakterije. Borodina in sod. (2005) so pri *S. tenebrarius* poleg poti EMP dokazali tudi prisotnost in aktivnost poti ED (Borodina in sod., 2005).

Naslednja stopnja centralnega metabolizma razgradnje substratov je cikel citronske kisline (CCK) oz. Krebsov cikel. Gre za pogosto metabolno pot, kjer se acetil-CoA, kateri nastaja pri razgradnji ogljikovih hidratov, maščobnih kislin in proteinov, reducira (Madigan in sod., 2008). Geni za encime CCK so prisotni in aktivni pri številnih streptomicetah (Kieser in sod., 2000). Krebsov cikel je pomemben za nastajanje prekurzorjev, ki se uporabljam kot gradbene enote pri biosintezi številnih sekundarnih metabolitov, in ker je tudi del respiratorne poti pri mikroorganizmih (Madigan in sod., 2008). Zaradi sprotne porabe intermediatov CCK jih morajo bakterije nadomeščati s produkti anaplerotičnih reakcij (Han in Reynolds, 1997). Tak primer je bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor* A3(2)), ki z encimom fosfoenolpiruvat (PEP) karboksilazo pretvarjajo PEP v oksalacetet, ki je intermediat CCK (Hodgson, 2000).

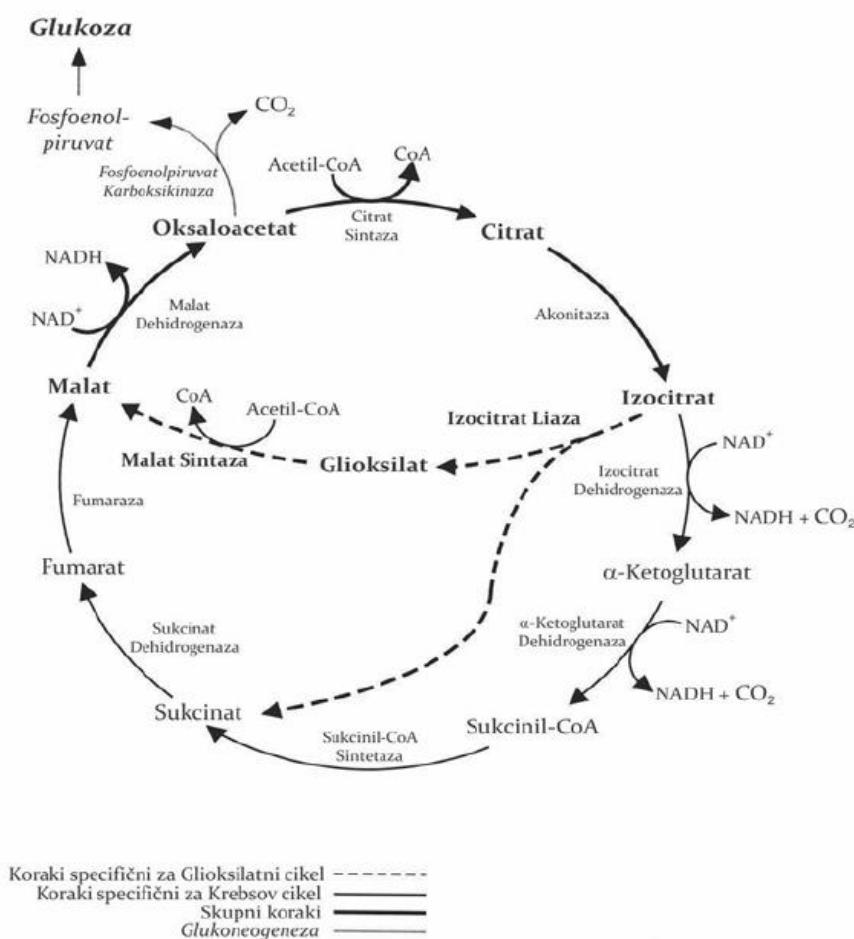
Znanih je nekaj vrst streptomicet, ki so zmožne rasti na spojinah z enim ali dvema atomoma ogljika (C1- in C2-spojinah). Taki spojini sta metanol in acetat (Erb in sod., 2007). Streptomicete metabolizirajo pa tudi druge vire ogljika, kot so maščobne kisline, alkoholi in estri, voski in alkeni. Ti viri ogljika v centralni metabolizem, enako kot C1- in C2-spojine, vstopijo na stopnji acetil-CoA. Pretvorbo acetil-CoA do ključnih intermediatov primarnega metabolizma, kot so piruvat/fosfoenolpiruvat, α -ketoglutarat in oksalacetat, imenujemo asimilacija acetil-CoA (Alber, 2011). Pri streptomicetah poznamo dve metabolni poti za asimilacije acetilCoA: glioksilatni cikel (Kornberg in Madsen, 1957, 1958) in pot etilmalonil-CoA (Erb in sod., 2007).

2.1.4.1 Glioksilatni cikel

Acetil-CoA je ključen intermediat primarnega metabolizma ogljika. Rast mikroorganizmov na C1- in C2-spojinah ter na ostalih komponentah, ki se metabolizirajo in vstopajo v centralni metabolizem na stopnji acetil-CoA, je lahko težavna iz vidika pretvorbe acetil-CoA v ostale celične gradnike. Katabolne reakcije acetil-CoA potekajo preko CCK, pri čemer sinteza celičnih gradnikov ni mogoča, saj se C4-kisline CCK ves čas izločajo iz obtoka v obliki molekule CO₂. Za premostitev te ovire, nekateri mikroorganizmi za rast na acetatu, kot edinemu viru ogljika, uporabljajo metabolne reakcije glioksilatnega cikla (Kornberg in Madsen, 1958).

Glioksilatni cikel sta prva opisala Kornberg in Madsen (1958). Odkrila sta, da lahko acetat v obliki acetil-CoA, vstopi v CCK na dveh mestih: (i) v reakciji z oksalacetatom, pri kateri nastaja citrat, in (ii) v reakciji z glioksilatom, pri kateri nastaja malat. Glioksilatni cikel se od cikla citronske kisline loči z encimom izocitrat liaza, ki pretvarja izocitrat v glioksilat in sukcinat ter se na ta način izogne dekarboksilaciji izocitrata. Naslednji za glioksilatni cikel

značilen encim je malat sintaza, ki z aldolno kondenzacijo kondenzira glioksilat z acetil-CoA, pri čemer nastaja malat. V CCK vstopi ena molekula acetata in izstopita dve molekuli CO₂, medtem ko v glioksilatni cikel vstopita dve molekuli acetil-CoA, nastane pa sukcinat oziroma malat (Kornberg in Madsen, 1958). Glioksilatni cikel omogoča obvod nekaj stopenj CCK in se s tem izgubi dveh C-atomov v obliki CO₂, kar je še posebej pomembno pri sintezi kompleksnih celičnih gradnikov (Soh, 2011).



Slika 3: Krebsov cikel in glioksilatni cikel. Slika prikazuje običajno pot razgradnje acetil-CoA – Krebsov cikel in alternativno pot – glioksilatni cikel, ki je označena s črtkano puščico na sredini (povzeto po Dunn in sod. 2009; Erb in sod., 2007; Kim in sod., 2004).

2.1.4.2 Pot etilmalonil-CoA

Raziskovalci so demonstrirali, da številne bakterije, ki asimilirajo spojine C2, nimajo zapisa za enega ali obeh ključnih encimov glioksilatne poti (Ensign, 2006). Takšne so škrlatne ne-žveplove fotosintetske bakterije vrst *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum*

ruberum in *Rhodobacter sphaeroides* (Meister in sod., 2005), *Paracoccus - Thiobacillus versutus* (Claassen in Zehnder, 1986), *Methylobacterium extorquens* (Schneider in sod., 2012), kot tudi bakterije rodu *Streptomyctetes* (Han in Reynolds, 1997). To nakazuje na dejstvo, da te bakterije uporabljajo alternativno pot asimilacije acetata (Ensign, 2006).

Alber in sod. so leta 2006 prvič opisali pot etilmalonil-CoA. V raziskavah so se osredotočali na bakterijo vrste *Rhodobacter sphaeroides*, ki lahko asimilira acetat in nima zapisa za ključen encim glioksilatnega cikla – izocitrat liazo (Alber in sod., 2006). Erb in sod. (2007) so prisotnost poti etilmalonil-CoA identificirali tudi pri bakterijah rodu *Streptomyces* in nekaterih drugih aktinomicetah (Erb in sod., 2007).

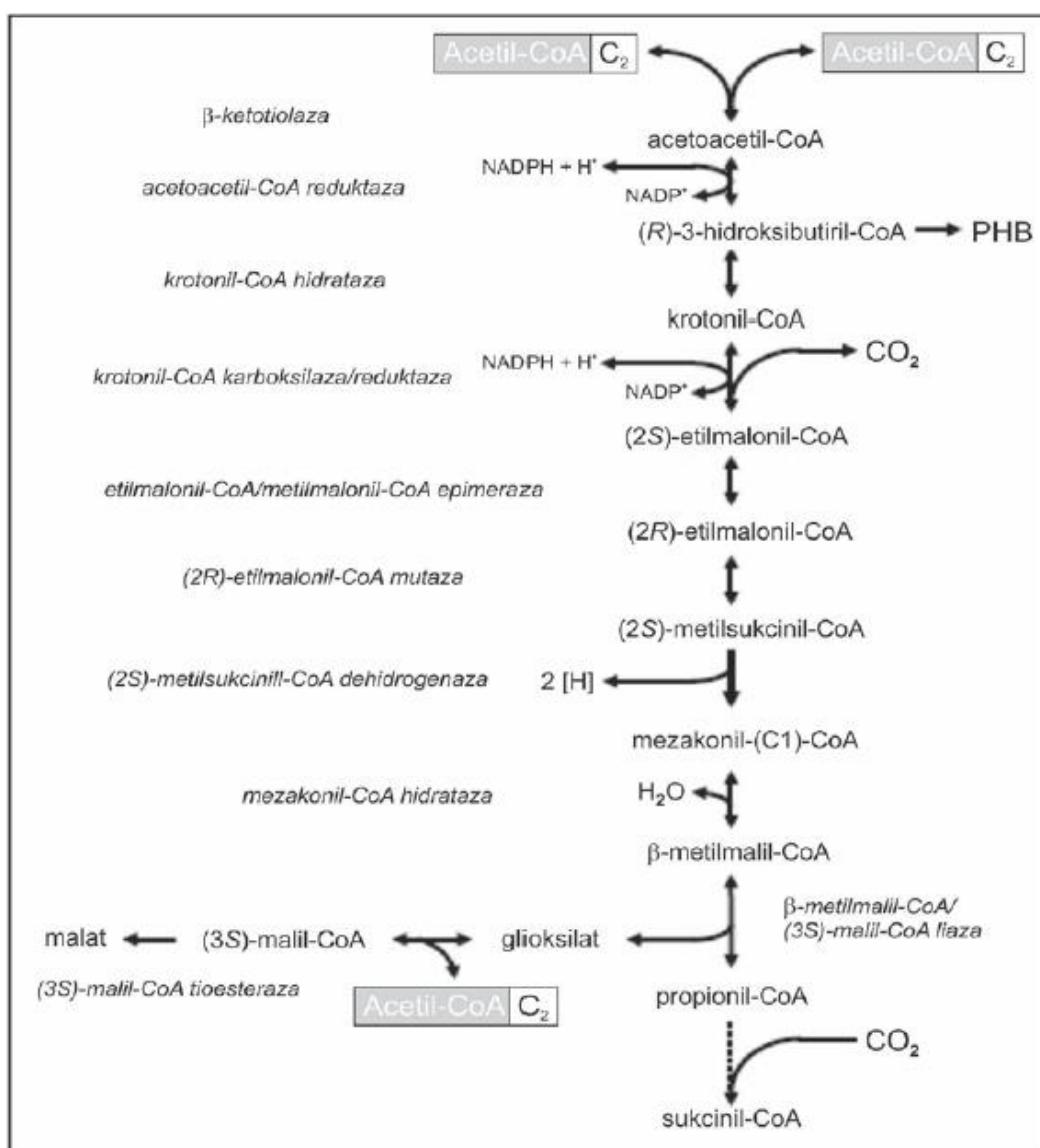
Pri obeh poteh asimilacije acetil-CoA (pot EMC in glioksilatni cikel) nastaja malat. Pri poti EMC, so za nastanek dveh molekul malata potrebne tri molekule acetil-CoA, ena molekula CO_2 in HCO_3^- , medtem ko so pri glioksilatnem ciklu, za nastanek dveh molekul malata potrebne štiri molekule acetil-CoA (Ensign, 2006).

V prvi reakciji poti EMC, se združita dve molekuli acetil-CoA in s pomočjo encima β -ketotiolaza, nastane acetoacetil-CoA, ki se v nadaljevanju reducira v 3-hidroksibutiril-CoA in nato s krotonil-CoA reduktazo (Ccr) pretvori v C4-intermediat, krotonil-CoA (Slika 4). Sledi karboksilacija in redukcija krotonil-CoA in nastanek C5-intermediata (2S)-etilmalonil-CoA, ki se z encimom, etilmalonil-CoA/metilmalonil-CoA epimeraza (Epi), pretvori v (2R)-etilmalonil-CoA. Sledi nastanek (2S)-metilsukcinil-CoA z (2R)-etilmalonil-CoA mutazo (Ecm), nato mezakonil(C1)-CoA z (2S)metilsukcinil-CoA dehidrogenazo (Mcd) in v še metilmalil-CoA z mezakonil-CoA hidratazo (Mch). Tu se zaključi prvi del poti. V drugem delu liaza razcepi metilmalonil-CoA na propionil-CoA in glioksilat. Propionil-CoA se nato karboksilira do končnega produkta sukcinil-CoA. Glioksilat se podobno kot v glioksilatnem ciklu z acetil-CoA pretvori v malat (Slika 4) (Erb in sod., 2007). Reakcije prvega dela poti etilmalonil-CoA, do nastanka krotonil-CoA in zadnjega dela, od β -metilmalil-CoA (Slika 4), so znane tudi pri drugih metabolnih poteh (Ensign, 2006).

Končna produkta poti EMC, sukcinil-CoA in malat, sta tudi intermediata CCK. Sukcinil-CoA in malat lahko vstopita v CCK in se porabita za sintezo kompleksnih molekul in izgradnjo celičnih komponent (Erb in sod., 2007). Intermediati, ki nastajajo med potekom poti EMC, se lahko uporabijo tudi za napajanje drugih metabolnih poti. Korotkova in sod. (2005) so pri bakteriji vrste *Methylobacterium extorquens* ugotovili, da glioksilat napaja serinski cikel. Serinski cikel omenjene bakterije uporablja za asimilacijo metilnih komponent. Glioksilat, ki je nujen za potek serinskega cikla, lahko izvira iz poti EMC (Korotkova in sod., 2005).

Pot EMC ni ciklična, kar pomeni, da ni potrebe po metabolni regeneraciji intermedirov, kar bi omogočalo potek vseh encimskih reakcij, kar je značilno za ciklične metabolne poti. Za začetni del poti EMC sta potrebna acetil-CoA in CO_2 , katera izvirata iz različnih substratov. S pomočjo metabolnega inženirstva, bi lahko v principu vsak intermediat poti

EMC uporabili za začetek »idealne« metabolne poti, katera bi vodila v sintezo želenih produktov. Za konstrukcijo bi morali upoštevati zahteve po energiji celice, načinu izločanja produktov, izplen želenih produktov in potencialno toksičnost produktov metabolne poti. Ravno zato je metabolna pot EMC uporabna za industrijske aplikacije biotehnologije in metabolno inženirstvo. Z metabolnim inženiristvom lahko spremenimo prvotni tok metabolitov in pridemo do dragocenih produktov. Končni produkti, ki lahko nastanejo s pomočjo poti etilmanoil-CoA, so lahko, npr. polihidroksibutirat (PHB), metabolni intermediati brez CoA skupine, skupina CoA, ki jo lahko encimsko vežemo na poljubno molekulo, 2-ethylhidroksipropionat in 3-hidroksiizobutirat (Alber, 2011).



Slika 4: Shema metabolne poti etilmalonil-CoA (Blažič, 2014: 11).

2.1.5 Sekundarni metabolizem

Sekundarni metaboliti so produkti, ki jih mikroorganizmi navadno sintetizirajo na koncu eksponencialne faze rasti oziroma med stacionarno fazo rasti. Za rast in reprodukcijo sekundarni metaboliti niso nujno potrebni. Njihova sinteza je odvisna od rastnih dejavnikov, še posebej od vrste gojišča. Lahko nastajajo v velikih količinah (Madigan in sod., 2008).

Streptomicete so najpomembnejši proizvajalci industrijsko pomembnih sekundarnih metabolitov (Hodgson, 2000). Po ocenah je leta 2005 kar 17 % (7600 od 43000) biološko aktivnih sekundarnih metabolitov izviralo iz rodu *Streptomyces*. Leta 2012 je bilo kar 80 % antibiotikov proizvedenih v streptomicetah (Procópio in sod., 2012).

Vloga sekundarnih metabolitov v naravi ni dobro poznana. Najverjetneje v naravnem okolju sekundarni metaboliti svojim proizvajalcem dajejo selektivno prednost za preživetje v poznejših fazah rasti ali pa služijo kot signalne molekule za komunikacijo znotraj iste vrste (Hodgson, 2000).

Streptomicete tvorijo kemijsko zelo raznolike sekundarne metabolite, ki so lahko peptidi, glikopeptidi, laktone, makrolidi, poliketidi, alkaloidi, terpeni ipd. Protimikrobine učinkovine predstavljajo največjo biološko aktivno skupino sekundarnih metabolitov streptomicet. Glede na biološko aktivnost, lahko sekundarne metabolite streptomicet razdelimo v štiri skupine: (i) antagonistični agensi, (ii) farmakološki agensi – spojine s protitumorskim delovanjem, imunomodulatorji, nevrološki agensi ter inhibitorji encimov, (iii) agrobiološki agensi – insekticidi, pesticidi, herbicidi, in (iv) spojine z regulatorno aktivnostjo, kot so rastni dejavniki, sideroforji in morfogenetski elementi (Tarkka, 2008).

Na biosintezo teh spojin vplivajo fiziološki in okoljski dejavniki ter celične signalne molekule (ppGpp, fosfat, A-faktor, γ -butirolakton, PI-faktor, družina regulatornih proteinov SARP ipd.). Tvorba sekundarnih metabolitov običajnosovpa da z razvojem zračnega micelija, ko se upočasni rast filamentov in začne sporulacija (Bibb, 2005).

Geni, ki imajo zapis za sintezo sekundarnih metabolitov, so združeni v velike gruče genov s povprečno velikostjo 15–100 kbp. Tovrstna organizacija genov omogoča njihovo natančno in koordinirano izražanje. Vsebujejo regulatorne gene, ki uravnavajo biosintezo, kot tudi gene, ki sodelujejo pri transportu metabolitov in lasten mehanizem odpornosti proti njim (avto-rezistenco) (Bibb in Hesketh, 2009; Hodgson, 2000).

2.2 GENOM BAKTERIJ RODU *Streptomyces*

2.2.1 Genomska DNA

Prvi genom streptomicet, ki so mu v celoti določili nukleotidbo zaporedje, je bil genom *S. coelicolor* A3(2) (Bentley in sod., 2002). Kromosom streptomicet je pogosto linearne

molekula DNA (replikon) dolžine od 8–10 Mbp in so zato eni izmed največjih bakterijskih kromosomov. Daljši so na račun velikega števila različnih genov, kar se odraža v bogatem sekundarnem metabolizmu, kompleksni strukturi in variabilnosti v njihovem naravnem okolju (tleh) (Kirby in sod., 2011). Bentley in sod. (2002) so pri *S. coelicolor* A3(2) anotirali 7825 genov, kar je več kot pri nekaterih preprostih evkariontih (npr. *Saccharomyces cerevisiae* ima približno 6000 genov) (Bentley in sod., 2002).

Kromosom streptomacet se lahko razdeli na ohranjeno osrednjo regijo ter na dve roki kromosoma z različnim naborom genov, glede na sev bakterije rodu *Streptomyces*. V osrednji regiji se nahajajo vzdrževalni geni (angl. *housekeeping genes*), na levi in desni roki kromosoma pa so neesencialni geni, kot so geni za sekundarni metabolizem in geni za prevzem alternativnih virov hrani. Leva in desna roka kromosoma je zelo podvržena horizontalnim prenosom. Mnogokrat pride do prerazporejanja (znotrajkromosomske rekombinacije) genoma med ramama kromosoma ali pa med eno ramo in linearnim plazmidom. To prerazporejanje kromosoma razloži veliko genetsko raznolikost streptomacet (Kirby in sod., 2011).

Streptomicete imajo zelo kompleksna telomerna zaporedja. Zadnjih 200–300 bp na 3'-koncu je med podvojevanjem DNA zelo izpostavljenih in lahko pride do krašanja telomernih zaporedij. Na teh mestih so pogoste sekundarne strukture, kar ščiti konce pred eksonukleazno aktivnostjo. Večina telomer streptomacet je sestavljenih iz visoko ohranjenih zaporedij nukleotidov. Običajno gre za palindromska zaporedja, ki so lahko med seboj komplementarna in tvorijo sekundarne strukture. Atipične telomere so pogoste pri plazmidni DNA, v majhnem deležu pa tudi pri kromosomski DNA. Telomere so pogosto del daljših terminalnih obrnjениh ponovitev (TIR) (Kirby in sod., 2011).

2.2.2 Plazmidna DNA

Plazmidi so zelo pogosto prisotni pri bakterijah rodu *Streptomyces*. Pojavljajo se tako krožni kot linearni plazmidi. Struktura linearnih plazmidov je običajno zelo podobna kromosomom. Imajo končne obrnjene ponovitve nukleotidov z vezanimi terminalnimi proteini in mestom začetka podvojevanja. Tako linearni, kot krožni plazmidi, so pogosto konjugativni, vendar imajo le redki zapise za seleksijsko prednost (npr. gene za odpornost proti antibiotikom) ali za tvorbo sekundarnih metabolitov (Kirby in sod., 2011).

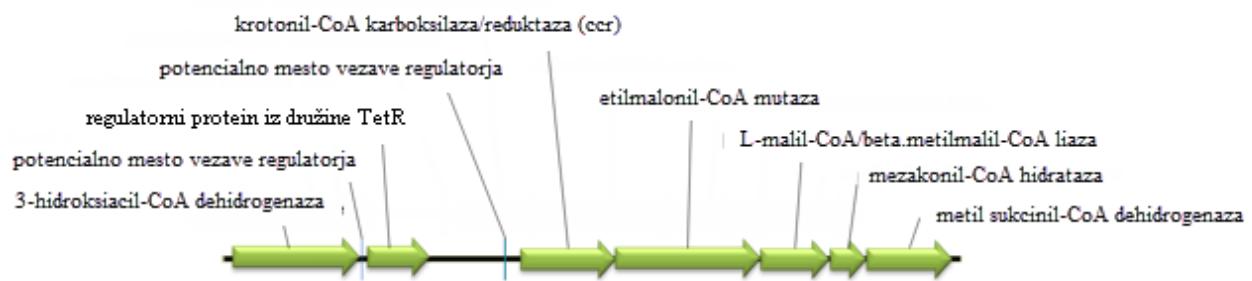
2.2.3 Operon *emc*

Pri bakterijah rodu *Streptomyces* se geni, ki kodirajo encime metabolne poti etilmalonil-CoA praviloma nahajajo v operonu *emc*. Operon *emc* je sestavljen iz genov, kateri kodirajo encime (i) krotonil-CoA karboksilaza/reduktaza (*ccr*), (ii) etilmalonil-CoA mutaza (*ecm*), (iii) L-malil-CoA/beta-metilmalil-CoA liaza (*mml*), (iv) mezakonil-CoA hidrataza (*mch*),

(v) metil sukcinil-CoA dehidrogenaza (*msd*) in (vi) 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza (Blažič in sod., 2015). Poleg teh genov se v operonu nahaja tudi zapis za regulatorni protein iz družite TetR. Za regulatorne proteine družine TetR je značilno, da prepozna in se vežejo na palindromska zaporedja DNA v promotorski regiji in s tem uravnavajo izražanje genov, ki so pod kontrolo te promotorske regije. Običajno delujejo kot represor izražanja genov, redkeje kot aktivator. Hu in Lidstrom (2011) sta pri bakteriji *Methylobacterium extorquens* AM1 preučevala regulatorni protein CcrR, ki spada v družino regulatornih proteinov TetR. Ugotovila sta, da se CcrR veže na palindromsko zaporedje DNA više od promotorja *katA-ccr*, kateri uravnava izražanje homologa gena *ccr* (ta ne leži v operonu *emc*). Gen *ccr* ima zapis za krotonil CoA karboksilazo/karboksilazo, ki je kjučni encim poti EMC (Hu in Lindstrom, 2012).

Znotraj operona *emc* sta dva nekodirajoča odseka DNA, katera verjetno vsebuje mesta vezave regulatornih proteinov (Blažič in sod., 2015) (slika 5).

Poleg operona *emc* so raziskovalci pri bakterijah vrste *S. tsukubaensis* in *Streptomyces venezuelae* potrdili tudi prisotnost homologov gena *ccr* z zapisom za krotonil-CoA karboksilazo/reduktazo (Blažič in sod., 2015; Jung in sod., 2014).. *ccr*-homologi se pogosto nahajajo v gručah genov, ki kodirajo biosintezo sekundarnih metabolitov (Jung in sod., 2014).

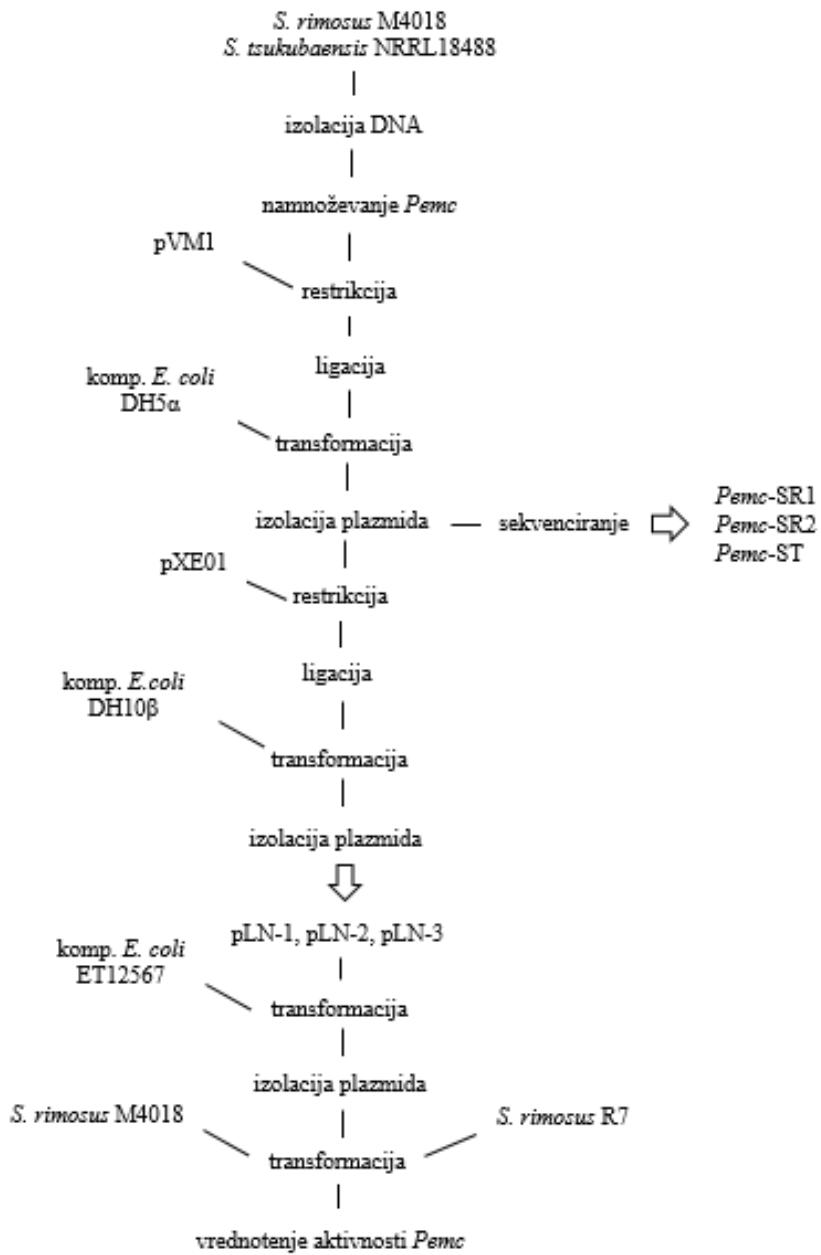


Slika 5: Prikaz organizacije operona *emc* pri bakteriji seva *Streptomyces tsukubaensis* (Blažič in sod., 2015: priloga 1).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA DELA

Na sliki 6 je shematsko prikazan potek našega dela.



Slika 6: Shematski prikaz poteka dela.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kemikalije

4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan žveplova kislina (HEPES)	Sigma-Aldrich (ZDA)
agarosa	Sigma-Aldrich (ZDA)
bakteriološki agar	Biolife (Italija)
barvilo SyberSafe	ThermoFischer Scientific
baza Tris	Merck (Nemčija)
dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4)	Merck (Nemčija)
dimetyl sulfoksid (DMSO)	BioLabs (Združeno Kraljestvo)
etanol	Carlo Erba (Italija)
etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Kemika (Hrvaška)
glicerol	Kemika (Hrvaška)
gojišče Tryptic Soy Broth	Biolife (Italija)
kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	Merck (Nemčija)
kalijev klorid (KCl)	Merck (Nemčija)
kvasni ekstrakt	Biolife (Italija)
ledocetna kislina	Merck (Nemčija)
lizocim	Sigma-Aldrich (ZDA)
magnezijev klorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich (ZDA)
magnezijev sulfat ($MgSO_4$)	Sigma-Aldrich (ZDA)
manitol	Kemika (Hrvaška)
natrijev klorid (NaCl)	Merck (Nemčija)
pirokatehol	Sigma-Aldrich (ZDA)
polietilen glikol (PEG 1000)	Sigma-Aldrich (ZDA)
polimeraza Phusion DNA	ThermoFischer Scientific
saharoza	Sigma-Aldrich (ZDA)
sojina moka	Sigma-Aldrich
tripton	Merck (Nemčija)

3.2.2 Raztopine in pufri

50 × pufer TAE

Zatehtali smo 242,0 g baze Tris, dodali 57,1 mL ledocetne kisline, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0), dopolnili z dH₂O do 1000 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Sambrook in Russell, 2001).

Pufer ET

Zatehtali smo 3 g PEG 1000 in 0,65 g saharoze, dodali 1 mL glicerola, dopolnili z dH₂O do 10 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Sambrook in Russell, 2001).

15 % (v/v) glicerol

Odmerili smo 150 mL glicerola, dopolnili z dH₂O do 1000 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Magdevska, 2010).

10 % (w/v) sahariza

Zatehtali smo 100 g saharoze, dopolnili z dH₂O do 1000 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Pigac in Schrempf, 1995).

0,1 M HEPES

Zatehtali smo 2,38 g HEPES, dopolnili z dH₂O do 100 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Magdevska, 2010).

2 M raztopina Mg²⁺ (MgSO₄ × 7 H₂O in MgCl₂)

Zatehtali smo 0,952 g MgCl₂ in 2,465 g MgSO₄ × 7 H₂O, ju raztopili v 20 mL dH₂O, sterilno prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 nm ter do uporabe shranili pri 4 °C (Inoue in sod., 1990).

100 mM kalijev fosfatni pufer

Zatehtali smo 1,36 g KH₂PO₄ in 4,35 g K₂HPO₄, dopolnili z dH₂O do 300 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Keiser in sod., 2000).

20 mM kalijev fosfatni pufer

Odmerili smo 20 mL 100 mM kalijevega fosfatnega pufra, dopolnili z dH₂O do 100 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Keiser in sod., 2000).

Pufer TB

Zatehtali smo 2,2 g CaCl₂, 18,65 g KCl 20 mL, dodali 20 mL 0,5 M raztopine PIPES, dopolnili z dH₂O do 800 mL ter s 1 M KOH umerili pH na 6,7. Nato smo dodali 10,88 g MnCl₂ raztopljenega v 100 mL dH₂O in dopolnili z dH₂O do 1000 mL. Raztopino smo

prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 nm ter do uporabe hranili pri 4 °C (Inoue in sod., 1990).

Pufer za vzorčenje

Zatehtali smo 0,74 g mM EDTA, dodali 90 mL 100 mM kalijevega fosfatnega pufra in 10 mL acetona ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Keiser in sod., 2000).

10 % Triton X-100

Zatehtali smo 1 g Tritona X-100, dopolnili z dH₂O do 10 mL ter avtoklavirali pri temperauri 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min (Keiser in sod., 2000).

0,2 mM pirokatehol

Zatehtali smo 2,2 g pirokatehola, dopolnili z dH₂O do 100 mL, raztopili in prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 nm (Keiser in sod., 2000).

Analizni pufer

Odmerili smo 100 mL sterilnega 100 mM kalijevega fosfatnega pufera in mu dodali 100 µL 0,2 M pirokatehola (Keiser in sod., 2000).

3.2.3 Komercialni kompleti

Pri nalogi smo glede na potrebe uporabljali spodaj navedene komercialne komplete.

3.2.3.1 Komplet za izolacijo genomske DNA

Genomsko DNA bakterij *S. rimosus* (seva 4018 in R7) ter *S. tsukubaensis* NRRL18488 smo izolirali s kompletom »GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit« (Sigma-Aldrich, ZDA).

3.2.3.2 Komplet za izolacijo plazmidne DNA

S kompletom »GenElute™ Plasmid Miniprep Kit« (Sigma-Aldrich, ZDA) smo izolirali plazmidno DNA transformant *E. coli* sevov DH10β in ET12567.

3.2.3.3 Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela

Plazmidno DNA in vključke smo po restrikciji z endonukleaznimi encimi ločili od preostale DNA z elektroforezno ločitvijo v agaroznem gelu. Fragmente ustreznega velikosti smo nato izrezali iz gela in jih očistili s komercialnim kompletom »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega, ZDA).

3.2.4 Gojišča

Sestava vseh uporabljenih gojišč je povzeta v preglednici 1. Vsa gojišča smo avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min, razen gojišči SM in tekoče produkcijsko gojišče GOTC, ki smo ju avtoklavirali 30 min. Za pripravo trdnih gojišč smo dodali 15 g agaroze na 1 L gojišča, avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar 20 min in ga alikvotirali po okoli 20 mL na petrijevko (pri gojišču MS 30 mL). Antibiotike (ampicilin - 100 µg/mL, apramicin - 50 µg/mL, kloramfenikol - 10 µg/mL in tiostrepton - 30 µg/mL) smo po potrebi dodali v avtoklavirana gojišča šele, ko smo gojišča predhodno ohladili na 60 °C.

Preglednica 1: Sestava uporabljenih gojišč.

Gojišče	Sestavina	Količina [g]	Referenca
LB	tripton	10	
	kvasni ekstrakt	5	
	NaCl	10	Sambrook in Russell, 2001
	dH ₂ O	do 1000 mL	
2TY	tripton	16	
	kvasni ekstrakt	10	
	NaCl	5	Sambrook in Russell, 2001
	dH ₂ O	do 1000 mL	
Trdno gojišče SM	sojina moka	20	
	manitol	20	
	bakteriološki agar	20	Kieser in sod., 2000
	dH ₂ O	do 1000 mL	
TSB	tripton	15	
	sojina moka	5	
	NaCl	5	Kieser in sod., 2000
	dH ₂ O	do 1000 mL	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1

Gojišče	Sestavina	Količina [g]	Referenca
Trdno gojišče TSA	tripton	15	
	sojina moka	5	
	NaCl	5	Kieser in sod., 2000
	agarozna	15	
Tekoče gojišče SOB*	dH ₂ O	do 1000 mL	
	tripton	20 g	
	kvasni ekstrakt	5 g	
	NaCl	0,584 g	Hanahan, 1983
Tekoče vegetativno gojišče GOTC**	KCl	0,186 g	
	2 M raztopina Mg ²⁺	20 mL	
	dH ₂ O	do 1000 mL	
	tripton	15	
Tekoče vegetativno gojišče GOTC**	glukoza	10	
	CaCO ₃	1,0	Blažič in sod., 2014
	kvasni ekstrakt	5,0	
	dH ₂ O	do 1000 mL	
Tekoče produkcijsko gojišče GOTC***	MOPS	7 g	
	sojina moka	42 g	
	amonijev sulfat	6 g	
	MgCl ₂	2 g	
	NaCl	1,5 g	
	CaCO ₃	7,3 g	Blažič in sod., 2014
	koruzni škrob	28 g	
	1 % raztopina cinkovega sulfata	10 mL	
1 % raztopina manganovega sulfata		3,75 mL	
dH ₂ O		do 1000 mL	

*Gojišče smo pripravili brez 2 M raztopine Mg²⁺ in ga avtoklavirali. Raztopino ionov smo gojišču dodali po avtoklaviranju. Končni pH smo umerili na 6,8 in 7,0 z 10 % NaOH ali HCl.

**Dobro premešamo, da se vse komponente raztopijo, raztopino gojišča razdelimo v falkonke po 5 mL in avtoklaviramo.

***Gojišče smo kuhalo do 80 °C v vodni kopeli z mešanjem. Nato ga ohladili in umerili pH na 6,25 z 10 % NaOH ali HCl. Gojišče smo razdelili o v falkonke po 5 mL in avtoklavirali s penastimi zamaški, 30 min pri 121 °C.

3.2.5 Antibiotiki

Antibiotike, ki smo jih v eksperimentalnem delu uporabili za selekcijo, smo pripravili v založnih koncentracijah, raztopljene v ustreznih topilih (preglednica 2). Tiste, ki smo raztoplili v dH₂O, smo prefiltrirali s filtrom velikosti por 0,2 nm.

Preglednica 2: Uporabljeni antibiotiki.

Antibiotik	Proizvajalec	Založna koncentracija [mg/mL]	Delovna koncentracija [µg/mL]
ampicilin (Amp)	Sigma-Aldrich (ZDA)	100 (v dH ₂ O)	100
apramicin (Apr)	Sigma-Aldrich (ZDA)	50 (v dH ₂ O)	50
kloramfeniol (Cm)	Sigma-Aldrich (ZDA)	10 (v etanolu)	10
tiostrepton (Ts)	Sigma-Aldrich (ZDA)	100 (v DMSO)	30

Plazmidi, ki smo jih uporabljali pri transformaciji kompetentnih celic *E. coli*, imajo kot selekcijski označevalec gen za odpornost proti določenemu antibiotiku. Po transformaciji smo celice gojili na trdnih gojiščih z dodatkom izbranega antibiotika in tako dobili transformante.

3.2.6 Restriktični encimi

Za restrikcijo plazmidne DNA in pomnožkov PCR smo uporabili različne restriktične endonukleaze, povzete v preglednici 3. Uporabili smo jih po navodilih proizvajalca skupaj z 10 × pufrom FastDigest.

Preglednica 3: Uporabljeni restriktični endonukleaze.

Encim	Mesto cepitve	Proizvajalec
<i>Eco</i> RI	5' G↓AATTC 3' 3' CTTAA↓G 5'	ThermoFischer Scientific (FastDigest enzyme)
<i>Xba</i> I	5' T↓CTAGA 3' 3' AGATC↓T 5'	ThermoFischer Scientific (FastDigest enzyme)
<i>Nde</i> I	5' C↓ATATG 3' 3' GTATA↓C 5'	ThermoFischer Scientific (FastDigest enzyme)

3.2.7 Ligacijski encim

Za ligacijo produktov restrikcije smo uporabili ligazo T4 (ThermoFischer Scientific), pri čemer smo sledili navodilom proizvajalca.

3.2.8 Standarda za določanje velikosti DNA fragmentov

Velikost in količino DNA fragmentov po elektroforezni ločitvi v agaroznem gelu smo opredelili s pomočjo standardov znanih dolžin in količin fragmentov DNA:

- označevalec velikosti DNA »GeneRuler™ DNA Ladder Mix« (ThermoFischer Scientific) in
- označevalec velikosti DNA »Lambda DNA/HindIII« (ThermoFisher Scientific).

3.2.9 Bakterijski sevi

3.2.9.1 Sevi bakterije *Escherichia coli*

V nalogi uporabljeni bakterijski sevi, njihove lastnosti in namen uporabe so povzeti v preglednici 4.

Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi *E. coli*.

Oznaka seva	Genotip	Proizvajalec	Namen uporabe
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen	Transformacija s plazmidnimi vektorji pVM1 z vključki.
DH10β	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG</i>	Invitrogen	Elektroporacija celic s plazmidnimi vektorji pXE01 z vključki.
ET12567	F- <i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143::Tn1I galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtl1 glnV44</i>	MacNeil in sod., 1992	Elektroporacija celic s plazmidi pLN-1, pLN-2 in pLN-3. Sev ima prekinjena gena za metilazi Dam in Dcm, zato DNA ne metilira. Taka DNA je primerna za vnos v streptomicete, saj je njihovi restriktijski mehanizmi ne razgradijo.

3.2.9.2 Sevi bakterij rodu *Streptomyces*

V nalogi uporabljeni bakterijski sevi rodu *Streptomyces*, njihov vir in namen uporabe so povzeti v preglednici 5.

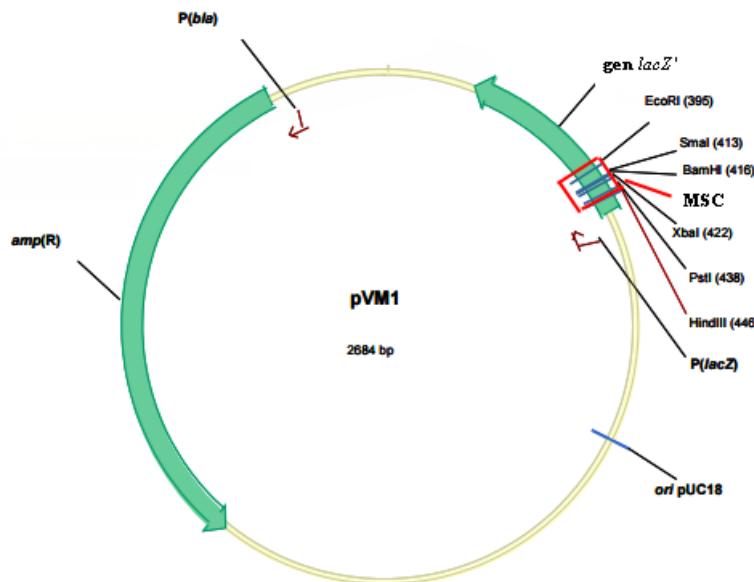
Preglednica 5: Uporabljeni bakterijski sevi rodu *Streptomyces*.

Oznaka seva	Vir	Namen uporabe
<i>Streptomyces rimosus M4018</i>	Rhodes in sod., 1981	Izolirano genomsko DNA smo uporabili za pomnoževanje promotorske regije <i>emc</i> v PCR. Kompetentne celice seva smo uporabili za transformacijo s plazmidi pLN-1, pLN-2 in pLN-3.
<i>Streptomyces rimosus R7</i>	ATCC 10970	Kompetentne celice seva smo uporabili za transformacijo z nemetiliranimi plazmidi pLN-1, pLN-2 in pLN-3.
<i>Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488</i>	ARS Culture Collection	Izolirano genomsko DNA smo uporabili za pomnoževanje promotorske regije <i>emc</i> v PCR.

3.2.10 Plazmidi

3.2.10.1 pVM1

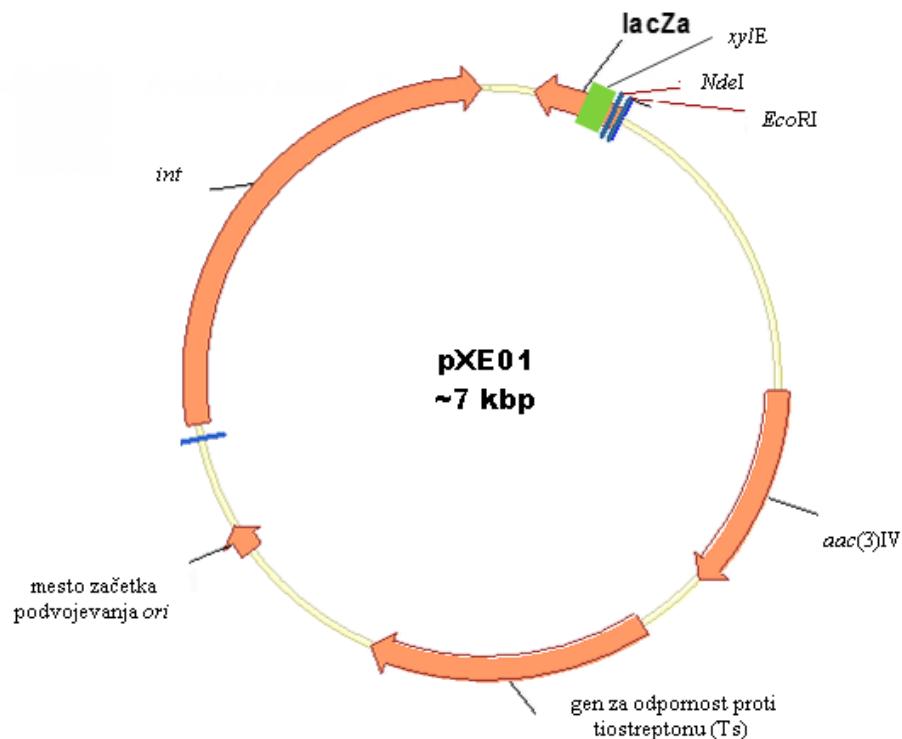
pVM1 je 2684 bp velik plazmid, ki je klonirni vektor podjetja Acies bio (Slovenija). Izhaja iz plazmida pUC18, brez restriktivnega mesta *NdeI* v genu *lacZ'*. Ima gen, ki kodira ampicilinsko rezistenco, gen, ki kodira okrnjen del β-galaktozidaze, mesto začetka podvajanja in mesto za kloniranje. Ima restriktivni mesti za endonukleazi *XbaI* in *EcoRI* (slika 7) (Magdevska, 2010).



Slika 7: Shema vektorja pVM1 (vektor podjetja AciesBio). pVM1 izhaja iz pUC18, vendar nima restriktivnega mesta *NdeI* v genu *lacZ'*. Ima gen *amp(R)* z zapisom za odpornost proti ampicilinu, gen *lacZ'*, ki kodira začetni del β-galaktozidaze, brez restriktivnega mesta za *NdeI*. pVM1 ima mesto začetka podvajanja *ori* pUC18 in mesto za kloniranje iz plazmida (MSC) pUC18 (Magdevska, 2010: 40).

3.2.10.2 pXE01

pXE01 je integrativni vektor, kateri je nastal tekom raziskovalnega dela na fakulteti, z ligacijo gena *xylE* v vektor pAB04. Njegova osnovna struktura je plazmid pSet152 z mestom vezave $\Phi C31attP$ faga $\Phi C31$. Ima restriktijski mesti *EcoRI* in *NdeI*. Nekaj nukleotidov stran od restriktijskega mesta *NdeI* ima poročevalski gen *xylE*, kateri ima zapis za encim katehol-2,3-deoksigenazo.



Slika 8: Shema vektorja pXE01 (vektor Biotehniške fakultete). Vektor pXE01 izhaja iz vektorja pSet152. Ima gen *aac(3)IV* z zapisom za odpornost proti apramicinu in gen z zapisom za odpornost proti tiostreptonu (Ts). Ima mesto začetka podvojevanja *ori* in gen za integrago (*int*) faga $\Phi C31$. Ima poročevalski gen *xylE*.

3.2.10.3 pLN-1

Plazmid pLN-1 je vektor pXE01 z vstavljeni promotorsko regijo *Pemc-SR1* operona *emc* iz *S. rimosus* M4018. pLN-1 smo konstruirali v tej magistrski nalogi.

3.2.10.4 pLN-2

Plazmid pLN-2 je vektor pXE01 z vstavljeni promotorsko regijo *Pemc-SR2* operona *emc* iz *S. rimosus* M4018. pLN-2 smo konstruirali v tej magistrski nalogi.

3.2.10.5 pLN-3

Plazmid pLN-3 je vektor pXE01 z vstavljeni promotorsko regijo *Pemc-ST* operona *emc* iz *S. tsukubaensis* M4018. pLN-3 smo konstruirali v tej magistrski nalogi.

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

avtokav (Sutjeska, Jugoslavija)

centrifuge: Hettich® ROTANTA 460/460R centrifuge (Sigma-Aldrich, ZDA); Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Nemčija); Mini Spin plus (Eppendorf, Nemčija)

ciklični termostati za PCR: GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, ZDA); iCycler (Bio-Rad, ZDA)

elektroporator MicroPulser™ (Bio-Rad)

gel dokumentacijski sistem Gel Doc 2000 (Bio-Rad, ZDA)

hladilnik (BSK International, Nemčija)

inkubator (Sutjeska, Jugoslavija)

inkubator Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemčija)

kivete: Electroporation Cuvette 0,1 cm gap (Sigma-Aldrich, ZDA); Gene Pulser Cuvete 0,2 cm (Bio-Rad, ZDA)

laminar SMBC 122VA (Iskra PIO, Slovenija)

magnetno mešalo RCT basic (IKA, Nemčija)

mikrovalovna pećica Super Showerwave (Sanyo, Japonska)

napajalnik za elektroforezo (Bio-Rad, ZDA)

pH meter (Mettler toledo, Švica)

spektrofotometer: Lambda Bio+ (Perkin Elmer, ZDA); Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech); Safire² Tecan (Thermo Fischer Scientific, ZDA); NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, ZDA)

stesalnik Multitron (INFORS HT, Nemčija)

tehnicna (Mettler toledo, Švica)

zamrzovalnik (Thermo Fischer Scientific, ZDA)

3.4 METODE

3.4.1 Metode uporabljene za pomnoževanje promotorske regije *Pemc* v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

3.4.1.1 Izolacija genomske DNA za PCR

Genomsko DNA smo iz bakterij *S. rimosus* M4018 ter *S. tsukubaensis* NRRL18488 izolirali s komercialnim kompletom za izolacijo genomske DNA »GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit« (Sigma-Aldrich, ZDA) po navodilih proizvajalca. Izolirano genomsko DNA smo shranjevali v sterilnem pufru TE, pri 4 °C.

3.4.1.2 Izbira začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide za PCR-pomnoževanje promotorske regije *Pemc* (preglednica 6) smo določili glede na znana zaporedja operona *emc*, ki kodira gene za metabolno pot EMC. Pri *S. rimosus*, smo določili mesta naleganja oligonukleotidnih začetnikov, približno 500 nukleotidov višje od prvega start kodona v operonu *emc*, pri *S. tsukubaensis* pa približno 750 nukleotidov višje. Para začetnih oligonukleotidov PemcSr Fw in PemcSr Rv smo uporabili za pomnoževanje promotorske regije *emc* bakterije *S. rimosus* M4018 (*Pemc-SR*). Para začetnih oligonukleotidov PemcSt2 Fw in PemcSt2 Rv smo uporabili za pomnoževanje promotorske regije *emc* bakterije *S. tsukubaensis* NRRL18488 (*Pemc-ST*). Začetna oligonukleotida PemcSr Rv, PemcSt2 Rv imata restriktionski mesti za *NdeI* in *XbaI*, PemcSr Fw in PemcSt2 Fw pa restriktionsko mesto za *EcoRI*. Mesta restrikcije so pomembna za nadaljnje postopke kloniranja. Začetne oligonukleotide smo skonstruirali s prostodostopnim orodjem Multiple Primer Analyzer (Thermo Fischer Scientific).

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Oligonukleotidno zaporedje (5' -> 3')	Predvidena velikost pomnožka (bp)
PemcSr Fw	AAAAAGAATTTCAGGTCTGGTACCGTGGCCCGTAC	~500
PemcSr Rv	AAAAATCTAGACATATGGTGCCTCCGGCGAACGCCAGTCGAAAG	
PemcSt2 Fw	AAAAAGAATTCCCAAACCAACTTGGTCGTCGTCCCTAACAA	~750
PemcSt2 Rv	AATTTCTAGACATATGGTGCCTCCGGCAAAGCGCGTCGGGG TGT	

3.4.1.3 Optimizacija pogojev verižne rekacije s polimerazo

Za pomnoževanje DNA odsekov promotorskih regij *emc* smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Reakcijo smo skušali optimizirati s spremjanjem volumskega deleža DMSO v reakcijski zmesi, da bi pridobili čim večjo količino pomnožka. Med fazo optimizacije, smo uporabljali reakcijsko zmes za PCR v skupnem volumnu 25 µL. Po ugotovljeni optimalni sestavi reakcijske zmesi za PCR in pogojev reakcije PCR pa smo naredili reakcijo PCR v skupnem volumnu 100 µL. Na ta način smo v eni reakciji PCR dobili več ciljnega produkta PCR – promotorske regije operona *emc*. Sestave reakcijske zmesi za PCR je predstavljena v preglednici 7.

Preglednica 7: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje DNA v PCR

Bakterijski sev	4018		NRRL18488	
Sestavina	skupni volumen 25 µL	skupni volumen 100 µL	Volumen [µL]	
	skupni volumen 25 µL	skupni volumen 100 µL	skupni volumen 25 µL	skupni volumen 100 µL
polimerazni pufer Phusion GC (2x)	5	20	5	20
začetni oligonukleotid 1 (10 mM)	1	4	1	4
začetni oligonukleotid 2 (10mM)	1	4	1	4
DMSO	0,3	1,2	0,3–0,5	1,2–2,0
matrična DNA (20ng/µL)	1	4	0,6	2,4
Phusion DNA polimeraza (2 U/µL)	0,25	1	0,25	1
ddH ₂ O do 10 µL končnega V	1,7	6,8	1,5–1,7	6,0–6,8

PCR je običajno sestavljen iz treh ponavljajočih se stopenj: denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov (hibridizacija) in sinteza komplementarne verige DNA. V prvi stopnji smo pri temperaturi 98 °C denaturirali dvoverižno DNA. Naslednja stopnja je prileganje začetnih oligonukleotidov. Te stopnje pri pomnoževanju DNA *S. rimosus* nismo vključili, saj proizvajalec navaja, da ta ni potrebna pri začetnih oligonukleotidih z visoko temperaturo tališča. Tako da je stopnji denaturacije kar sledila stopnja, ki smo jo izvedli pri 72 °C in so se v njej tako vezali začetni oligonukleotidi, kot je potekala sinteza DNA s termostabilno DNA-polimerazo Phusion (Finnzymes). Uporabljen program je prikazan v preglednici 8.

Pri *S. tsukubaensis* s takim programom PCR, kot smo ga uporabili za *S. rimosus*, nismo dobili ustreznega produkta, zato smo program PCR optimizirali. Za optimizacijo smo izvedli PCR s temperaturnim gradientom 56–72 °C za prileganje začetnih oligonukleotidov. Uporabljen program PCR za *S. tsukubaensis* je prikazan v preglednici 8.

Preglednica 8: Program pomnoževanja DNA v PCR

Stopnja	Čas	Temperatura [°C]	Število ciklov
Pomnoževanje promotorske regije <i>emc</i>			
<i>S. rimosus</i>			
začetna denaturacija DNA	2 min	98	1
denaturacija DNA	30 s	98	
prileganje začetnih oligonukleotidov in sinteza komplementarne verige DNA	30 s	72	35
zaključek prepisovanja DNA	10 min	72	1
Pomnoževanje promotorske regije <i>emc</i>			
<i>S. tsukubaensis</i>			
začetna denaturacija DNA	2 min	98	1
denaturacija DNA	30 s	98	
prileganje začetnih oligonukleotidov	30 s	56 – 72	35
sinteza komplementarne verige DNA	30 s	72	
zaključek prepisovanja DNA	10 min	72	1

3.4.2 Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforeza DNA je standardna metoda za ločevanje in analizo fragmentov DNA. Za preverjanje uspešnosti reakcije PCR smo pripravili 1,5 % (w/v) agarozni gel.

Ustrezno količino agaroze za gel smo zatehtali in jo popolnoma raztopili v pufru 1 × TAE s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Raztopino smo ohladili na 60 °C in ji dodali 1 µL barvila SyBRSafe na 100 mL gela. Gel smo vlinili v elektroforezni nosilec z ustreznim glavničkom in počakali, da polimerizira. Nato smo ga prenesli v elektroforezno banjico ter ga prelili s 1 × TAE pufrom. Za določanje velikosti in količine fragmentov DNA smo v prvo jamico nanesli 3 µL standardnega označevalca velikosti DNA »DNA Ladder Mix«. V naslednje jamice smo nanašali 10 µL raztopine vzorcev DNA in 2 µL nanašavnega pufra 6 × LD.

3.4.3 Izolacija in čiščenje DNA iz agaroznega gela

Iz agaroznega gela smo očistili in izolirali pomnožke PCR, ki smo jih po elektroforezni ločitvi vizualizirali z UV-presvetljevalnikom. S sterilnim skalpelom smo izrezali ustrezeno velik fragment: *Pemc-SR* velik približno 500 bp, *Pemc-ST* pa približno 750 bp. Košček gela s fragmentom smo stehtali in shranili v sterilni 2-mL centrifugirki Eppendorf. DNA smo izrezanih agaroznih blokov očistili in izolirali s komercialnim kompletom »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega) po navodilih proizvajalca. V zadnji stopnji smo DNA eluirali v 50 µL dH₂O.

3.4.4 Molekulsко kloniranje promotorskih zaporedij *Pemc-SR* in *Pemc-ST* v klonirni vektor pVM1

3.4.4.1 Vključitev *Pemc-SR* in *Pemc-ST* v klonirni vektor pVM1

Očiščeno pomnoženo DNA in vektor pVM1 smo cepili z enakima restrikcijskima endonukleazama, *EcoRI* in *XbaI*, v reakciji zmesi kot je navedeno v pregledici 9. Reakcija je potekala 15 min, pri 37 °C.

Preglednica 9: Restrikcijska zmes za rezanje DNA pred ligacijo v pVM1.

Sestavina	Volumen [µL]
tarčna DNA	35
restrikcijska endonukleaza 1 (<i>EcoRI</i>)	1
restrikcijska endonukleaza 2 (<i>XbaI</i>)	1
10 × pufer za restrikcijo	5
dH ₂ O	8

Rezane vključke promotorskih zaporedij *Pemc-SR* in *Pemc-ST* smo z ligacijo vstavili v odprt plazmidni vektor pVM1 v razmerju 1 : 3 (vektor : vključek). Razmerje med vektorjem in vključkom v ligacijski zmesi smo določili s pomočjo označevalca velikosti DNA »λ + *HindIII*« s skupnim volumnom DNA 12 µL. Sestava reakcijske zmesi za ligacijo je navedena v preglednici 10. Uporabili smo ligazo T4 (ThermoFischer Scientific, ZDA) skupaj z ligacijskim puferom T4 po navodilih proizvajalca. Ligacija je potekala preko noči pri 4 °C.

Preglednica 10: Zmes reagentov za ligacijo produkta PCR v vektor.

Sestavina	Volumen [µL]
pVM1	3
vključek (<i>Pemc-SR</i> , <i>Pemc-ST</i>)	9
ligacijski pufer	1,5
2 U ligaze T4	1
dH ₂ O	0,5

3.4.4.2 Priprava kompetentnih celic *E. coli* DH5α po metodi SEM (Inoue in sod., 1990)

Za vnos plazmidnega vektorja pVM1 z vključkom *Pemc* smo celice DH5α pripravili kompetentne po metodi SEM (angl. *simple and efficient method*). V 100 mL tekočega gojišča SOB (Hanahan, 1983) v 1000-mL erlenmajericah smo inokulirali eno svežo kolonijo iz trdnega gojišča LB in stresali, dokler njihova optična gostota ni dosegla OD₆₀₀

= 0,6. Nato smo erlenmajerico z bakterijsko kulturo za 10 min inkubirali v ledeni kopeli. Kulturo smo po inkubaciji prelili v 250-mL centrifugirko in centrifugirali pri $2.500 \times g$ 10 min pri temperaturi 4 °C. Odlili smo supernatant, celice resuspendirali v 32 mL ledeno hladnega pufra TB in inkubirali v ledeni kopeli 10 min. Ponovno smo centrifugirali pri 4 °C, 10 min pri $900 \times g$ ter spirali z 8 mL pufra TB. Usedlini celic smo nato dodali DMSO do končne koncentracije 7 %, rahlo premešali in inkubirali na ledu 10 min. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 40 µL v sterilne 2-mL centrifugirke Eppendorf, takoj zamrznili v tekočem dušiku in shranili do uporabe pri –80 °C.

3.4.4.3 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5α

Za transformacijo vključkov promotorja operona *emc* (*Pemc*-SR in *Pemc*-ST) v vektorju pVM1 smo uporabili s kalcijevimi ioni obdelane komepetentne celice *E. coli* DH5α. 40 µL celic v 2-mL centrifugirko Eppendorf smo odtalili na ledu in jim dodali 3 µL DNA, jih inkubirali pri 42 °C 45 s in jih še za 2 min inkubirali v ledeni kopeli. V 2-mL centrifugirko Eppendorf smo nato dodali 960 µL tekočega gojišča 2TY (ali LB) in inkubirali 45 min pri 37 °C v inkubatorju Thermomixer comfort. Po inkubaciji smo celice centrifugirali pri $3.000 \times g$ 10 min, odstranili supernatant, jih resuspendirali v 100 µL tekočega 2 TY (LB) in jih po 90 µL oz. 10 µL razmazali na ploščo 2TY (LB) Amp. Ampicilin (Amp) na ploščah 2TY (LB) je dodan za selekcijo transformant, saj ima plazmid pVM1 zapis za odpornost proti ampicilinu. Plošči 2TY (LB) Amp smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Za kolonije, ki so zrasle na trdnih gojiščih do naslednjega dne, smo predvidevali da imajo v pMV1 vključen želen insert *Pemc*, kar pa smo še preverili.

3.4.4.4 Preverjanje uspešnosti vključitve *Pemc* v vektor pMV1

Kolonije, za katere smo preverjali uspešnost vključitve *Pemc* v pMV1, smo prenesli v 5 mL tekočega gojišča 2TY Amp in jih inkubirali preko noči pri 37 °C in 220 obr./min.

Naslednji dan smo plazmidno DNA iz 2 mL prekonočne kulture izolirali s komercialnim kompletom »GenElute Plasmid Miniprep Kit« (Sigma-Aldrich) po navodilih proizvajalca. Plazmidno DNA smo v zadnji fazi eluirali s kolone s 100 µL dH₂O.

Sledilo je izrezovanje vključkov iz vektorja z restriktijskimi endonukleazami. V preglednici 11 je prikazana reakcijska zmes. Restrikcija je potekala 15 min pri 37 °C. Sledila je elektroforezna ločitev DNA v agaroznem gelu. DNA smo detektirali z UV-transiluminatorjem. Gel smo slikali z gel dokumentacijskim sistemom.

Preglednica 11: Restriktivna zmes za preverjanje uspešnosti vključitve vključka v plazmidni vektor.

Sestavina	Volumen [μ L]
tarčna DNA	5
restriktivna endonukleaza 1 (<i>EcoRI</i>)	0,3
restriktivna endonukleaza 2 (<i>XbaI</i>)	0,3
10 × pufer za restrikcijo	1
dH ₂ O	3,4

Za preverjanje nukleotidnega zaporedja vključka smo vzorce plazmida pVM1 z vključki, izoliranega s komercialnim kompletom, GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), po navodilih proizvajalca, poslali v podjetje Macrogen (Seoul, Koreja), kjer so za poslane vzorce določili nukleotidno zaporedje. Poslali smo 3 vzorce DNA: dva s promotorsko regijo *emc S. rimosus* (*Pemc-SR1* in *Pemc-SR2*) ter enega s promotorsko regijo *emc S. tsukubaensis* (*Pemc-ST*).

Poravnavo zaporedij promotorskih regij *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* z referenčnim zaporedjem promotorske regije *emc*, smo izvedli s programom ContigExpress, kateri je del programskega paketa Vector NTI (Thermo Fischer Scientific, ZDA).

3.4.5 Molekulsко kloniranje promotorskih zaporedij *Pemc-SR* in *Pemc-ST* v integrirni vektor pXE01

3.4.5.1 Vključitev *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2*, *Pemc-ST* v integrirni vektor pXE01

Vključke *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* smo izrezali iz vektorja pVM1 z restriktivskema endonukleazama *EcoRI* in *NdeI*. Z enakima restriktivskema endonukleazama smo cepili tudi plazmidni vektor pXE01. V preglednici 12 je prikazana reakcijska zmes za restrikcijo. Restrikcija je potekala 15 min pri 37 °C. DNA reakcijske zmesi po restrikciji smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo in fragmente DNA na gelu vizualizirali z UV-presvetljevalnikom. S sterilnim skalpelom smo izrezali ustrezno velik fragment, ki je bil pri *Pemc-SR* velik približno 500 bp, pri *Pemc-ST* pa približno 750 bp. V primeru vektorja pXE01 smo na gelu dobili en fragment in tega izrezali. Košček gela s fragmentom smo stehtali in shranili v sterilni 2-mL centrifugirki Eppendorf. DNA smo iz agaroznih blokov očistili in izolirali s komercialnim komplemom »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega) po navodilih proizvajalca. V zadnji stopnji smo DNA eluirali v 50 μ L dH₂O.

Preglednica 12: Restriktivna zmes za rezanje DNA pred ligacijo v pXE01.

Sestavina	Volumen [μL]
tarčna DNA	35
restriktivna endonukleaza 1 (<i>EcoRI</i>)	1
restriktivna endonukleaza 2 (<i>NdeI</i>)	1
10 × pufer za restriktijo	5
dH ₂ O	8

Izrezane vključke DNA *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* iz pVM1, smo z ligacijo vstavili v odprt plazmidni vektor pXE01 v razmerju 1 : 3 (vektor : vključek). Razmerje med vektorjem in vključkom v ligacijski zmesi smo določili s pomočjo označevalca velikosti DNA »λ + *HindIII*« s skupnim volumnom DNA 12 μL . Sestava reakcijske zmesi je prikazana v preglednici 13. Za ligacijo smo uporabili ligazo T4 (ThermoFischer Scientific, ZDA) skupaj s ligacijskim puferom T4 po navodilih proizvajalca. Ligacija je potekala preko noči pri 4 °C.

Preglednica 13: Zmes reagentov za ligacijo produkta PCR v vektor.

Sestavina	Volumen [μL]
pXE01	3
vključek (<i>Pemc-SR</i> , <i>Pemc-ST</i>)	9
ligacijski pufer	1,5
2 U ligaze T4	1
dH ₂ O	0,5

3.4.5.2 Priprava kompetentnih celic *E. coli* DH10β

Za vnos vektorja pXE01 z vključki *Pemc-SR* in *Pemc-ST* smo pripravili kompetentne celice DH10β po naslednji metodi. Eno cepilno zanko bakterijskih celic, shranjenih pri -80 °C, smo naceplili na trdno gojišče 2TY in inkubirali preko noči v inkubatorju pri 37 °C. Naslednji dan smo inokulirali 2 × 10 mL tekočega gojišča 2TY in inkubirali na rotacijskem stresalniku preko noči, pri 200 obr./min in 37 °C. Tetji dan smo prenesli po 4 × 4 mL prekonočne kulture v 400 mL tekočega gojišča 2TY. Nacepljena gojišča smo inkubirali v rotacijskem stresalniku pri 220 obr./min in 37 °C do optične gostote OD₆₀₀ = 0,8–0,9. Nato smo kulture celic prestavili v šest ohlajenih 250-mL centrifugirk in jih inkubirali v ledeni kopeli 20 min. Vse nadaljnje inkubacije smo izvajali v ledeni kopeli in vsa centrifugiranja v ohlajeni centrifugi pri 4 °C. Celice smo centrifugirali pri 4.000 obr./min za 10 min, odstranili supernatant in jih spirali z 130 mL 10 mM ledeno hladnega HEPES. Korak centrifugiranja in spiranja smo ponovili in usedljino celic sprali s 66 mL HEPES. Vsebino

treh centrifugirk smo združili v skupno centrifugirko. Za tretje spiranje usedline celic smo uporabili 100 mL 10 % (v/v) glicerola z dodatkom 1 mM HEPES ter združili vsebino dveh centrifugirk. Suspenzijo celic smo ponovno centrifugirali, odstranili supernatant in celice resuspendirali v 6 mL raztopine 10 % (v/v) glicerola z dodatkom 1 mM HEPES. Po 40 µL suspenzije celic smo alikvotirali v sterilne ohlajene 2-mL centrifugirke Eppendorf in jih shranili do uporabe pri –80 °C.

3.4.5.3 Elektroporacija kompetentnih celic *E. coli* DH10β

Plazmidni vektor pXE01 z vključki *Pemc*-SR1, *Pemc*-SR2 in *Pemc*-ST smo v celice *E. coli* DH10β vnesli z elektroporacijo. 2-mL centrifugirko Eppendorf z 40 µL elektrokompetentnih celic smo inkubirali na ledu in počakali, da so se celice odtalile. Celicam smo nato dodali 3 µL plazmidne DNA, premešali in prenesli v ohlajene kivete za elektroporacijo (Sigma-AldrichTM Electroporation Cuvette 0,1 cm gap) ter izvedli elektroporacijo. Uporabljali smo elektroporator MicroPulser™ (Bio-Rad) z naslednjimi nastavitevami: električni pulz 2,5 kV, kapaciteta 25 µF, upornost 200 Ω. Celice smo razredčili z 960 µL tekočega gojišča 2TY (ali LB) ter prenesli v sterilno 2-mL centrifugirko Eppendorf. Sledila je 45-minutna inkubacija pri 37 °C. Celice smo nato centrifugirali pri 3.000 × g, odstranili supernatant, jih resuspendirali v 100 µL tekočega gojišča 2TY (LB) in jih razmazali po 90 µL oz. 10 µL na trdno gojišče 2TY Apr. Nacepljena gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Antibiotik apramicin (Apr) je v gojišče dodan za selekcijo. Zapis za odpornost proti apramicinu je na plazmidu pXE01. Kolonije, ki so zrasle na trdnih gojiščih, smo prenesli v 5 mL tekočega gojišča 2TYz Apr in jih inkubirali preko noči pri 37 °C na 220 obr/min.

3.4.5.4 Preverjanje uspešnosti vključitve *Pemc* v vektor pXE01

Izolacijo plazmidov pXE01 z vključki in previrjanje uspešnosti vključitve *Pemc* smo izvedli tako kot je zapisano v poglavju 3.4.4.4.

3.4.6 Priprava nemetiliranih plazmidov pLN-1, pLN-2 in pLN-3, primernih za vnos v streptomicete

3.4.6.1 Priprava kompetentnih celic *E. coli* ET12567

Za vnos plazmidov pLN-1, pLN-2 in pLN-3, smo pripravili kompetente celice ET12567 po enaki metodi, kot smo pripravili kompetentne celice DH10β (poglavje 3.4.5.2.).

3.4.6.2 Elektroporacija kompetentnih celic *E. coli* ET12567

Plazmidi pLN-1, pLN-2 in pLN-3 smo v celice *E. coli* ET12567 vnesli z elektroporacijo po enakem protokolu, kot je zapisno v poglavju 3.5.4.3. Edina razlika je v tem, da smo transformante razmazali na trdno gojišče 2TY Apr Cm. Zapis za odpornost proti apramicinu (Apr) je na plazmidu pXE01, sam sev ET12567 pa ima zapis za odpornost proti klorampfenikolu (Cm). Kolonije, ki so zrasle na trdnih gojiščih, smo prenesli v 5 ml tekočega gojišča 2TY Apr Cm in jih inkubirali preko noči pri 37 °C na 220 obr/min.

3.4.6.3 Izolacija nemetilirane plazmidne DNA

Izolacijo nemetiliranih plazmidov pLN-1, pLN-2 in pLN-3 smo izvedli tako kot je zapisano v poglavju 3.4.4.4.

3.4.7 Vnos plazmidov za ugotavljanje aktivnosti promotorjev v celice *S. rimosus*

3.4.7.1 Priprava kompetentnih celic *S. rimosus* R7 in M4018 (Pigac in Schrempf, 1995)

Pripravili smo elektrokompetentne celice *S. rimosus* sevov 4018 in R7. Suspenzije spor v 20 % (v/v) glicerolu smo do uporabe hranili v zmrzovalniku pri –80 °C. Po 100 µL suspenzije spor smo razmazali na trdna gojišča TSA in jih inkubirali 7 dni pri 30 °C. V falkonko s 5 mL tekočega gojišča TSB smo prenesli po eno kolonijo iz trdnega gojišča TSA ter inkubirali 24 ur pri 30 °C in 220 obr./min. Naslednji dan smo 1 mL prekonočne kulture prenesli v 100 mL tekočega gojišča TSB in stresali 24 h pri 30 °C, 220 obr./min. Centrifugirko s poraslo kulturo smo nato 30 min inkubirali na ledu in jih centrifugirali pri 4 °C, 15 min, 10.000 obr./min. Pelet smo resuspendirali v 100 mL 10 % (w/v) ohlajene raztopine saharoze in ponovno centrifugirali v hlajeni centrifugi. V nadaljevanju smo spiranje ponovili s 50 mL hladne 10 % (w/v) raztopine saharoze in nato še z 20 mL 15 % (v/v) ohlajenega glicerola. Na koncu smo usedlino celic resuspendirali v 10 mL 15 % (v/v) ohlajenega glicerola. Sledil je dodatek lizocima, s čimer smo razgradili bakterijsko celično steno. Pri pri *S. rimosus* M4018 smo dodali 100 µL v dH₂O raztopljenega lizocima do končne koncentracije 400 µg/mL in pri *S. rimosus* R7 100 µL, do končne koncentracije 100 µg/mL. Reakcijsko zmes smo inkubirali 50 min pri 37 °C in nato centrifugirali v hlajeni centrifugi pri 10.000 obr./min, 15 min. Usedlino celic smo resuspendirali v 20 mL ohlajenega 15 % (v/v) glicerola in centrifugirali 15 min v hlajeni centrifugi pri 7.000 obr./min. Usedlino celic smo nato resuspendirali v 2,5 mL pufra ET, suspenzijo celic razdelili v 50-mL centrifugirke in jih do uporabe shranili pri –80 °C.

3.4.7.2 Elektroporacija kompetentnih celic sevov *S. rimosus* R7 in M4018 (Pigac in Schrempf, 1995)

Nemetilirane plazmje pLN-1, pLN-2 in pLN-3 smo vnesli v celice *S. rimosus* seva 4018 in R7. Uporabljali smo elektroporator MicroPulser (Bio-Rad), ki smo ga nastavili na električni pulz 2 kV. Elektrokompetentne celice smo iz – 80 °C odtalili na ledu, jim dodali 8 µL DNA, dobro premešali in prenesli v ohlajeno elektroporacijsko kiveto (Bio-Rad, Gene Pulser Cuvete 0,2 cm). Izvedli smo elektroporacijo in v kiveto dodali 950 µL tekočega gojišča TSB, premešali in vse skupaj prenesli v sterilno 2-mL centrifugirko Eppendorf. Celice smo inkubirali 3 h pri 30 °C. Po končani inkubaciji smo 100 µL celične suspenzije razmazali na trdna gojišča TSA Ts, ostanek pa centrifugirali ($3000 \times g$, 10 min), resuspendirali v 100 µL TSB in vse razmazali na trdna gojišča TSA Ts. Gojišča smo inkubirali 3 dni pri 30 °C. Tiostrepton (Ts) je bil dodan za selekcijo transformant, saj imajo plazmidi pLN-1, pLN-2 in pLN-3 zapis za odpornost proti tiostreptonu (Ts).

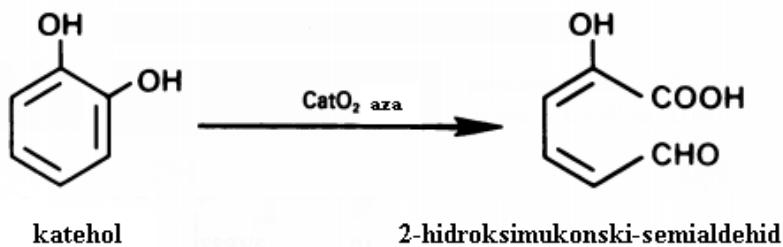
3.4.7.3 Selekcija transformant *S. rimosus* R7 in M4018

Po transformaciji celic *S. rimosus* smo izvedli selekcijo za celice, ki so prejele plazmid. To smo naredili z dvakratnim precepljanjem kolonij na trdna gojišča:

1. Kolonije, ki so po inkubaciji, ki je sledila transformacija, zrasle na trdnih gojišč TSA Tn, smo s sterilnimi zobotrebci s plosko površino, preneseli na sveža trdna gojišča TSA Tn. Izbrali smo temnejše kolonije, ki rastejo v višino. Posamezno kolonijo na svežem trdnem gojišču smo razmazali po približno 4 cm^2 -površini trdnega gojišča. Na eno trdno gojišče smo prenesli 8–9 kolonij. Gojišča smo inkubirali 3 dni pri 30 °C.
2. Kolonije iz trdnega gojišča TSA Tn smo preneseli na plošče s trdnim gojiščem SM Tn in jih inkubirali 10 dni pri 30 °C.

3.4.8 Merjenje aktivnosti katehol 2,3-dioksigenazne XyIE (Keiser in sod., 2000)

Katehol 2,3-dioksigenaza pretvori brezbarvni ketanol v rumeno obarvan hidroksimukonski-semialdehid (slika 9).



Slika 9: Encimska pretvorba brezbarvnega katehola v rumenoobarvan 2-hidroksimukonski-seamialdehid (Magdevska, 2011: 40).

Gen *xylE* za katehol 2,3-dioksigenazo se nahaja tik za vstavljeno promotorsko regijo *emc*, zato se *xylE* izraža pod vplivom promotorja *emc*. Aktivnost promoroja kolerira z aktivnostjo poročevalskega gena *xylE*. Za detekcijo 2,3-deoksiogenazne aktivnosti, smo 12 transformant *S. rimosus* R7 in M4018 ter pozitivno kontrolo v dveh ponovitvah gojili v 5 mL tekočega vegetativnega gojišča TSB ali GOTC v 50-mL centrifugirkah, 24 h pri 30 °C in 220 obr./min. Za pozitivno kontroli smo vzeli sev *S. rimosus* M4018 z genom *xylE* pod kontrolo konstitutivnega in inducibilnega promotorja *erm**. Naslednji dan smo 1 mL kulture prenesli v 5 mL svežega tekočega gojišča TSB oz. produkcijskoga gojišča GOTC v 50-mL centrifugirkah in jih inkubirali pri 30 °C in 220 obr./min. V primeru, ko smo gojili na gojišču TSB, smo kultivacijo zaključili po 24 urah in za analizo odpipetirali 5 mL vzorca. V primeru gojišča GOTC smo kulturo gojili do 72 ur, vzorčili pa po 24 h, 48 h in 72 h inkubacije ter za analizo odpipetirali 1 mL vzorca.

1 ali 5 mL odzvete kulture smo najprej centrifugirali 5 min pri 10.000 obr./min., spirali z 1 mL 20 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH 7,2,) in resuspendirali v 0,5 mL pufra za vzorčenje. Celice smo nato lizirali s sonifikacijo z ultrazvočnim homogenizatorjem: 4 × 15 s z 30 s intervalom. S tem smo se izognili penjenju. Vzorce smo med soniciranjem inkubirali v ledeni kopeli. Po sonifikaciji smo vzorcu dodali 5 µL 10 % (v/v) raztopine detergenta triton X-100 in lizirane celice inkubirali v ledeni kopeli za 15 min. Ostanke celice smo odstranili s 5-minutnim centrifugiranjem pri 14.000 obr./min. V reakcijsko zmes smo odpipetirali 195 µL analiznega pufra in 5 µL celičnega ekstrakta ter inkubirali 30 min pri 37 °C. Encimsko pretvorbo katehola v 2-hidroksimukonski-seamialdehid smo merili spektrofotometrično pri valovni dolžini 375 nm.

Katehol oksigenazno aktivnost (U) smo ovrednotili kot spremembo absorbance, pri 375 nm, na minuto (enačba 1).

$$\text{Encimska aktivnost } (\mu\text{U}) = \frac{\Delta A_{375}}{\Delta t * \varepsilon} * 1000000 \quad \dots (1)$$

A_{375} – absorbanca pri valovni dolžini 375 nm

t – čas reakcije (min)

ε – ekstinkcijski koeficient ($M^{-1} cm^{-1}$) katehola, katerega vrednost je $33000 M^{-1} cm^{-1}$

3.4.9 Iskanje palindromskih zaporedij s pomočjo spletnega orodja EMBOSS explorer

Palindromska zaporedja smo poiskali, da bi ugotovili ali ta obstajajo v promotorskih regijah *emc*. Namreč, na ta zaporedja se lahko vežejo regulatorni proteini iz družine TetR in tako uravnavajo aktivnost promotorjev.

S pomočjo spletnega orodja EMBOSS explorer (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>) smo poiskali palindromska zaporedja promotorskih regij *emc* sevov *S. rimosus* M4018 in *S. tsukubaensis* NRRL18488. Na spletni strani smo v zahtevano okno vnesli zaporedja promotorjev *emc* ter določili kriterije iskanja palindromskih zaporedij, glede na objavo avtorjev Hu in Lidstrom (2012) ter Yu in sod. (2010). Kot ustrezne palindrome smo prevzeli tiste, katerih dolžina je bila šest ali več nukleotidov in največjim številom nukleotidov med obema ponovitvama šest.

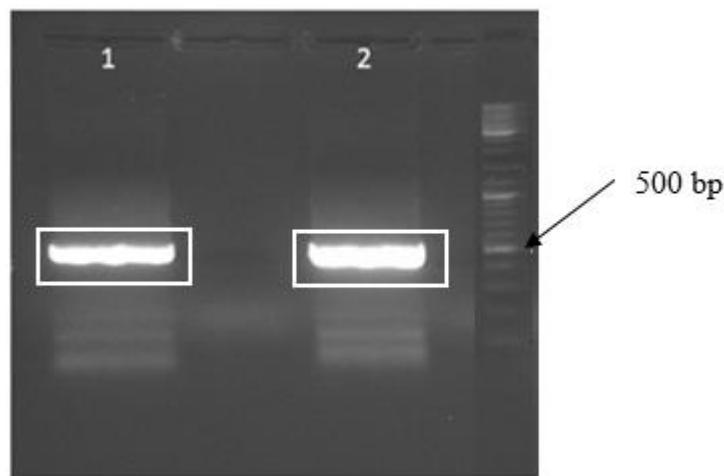
4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA METODE PCR ZA USPEŠNO NAMNOŽITEV PROMOTORSKIH REGIJ *Pemc*

Metodo PCR smo optimizirali za čim višjo koncentracijo dobljenih pomnožkov *Pemc*. V PCR smo kot matrično DNA uporabili genomsko DNA sevov *S. rimosus* M4018 in *S. tsukubaensis* NRRL18488. Pomnoževali smo promotorske regije operona *emc* obeh sevov. Pri sevu M4018 smo uporabili para začetnih oligonukleotidov PemcSr Fw/Rv, pri sevu NRRL18488 pa PemcSt2 Fw/Rv (preglednica 6). Obe reakciji smo pod optimalnimi pogoji reakcije PCR izvedli še v večjem merilu, tako smo naenkrat pridobili dovolj produkta PCR za nadaljnje delo. Namesto reakcijske zmesi v skupnem volumnu 25 µL smo pripravili 100 µL reakcijske zmesi v enakem razmerju reagentov (preglednica 7). Po končani reakciji PCR smo dobljene pomnožke PCR ločili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze in s pomočjo standardne lestvice fragmentov DNA določili velikost fragmentov.

4.1.1 Pomnožki PCR *Pemc* bakterije *S. rimosus* M4018

Pogojev reakcije PCR in sestave reakcijske zmesi za PCR ni bilo potrebno optimizirati, saj smo že z izbranimi začetnimi parametri dobili ustrezen produkt PCR, promotorske regije operona *emc*, v velikosti približno 500 bp. Metoda PCR v večjem merilu (skupnem volumnu 100 µl) je bila uspešna. Fragment, ki je bil dolg približno 500 bp (Slika 10, fragmenta 1 in 2), smo s sterilnim skalpelom izrezali iz agaroznega gela in očistili za nadalnje delo.

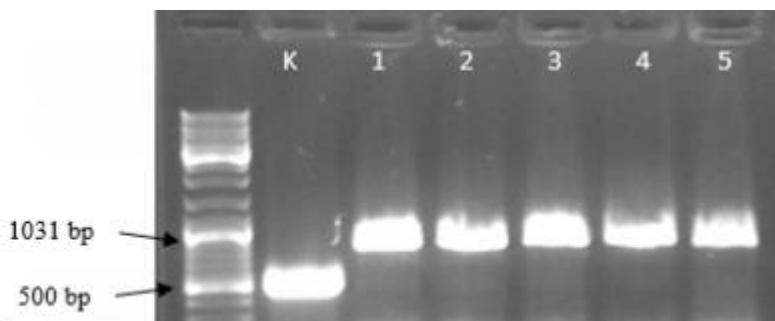


Slika 10: Agarozni gel po elektroforezi pomnožkov PCR promotorja operona *emc* pri bakteriji *S. rimosus* M4018. Obkroženi lisi 1 in 2: pomnožki PCR promotorske regije *S. rimosus* M4018.

4.1.2 Pomnožki PCR *Pemc* bakterije *S. tsukubaensis* NRRL18488

Ker pri začetnih parametrih reakcijePCR nismo dobili ustreznega pomnožka, smo metodo PCR optimizirali s spremenjanjem volumskega deleža DMSO v zmesi za PCR ter spremenjanjem temperature faze prileganja začetnih oligonukleotidov.

Ugotovili smo, da volumski delež DMSO bistveno ne vpliva na količino produkta PCR. Pomembno vlogo pri uspešnosti PCR je imela temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov. Za iskanje optimalne temperature faze prileganja začetnih oligonukleotidov smo pri uporabili temperaturni gradient od 56 °C do 72 °C in ugotovili, da je optimum v območju 60–66°C. PCR smo ponovno izvedli s temperaturnim gradientom 56,6–64 °C (Slika 11). Glede na dobljeno količino produkta smo ocenili optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov – 61,7 °C. Z uporabo optimalne temperature (61,7 °C) smo pripravili zmes PCR v večjem merilu. Izvedba PCR v večjem merilu v primeru *S. tsukubaensis* ni bila uspešna, saj smo dobili produkt v velikosti približno 100 bp, medtem ko je bila pričakovana velikost produkta približno 750 bp. Da smo pridobili dovolj pomnožka, smo tako PCR izvedli večkrat v manjšem merilu, produkte izrezovali iz gela in jih očistili za nadanje delo.



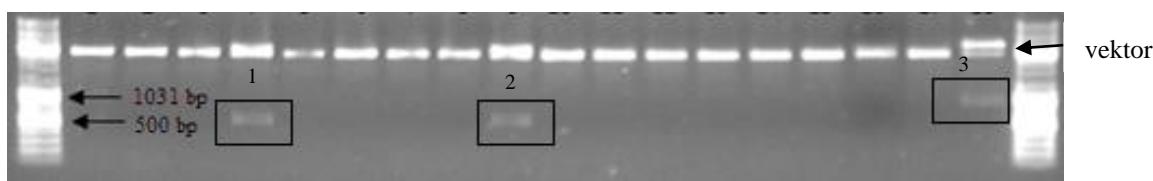
Slika 11: Agarozni gel po elektroforezi pomnožkov PCR promotorja operona *emc* pri bakteriji *S. tsukubaensis* NRRL18488. Pri PCR smo uporabili gradient temperature (56,6 °C – 64 °C) faze prileganja začetnih oligonukleotidov - 1: 56,6 °C, 2: 59,7 °C, 3: 61,9 °C, 4: 63,3 °C, 5: 64 °C. K: pozitivna kontrola (S PCR pomnožen *Pemc* bakterije *S. rimosus* R7).

4.2 KONSTUKCIJA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z VKLJUČKI *Pemc*

4.2.1 Konstrukcija klonirnega plazmida pVM1 z vključki *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST*

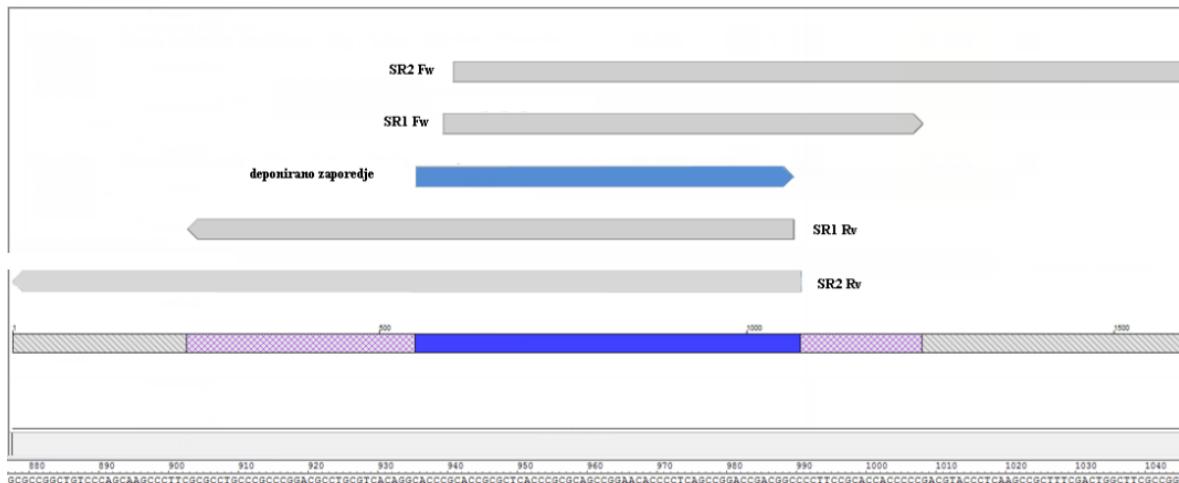
V PCR pomnožene promotorske regije *Pemc* smo s postopki molekulskega kloniranja vstavili v klonirni vektor pVM1. Z restriktijskima encimoma *EcoRI* in *XbaI* smo razrezali plazmid pVM1 in s PCR pomnoženo promotorsko regijo operona *emc* bodisi iz seva *S. rimosus* M4018 (*Pemc-SR*), bodisi iz seva in *S. tsukubaensis* NRRL18488 (*Pemc-ST*).

Irezane *Pemc* smo s pomočjo ligaze T4 vstavili v odprt vektor pVM1. Pripravljene plazmide smo s transformacijo vnesli v kompetentne celice *E. coli* DH5α. Iz transformant, ki so zrasle na selektivnih trdnih gojiščih LB Amp, smo izolirali plazmidno DNA. Uspešnost ligacije smo potrdili tako, da smo z istima encimoma izrezali vključke iz plazmidne DNA ter razrezano DNA ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Pri treh vzorcih sta ločena fragmenta ustrezala velikosti vektorja in vključka: dve pozitivni z vključkom *Pemc*-SR (slika 12, lisa 1 – *Pemc*-SR1 in 2 – *Pemc*-SR2) v velikosti približno 500 bp in eno z vključkom *Pemc*-ST (slika 12, lisa 3 – *Pemc*-ST) v velikosti približno 750 bp.



Slika 12: Agarozni gel po elektroforezi cepljenih vektorjev pVM1 z vključki *Pemc*-SR in *Pemc*-ST. Na sliki zgoraj so plazmidni vektorji pVM1 ustrezne velikosti. Na sliki so označene tri lise, katere ustrezajo velikosti vključkov. 1:*Pemc*-SR1, 2: *Pemc*-SR2, 3: *Pemc*-ST.

Ustreznost vključkov promotorjev operona *emc* v vektorju pVM1 smo potrdili s sekvenciranjem. Dobljena nukleotidna zaporedja vključkov *Pemc*, kot so nam jih posredovali iz podjetja Macrogen, smo poravnali z v genski banki deponiranim zaporedjem operona *emc* s pomočjo programa ContigExpress. Nukleotidna zaporedja *Pemc*-SR1, *Pemc*-SR2 in *Pemc*-ST se 100 % ujemajo z zaporedjem promotorja operona *emc* (slika 13 in 14). Pri poravnavi zaporedja *Pemc*-ST, dobljenega iz smeri Fw, so rezultati nakazovali na dve mutaciji. Vendar smo iz poravnave s zaporedjem *Pemc*-ST, dobljenega iz smeri Rv, ugotovili, da je šlo zgolj za napaki pri sekveniranju in da je torej v vektor vključeno zaporedje *Pemc*-ST intaktno.



Slika 13: Poravna dobljenih nukleotidnih zaporedij *Pemc-SR1* in *Pemc-SR2* s promotorjem operona *emc* seva *S. rimosus* M4018. Dobljena nukleotidna zaporedja *Pemc-SR1* in *Pemc-SR2* iz smeri Fw (SR1 Fw in SR2 Fw) in iz smeri Rv (SR1 Rv in SR2 Rv) so pobarvana s sivo barvo. V genski banki deponirano zaporedje promotorja operon *emc* seva *S. rimosus* M4018 je pobarvano z modro barvo.

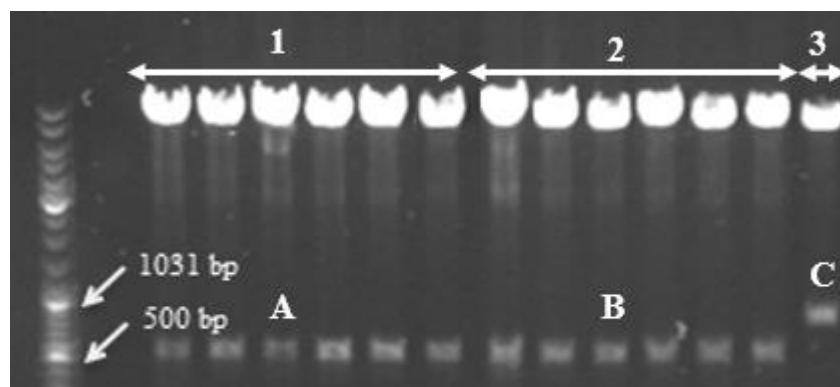


Slika 14: Poravna dobljenih nukleotdnih zaporedij *Pemc*-ST s promotorjem operona *emc* seva *S. tsukubaensis* NRRL18488. Dobljena nukleotidna zaporedja *Pemc*-ST iz smeri Fw (ST Fw) in iz smeri Rv (ST Rv) so pobarvana s sivo barvo. V genski banki deponirano zaporedje promotorja operon *emc* seva *S. tsukubaensis* NRRL18488 je pobarvano z modro barvo.

4.2.2 Konstrukcija integrirnega plazmida pXE01 z vključki *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST*

Vektor pXE01 ima gen *int*, ki kodira encim integrazo, in gen *xyIE*, ki kodira encim katehol 2,3-dioksigenazo. Encim integraza omogoča vgrajevanje plazmida v genom seva *S. rimosus* M4018 in R7. Gen *xyIE* je poročevalski gen, ki se na plazmidu nahaja tik za mestom restrikcije encima *NdeI*. Vektor pXE01 nam je služil tako za integracijo v kromosom kot za ugotavljanje aktivnosti promotorjev operona *emc*.

Z restriktijskima encimoma *EcoRI* in *NdeI* smo iz plazmidov pVM1 z vključki izrezali vključke *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2*, *Pemc-ST*. Z enakima encimoma smo odprli plazmid pXE01 in vključke s pomočjo ligaze T4 vstavili v vektor. Pripravljene plazmide smo s transformacijo vnesli v kompetentne celice *E. coli* DH10 β . Iz transformant, ki so zrasle na selektivnih trdnih gojiščih LB Apr, smo izolirali plazmidno DNA. pXE01 ima zapis za apramicinsko rezistenco, kar pomeni, da imajo zrasle transformante plazmid pXE01, ni pa nujno da je v plazmidu želen vključek, promotor operona *emc*. Uspešnost vključitve *Pemc* smo potrdili tako, da smo z istima encimoma izrezali insert iz plazmidne DNA ter razrezano DNA ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Pri trinajstih vzorcih (12 vzorcev s *Pemc-SR* in eden vzorec s *Pemc-ST*) sta ločena fragmenta ustrezala velikosti vektorja in vključka (slika 15). Za nadalnje delo (transformacijo seva *E.coli* ET12567) smo izbrali rekombinantne plazmide označene na sliki 15: A, B in C.



Slika 15: Agarozni gel po elektroforezi cepljenih vektorjev pXE01 z vključki *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST*. Na sliki zgoraj so lise, katere ustrezajo velikosti plazmidnih vektorjev pXE01. Spodaj so lise, katere ustrezajo velikosti vključkov. 1:*Pemc-SR1*, 2:*Pemc-SR2*, 3:*Pemc-ST*.

Plazmide pLN-1, pLN-2 in pLN-3 (označene na sliki 19) smo transformirali še v sev *E. coli* ET12567, kateri ima prekinjena gena za metilazi Dam in Dcm. Ta sev tako ne metilira DNA, zato je plazmidna DNA izolirana iz tega seva primerna za vnos v streptomicete.

4.2.2.1 Elektroporacija *S. rimosus* R7 in M4018

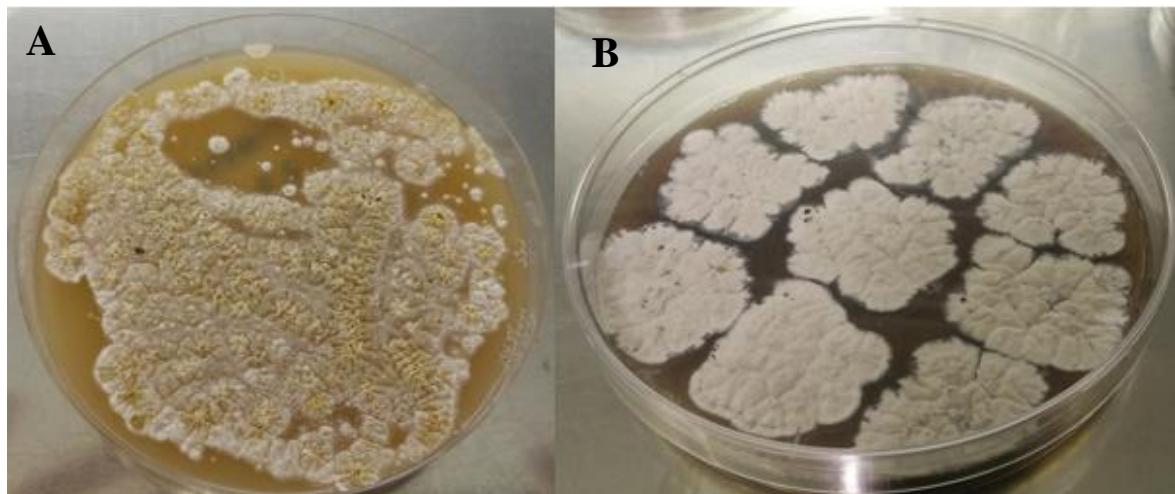
Bakterije sevov *S. rimosus* M4018 (slika 16A) in *S. rimosus* R7 (slika 17A) smo nacepili na plošče z gojiščem SM. Po 10 dnevni inkubaciji pri 30 °C sta seva sporulirala.

Za pripravo kompetentnih celic seva M4018, smo vzeli naključne spore, saj so se razraščale čez celotno površino plošče (slika 16A). Za pripravo kompetentnih celic seva R7, pa smo vzeli spore bele barve (slika 17A, obkoženo s črno).

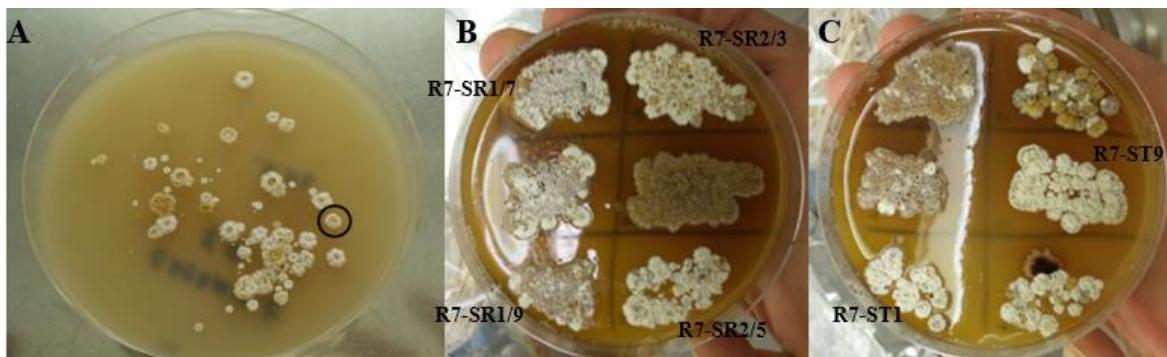
S transformacijo smo v kompetentne celice sevov *S. rimosus* R7 in *S. rimosus* M4018 vnesli plazmide pLN-1, pLN-2 in pLN-3. Transformante smo 10 dni gojili na trdnem gojišču SM Ts. Med transformantami seva M4018 ni bilo mogoče opaziti pomembnejših

morfoloških razlik v primerjavi z izhodnim sevom (slika 16). Če primerjamo spore seva M4018 pred in po transformaciji, opazimo manjše spremembe v morfologiji - spore transformant so bele barve, medtem ko so pri WT belo-rumene. Transformante seva R7 so morfološko zelo različne (slika 17 A in B). Na gojišču SM opazimo belo, rumeno, svetlo in temno rjavo obarvane spore z nagubano površino. Spore belih barv imajo tršo površino, rumene in rjave spore so mehkejše. Na površini tvorijo različne strukture. Vse se globoko razraščajo v notranjost trdnega gojišča. Če primerjamo WT in transformante seva R7, so transformante tudi rjavih barv, medtem ko so WT bele ali rumene barve. Transformante imajo različno nagubane površine, medtem ko je pri WT površina spor v obliki »kraterja«.

Ker nismo opazili razlik v morfologiji transformant seva M4018, na trdnem gojišču SM Ts, smo za vrednotenje aktivnosti promotorjev operona *emc* izbrali dve naključni spori za vsak plazmid (pLN-1, pLN-2 in pLN-3) (slika 16B). Za seva R7 smo izbrali bele spore s trdo površino. Te so vidne na sliki 17. V preglednici 15 so navedene transformante *S. rimosus*, katere smo jih izbrali za vrednotenje aktivnosti promotorjev *emc*.



Slika 16: Rast bakterij *S. rimosus* 4018 na trdnem gojišču SM pred (A) in po (B) transformaciji s plazmidji pLN-1, pLN-2, pLN-3. A. Rast bakterij *S. rimosus* 4018 na trdnem gojišču SM po desetdnevni inkubaciji pri 30 °C. Spore seva M4018 so belo-rumene barve z malo nagubano in trdo površino ter mehko notranjostjo. B: Rast transformant (s plazmidji pLN-1, pLN-2 ali pLN-3) *S. rimosus* 4018 na trdnem gojišču SM Ts po desetdnevni inkubaciji pri 30 °C.



Slika 17: Rast bakterij *S. rimosus* R7 na trdnem gojišču SM pred (A) in po (B in C) transformaciji s plazmidmi pLN-1, pLN-2, pLN-3. A: Rast bakterij *S. rimosus* R7 na trdnem gojišču SM po desetdnevni inkubaciji pri 30 °C. Spore seva R7 so bile belo-rumene obarvane s trdo površino spor in mehko notranjostjo. V primerjavi s sporamimi seva 4018, so spore R7 zrasle višje in višino in imele bolj nagubano površino. Spore seva R7 so se globje vrašcale v notrajanost trdnega gojišča, kot spore M4018. Obkožene spore smo uporabili za pripravo elektrokompetentnih celic. B in C: Rast transformantov *S. rimosus* R7 (s plazmidmi pLN-1, pLN-2 ali pLN-3) na trdnem gojišču SM po desetdnevni inkubaciji pri 30 °C. Za nadaljnje delo smo izbrali transformante označene na sliki: R7-SR1/7, R7-SR1/9, R7-SR2/3, R7-SR2/5, R7-ST1 in R7-ST9.

Preglednica 14: Transformante seva R7 in M4018 izbrane za vrednotenje aktivnosti promotorjev operona *emc*. V prvem stolpcu so napisane oznake transformantov, v drugem sev iz katerega izhaja transformanta in v tretjem plazmid, katerega ima posamezna transformanta.

oznaka transformante	sev transformante	plazmid
R7-SR1/7	R7	pLN-1
R7-SR1/4		pLN-1
R7-SR2/3		pLN-2
R7-SR2/5		pLN-2
R7-ST1		pLN-3
R7-ST9		pLN-3
M4018-SR1/7	M4018	pLN-1
M4018-SR1/8		pLN-1
M4018-SR2/3		pLN-2
M4018-SR2/5		pLN-2
R7-ST1		pLN-3
R7-ST9		pLN-3

4.3 VREDNOTENJE AKTIVNOSTI PROMOTORJEV EMC SEVOV *S. rimosus* M4018 in *S. tsukubaensis* NRRL18488 Z REPORTERSKIM GENOM *xylE*

Gen *xylE* ima zapis za encim katehol 2,3-dioksigenazo, ki brezbarvni katehol spremeni v rumeno obarvan 2-hidroksimukonski semialdehid (poglavlje 3.4.8). Spremembo barve smo merili spektrofotometrično pri valovni dolžini 375 nm. Večja kot je aktivnost promotorjev, več encima se sintetizira in bolj intenzivna je barva, večjo absorbanco pri 375 nm izmerimo.

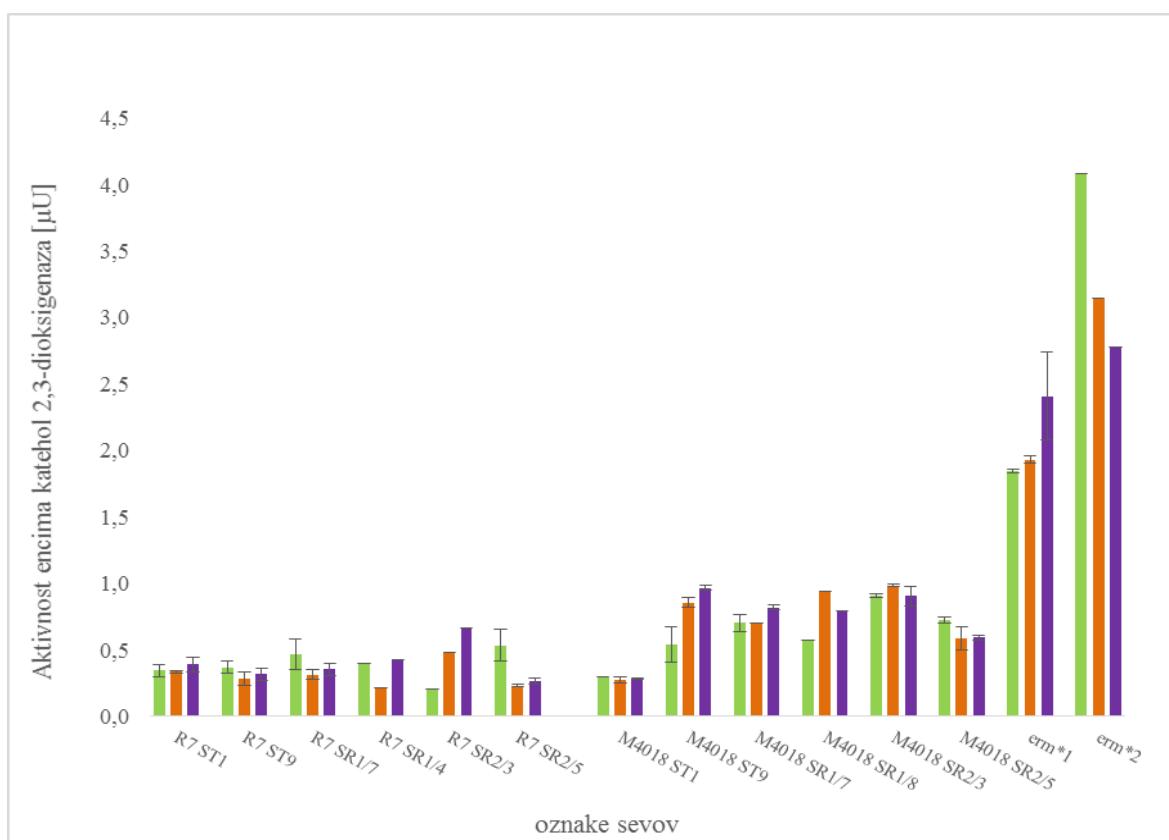
4.3.1 Vrednotenje aktivnosti promotorjev *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* v gojišču GOTC

Encimsko aktivnost v izbranih dvanajstih transformantah *S. rimosus* R7 in *S. rimosus* M4018 smo v gojišču GOTC vrednotili prvi, drugi in tretji dan. Rezultate smo primerjali s pozitivno kontrolo - sev *S. rimosus* M4018 z genom *xylE* pod kontrolo konstitutivnega in induciabilnega promotorja *erm**.

Glede na rezultate meritev, pri sevu R7 ni opaznih razlik v aktivnosti promotorjev operona *emc*, prvi, drugi in tretji dan (slika 18), razen pri transformanti R7-SR2/5, kjer smo izmerili najvišjo aktivnost prvi dan (slika 18). Pri transformantah R7-SR1/4 in R7-SR2/3, smo pri eni od dveh ponovitev izmerili vrednost absorbance nižjo od odzadja, zato teh rezultatov nismo upoštevali in prikazali rezultate samo ene ponovitve (slika 18). Povprečna vrednost aktivnosti promotorjev v transformantah R7 je bila prvi dan $0,39 \pm 0,11 \mu\text{U}$, drugi dan $0,31 \pm 0,10 \mu\text{U}$ in tretji dan $0,40 \pm 0,14 \mu\text{U}$.

V primeru transformant seva M4018, prav tako ni bilo razlik v aktivnosti promotorjev prvi, drugi in tretji dan. Izjemoma smo pri transformanti M1018-ST9 izmerili naraščanje aktivnosti promotorjev od prvega do tretjega dne (slika 18). Pri transformantah M4018-SR1/8, smo pri eni od dveh ponovitev izmerili vrednost absorbance nižjo od odzadja, zato teh rezultatov nismo upoštevali in prikazali rezultate samo ene ponovitve (slika 18). Povprečna vrednost aktivnosti promotorjev v transformantah M4018, prvi dan je bila $0,53 \pm 0,30 \mu\text{U}$, drugi dan $0,62 \pm 0,37 \mu\text{U}$ in tretji dan $0,62 \pm 0,36 \mu\text{U}$.

Aktivnost konstitutivnega promotorja *erm** v gojišču GOTC je bila zelo variabilna $1,8 - 4,1 \mu\text{U}$ (slika 18).



Slika 18: Aktivnost encima katehol 2,3-dioksgenaza pri transformantah *S. rimosus* R7 in *S. rimosus* M4018 kultiviranih v gojišču GOTC po 24 h, 48 h in 72 h pri 30 °C. Zeleni stolpci: vzorci, odvzeti po 24 h gojenja transformant, oranžni stolpci: vzorci, odvzeti po 48 h gojenja transformant; vijolični stolpci: vzorci, odvzeti po 72 h gojenja transformant.

4.3.2 Vrednotenje aktivnosti promotorjev *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* v gojišču TSB

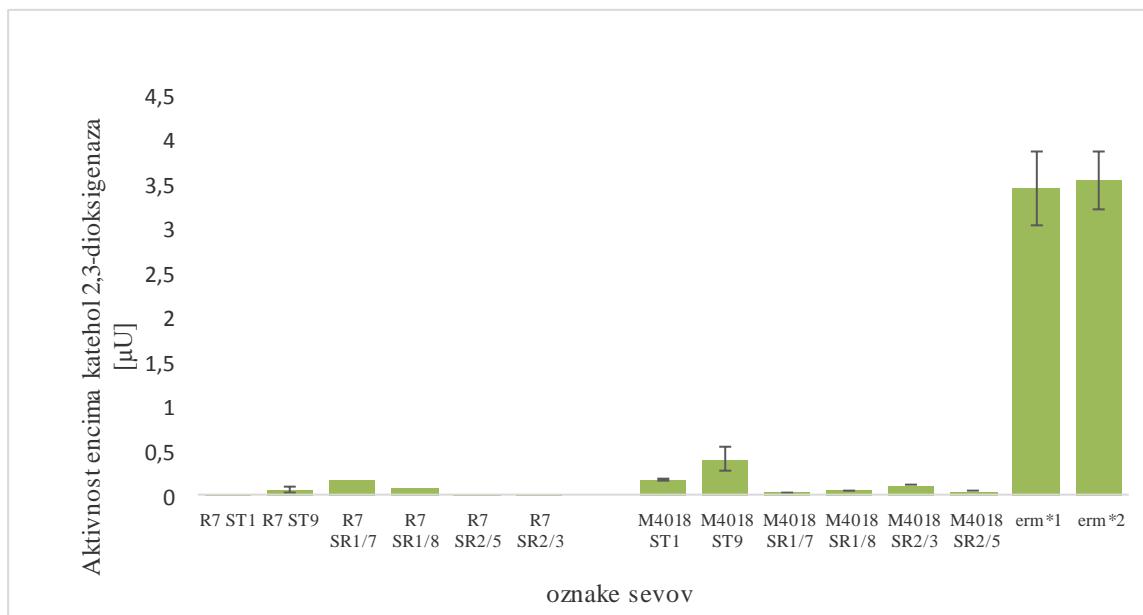
Encimsko aktivnost v izbranih dvanajstih transformantah *S. rimosus* R7 in v *S. rimosus* M4018 v gojišču TSB smo merili samo prvi dan (po 24 h), ker so predhodne raziskave pokazale, da v gojišču TSB po 24 h ni več encimske aktivnosti (Magdevska, 2010). Rezultate smo primerjali s pozitivno kontrolo - sev *S. rimosus* M4018 z genom *xyle* pod kontrolo konstitutivnega in inducibilnega promotorja *erm**.

Pri transformantah M4018-SR1/7, M4018-SR1/8, M4018-SR2/3, M4018-SR2/5 smo izmerili encimsko aktivnost katehol 2,3-dioksgenaze manjšo od 0,2 μU (slika 19). Le pri M4018-ST1 in M4018-ST9 je bila encimska aktivnost višja od 0,2 μU: 0,18 μU in 0,41 ± 2,26 μU (slika 19).

Pri transformantah R7-ST1, R7-ST9, R7-SR1/8, R7-SR2/5, R7-SR2/3 smo izmerili encimsko aktivnost katehol 2,3-dioksgenaze manjšo od 0,2 μU. Pri transformantah

R7-SR1/7 smo izmerili $0,29 \mu\text{U}$ v eni od ponovitev, pri drugi ponovitvi je bila vrednost absorbance manjša od odzadja (slika 19).

Pri pozitivni kontroli (sev M4018 z *xylE* pod kontrolo promotorja *erm**) smo izmerili aktivnost XylE $3,51 \pm 0,62 \mu\text{U}$.



Slika 19: Aktivnost encima katehol 2,3-dioksigenaza pri transformantah *S. rimosus* R7 in *S. rimosus* M4018 kultiviranih v gojišču TSB po 24 h kultivaciji pri 30°C .

4.3.3 Iskanje palindromskih zaporedij

Palindromska zaporedja smo poiskali s pomočjo spletnim orodjem EMBOSS explorer (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>). Zaporedja palindromov z osnovnimi podatki so prikazana v preglednici 16.

Preglednica 15: Palindromska zaporedja promotorskih regij operona *emc*. Prikazana je oznaka s PCR pomnoženega promotorja *emc*, zaporedje palindroma, mesto palindromskega zaporedja glede na start kodon prvega gena v operonu *emc* (mesto), število nukleotidov v eni ponovitvi palindromskega zaporedja (št. nt), število nukleotidov (nt) med ponovitvama palindromskega zaporedja in delež baznih parov GC palindromov v procentih (%).

oznaka zaporedja	zaporedje palindromov	mesto	št. nt	št. nt med ponovitvama	% GC
<i>Pemc-SR1</i> in <i>Pemc-SR2</i>	GGCGCTGCTTCAGCGC	-449 do -434	6	3	83
	CAGATGTCATCTG	-382 do -369	6	1	50
	CCGGGGGTGGCGTGCACCACCCCCGG	-393 do -367	10	6	90
<i>Pemc-ST</i>	GCCGTGTTCCCGCACGGC	-125 do -108	6	5	83
	CCCGGGGAGGGCAGTCCCCGGG	-640 - 618	8	6	88
	TGGCACGCCGTGCCA	- 227 - 212	7	1	71
	TCGCAGACTGCGA	- 479 - 466	6	1	67
	CGCAGCCTGCTGCG	-526 - 512	6	2	83
	CGAGGAGTTCCCTCG	- 592 - 577	6	3	67

5 RAZPRAVA

Bakterija vrste *Streptomyces rimosus* se tradicionalno uporablja v biotehnologiji za proizvodnjo sekundarnih metabolitov (npr. oksiteraciklin). Za dvig donosa sekundarnih metabolitov, na splošno, je v proizvodnji ključno poznavanje regulacije primarnega in sekundarnega metabolizma. Relativno novo odkrita metabolna pot, pot etilmalonil-CoA (EMC), je del primarnega metabolizma pri streptomicetah. Proizvodi in intermediati poti EMC so ključni za sintezo sekundarnih metabolitov. Verjamemo, da bodo nova spoznanja regulacije aktivnosti promotorske regije *emc* pripomogla k razumevanju vloge poti EMC v biosintezi industrijsko pomembnih produktov, izboljšanju industrijskih sevov in s tem k donosnejši produkciji učinkovin v industriji.

Alber (2011) v metabolni poti etilmalonil-CoA vidi velik biotehnološki potencial, predvsem zaradi industrijsko zanimivih intermediatov, ki nastajajo tekom poti (slika 3) (Alber, 2011). Uravnavanje izražanja genov z zapisom za encime, ki sodelujejo v poti EMC, je relativno slabo poznano (Blažič in sod., 2015; Hu in Lidstrom, 2012). Geni z zapisom za encime poti ECM se nahajajo v operonu *emc* (Blažič in sod., 2015). Hu in Lidstrom (2012) sta pri bakterijah *Mathylobacterium extorquens* AM1 preučevala transkripcijski regulator CcrR, ki spada v družino transkripcijskih regulatorjev TetR. Ugotovila sta, da CcrR pozitivno vpliva na izražanje genov operona *emc* in s tem na izrabo C2-virov ogljika. Rast mutant v CcrR na etilaminu kot edinemu viru ogljika, je bila dvakrat manjša v primerjavi z divjim tipom. Medtem ko mutante na metanolu niso izkazale slabše rasti. To pomeni, da vir substrata posredno, preko regulatorja CcrR, vpliva na aktivnost promotorske regije (Hu in Lidstrom, 2012). Podobno so Blažič in sod. (2015) pokazali pri bakterijah *Streptomyces tsukubaensis*, da je izražanje genov poti EMC odvisno od vira substrata. V gojišču bogatim z glukozo in dekstrinom se gen *ccl1*, kateri ima zapis za encim poti EMC, krotonil-CoA karboksilazo/reduktaz, ne izraža. Nasprotno pa so v minimalnem gojišču z acetatom kot edinim virom ogljika, izmerili visoko izražanje gena *ccl1*. Kar pomeni, da se izražanje genov operona *emc* inducira v prisotnosti acetata kot edinega vira ogljika in inhibira v prisotnosti enostavnih virov ogljika, kot je glukoza (Blažič in sod., 2015). Enako so demonstrirali tudi avtorji Okubo in sod. (2010) in Smejkalová in sod. (2010). Ta dognanja bi po optimizaciji, lahko potencialno uporabili v industriji za proizvodnjo dragocenih produktov. Za promotorsko regijo *emc* operona bi klonirali gen za želeni produkt, katerega bi po dodatku acetata sintetizirali v velikih količinah. Kar je bil tudi razlog za to nalogu.

V tej nalogi smo s PCR namnožili promotorske regije *Pemc* in jih vključili v vektor pVM1 oz. pXE01. Kot klonirni vektor smo izbrali plazmid pVM1, ki izhaja iz plazmida pUC18, saj je kloniranje v plazmid pVM1 zato dokaj enostavno. Kot integrirni vektor smo izbrali pXE01, saj ima gen *int* za integrasco, ki omogoča vgrajevanje plazmida v genom in poročevalski gen *xylE* za merjenje aktivnosti promotorjev *Pemc*. Tako smo dobili plazmide

pLN-1, pLN-2 in pLN-3, za katere smo preverjali aktivnost kloniranih promotorjev, ki smo jih po predhodni gojiti v sevu *E. coli* ET12567, kateri ima mutacijo v genu za metilazi Dam in Dcm, vstavili v sev *S. rimosus* M4018 in sev *S. rimosus* R7.

Izbrali smo dva različna seva, ker smo želeli ugotoviti ali med njima obstajajo kakšne razlike v aktivnosti promotorjev *emc* in morfologiji spor na trdnem gojišču. Transformante smo gojili na trdnem gojišču SM Ts in opazovali morfologijo spor na ploščah. V primeru seva M4018 ni večjih razlik v morfologiji pred in po transformacijo, prav tako ni razlik med samim transformantom (slika 16 in 17). Nasprotno v primeru seva R7 opazimo razlike v morfologiji in barvi spor pred in po transformacijo. Sprememba v morfologiji med transformantom je posledica izražanja različnih genov. Razlog, da prihaja do teh variacij izražanja pa ni poznan.

Aktivnost promotorske regije *emc* iz *S. rimosus* M4018 (*Pemc-SR*) in *S. tsukubaensis* NRRL18488 (*Pemc-ST*) smo vrednotili v gostiteljskem sevu *S. rimosus* R7 in *S. rimosus* M4018, s pomočjo poročevalskega gena *xylE*. Gojišča GOTC in TSB sta zelo kompleksna in bogata ter glede na predhodna znanja ne spodbujata izražanja genov za pot EMC–promotorska regija *emc* je verjetno neaktivna (Blažič in sod., 2015). Kljub temu smo le izmerili nizko aktivnost, vendar le na kompleksnem gojišču GOTC. V primeru gojišča TSB nismo izmerili promotorske aktivnosti. Razloga, zakaj smo kljub temu izmerili manjšo aktivnost promotorjev *emc*, ne poznamo. Pri konstitutivnim promotorju *erm** ni razlik v encimski aktivnosti med gojiščema, kar je pričakovano.

Aktivnost promotorjev *Pecm-ST* se v primerjavi s promotorji *Pemc-SR* ni razlikovala v gojišču GOTC v transformantah seva R7 in M4018 (slika 18). Z izjemo smo pri sevu M4018-ST (slika 18), izmerili nižjo aktivnost promotorja kot pri vseh ostalih transformantah M4018. Vendar vseeno ne moremo trditi, da je aktivnost promotorjev *Pemc-ST* večja kot aktivnost promotorjev *Pemc-SR*.

Če primerjamo aktivnost promotorjev operona *emc* med transformantom sevov M4018 in R7 je aktivnost približno enaka v primeru obeh gojišč. V gojišču GOTC približno 0,4–0,5 µU, v TSB pa 0. Sev M4018 je industrijski sev in se tradicionalno uporablja v biotehnologiji za proizvodnjo sekundarnih metabolitov in ima verjetno deregulirano izražanje genov. Sev R7 je nativni sev, zato ima lahko v primerjavi s sevom M4018 različno regulacijo izražanja. Čeprav razlik med sevoma R7 in M4018 nismo izmerili, še ne pomeni, da imata popolnoma enake mehanizme regulacije. Pomeni samo, da razlik v okviru naših meritev nismo uspeli zaznati.

Blažič in sod. (2015) ugotovili, da se geni *emc* operona izražajo v gojišču s C2 kot edinim virom ogljika (npr. acetat). V nadalnjih raziskavah, bi lahko previrili ali to velja tudi za transformante izdelane tekom te magistrske naloge. Aktivnost promotorjev *emc* transformant bi merili v minimalnem gojišču s C2, kot edinim virom ogljika. Uporabili bi lahko različna minimalna gojišča, kot tudi različne vire C2 (npr. amonijev acetat). Rezultate bi primerjali z aktivnostimi iz kompleksnih gojišč in ugotovili, če katere od C2-

komponent vplivajo na testirane promotorje. V nadaljevanju tega projekta bi lahko transformante R7 gojili v bogatem gojišču, da dosežemo visoko koncentracijo celic v gojišču in nato dohranjevali z acetatom. Poiskušali bi najti nabolj primeren čas, za dodatek acetata, da bi bil promotor operona *emc* najbolj aktiven.

Zelo malo je znanega o regulatorjih izražanja genov metabolne poti EMC. Hu in Lidstrom (2012) sta identificirala prvi regulator iz družine TetR, CcrR, pri bakteriji *Methylobacterium extorquens* AM1. Glede na njihove rezultate, homolog CcrR pozitivno uravna izražanje gena za encim metabolne poti EMC (*ccr*), krotonil-CoA reduktaze/karboksilaze tako, da se veže na palindromsko zaporednje DNA, višje od promotorske regije gena *ccr*. Pri mutantah CcrR so opazili 2-kratni upad izražanja in aktivnosti Ccr ter slabšo rast v minimalnem gojišču z dodanim etilaminom, kjer je Ccr nujen za asimilacijo ogljika. Povzeli so, da 2-kratni upad aktivnosti Ccr vodi v manjši pretok ogljika skozi pot EMC. Ugotovili so, da se je Ccr izražal v gojišču s sukinatom, kar nakazuje na prisotnost dodatnih regulatornih elementov (tudi represorjev).

Družina regulatorjev TetR je splošno razširjena med prokarioti. Pogosto so udeleženi pri regulaciji genov, v povezavi na adaptacijo okolja, kot je tudi koriščenje različnih virov ogljika. Bolj pogosto delujejo kot represorji in ne kot aktivatorji. Večina je avtoregulatorjev, kar pomeni, da uravnava lastno izražanje (Hu in Lidstrom, 2012).

Rekombinantni sevi M4018-SR1, M4018 SR2, M4018-ST, R7-SR1, R7-SR2, R7-ST, konstruirani tekom te magistrske naloge, vsebujejo gene za regulator družine TetR, kateri potencialno regulirajo aktivnost promotorjev *emc*. Da bi predpostavko preverili, bi lahko gen za regulator iz družine TetR klonirali v plazmidni vektor z močnim konstitutivnim promotorjem. Ta genski konstrukt bi transformiral v celice rekombinantnih sevov. S pomočjo poročevalskega gena *xylE* bi merili aktivnost promotorja operona *emc* in jo primerjali z aktivnostjo brez plazmidnega vektorja s vključkom gena za regulatorni protein iz družine TetR. V primeru, da bi bila aktivnost promotorja novih transformant višja, pomeni, da regulatorni protein iz družine TetR deluje kot aktivator promotorske regije *emc*, v nasprotnem primeru pa kot represor. Če deluje kot aktivator, bi v transformantah s konstitutivno izraženim regulatornim proteinom iz družine TetR, morali izmeriti boljšo rast v minimalnem gojišču z etilaminom, kot pri sevu brez konstitutivno izraženega regulatornega proteina iz družine TetR (Hu in Lidstrom, 2012). Hu in Lidstrom (2012) navajajta, da je razlog v tem, ker regulatorni protein iz družine TetR vpliva na povečan pretok ogljika skozi metabolno pot EMC. V metabolno pot EMC vstopajo C2-molekule, kar pa je tudi etilamin. Če ne bi izmerili sprememb v aktivnosti, bi iz tega lahko sklepali, da regulatorni protein iz družine TetR ni regulator promotorja *emc*.

Homodimerni regulatorni protein iz družine TetR se običajno veže na palindromska zaporedja DNA. Tipičen potek vezave proteina iz družine TetR na palindromska zaporedje poteka tako, da se dva identična monomera proteina iz družine TetR, vežeta na enako zaporedje DNA, vsak na svojo verigo molekule DNA. Hu in Lidstrom (2012) sta na

mestu -334 do -321, glede na začetek mesta translacije poročevalskega gena (*katA*) za promotorsko regijo gena *ccr* našla palindromsko zaporedje (CGCGCCTTGAGGCGCG). Ugotovila sta, da se nanj veže regulatorni protein družine TetR (CcrR) in tako aktivira promotorje gena *ccr*. S pomočjo spletnega orodja EMBOSS explorer, smo v promotorjih operona *emc*- *Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST* poiskali palindromska zaporedja. Palindromsko zaporedje avtorjev Hu in Lidstrom (2012) je sestavljen iz dveh ponovitev 7 nukleotidov z 86 % delžem GC baznih parov, med ponovitvama sta 2 nukleotida. Poznani so različni regulatorji družine TetR, ki se vežejo na zelo različna palindromska zaporedja (Yu in sod., 2010). To so razlike v dolžini in deležu GC baznih parov palindromov ter število nukleotidov med ponovitvama. Mesto vezave je odvisno od aminokislinskega zaporedja in strukture regulatornega proteina (Yu in sod., 2010). Ker ne poznamo lastnosti potencialno prisotnega proteina iz družine TetR v rekombinantnih sevih R7 in M4018, bi lahko analizirali vsa najdena palindromska zaporedja.

V rekombinantnih sevih M4018-SR1, M4018 SR2, M4018-ST, R7-SR1, R7-SR2, R7-ST s plazmidnim vektorjem z genom za regulatorni protein iz družine TerR pod regulacijo močnega, konstitutivnega promotorja, bi naredili delecije palindromskih zaporedij in opazovali, če prihaja do sprememb v regulaciji promotorja operona *emc*. Aktivnost promotorja *emc* bi lahko merili s pomočjo poročevalskega gena. V primeru sprememjenje (višje ali nižje) aktivnosti promotorjev *emc*, bi potrdili, da regulatorni protein iz družine TetR s svojo vezavo na palindromska zaporedja vpliva na aktivnost promotorjev *emc* (kot represor ali aktivator). Če ne bi opazili sprememb, bi to pomenilo, da ima regulatorni protein iz družine TetR drugačen način delovanja.

6 SKLEPI

Glede na postavljene hipoteze nam je uspelo:

- S pomočjo bioinformacijske analize smo uspeli analizirati promotorsko regijo *emc* pri sevih *S. tsukubaensis* NRRL18488 in *S. rimosus* M4018 in predvideti promotorska zaporedja. Glede na zaporedje promotorske regije, smo konstruirali začetne oligonukleotide za reakcijo PCR.
- Z metodo PCR smo uspešno pomnožili promotorsko regijo operona *emc* pri bakterijah *S. tsukubaensis* in *S. rimosus*.
- Z molekularno-biološkimi metodami smo pripravili poročevalski sistem na osnovi katehol-2,3-deoksigenaze Xyle, ki se izraža v odvisnosti od promotorskih regij *emc*.

7 POVZETEK

Pot etilmalonil-CoA je centralna pot pri metabolizmu ogljika pri številnih bakterijah, kot so *Streptomyces* spp. Gre za nedavno opisano metabolno pot, katere funkcija je pretvorba intermediata centralnega metabolizma, acetil-CoA, v ostale prekurzorske metabolite, udeležene pri celični biosintezi. Med potjo asimilacije acetil-CoA nastajajo unikatni intermediati CoA estri, kot so (2R)- in (2S)-etilmalonil-CoA, (2S)-metilsikcinil-CoA, mezakonil-(C1)-CoA in (2R)- in (2S)-metilmalil-CoA. Poleg intermediatov, so tu prisotni tudi edinstveni encimi, ki katalizirajo reakcije poti etilmalonil-CoA (Alber, 2010).

Dobro poznavanje regulacije izražanja operona *emc* je pomembno na področju genskega inženirstva. To bi nam omogočilo manipulacijo metabolne poti EMC in potencialno aplikacijo v industriji za proizvodnjo dragocenih encimov in intermediatov. Namen magistrske naloge je bil, konstrukcija plazmidov za vrednotenje promotorske regije operona *emc* bakterij *S. rimosus* in *S. tsukubaensis*.

Promotorske regije poznanih operonov *emc* smo klonirali v plazmidni vektor pXE01 in na novo konstuirane plazmide poimenovali pLN-1, pLN-2 in pLN-3. Te smo s transformacijo vnesli v kompetentne celice seva *S. rimosus* M4018 in *S. rimosus* R7. S pomočjo encimske aktivnosti katehol 2,3-dioksigenaza smo merili aktivnost promotorjev v GOTC in TSB gojišču. Izmerili smo nizke aktivnost promotorjev v gojišču GOTC, medtem ko v gojišču TSBaktivnosti nismo zaznali. S pomočjo spletnega orodja EMBOSS explorer smo identificirali palindromska zaporedja v promotorskih regijah *emc* (*Pemc-SR1*, *Pemc-SR2* in *Pemc-ST*), ki so potencialna mesta vezave regulatornega proteina TetR. Ta s svojo vezavo verjetno deluje kot aktivator promotorjev *emc*.

8 VIRI

- Alber B.E. 2011. Biotechnological potential of the ethylmalonyl-CoA pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 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: 297-309
- Anderson A.S., in Wellington E.M. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797-814
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., P. van Wezel G.. 2016, Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80: 1-43
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga 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., Rabinowitsch 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: 141-147
- Bibb M. in Hesketh A. 2009. Chapter 4. Analyzing the regulation of antibiotic production in *Streptomycetes*. V: *Methods in Enzymology*. Hopwood D. A. (ur.). Burlington, Academic Press: 458: 93-116
- Bibb M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomycetes*. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 208-215
- Blažič M. 2014. Metabolne poti gradbenih enot za biosintezo FK506 in strukturno-podobnih sekundarnih metabolitov pri bakterijah rodu *Streptomyces*. Doktorska dizertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 133 str.
- Blažič M., Kosec G., Baebler Š., 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, 164, doi: 10.1186/s12934-015-0352-z: 12 str.
- Blažič M., Čadež N., Jamnik P., Paš M., Petković H. 2014. Biotehnologija mikroorganizmov : delovno gradivo za vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 44 str.

- Borodina I., Schöller 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: 2294-2302
- Bush M. J., Tschowri N., Schlimpert S., Flärdh K., Buttner M. J. 2015, c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in *Streptomycetes*. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 749-760
- Claassen A.M.P. in Zehnder J.B.A. 1986. Isocitrate Lyase Activity in *Thiobacillus versutus* Grown Anaerobically on Acetate and Nitrate. *Microbiology*, 132: 3179-3185
- Dunn M. F., Ramírez-Trujillo J. A., Hernández-Lucas I. 2009, Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*, 155: 3166-3175. Ensign S.A. 2006. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation: *Molecular Microbiology*, 61: 274-276
- Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Müller M., Fuchs G., Alber B.E. 2007. Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 10631-10636
- Han L. in Reynolds K.A.. 1997. A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in *Streptomycetes*. *Journal of Bacteriology*, 179: 5157-5164
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580
- Hodgson D.A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomycetes*: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42:47-238
- Kim H. J., Kim T. H., Kim Y., Lee H. S. 2004. Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*: *Journal of Bacteriology*, 186: 3453-3460
- Kirby R. in Chen C.W. 2011. Genome Architecute V: *Streptomyces*: Molecular Biology and Biotechnology. Paul Dyson (ur.). Letchett Matravers: Caister Academic Press: 5-25
- Hu B. In Lidstrom M. 2012. CcrR, a TetR family transcriptional regulator, activates the transcription of a gene of the Ethylmalonyl coenzyme A pathway in *Methylobacterium extorquens AM1*. *Journal of Bacteriology*, 194: 2802-2808
- Inoue H., Nojima H., Okayama H.. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28

- 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
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, John Innes Foundation: 613 str.
- Kornberg H.L. in Madsen N.B.. 1957. Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acid cycle. Biochimica et Biophysica Acta, 24: 651-653
- Kornberg H.L. in 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
- Korotkova N., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. 2005. Identification of genes involved in the glyoxylate regeneration cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1, including two new genes, meaC and meaD. Journal of Bacteriology, 187: 1523-1526
- LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
<http://www.bacterio.net/> (18.10.2016)
- MacNeil D.J., Gewain M.K., Ruby C.L., Dezeny G., Gibbons P.H., MaeNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene, 111: 61-68
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. 2008. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 1061 str.
- Magdevska V. 2010. *Streptomyces rimosus* as a potential host for heterologous protein expression. Doctoral dissertation. Ljubljana, Biotechnological faculty, Department of Food Science and Technology: 150 str.
- Meister M., Saum S., Alber B.E., Fuchs G.. 2005. L-malyl-coenzyme A/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Bacteriology, 187: 1415-1425
- Okubo Y., Yang S., Chistoserdova L., Lidstrom M.E. 2010. Alternative route for glyoxylate consumption during growth on two-carbon compounds by *Methylobacterium extorquens* AM1. Journal of Bacteriology, 192: 1813-1823
- Pigac J., Schrempf H. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomycetes* by electroporation. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1: 352-356

- Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M.. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16: 466-471
- Rhodes P.M., Winskill N., Friend E.J., Warren M. 1981. Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis. Journal of General Microbiology, 124: 329–338
- Sambrook J. in Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 258 str.
- Schneider K., Peyraud R., Kiefer P., Christen P., Delmotte N., Massou S., Portais J.C., Vorholt J. A. 2012. The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by *Methylobacterium extorquens* AM1 during growth on acetate. The Journal of Biological Chemistry, 287: 757-766
- Smejkalová H., Erb T.J., Fuchs G. 2010. Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: demonstration of all enzymes and their regulation. PLoS One, 5, 10: e13001, doi: 10.1371/journal.pone.0013001: 12 str.
- Soh B. S., Loke P., Sim T. S. 2001. Cloning, heterologous expression and purification of an isocitrate lyase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585: Biochimica et Biophysica Acta, 1522: 112-117
- Tarkka, M. in Rüdiger H. 2008. Secondary metabolites of soil *Streptomycetes* in biotic interactions. V: Secondary metabolites in soil ecology. Karlovsky P. (ur.). Berlin, Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 14: 107-126
- Yu Z., Reichheld S. E., Savchenko A., Parkinson J., Davidson A. R.. 2010. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. Journal of Molecular Biology, 400: 847-864

ZAHVALA

Najprej se najlepše zahvaljujem družini in prijateljem za podporo in vzpodbudne besede tekom izdelave magisterskega dela.

Hvala mentorju prof. dr. Hrvoju Petkoviću za pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magisterskega dela.

Zahvaljujem se somentorici asist. dr. Martini Avbelj za čas in pomoč pri praktični izvedbi eksperimentov v okiru magistrskega dela

Velika zahvala gre prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za hiter in temeljit pregled magistrske naloge.

Hvala vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil – Maji, Neži, Mii, Mateju in Dragici. Hvala Vasilki in Marku iz podjetja Acies bio d.o.o. Hvala kolegom – Ilijji, Martini in Luciji za pomoč in popestritev dni v laboratoriju.