

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Miha TOME

**ČEZMERNO IZRAŽANJE HOMOLOGA  
REGULATORNEGA GENA *lmbU* PRI AKTINOMICETI  
*Saccharopolyspora erythraea***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Miha TOME

**ČEZMERNO IZRAŽANJE HOMOLOGA REGULATORNEGA GENA *lmbU* PRI  
AKTINOMICETI *Saccharopolyspora erythraea***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**OVEREXPRESSION OF THE REGULATORY GENE HOMOLOG *lmbU* IN  
ACTINOMYCETES *Saccharopolyspora erythraea***

M.S.C. THESIS  
Master Study Programmes – Field Biotechnology

Ljubljana, 2013

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

---

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

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja dr. Gregorja Kosca in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentorica: prof. dr. Polona Jamnik

Somentor: dr. Gregor Kosec

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Polona Jamnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Gregor KOSEC

Acies Bio d.o.o., Tehnološki park Ljubljana

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisan se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Miha Tome

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
 DK UDK 604.4:615.332:579.873:577.2(043)=163.6  
 KG aktinomicete/*Saccharopolyspora erythraea*/sekundarni metaboliti/makrolidni antibiotiki/eritromicin/biosinteza eritromicina/regulacija biosinteze/molekularna genetika/proteomika/SACE\_5599  
 AV TOME, Miha, dipl. bioteh. (UN)  
 SA JAMNIK, Polona (mentorica)/KOSEC, Gregor (somentor)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
 LI 2013  
 IN ČEZMERNO IZRAŽANJE HOMOLOGA REGULATORNEGA GENA *lmbU*  
     PRI AKTINOMICETI *Saccharopolyspora erythraea*  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)  
 OP XVIII, 82 str., 34 pregl., 20 sl., 6 pril., 98 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Eritromicin je komercialno pomemben makrolidni antibiotik, ki je produkt sekundarnega metabolizma bakterije *Saccharopolyspora erythraea*. Njegova biosinteza je dobro poznana, o regulaciji biosinteze pa ni znanega veliko. Za industrijsko proizvodnjo se uporablja visoko donosne seve, ki so rezultat dolgoletne selekcije sevov, v katere so vnašali mutacije s pomočjo mutageneze. To poviša donos eritromicina, ne omogoča pa vpogleda v regulatorne in metabolne mehanizme, ki stojijo za tem. V magistrskem delu smo želeli ovrednotiti vpliv čezmerno izraženega gena SACE\_5599 v naravnem sevu *S. erythraea* NRRL23338. Gen kodira enega od proteinov, za katerega je bilo s primerjalnim proteomskim pristopom ugotovljeno, da je njegova raven sinteze bistveno višja v visoko donosnem sevu. Opazovanje njegovih homologov v aktinomicetah predvideva regulatorno vlogo. Ugotovili smo, da čezmerno izražanje gena SACE\_5599 pod kontrolo konstitutivnega promotorja *ermE\** pozitivno vpliva na produkcijo eritromicina. Razlika v produkciji je bila statistično značilna v primeru skupine konjugant, pri katerih je promotorska regija vsebovala tudi vezavno mesto za ribosom. Izražanje gena SACE\_5599 na proteinskem nivoju s prenosom western nismo uspeli detektirati.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 604.4:615.332:579.873:577.2(043)=163.6  
CX actinomycetes/*Saccharopolyspora erythraea*/secondary metabolites/macrolide antibiotics/erythromycin/erythromycin biosynthesis/regulation of biosynthesis /molecular genetics/proteomics/SACE\_5599  
AU TOME, Miha  
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/KOSEC, Gregor (co-supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja(reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2013  
TI OVEREXPRESSION OF THE REGULATORY GENE HOMOLOG *lmbU* IN ACTINOMYCETES *Saccharopolyspora erythraea*  
DT M.SC. thesis (Master Study Programmes – Field Biotechnology)  
NO XVIII, 82 p., 34 tab., 20 fig., 6 ann., 98 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Erythromycin is a macrolide antibiotic that has commercial significance and is a product of secondary metabolism in bacteria *Saccharopolyspora erythraea*. Its biosynthesis is well known, but the regulation of biosynthesis is fairly unknown. High-productive strains are used for industrial production and are the result of many years of selecting mutated strains via classical mutagenesis. This increases the yield of erythromycin, but does not tell much about the regulatory and metabolic mechanisms behind it. In this thesis, we wanted to evaluate the impact of over-expressed gene SACE\_5599 in the natural strain of *S. erythraea* NRRL23338. This gene encodes one of the proteins, whose increased synthesization was significantly detected in the industrial strain using a comparative proteomic approach. Observing its homologs in other actinomycetes provides us a putative regulatory role of the gene. We found that overexpression of the gene SACE\_5599 under the control of a constitutive promoter *ermE\** had a positive impact on the production of erythromycin. The difference in production was statistically significant in the group of conjugates, in which the promoter region contained a binding site for the ribosome. Overexpression of the gene SACE\_5599 on the protein level was not detected.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>XI</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIV</b>
<b>GENETSKI KOD IN OKRAJŠAVE AMINOKISLIN .....</b>	<b>XVII</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 AKTINOMICETE .....	3
2.2 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .....	3
<b>2.2.1 Življenjski cikel.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Genom <i>S. erythraea</i>.....</b>	<b>5</b>
2.3 ERITROMICIN .....	6
<b>2.3.1 Poliketid sintaze (PKS) tipa I .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Biosinteza eritromicina .....</b>	<b>8</b>
2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITOV PRI AKTINOMICETAH.....	10
<b>2.4.1 Globalna (pleiotropna) regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov.....</b>	<b>11</b>
2.4.1.1 Geni <i>bld</i> .....	11
2.4.1.2 Geni <i>afs</i> , <i>abs</i> in <i>aba</i> .....	12
2.4.1.3 Vloga signalnih molekul pri globalni regulaciji .....	12
<b>2.4.2 Pot-specifična regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov .....</b>	<b>14</b>
2.4.2.1 Regulatorni proteini družine SARP .....	14
2.4.2.2 Regulatorni proteini družine LAL .....	15
2.4.2.3 Regulatorni proteini družine LTTR .....	15
<b>2.5 REGULACIJA SINTEZE ERITROMICINA .....</b>	15
<b>2.5.1 BlD</b> .....	<b>16</b>

<b>2.5.2 Homologi LmbU - domnevni regulatorji.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1 Začetni oligonukleotidi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Vektorji.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.3 Bakterijski sevi.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.4 Gojišča .....</b>	<b>21</b>
3.1.4.1 Gojišče za kultivacijo <i>E. coli</i> - 2TY .....	21
3.1.4.2 Trdno gojišče za konjugante <i>S. erythraea</i> - SM-MgCl <sub>2</sub> .....	22
3.1.4.3 Trdno sporulacijsko gojišče ABSM4 .....	22
3.1.4.4 Tekoče vegetativno gojišče za <i>S. erythraea</i> ABVM1 .....	23
3.1.4.5 Tekoče produkcijsko gojišče za <i>S. erythraea</i> ABPM8.....	23
3.1.4.6 Tekoče gojišče TSB.....	23
3.1.4.7 Trdno gojišče ABA.....	24
<b>3.1.5 Raztopine.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.6 Ostali materiali .....</b>	<b>28</b>
3.1.6.1 Encimi.....	28
3.1.6.2 Elektroforezni standardi .....	28
3.1.6.3 Kompleti reagentov .....	29
3.1.6.4 Antibiotiki.....	29
3.1.6.5 Protitelesa (Ab).....	30
3.1.6.6 Ostale kemikalije, reagenti in materiali .....	30
3.1.6.7 Pomembnejše aparature.....	30
3.2 METODE .....	32
<b>3.2.1 Molekularnobiološko kloniranje.....</b>	<b>32</b>
3.2.1.1 Izolacija genomske DNA iz kulture <i>S. erythraea</i> .....	32
3.2.1.2 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....	32
3.2.1.3 Elektroforeza DNA.....	33
3.2.1.4 Čiščenje produktov PCR .....	34
3.2.1.5 Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami.....	34
3.2.1.6 Ligacija v vektor pSet152.....	34
3.2.1.7 Izolacija plazmidne DNA .....	35
3.2.1.8 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH10b in <i>E. coli</i> ET12567 pUZ8002 .	35

3.2.1.9 PCR na osnovi kolonije .....	36
<b>3.2.2 Mikrobiološke metode.....</b>	<b>37</b>
3.2.2.1 Prekonočne kulture celic <i>E.coli</i> DH10β in <i>E.coli</i> ET12567 pUZ8002 .....	37
3.2.2.2 Konjugacija spor bakterije <i>S. erythraea</i> .....	37
3.2.2.3 Gojenje izbranih sevov <i>S. erythraea</i> na agarnih ploščah.....	38
3.2.2.4 Gojenje izbranih sevov <i>S. erythraea</i> v tekočem gojišču in vzorčenje fermentacijskih brozg .....	38
<b>3.2.3 Analiza produkcije eritromicina z biološkim testom .....</b>	<b>39</b>
3.2.3.1 Ekstrakcija eritromicina brez soli .....	39
3.2.3.2 Biološki test z <i>B. subtilis</i> .....	39
<b>3.2.4 Analiza in statistična obdelava rezultatov biološkega testa.....</b>	<b>40</b>
3.2.4.1 Analiza osamelcev .....	40
3.2.4.2 Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk .....	41
3.2.4.3 Analiza homogenosti varianc s testom Levene .....	41
3.2.4.4 Analiza podatkov z neparametričnim testom Kruskal-Walis .....	42
3.2.4.5 Analiza podatkov s testom Mann-Whitney .....	42
<b>3.2.5 Izolacija in analiza proteinov konjugant <i>S. erythraea</i> .....</b>	<b>44</b>
3.2.5.1 Izolacija proteinov .....	44
3.2.5.2 Merjenje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu.....	44
3.2.5.3 Detekcija HA-tag proteina s prenosom western .....	45
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>47</b>
4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE .....	47
<b>4.1.1 Pomnoževanje gena SACE_5599-HA s pomočjo reakcije PCR .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2 Priprava plazmidnega konstrukta pSet152+ermE*+SACE_5599-HA .....</b>	<b>48</b>
4.1.2.1 Plazmid pSet152+ermE* .....	48
<b>4.1.3 Pridobitev konjugant <i>S. erythraea</i> z vstavljenima plazmidoma .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.4 Preverjanje uspešnosti konjugacije s PCR na osnovi kolonij .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.5 Preverjanje načina in mesta vstavitve plazmida pSet152+ermE*+ SACE_5599-HA s PCR na osnovi kolonij .....</b>	<b>52</b>
4.2 PRODUKCIJA ERITROMICINA V SEVIH <i>S. erythraea</i> Z DODATNO KOPIO GENA SACE_5599 .....	55
<b>4.2.1 Kultivacija konjugant <i>S. erythraea</i> in analiza produkcije eritromicina z biološkim testom.....</b>	<b>55</b>

<b>4.2.2 Statistična obdelava podatkov produkcije eritromicina .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.3 Rezultati produkcije eritromicina.....</b>	<b>58</b>
4.3 ANALIZA SINTEZE PROTEINOV S PRENOSOM WESTERN.....	60
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>66</b>
5.1 RAZPRAVA.....	66
5.2 SKLEPI.....	71
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>72</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>74</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oznake in zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov ter njihove lastnosti.	
Vsa zaporedja so zapisana od 5'- proti 3'- koncu. ....	19
Preglednica 2: Seznam uporabljenih mikroorganizmov .....	21
Preglednica 3: Sestava tekočega in trdnega gojišča 2TY .....	21
Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča SM.....	22
Preglednica 5: Raztopina 1M MgCl <sub>2</sub> .....	22
Preglednica 6: Sestava sporulacijskega gojišča ABSM4 .....	22
Preglednica 7: Sestava vegetativnega gojišča ABVM1 .....	23
Preglednica 8: Sestava produkcijskega gojišča ABPM8.....	23
Preglednica 9: Sestava tekočega gojišča TSB.....	24
Preglednica 10: Sestava trdnega gojišča ABA .....	24
Preglednica 11: TAE pufer.....	24
Preglednica 12: 0,5 M založna raztopina EDTA.....	25
Preglednica 13: 10x elektroforezni pufer za SDS-PAGE .....	25
Preglednica 14: 10x založna raztopina za prenašalni pufer.....	25
Preglednica 15: 10x Tris s soljo (TBS) .....	25
Preglednica 16: 0,5 M založna raztopina za fosfatni pufer .....	26
Preglednica 17: 100 mM založna raztopina fenilmetsulfonil flourid (PMSF) .....	26
Preglednica 18: Pufer za proteinske vzorce .....	26
Preglednica 19: Prenašalni pufer.....	26
Preglednica 20: 10x PBS.....	27
Preglednica 21: Raztopina za detekcijo proteinov na membranah.....	27
Preglednica 22: 1x TBS in 3 % mleko (TBSM).....	27
Preglednica 23: Založna raztopina 1 % DAB: .....	27
Preglednica 24: Raztopina za detekcijo HRP (hrenova peroksidaza) aktivnosti.....	28
Preglednica 25: Uporabljeni antibiotiki .....	29
Preglednica 26: Program PCR-reakcije za pomnožitev gena SACE-5599+HA-tag .....	33
Preglednica 27: Sestava mešanice za PCR reakcijo.....	33
Preglednica 28: Reakcijska zmes za rezanje plazmidne DNA z restriktijskimi endonukleazami pri preverjanju izoliranih plazmidov ( <b>a</b> ) in pri pripravi PCR produkta za ligacijo ( <b>b</b> ).....	34
Preglednica 29: Sestava mešanice za ligacijo inserta v plazmid pSet152+ermE* z in brez RBS....	35
Preglednica 30: Sestava mešanice za PCR na osnovi kolonije. ....	36
Preglednica 31: Program PCR reakcije za pomnožitev zapisov SACE_5599-HA v kombinaciji z različnimi promotorji (začetni oligonukleotidi promotor_SACE_5599-F, ermE*-F, HA-tag-R in SACE_5599-R). .....	36

Preglednica 32: Sestavine za poliakriamidni gel; ločevalni in koncentracijski del (za pripravo enega gela).....	45
Preglednica 33: Povzetek rezultatov statistične analize podatkov. ....	56
Preglednica 34: Rezultati produkcije eritromicina v različnih sevih bakterije <i>S. erythraea</i> .....	58

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz življenjskega cikla <i>S. erythraea</i> (Angert, 2005).....	5
Slika 2: Shematski prikaz genske skupine za biosintezo eritromicina v genomu <i>S. erythraea</i> (Staunton in Weissman, 2001). .....	8
Slika 3: Biosintezna pot eritromicina se prične s sintezo poliketidne verige s proteini Debs1, Debs2 in Debs3 (ki jih kodirajo geni <i>eryAI</i> , <i>eryAII</i> in <i>eryAIII</i> ) (Lal in sod., 2000) .....	9
Slika 4: a) Shema ključnih metabolnih poti pri sintezi eritromicina A b) Biosinteza 6-Deb (Mirnov in sod., 2004).....	10
Slika 5: Osnovni vektor pSet152 (Kieser in sod., 2000) .....	20
Slika 6: DNA in proteinski elektroforezni standardi.....	29
Slika 7: Analiza produktov reakcije PCR za pomnožitev gena SACE_5599-HA na 0,8 % agaroznem gelu pri dveh različnih temperaturah. ....	47
Slika 8: Shematski prikaz plazmidov pSet152+ <i>ermE</i> */RBS+SACE_5599-HA in pSet152+ <i>ermE</i> *+SACE_5599-HA .....	49
Slika 9: Preverjanje vstavitve gena SACE_5599-HA v ekspresijski vektor pSet152+ <i>ermE</i> */RBS in pSet152+ <i>ermE</i> * na 0,8 % agaroznem gelu. ....	49
Slika 10: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje SACE_5599-HA. ....	50
Slika 11: Preverjanje uspešnosti vstavitve plazmida s PCR reakcijo na osnovi kolonije na 0,8 % agaroznem gelu. ....	51
Slika 12: Shematski prikaz dveh možnih načinov vstavitve plazmidov pSet152+ <i>ermE</i> *+SACE_5599-HA in pSet152+ <i>ermE</i> */RBS +SACE_5599-HA v kromosom bakterije <i>S. erythraea</i> . ....	53
Slika 13: Preverjanje mesta vstavitve konstrukta s PCR reakcijo na osnovi kolonije z <i>ermE</i> -F in HA-tag-R (vzorci ha1.1-1.15) na 0,8 % agaroznem gelu.....	54
Slika 14: Rezultati produkcije antibiotika eritromicina prikazani z grafikoni kvartilov in razpršenostjo podatkov.....	60
Slika 15: Preverjanje prenosa proteinov na nitrocelulozno membrano z barvanjem s Ponceau S... .	61
Slika 16: Detekcija SACE_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča TSB in ABPM8) na nitrocelulozni membrani.....	62
Slika 17: Detekcija SACE_5599-HA z metodo prenosa western (vzorec ha1.11 iz gojišča ABPM8, časovno vzorčenje) na nitrocelulozni membrani.....	62
Slika 18: Detekcija SACE_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča ABPM8) na nitrocelulozni membrani.....	63
Slika 19: Detekcija SACE_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha2 skupine iz gojišča ABPM8) na nitrocelulozni membrani.....	64

Slika 20: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča ABPM8) na razvitem filmu po kemiluminiscenčni reakciji. ..... 65

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica produkcije eritromicina v neodvisnih klonih *S. erythraea*

Priloga B: Preverjanje prisotnosti osamelcev s pravilom o označevanju osamelcev

Priloga C: Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

Priloga D: Analiza homogenosti varianc s testom Levene

Priloga E: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

Priloga F: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom Mann-Whitney in Bonferronijevo korelacijo

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%GC	odstotek gvanozina in citozina v DNA
2TY	gojišče za kultivacijo <i>E. coli</i> (ang. triptone yeast extract media)
6-DEB	6-deoksieritronolid B
Ab	protitelo
ABA	trdno gojišče
ACP	proteinski prenašalec acilne skupine
ak	aminokislina
ang.	angleško
Apr	antibiotik apramicin
APS	amonijev persulfat
AT	aciltransferaza
ATP	adenin trifosfat
bp	bazni par
C	citozin
CCK	cikel citronske kisline - Krebsov cikel
Cm	antibiotik kloramfenikol
ABSM4	trdno sporulacijsko gojišče
CoA	koencim A
CS	citrat sintetaza
CSL	koruzna namakalna vodica
DAB	3,3'-diaminobenzidine
Debs	6-deoksieritromicin-D sintaza
DH	dehidrataza
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
ER	enoil reduktaza
Er-A	eritromicin A
Er-B	eritromicin B
Er-C	eritromicin C
ABPM8	tekoče produkcijsko gojišče za <i>S. erythraea</i>

ABVM1	tekoče vegetativno gojišče za <i>S. erythraea</i>
G	gvanozin
g	gravitacijski pospešek
GDP	gvanozin-difosfat
GTP	gvanozin-trifosfat
HRP	hrenova peroksidaza
HTH	funkcionalna domena proteina (ang. Helix-turn-helix)
IQR	medkvartilno območje (ang. interquartile range)
kDa	kilo dalton
Kn	antibiotik kanamicin
KR	$\beta$ -keto reduktaza
KS	ketosintaza
LAL	družina regulatornih proteinov (ang. large ATP-binding regulators of the LuxR family)
LD	začetni del modula, ki ga sestavlja AT in ACP
LTTR	družina regulatornih proteinov (ang. LysR-type transcriptional regulators; LTTR)
Mbp	mega bazni par
MCM	metilmalonil-CoA mutaza
MeOH	metanol
mM	ili molarno
MMT	metilmalonil-CoA transkarboksilaza
MS	masna spektrometrija
Nal. K.	antibiotik nalidinska kislina
OAA	oksalacetna kislina
obr./min	obrati na minuto
OVP	visokoprodukcijski sev bakterije (ang. overproducer)
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffered saline)
PCC	propionil-CoA karboksilaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PEP	fosfoenol piruvat
PFK	fosfofruktokinaza
PKS	poliketid sintaza

PMSF	fenilmetilsufonil flourid
PMV	parcialni micelijski volumen
ppGpp	gvanozin tetrafosfat
Q1	prvi kvartil
Q2	mediana/srednja vrednost oziroma drugi kvartil
Q3	tretji kvartil
RBS	vezavno mesto za ribosom (ang. ribosome bidding site)
S-C	vez med žveplom in ogljikom
SARP	družina regulatornih proteinov v aktinomicetah (ang. Streptomyces antibiotic regulatory protein)
SDS	natrijevega dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
SM	trdno gojišče za konjugante (soja manitol)
TAE	tris acetatni pufer z EDTA
TBS	tris s soljo
TBSM	raztopina TBS z mlekom
TEMED	tetrametiletilendiamin
TTA	redek kodon v aktinomicetah
TE	tioesteraza
Tm	talilna temperatura DNA
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
TSB	tekoče gojišče
UUU	specifični levcinski kodon
WT	divji sev bakterije (ang. wild type)

### GENETSKI KOD IN OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

	T			C			A			G		
T	TTT	Phe	F	TCT	Ser	S	TAT	Tyr	Y	TGT	Cys	C
	TTC	Phe	F	TCC	Ser	S	TAC	Tyr	Y	TGC	Cys	C
	TTA	Leu	L	TCA	Ser	S	TAA	stop		TGA	stop	
	TTG	Leu	L	TCG	Ser	S	TAG	stop		TGG	Trp	W
C	CTT	Leu	L	CCT	Pro	P	CAT	His	H	CGT	Arg	R
	CTC	Leu	L	CCC	Pro	P	CAC	His	H	CGC	Arg	R
	CTA	Leu	L	CCA	Pro	P	CAA	Gln	Q	CGA	Arg	R
	CTG	Leu	L	CCG	Pro	P	CAG	Gln	Q	CGG	Arg	R
A	ATT	Ile	I	ACT	Thr	T	AAT	Asn	N	AGT	Ser	S
	ATC	Ile	I	ACC	Thr	T	AAC	Asn	N	AGC	Ser	S
	ATA	Ile	I	ACA	Thr	T	AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
	ATG	Met	M	ACG	Thr	T	AAG	Lys	K	AGG	Arg	R
G	GTT	Val	V	GCT	Ala	A	GAT	Asp	D	GGT	Gly	G
	GTC	Val	V	GCC	Ala	A	GAC	Asp	D	GGC	Gly	G
	CTA	Val	V	GCA	Ala	A	GAA	Glu	E	GGA	Gly	G
	GTG	Val	V	GCG	Ala	A	GAG	Glu	E	GGG	Gly	G

A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asp	aspartat
E	Glu	glutamat
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin

## SLOVARČEK

Aktinomicete - Bakterije, ki spadajo v deblo Actinobacteria.

Genska skupina - Set dveh ali več genov, ki služijo za kodiranje enakih ali podobnih produktov.

Hemaglutinininski epitop (HA-tag) - HA-tag izhaja iz hemaglutinina človeške gripe, ki je površinski glikoprotein potreben za infektivnost virusa. HA-tag je dolg 9 ak in se uporablja kot epitop za označevanje proteinov.

Homologni geni - Vsi geni, ki so podobni po zgradbi, delovanju in izvoru.

Izoelektrična točka - Neto naboj aminokisline je odvisen od pH-ja topila in od stranske verige aminokisline. Pri določenem pH-ju je vrednost neto naboja nič - to vrednost imenujemo izoelektrična točka.

Oligonukleotidi začetniki - Kratke nukleinske kisline, ki služijo za začetek podvojevanja pri verižni reakciji s polimerazo.

Poliketidi - Sekundarni metaboliti bakterij, gliv, rastlin in živali, ki nastanejo s polimerizacijo prekurzorjev enostavnih karbokslinih kislin.

Poliketid sintaze (PKS) - Encimski kompleksi na katerih se sintetizirajo poliketidi.

Prekurzor - Izhodna spojina. Molekula, ki se uporablja pri biosintezi kompleksnejših molekul.

Promotor - Nukleotidno zaporedje, ki se nahaja na 5' koncu gena in regulira njegovo izražanje.

Sekundarni metabolit - Biokemijski produkti mikroorganizmov, ki nimajo neposrednega vpliva na rast in razmnoževanje celic.

Sekvenciranje - Tehnika, s katero določimo nukleotidno zaporedje nukleinske kisline.

Transformacija - Pojem transformacija se uporablja za opis brezvirusnega prenosa DNA v bakterijo ali v neživalske evkariontske celice.

## 1 UVOD

Eritromicin je makrolidni antibiotik širokega spektra. Je produkt sekundarnega metabolizma nitaste talne bakterije *Saccharopolyspora erythraea*. Biosinteza eritromicina je dobro poznana in natančno opisana. Pri biosintezi sodelujejo veliki kompleksi večdomenskih encimov - modularne poliketid sintaze tipa I (PKS tipa I) in serija »post-PKS« reakcij, ki jih katalizirajo specifični encimi. Tako kot pri večini naravnih spojin so PKS in »post-PKS« geni za biosintezo eritromicina v genomu *S. erythraea* skupaj, v t. i. genski skupini (Staunton in Weissman, 2001; Weber in sod., 2003). Zanimivo pri tem je, da ta genska skupina nima specifičnih regulatornih genov, kljub temu pa je transkripcija te genske skupine tekom biosinteze usklajena in natančno regulirana (Lum in sod., 2004). Zato bi bilo zanimivo odkriti potencialne regulatorne gene, ki bi lahko vplivali na donos tega dragocenega antibiotika, in tako bolje razumeti slabo poznano ragulacijo biosinteze eritromicina.

Visoko donosni sevi, ki se uporabljajo v industriji, so produkt dolgoletne selekcije sevov, v katere so vnašali mutacije s pomočjo mutageneze s kemijskimi in fizikalnimi postopki. Te metode so se izkazale za zelo uspešne, saj je pri nekaterih mikroorganizmih prišlo tudi do več stokratnega povečanja donosa ciljnega metabolita glede na izhodni sev. Žal pa na ta način pridobljeni sevi ne omogočajo vpogleda v regulatorne in metabolne mehanizme, ki omogočajo tako povečane donose metabolitov. Zaradi tega so raziskovalci Acies Bio, Biotehniške fakultete in Instituta Jožef Stefan s primerjalnim proteomskim pristopom identificirali proteine, pri katerih je raven sinteze v visoko donosnem industrijskem sevu *S. erythraea* bistveno višja kot v naravnem sevu *S. erythraea* NRRL23338. Na ta način se je odkrilo določene kandidate, katerih vpliv na produkcijo bi bilo smiselno preizkusiti.

En takšnih je gen SACE\_5599, ki kodira relativno majhen protein (21,47 kDa) z visoko izoelektrično točko. Pregled njegovih homologov pri sorodnih aktinomicetah nam pokaže sliko relativno slabo raziskane skupine proteinov, katerih edina skupna lastnost je domnevna regulatorna vloga v svojih genskih skupinah in relativno visoka izoelektrična točka. Iz tega smo lahko sklepali, da imamo mogoče opravka s potencialnim regulatorjem, ki za razliko od homologov ni znotraj genske skupine, ki jo regulira. Po temu sodeč je SACE\_5599 zanimiv kandidat za laboratorijski eksperiment. Osnovno vprašanje eksperimenta je, ali je čezmerno izražanje tega gena in posledično sinteza proteina vzročno-posledično povezano z donosom eritromicina v laboratorijskem merilu.

Eksperiment je vključeval pripravo plazmidov z genom SACE\_5599, kateremu smo dodali še zapis za hemaglutininiski epitop-HA na karboksiterminalnem delu proteina, da smo lahko detektirali protein s prenosom western. Plazmid je vseboval močan konstitutiven promotor *ermE*\*. Pri eksperimentu smo nato s pomočjo konjugacije prenesli plazmid v sev *S. erythraea* NRRL23338, preverili način vstavitve v kromosom ter opravili analizo produkcije eritromicina v laboratorijskem merilu in detekcijo čezmerne sinteze proteina s prenosom western.

### 1.1 NAMEN DELA

S primerjalno proteomsko analizo naravnega seva *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338 (WT) in industrijskega visokodonosnega seva so identificirali predvideni regulatorni protein, ki ima v industrijskem sevu *S. erythraea* bistveno višjo raven sinteze kot v naravnem sevu (divjem tipu - WT). Namen magistrskega dela je ugotoviti, ali ima raven izražanja tega gena in posledično sitentiziranja proteina vpliv na donos eritromicina.

Cilj dela je čezmerno izraziti gen SACE\_5599 v WT sevu *S. erythraea*. Poleg tega je cilj na karboksiterminalnem delu proteina dodati t. i. hemaglutininiski epitop (HA-tag), ki bo omogočal specifično detekcijo čezmerno sintetiziranega proteina v proteinskih ekstraktih s prenosom western. Končni cilj je ugotoviti, ali čezmerno izražanje tega gena vpliva na donos eritromicina v laboratorijskem merilu in tako dobiti boljši vpogled v regulacijo biosinteze eritromicina.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Z načrtovanim postopkom bomo v *S. erythraea* uspeli čezmerno izraziti gen za domnevno regulatorni protein SACE\_5599.

Sintetiziran protein, produkt čezmerne izražanja gena SACE\_5599, bomo v proteinskih ekstraktih uspeli detektirati s prenosom western.

Čezmerno izražanje gena SACE\_5599 v naravnem sevu *S. erythraea* vpliva na donos eritromicina v laboratorijskem merilu.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 AKTINOMICETE

Aktinomicete (bakterijsko deblo Actinobacteria) so velika skupina filogenetsko povezanih, nitastih, aerobnih, gram-pozitivnih bakterij. Večinoma živijo v tleh in sodelujejo pri razgradnji in reciklaži organskih snovi. Ena glavnih morfoloških značilnosti je rast v obliki razvejane mreže 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  širokih filamentov, ki tvorijo micelij. Kljub temu da je manjših dimenzij, je podoben miceliju, ki ga tvorijo glice. Večina aktinomicet tvori spore. Ravno morfološke lastnosti in proces nastanka spor se velikokrat uporablja za klasifikacijo v raznolike podskupine. Taksonomija debla Actinobacteria je kompleksna. Vsebuje 5 redov, 13 podredov, 48 družin in 219 rodov (Zhi in sod., 2009). Za to raznoliko skupino bakterij so značilne visoka vsebnost gvanina (G) in citozina (C) v genomih in kompleksne morfološke, fiziološke in metabolne lastnosti, ki jim omogočajo, da uspevajo v zelo različnih okoljih. Zaradi pestrega sekundarnega metabolizma so zelo zanimive v medicini, saj so proizvajalci velikega števila bioaktivnih učinkovin, nekatere vrste pa so tudi patogene. Pomemben mejnik v raziskovanju aktinomicet in tudi širše v sodobni medicini je bilo odkritje streptomicina v kulturi *Streptomyces griseus*. Izolirani antibiotik so prvič preizkusili leta 1947 in ugotovili, da zavira rast bakterij, ki povzročajo tuberkulozo. To je spodbudilo intenzivno preučevanje rodu *Streptomyces* in sorodnih mikroorganizmov v redu Actinomycetales ter vodilo do odkritja široke palete naravnih spojin s protibakterijskim (vankomicin, tetraciklini, eritromicin), protiglivnim (ampotericin), protirakastim (mitomicin), imunosupresivnim (rapamicin, FK506), insekticidnim in protiparazitskim (avermektin) delovanjem. Actinomycetales vključujejo tudi pomembne industrijske producente aminokislin (ak) in vitaminov (*Corynebacterium glutamicum*) ter katalizatorje širokega spektra organskih spojin (*Rhodococcus spp.*) (Madigan in sod., 2003; Nett in sod., 2009).

### 2.2 *Saccharopolyspora erythraea*

*Saccharopolyspora erythraea* je nitasta talna bakterija, ki se uporablja za produkcijo antibiotika eritromicina v farmacevtski industriji. Eritromicin je bil prvi makrolidni antibiotik, ki je dosegel klinično uporabo. *S. erythraea* je bila prvotno klasificirana kot *Streptomyces erythraeus*, kasneje pa je bila po kemotaksonomskih značilnostih uvrščena v rod *Saccharopolyspora*, ki je del družine *Pseudanardiaceae* (Lebeda, 1987). Kljub temu

je biologija *S. erythraea* zelo podobna biologiji streptomicet, kot sta npr. industrijsko pomembna vrsta *Streptomyces avermitilis* in modelni organizem *Streptomyces coelicolor* (Nett in sod., 2009).

Kraljestvo: Bacteria  
 Deblo: Actinobacteria  
 Razred: Actinobacteria  
 Podrazred: Actinobacteridae  
 Red: Actinomycetales  
 Podred: Pseudonocardineae  
 Družina: Pseudonocardiaceae  
 Rod: *Saccharopolyspora*  
 Vrsta: *Saccharopolyspora erythraea*  
 (Stackebrandt in Schumann, 2006)

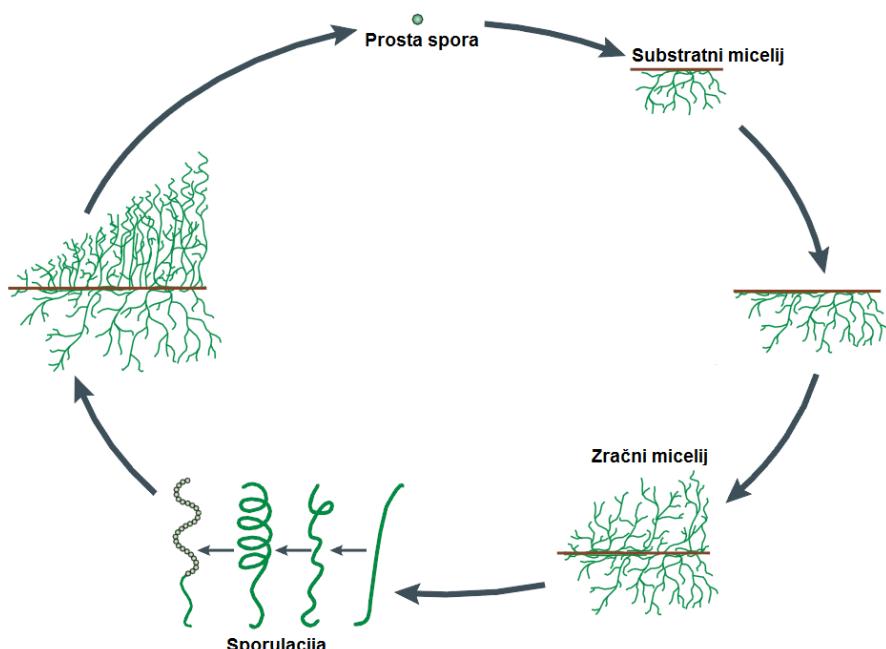
Komercialni pomen eritromicina je spodbudil intenziven razvoj visokodonosnih industrijskih sevov *S. erythraea* s povečano produkcijo tega antibiotika. Sprva so pri razvoju največ uporabljali klasične postopke, s katerimi so po več ciklih mutageneze in selekcije pridobili visokoprodukcijske mutante, ki se uporablja v industrijski proizvodnji eritromicina. Intenzivno so potekale tudi raziskave biosinteze eritromicina in genskega (metabolnega) inženiringa poti, ki bi lahko povečale produkcijo (Weber in sod., 2003) oziroma vodile do novih potencialno dragocenih makrolidnih analogov. V zadnjih letih nove možnosti za izboljševanje sevov *S. erythraea* omogoča tudi poznavanje genoma *S. erythraea* NRRL2338, ki je tudi javno dostopen (Oliynyk in sod., 2007).

### 2.2.1 Življenski cikel

Življenski cikel *S. erythraea* sestavlja izmenjujoče se faze rasti s tvorbo substratnega in zračnega micelija ter nastanka spor. Faze nastopajo v odvisnosti od rastnih pogojev v okolju. V ugodnih pogojih rastejo kolonije v večceličnih hifah, sestavljenih iz dolgih filamentov premera med 0,4 in 0,8 µm, ki tvorijo razvejan micelij (Angert, 2005; Yavari in Rafieenia, 2011). Optimalna rast poteka pri temperaturah od 28 do 38 °C in pH vrednostih med 6 in 8 (Yavari in Rafieenia, 2011).

Vegetativna rast se prične s procesom germinacije, kjer se iz posamezne spore razvijejo nove substratne hife in tvorijo substratni micelij. S pomočjo te strukture celice črpajo

potrebna hranila iz okolja. Ko v okolju začne primanjkovati hrani, se začnejo razvijati zračne hife in tvori se zračni micelij. S staranjem kolonij nastopi diferenciacija zračnih hif (segregacija protoplazme, tvorba prečne stene in delitev celic). Ta pojav se imenuje sporulacija in končni produkt so enojedrne spore, ki služijo za razmnoževanje. Ob ugodnih življenjskih pogojih se iz posamezne spore prične nov cikel (Angert, 2005).



Slika 1: Shematski prikaz življenjskega cikla *S. erythraea* (Angert, 2005)

### 2.2.2 Genom *S. erythraea*

Velik napredek v poznavanju biologije *S. erythraea* predstavlja pred nekaj leti dokončano sekvenciranje genoma (Oliynyk in sod., 2007). Genom *S. erythraea* NRRL2338 ima krožno topologijo, dolg je 8,2 mega baznih parov (Mbp), ima visoko vsebnost G+C (71,1 %), gostoto kodiranja 84,9 % in 7264 predvidenih kodirajočih sekvenc. Analiza sekvenc je razkrila določene razlike od genomov streptomicet. Na primer vsi do danes sekvencirani genomi streptomicet so linearni, genom *S. erythraea* pa ima krožno topologijo tako kot večina drugih aktinomicet (Oliynyk in sod., 2007).

Sekvenca genoma nakazuje na zelo pester sekundarni metabolizem z najmanj 27 genskimi skupinami, ki kodirajo biosintezo širokega razpona sekundarnih metabolitov. Velika večina teh spojin zaenkrat še nima poznane kemijske strukture. Izmed teh genskih skupin jih je pet (vključno z geni za biosintezo eritromicina - *ery*) lociranih v osrednji regiji genoma, ki ima najpomembnejše gene (Oliynyk in sod., 2007). Analiza profilov izražanja

DNA z mikromrežami je pokazala različno izražanje osrednje regije genoma in genov izven te regije med različnimi stopnjami rasti. Ugotovljeno je bilo, da je *ery* genska skupina in še šest drugih bolj izraženih v fazi A - hitri rasti prvih 32 ur (Peano in sod., 2007). Geni, ki kodirajo sistem poliketid sintaz za biosintezo eritromicina (*eryPKS*), so bili prvič sekvencirani v zgodnjih devetdesetih letih (Cortes in sod., 1990; Donadio in sod., 1991) in služijo kot modelni sistem za modularne poliketid sintaze tipa I (PKS tipa I) (Staunton in Weissman, 2001). Poleg *ery* genov ima *S. erythraea* tudi druge gene za modularne in iterativne PKS tipa I (PKS tipa I), dodatne modularne PKS (*pke*) z neznanimi funkcijami (Boakes in sod., 2004), ki so v drugih streptomicetah povezane z biosintezo alkenil furanonov (Banskota in sod., 2006), in domnevne PKS poti polinenasičenih maščobnih kislin. Zanimivo je, da v genomu *S. erythraea* ni genov za PKS tipa II, ki so tipični za streptomicete; identificirali pa so gene za PKS tipa III (THN sintaza), ki so povezani s produkcijo rdečega barvila, ki temelji na flaviolinu in daje *S. erythraea* razpoznaven rdeč odtenek (Nett in sod., 2009; Cortés in sod., 2002).

## 2.3 ERITROMICIN

Eritromicin je makrolidni antibiotik, ki ima na 12 členskem laktonskem obroču vezana sladkorja desozamin in mikarozo (Slika 3). Eritromicin je antibiotik širokega spektra. Njegova tarča je 50S podenota bakterijskega ribosoma, zato njegovo delovanje temelji na zaviranju sinteze beljakovin. Klinično se eritromicin in njegovi polysintezni derivati klaritromicin, azitromicin ter drugi pogosto uporabljam namesto penicilina pri pacientih, ki so alergični na penicilin in druge β-laktamske antibiotike (Madigan in sod., 2003). Eritromicin in klaritromicin imata dobro aktivnost tudi proti *Mycobacterium leprae* in *Mycobacterium avium* (Lal in sod., 2000). Eritromicin nastaja kot zmes več strukturno podobnih analogov. Najbolj aktivna in klinično najpomembnejša komponenta antibiotika je eritromicin A (Er-A), ki se uporablja tudi za sintezo drugih derivatov, kot so azitromicin, roksitromicin in klaritromicin. *S. erythraea* poleg Er-A proizvaja tudi strukturno sorodni spojini Er-B in Er-C (Zou in sod., 2010).

### 2.3.1 Poliketid sintaze (PKS) tipa I

Pri biosintezi eritromicina sodelujejo modularne PKS tipa I. To so veliki kompleksi večdomenskih encimov, v katerih so encimske domene razvrščene po modulih. Med

biosintezo se vsako aktivno mesto v posamezni domeni uporabi le enkrat, saj se nastajajoči poliketid premika od enega modula do drugega (Weber in sod., 2003).

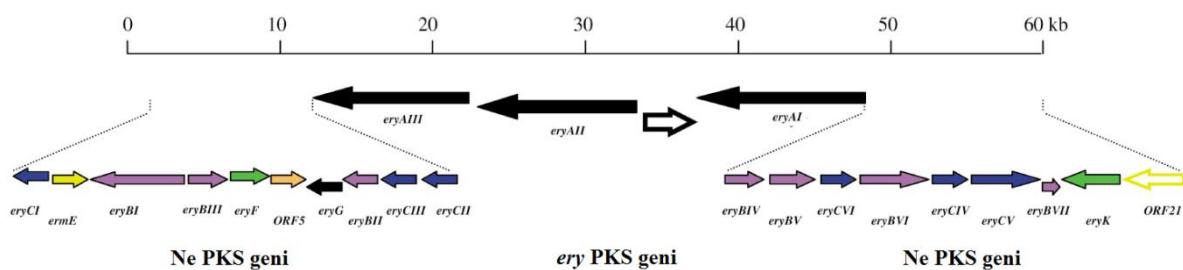
Mutiencimski kompleksi PKS katalizirajo kaskado dekarboksilacijskih kondenzacij med začetno in kratkimi podaljševalnimi enotami v obliki aktiviranih CoA-tioestrov (malonat, metilmalonat, etilmalonat in redkeje druge 2-substituirane malonske kisline). Biosinteza poliketidov je v osnovi podobna biosintezi maščobnih kislin. Razlikuje se v tem, da lahko PKS uporabijo različne začetne (acetat, propionat, butirat) in podaljševalne CoA enote ter da se tri reakcije redukcije nastajajoče verige ( $\beta$ -keto redukcija, dehidracija, enoilna redukcija) pri biosintezi maščobnih kislin izvedejo v vsaki stopnji podaljševanja, pri biosintezi poliketidov pa je stopnja redukcije odvisna od domen na določeni PKS. Pri biosintezi poliketidov podaljševanju verige sledijo še ciklizacija verige in naknadne modifikacije poliketidne strukture, t. i. »post-PKS« modifikacije (oksidacija, metilacija, glikozilacija) (Staunton in Weissman, 2001). Modularna narava PKS tipa I predstavlja zelo velik kombinatorni potencial za pridobivanje novih poliketidnih spojin (Lal in sod., 2000).

Domene, ki sestavljajo PKS tipa I, so ketosintazna (KS), aciltransferazna (AT), dehidratazna (DH), enoilreduktazna (ER), ketoreduktazna (KR) in proteinski prenašalec acilne skupine (ACP). Domene KS, AT in ACP so prisotne v vseh modulih in sodelujejo pri podaljševanju poliketidne verige. AT domena izbere tip aktivirane začetne ali podaljševalne enote (npr. propionil-CoA, malonil-CoA ali metilmalonil-CoA), ki se vključi v nastajajočo verigo. KS domena katalizira kondenzacijo, ACP domena pa najprej sprejme podaljševalno enoto od AT domene, veže rastočo poliketidno verigo in jo nato prenese do naslednjega modula. Za delovanje ACP je bistvena post-translacijska modifikacija aktivnega mesta s »fosfopanteteinsko roko«, ki nastajajočo verigo veže in podaja od enega do drugega encimskega modula.  $\beta$ -keto skupina, ki nastane, se nato procesira z reducijskimi domenami (ER, KR in DH), ki so prisotne v posameznem modulu. V odsotnosti reducijskih domen,  $\beta$ -keto skupina ostane nespremenjena, KR jo pretvori v  $\beta$ -hidroksi skupino, DH nadaljuje redukcijo do dvojne vezi in ER do enojne C-C vezi. Za vezavo prve enote (t.i. začetne enote) poliketidne verige je odgovoren začetek (LD), ki stoji pred prvim modulom in je sestavljen iz AT in ACP domene. Vezana začetna enota se prenese do KS domene prvega (odaljševalnega) modula, kjer se začne sinteza poliketidne verige. Na koncu zadnjega modula je tioesterazna domena (TE), ki sprosti molekulo iz

ACP domene in pogosto katalizira ciklizacijo verige v laktonski obroč (Lal in sod., 2000; Staunton in Weissman, 2001; Weber in sod., 2003).

### 2.3.2 Biosinteza eritromicina

Biosintezo eritromicina razdelimo v dve fazи. V prvi fazi PKS tipa I katalizirajo zaporedno kondenzacijo ene enote propionil-CoA in šestih enot metilmalonil-CoA. S ciklizacijo na koncu prve faze nastane molekula 6-deoksieritronolid B (6-Deb). V naslednji fazi se 6-Deb dodatno modificira s t. i post-PKS reakcijami, ki jih katalizirajo encimi, kot so regiospecifične hidroksilaze (EryF, EryK), epimeraza (EryB), desozaminil-N-dimetiltransferaza (EryC), O-metiltransferaza (EryG) in glikozil transferaze. Končni produkt je eritromicin A (Staunton in Wilkinson, 1997; Rawlings, 2001). Tako kot pri večini naravnih spojin se PKS in »post-PKS« geni za biosintezo eritromicina v genomu *S. erythraea* nahajajo skupaj, v t. i. genski skupini (Slika 2) (Staunton in Weissman, 2001).

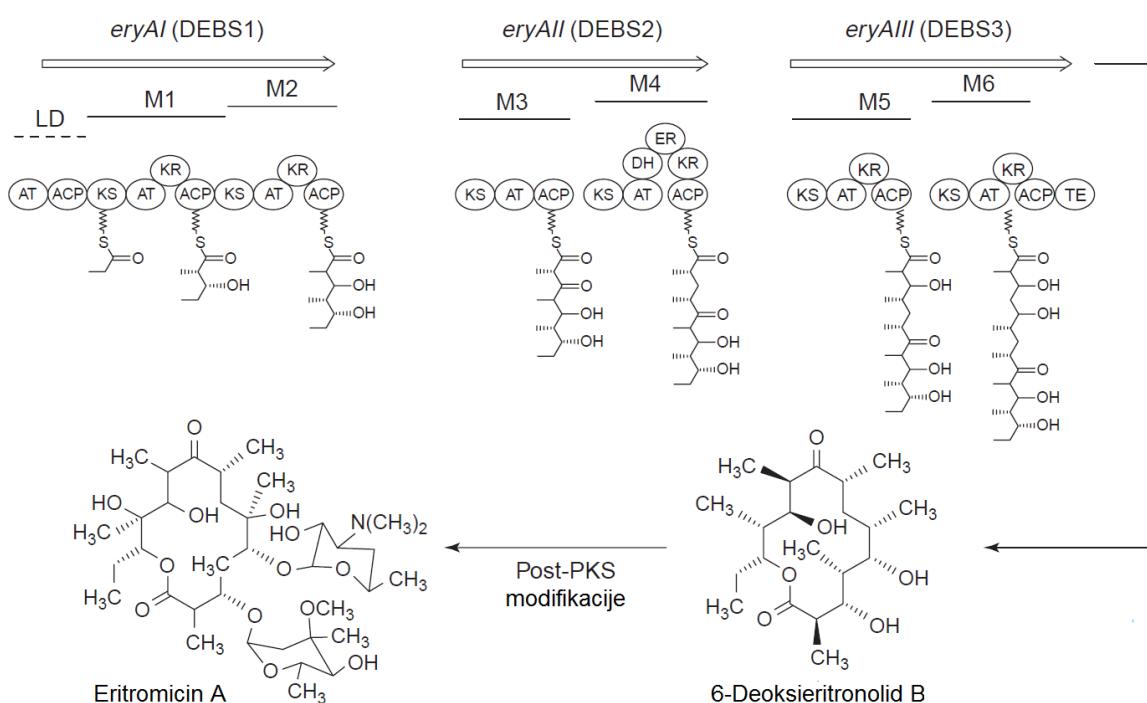


Slika 2: Shematski prikaz genske skupine za biosintezo eritromicina v genomu *S. erythraea* (Staunton in Weissman, 2001).

PKS tipa I za biosintezo eritromicina vsebuje tri velike multifunkcionalne proteine (vsak okoli 350 kDa): 6-deoksieritromicin-D sintaza 1 (Debs1), 2 (Debs2) in 3 (Debs3), ki jih kodirajo v istem vrstnem redu geni *eryAI*, *eryAII* in *eryAIII* (vsak velikosti okoli 10 kbp). Debs ima 3 module (začetnega in dva podaljševalna), Debs2 in Debs3 pa imata vsak po dva podaljševalna modula. Vsak od šestih podaljševalnih modulov katalizira dodajanje ene od podaljševalnih enot ter določa stopnjo redukcije in stereokemično konfiguracijo kiralnih centrov ob vsakem koraku podaljševanja poliketidne verige (Staunton in Weissman, 1997).

Biosinteza eritromicinske poliketidne verige se začne z začetnim modulom, ki naloži začetno enoto propionil-CoA. Ta enota se prenese na aktiven tiol (S-C vez) KS domene prvega podaljševalnega modula. Na istem modulu se na fosfopanteteinsko roko ACP domene naloži še enota metil malonata (iz molekule metilmalonil-CoA). Med naloženima enotama KS domena prvega podaljševalnega modula katalizira kondenzacijo, katere

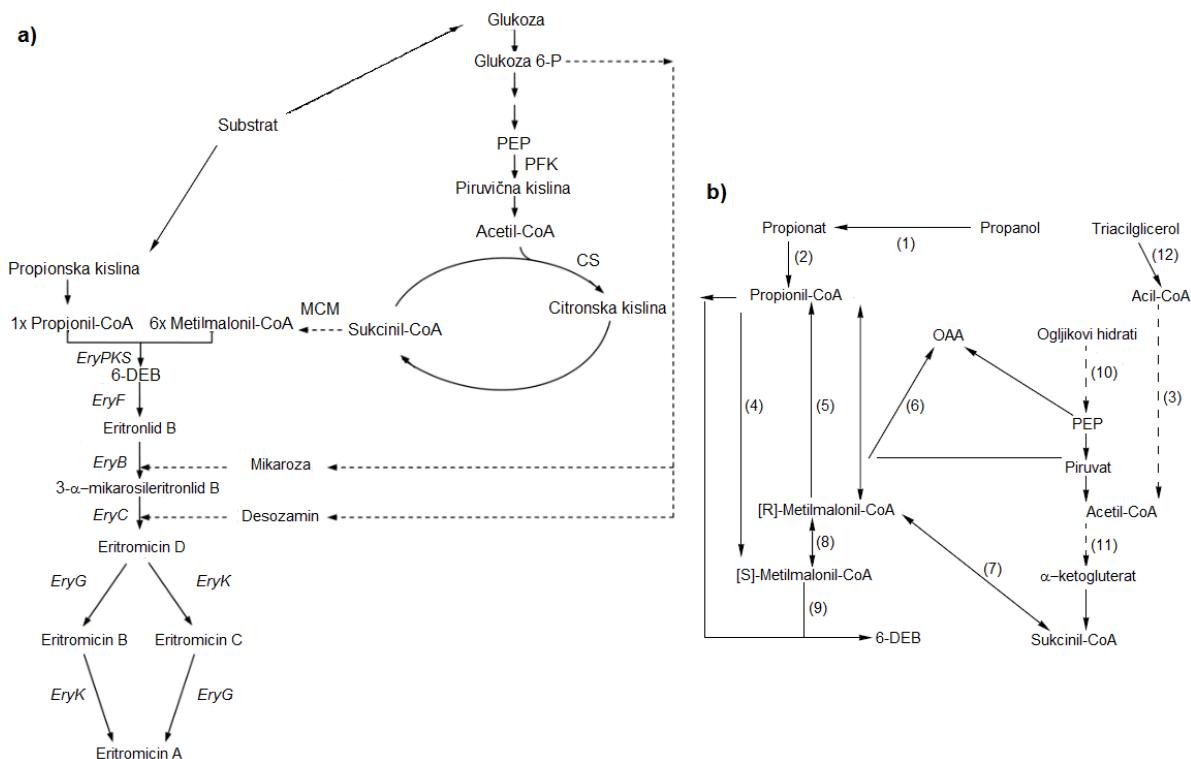
produkt je nov ketoester. Ta ketoester je nato podvržen še reducirajočim domenam. Dodajanje metilmalonil-CoA se nadaljuje od prvega do šestega modula in se zaključi kot heptaketidna veriga. Moduli 1, 2, 5 in 6 imajo le KR domeno, ki  $\beta$ -keto skupino reducira do hidroksi skupine, modul 4 ima domene KR, DH in ER, ki katalizirajo popolno redukcijo do enojne vezi; modul 3 pa je brez reducirajočih domen. Ciklizacija heptaketidnega intermediata (kjer se tvori 6-DEB) je katalizirana s TE domeno, ki je na karboksiterinalnem koncu proteina DEBS3 (Slika 3) (Lau in sod., 1999; Lal in sod., 2000; Rawlings, 2001).



Slika 3: Biosinteza pot eritromicina se prične s sintezo poliketidne verige s proteini Debs1, Debs2 in Debs3 (ki jih kodirajo geni *eryAI*, *eryAII* in *eryAIII*), ki sestavlja modularno poliketid sintazo 6-deoksieritronolida-B. Vsak od njih ima dva podaljševalna modula, vsak modul pa katalizira dodajanje ene molekule metilmalonil-CoA in reducira karbonilno skupino (Lal in sod., 2000)

Poleg PKS encimskega kompleksa je za učinkovito biosintezo eritromicinske poliketidne verige ključna tudi oskrba s prekurzorji, eno molekulo propionil-CoA in šestimi molekulami metilmalonil-CoA, ki se v celici tvorijo v metabolnih poteh primarnega metabolizma. Propionil-CoA lahko nastane po različnih poteh, kar je deloma odvisno tudi od substrata, ki se ga uporablja pri gojenju. Prva pot je preko glikolize in cikla citronske kisline (CCK); sukcinil-CoA (nastane iz  $\alpha$ -ketoglutarata) je podvržen izomerizaciji metilmalonil CoA mutaze (MCM), nastane metilmalonil-CoA in ta se lahko z metilmalonildekarboksilazo pretvori v propionil-CoA. Druga pot izhaja iz propanola, kjer

preko alkohol dehidrogenaze in propionat kinaze nastane propionil-CoA. Še ena pot pa gre preko triacilglicerola, kjer z lipolizo nastane acetil-CoA, ta vstopi v CCK, kjer preko  $\alpha$ -ketoglutarata in sukcinil-CoA pride do propionil-CoA. Metilmalonil-CoA lahko izvira iz dveh poti. Prva je izomerizacija sukcinil-CoA, ki jo katalizira MCM, druga pa je karboksilacija propionil-CoA, ki jo katalizira propionil-CoA karboksilaza (PCC) ali metilmalonil-CoA transkarboksilaza (MMT) (Mironov in sod., 2004; Li in sod., 2004).



Slika 4: **a)** Shema ključnih metabolnih poti pri sintezi eritromicina A; PFK - fosfofruktokinaza, CS - citrat sintetaza, MCM - metilmalonil CoA mutaza.; PEP - fosfoenolpiruvat **b)** Biosinteza 6-DeB: (1) alkohol dehidrogenaza; (2) propionat kinaza; (3)  $\beta$ -oksidacija maščobnih kislin; (4) propionil-CoA karboksilaza (PPC); (5) malonildekarboksilaza; (6) karboksiltransferaza; (7) mutaza; (8) epimeraza; (9) poliketid sintaza; (10) glikoliza; (11) Cikel citronske kisline; (12) lipoliza; OAA - oksaloacetna kislina (Mironov in sod., 2004).

## 2.4 REGULACIJA BIOSINTEZE SEKUNDARNIH METABOLITOV PRI AKTINOMICETAH

Mehanizmi regulacije biosinteze sekundarnih metabolitov so še vedno relativno slabo poznani. Gre za kompleksne sisteme, ki vključujejo številne signalne molekule in regulatorne proteine, ki se nanje odzivajo in s tem posredno ali neposredno vplivajo na izražanje različnih biosinteznih genov (Cundliffe, 2006). Biosinteza je regulirana preko

interakcij globalnih in pot-specifičnih regulatorjev, ki bodisi sprožijo ali zavirajo izražanje biosinteznih genov (Santos-Beneit in sod., 2009). Regulatorni proteini so iz različnih družin, nekatere od njih najdemo le pri aktinomicetah. Genske skupine za biosintezo poliketidov imajo običajno gene za pot-specifične regulatorne proteine, ki so transkripcijski aktivatorji in so tudi sami regulirani s strani pleiotropnih regulatornih proteinov ter različnih znotraj in zunajceličnih signalnih molekul. Biosintezo antibiotikov sprožijo različni fiziološki in okoljski dejavniki. Mednje sodijo pozitivni signali, kot so faza rasti,  $\gamma$ -butirolaktonske signalne molekule (Horinouchi in Beppu, 1994), neravnovesja v metabolizmu (Hood in sod., 1992) in različni fiziološki stresi (Hobbs in sod., 1992; Yang in sod., 1995), ter zaviralni signali, kot so metabolna represija in/ali inhibicija (enostavno dostopni viri dušika, fosfata in glukoze) (Demain in Fang, 1995; Martin, 2004). Biosinteza sekundarnih metabolitov pri aktinomicetah na trdnih gojiščih običajno nastopi okoli razvoja zračnega micelija. Pri gojenju v tekočih gojiščih pa običajno nastopi v stacionarni fazni rasti, kar je verjetno povezano s pomanjkanjem hranil (Bibb, 2005).

#### **2.4.1 Globalna (pleiotropna) regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov**

Globalni regulatorni proteini delujejo na višji ravni in lahko regulirajo produkcijo več sekundarnih metabolitov in tudi morfološko diferenciacijo ter se njihovi zapisi navadno nahajajo izven genskih skupin za biosintezo določenega sekundarnega metabolita. Dobro opredeljeni pleiotropni regulatorni proteini so kodirani z geni *bld*, *afs*, *abs* in *aba*. Te geni so pri številnih vrstah aktinomicet in njihovi produkti lahko regulirajo več procesov, tako v sekundarnem kot tudi v primarnem metabolizmu (Bibb, 2005).

##### **2.4.1.1 Geni *bld***

Geni *bld* so potrebni za razvoj zračnih hif in sporulacijo (Elliot in Talbot, 2004). Mutacije gena *bldA* izovejo značilen fenotip. Pri *S. coelicolor* je to odsotnost rdeče in modre pigmentacije ter nezmožnosti tvorbe zračnega micelija in sporulacije (Merrick, 1976). Gen *bldA* ima zapis za redek tRNA, ki prepoznavata specifični levcinski kodon UUA. TTA kodon je najbolj redek kodon v aktinomicetah in se pojavlja večinoma pri genih, ki so vpleteni v sekundarni metabolizem. To in kopiranje *bldA* tRNA v stacionarni fazni je privelo do hipoteze, da produkti homologov *bldA* regulirajo izražanje genov, ki imajo TTA kodon in so na ta način pleiotropni regulatorji sekundarnega metabolizma pri aktinomicetah (Leskiw in sod., 1993). Danes je vzrok značilnega fenotipa, ki ga opazimo

pri *bldA* mutantih mnogih aktinomicetnih vrst, dobro poznan. Gen, ki je odvisen od *bldA*, je pleiotropni regulatorni gen *adpA* (*bldH*). Gen *adpA* ima TTA kodon in je potreben za morfološko diferenciacijo (Nguyen in sod., 2003; Takano in sod., 2003). Od *bldA*, sta pri *S. coelicolor* odvisna tudi pot-specifična regulatorna gena, ki tudi imata TTA kodon in sta potrebna za izražanje genov za biosintezo pigmentov (White in Bibb, 1997). Chandra in Chater (2008) sta opravila bioinformacijsko analizo, ki je pokazala, da ima 109 izmed 143 genskih skupin za biosintezo sekundarnih metabolitov TTA kodone.

#### 2.4.1.2 Geni *afs*, *abs* in *aba*

Druge pomembne družine pleiotropnih regulatorjev so proteini, ki jih kodirajo geni *afs*, *abs* in *aba*. Geni *afs* pri *S. coelicolor* kodirajo AfsK-AfsR-AfsS sistem, ki v pogojih stradanja (npr. dušika, fosfata) globalno regulira biosintezo antibiotikov aktinorodin in udecilprodigiozin (Horinouchi, 2003). S fosforilacijo AfsR (pripada družini SARP regulatornih proteinov) se sproži izražanje AfsS proteina, ki deluje kot aktivator pot-specifičnih regulatorjev (Floriano in Bibb, 1996). Prekomerno izražanje *afsR* in *afsS* homologov je povišalo produkcijo sekundarnih metabolitov v številnih streptomictetah (Santos-Beneit in sod., 2011). Pri aktinomicetah je pogosto tudi dobro ohranjen pleiotropni regulator sekundarnega metabolizma AbsB. AbsB je endoribonukleaza, ki je potrebna za produkcijo antibiotikov pri *S. coelicolor* in ima vlogo v morfološki diferenciaciji in tvorbi sporulacijskih sept, običajno pa ni vpletena v biosintezne reakcije (Sello in Buttner, 2008). Še en globalni regulator kodira gen *abaA*. Prekinitev tega gena pogosto povzroči popolno prenehanje biosinteze oziroma zmanjšanje produkcije sekundarnih metabolitov ter negativno vpliva na sporulacijo (Fernandez-Moreno in sod., 1992).

#### 2.4.1.3 Vloga signalnih molekul pri globalni regulaciji

Velik pomen pri globalni regulaciji imajo tudi t. i. signalne molekule. Signalni nukleotid gvanozin tetrafosfat ppGpp se kopiči v pogojih stradanja in je pomemben faktor pri odzivu na pomanjkanje hranil (Riesenberd in sod., 1984). Študije na *Escherichia coli* so potrdile vlogo ppGpp kot globalnega regulatorja transkripcije genov v pogojih celičnega stradanja. ppGpp deluje preko regulacije RNA polimeraze in posredno preko regulacije sigma faktorjev RNA polimeraze (Potrykus in Cashel, 2008). Pri aktinomicetah je koncentracija ppGpp uravnavana z bifunkcionalnim encimom RelA/SpoT (Martinez-Costa in sod., 1998). Spo-Rel sintetaze-hidrolaze tvorijo pppGpp in ppGpp, lahko pa tudi hidrolizirajo

nukleotide do GDP in pirofosfata ali GTP in pirofosfata (Dalebroux in Swanson; 2012). S tem encimom se bakterije hitro odzivajo na spremembe v okolju, tako da sintetizirajo ali razgrajujejo ppGpp (Potrykus in Cashel, 2008). Pri aktinomicetah so potrdili globalno regulatorno vlogo ppGpp pri *S. coelicolor*, ker so z indukcijo sinteze ppGpp opazili vpliv na izražanje mnogih genov, med katerimi so bili tudi geni za sintezo antibiotikov (Hesketh in sod., 2007). Nujnost ppGpp za izražanje genov sekundarnega metabolizma so potrdili tudi pri *Streptomyces antibioticus* in *S. griseus*, kjer je bil gen *relA*, ki kodira ppGpp, nujen za sintezo aktinomicina in streptomicina (Hoyt in Jones, 1999; Ochi, 1987).

ppGpp ima vlogo pri regulaciji produkcije sekundarnih metabolitov v pogojih omejitve rasti z dušikom, a je pogrešljiv v pogojih, kjer je omejujoč faktor fosfat (Chakraburty in Bibb, 1997). Vloga fosfata pri produkciji antibiotikov je znana. Prekomerna raven anorganskega fosfata v gojiščih namreč preprečuje nastajanje številnih strukturno različnih sekundarnih metabolitov in vsaj v nekaterih primerih je to posledica represije transkripcije ustreznih genskih skupin (Bibb, 2005). Pri tem mehanizmu ima pomembno vlogo dvokomponentni sistem PhoR-PhoP, ki regulira izražanje genov za alkalno fosfatazo (npr. *phoA*). V *Streptomyces lividans* se ekspresija *phoA* inducira s fosforilacijo PhoP, zato mutanti brez *phoP* (ali genske skupine za *phoR-phoP*) ne morejo sintetizirati PhoA. Ti mutanti zato lahko proizvajajo velike količine aktinorodina in undecilprodigiozina (Sola-Landa in sod., 2003; Apel in sod., 2007).

Druga skupina signalnih molekul, ki sodelujejo pri regulaciji transkripcije pri aktinomicetah so  $\gamma$ -butirolaktoni.  $\gamma$ -butirolaktone proizvajajo mnoge aktinomicete, pri številnih vrstah pa sinteza  $\gamma$ -butirolaktonov tudi sovpada z začetkom sekundarnega metabolizma.  $\gamma$ -butirolaktoni se vežejo na citoplazemske receptorske proteine, kar sproži regulatorno kaskado, ki se velikokrat konča z aktivacijo pot-specifičnih regulatorjev v genskih skupinah za biosintezo (Bibb, 2005; Martin in Liras, 2010). Najbolje opredeljen  $\gamma$ -butirolakton je A-faktor iz *S. griseus*. Njegova posebnost je, da s sprožitvijo kaskade adpA regulona sodeluje tako pri začetku sekundarnega metabolizma kot tudi pri morfološki diferenciaciji (Kato in sod., 2004). Večina ostalih poznanih  $\gamma$ -butirolaktonov regulira predvsem sekundarni metabolizem in niso potrebni za morfološko diferenciacijo. Večina  $\gamma$ -butirolakton-vezavnih proteinov ima vlogo represorjev transkripcije tarčnih genov, obstajajo pa tudi taki s pozitivno vlogo regulacije. Producija  $\gamma$ -butirolaktonov je najpogosteje odziv na določen fiziološki signal (pomanjkanje hrani), njihova vloga pa je v

večini primerov koordiniranje sekundarnega metabolizma (Bibb, 2005; Martin in Liras, 2010).

### 2.4.2 Pot-specifična regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov

Zadnji člen v regulatorni kaskadi so največkrat pot-specifični regulatorji, katerih zapisи so skoraj vedno, z redkimi izjemami, prisotni v genskih skupinah za biosintezo sekundarnih metabolitov. Ti regulatorni proteini pogosto regulirajo izražanje več genov v genski skupini, v določenih primerih pa aktivirajo izražanje celotne genske skupine (Bibb, 2005; Cundliffe, 2006). Pri genski skupini za biosintezo streptomicina regulatorni protein StrR na primer regulira transkripcijo 25 *str-sts* biosinteznih genov z aktivacijo samo osmih promotorjev (Tomono in sod., 2005).

Posebej dobro preučen primer pot specifične regulacije biosinteze poliketida je biosinteza antibiotika tilozina. Genska skupina za biosintezo tilozina pri *Streptomyces fradiae* ima zapise za pet regulatornih proteinov, ki tvorijo kompleksno regulatorno mrežo. Med njima sta dva  $\gamma$ -butirolakton-vezavna proteina TylP in TylQ, dva transkripcijska regulatorja iz družine SARP, TylT in TylS, ter aktivator biosinteze tilozina - TylR. Ob vezavi  $\gamma$ -butirolaktona pride do prenehanja represije transkripcije *tylS*, kar omogoči izražanje ostalih regulatornih genov (*tylR*) in s tem aktivacijo biosinteze tilozina (Stratigopoulos in sod., 2004).

#### 2.4.2.1 Regulatorni proteini družine SARP

Ena večjih skupin pot-specifičnih regulatornih proteinov, ki kontrolira izražanje PKS sistemov pri aktinomicetah, je družina SARP (ang. *Streptomyces* antibiotic regulatory protein). To so proteini, ki imajo tri glavne funkcionalne domene, in sicer N-terminalno HTH (ang. Helix-turn-helix) DNA vezavno regijo, osrednjo ATP-azno domeno in C-terminalno TPR domeno s tetratrikopeptidnimi ponovitvami (Tanaka in sod., 2007). Zapise za SARP regulatorje so identificirali v genskih skupinah za različne sekundarne metabolite, kot so poliketidi tipa I, aromatski poliketidi, ribosomske in neribosomalne sintetizirane peptide,  $\beta$ -laktami, undecilprodiginini in azoksi spojinami (Bibb, 2005; Martin in Liras, 2010). Predlagan mehanizem delovanja SARP proteinov vključuje vezavo dveh monomerov SARP proteina na DNA. Po vezavi monomera tvorita dimer in omogočita vezavo RNA polimeraze na promotor (Tanaka in sod., 2007).

#### 2.4.2.2 Regulatorni proteini družine LAL

Genske skupine PKS tipa I imajo pogosto enega ali več SARP regulatornih genov, pogosto pa imajo tudi regulatorne gene iz družine LAL (ang. large ATP-binding regulators of the LuxR family) (Bibb, 2005). LAL so relativno veliki proteini (872-1159 ak), ki imajo N-terminalno ATP/GTP vezavno domeno, za katero je značilen Walkerjev motiv (Walker in sod., 1982) in C-terminalni LuxR-podobni HTH DNA vezavni motiv (Henikoff in sod., 1990). Identificirani so bili v nekaterih genskih skupinah za biosintezo, kot so nitastatin pri *Streptomyces noursei* (NysRI, NysRIII) (Brautaset in sod., 2000), rapamicin pri *Streptomyces hygroscopicus* (RapH) (Kuščer in sod., 2007) in FK506 pri *Streptomyces tsukubaensis* (Goranovič in sod., 2012). Našteti regulatorji imajo primarno pot-specifično vlogo, vendar pa imajo morda tudi dodatno regulatorno vlogo na višji ravni, kot je pokazala študija pri LAL mutantih *S. coelicolor*, kjer je imel en od LAL regulatorjev vlogo pri pleiotropni regulaciji (Guerra in sod., 2012).

#### 2.4.2.3 Regulatorni proteini družine LTTR

Pogosta skupina pot-specifičnih regulatorjev, ki se nahaja v genskih skupinah za biosintezo sekundarnih metabolitov pri aktinomicetah, so tudi transkripcijski regulatorji tipa LysR (ang. LysR-type transcriptional regulators; LTTR). LTTR so največja in najbolj razširjena družina transkripcijskih regulatorjev pri prokariontih (Maddock in Oyston, 2008; Knapp in Hu, 2010). Uravnavajo širok spekter bioloških procesov od produkcije sekundarnih metabolitov, metabolizma dušika, odzivov na stres, produkcije toksinov do zaznavanja celične gostote in celični cikel (Knapp in Hu, 2010). LTTR so sestavljeni iz okoli 310-325 ak, tvorijo oligomere, imajo ohranljeno N-terminalno HTH DNA-vezavno domeno in manj ohranljeno C-terminalno domeno, ki sodeluje pri vezavi signalnih molekul (Maddock in Oyston, 2008). Primera pomembnih homologov LTTR v genskih skupinah pri aktinomicetah sta *claR* pri *Streptomyces clavuligerus* za biosintezo klavulanske kisline (Perez-Redondo in sod., 1998) in *fkbR* pri *S. tsukubaensis* za biosintezo FK506 (Goranovič in sod., 2012).

### 2.5 REGULACIJA SINTEZE ERITROMICINA

Posebnost genske skupine za biosintezo eritromicina v *S. erythraea* je, da nima specifičnega regulatornega gena. Odsotnost regulatornih genov v genski skupini bistveno oteže razumevanje regulacije biosinteze eritromicina in ovira prizadevanja za

povečevanje učinkovitosti njegove proizvodnje. Odkritje in poznavanje udeleženih regulatornih genov bi bilo zelo pomembno, saj bi lahko njihovo čezmerno izražanje povišalo donos tega industrijsko pomembnega antibiotika (Chng in sod., 2008). Dober primer je čezmerno izražanje *sanG*, ki kodira transkripcijski regulator v genski skupini za biosintezo nikomicina pri bakteriji *Streptomyces ansochromogenes*, saj bistveno poviša donos tega antibiotika (Liu in sod., 2005).

### 2.5.1 BldD

Kljub odsotnosti regulatornega gena v genski skupini za eritromicin so ugotovili, da je transkripcija usklajena in natančno uravnana. Transkriptomska analiza z DNA mikromrežami je na primer pokazala različno raven transkripcije med divjim tipom (WT) *S.erythraea* in z mutegenezo in selekcijo izboljšanem visokoprodukcijskem sevom (OVP). Pri OVP je bilo izražanje celotne biosintezne genske skupine za eritromicin (*ery*) za nekaj dni daljše kot pri WT (Lum in sod., 2004). Spremenjeno in usklajeno izražanje skoraj vseh *ery* genov je bilo trdna indikacija za obstoj skupnega regulatorja za *ery*. Za identifikacijo takega regulatornega proteina, je skupina Chng in sod. (2008) primerjala lizate WT in OVP ter na njih izvedla analize vezave proteinov na DNA, tekočinske in afinitetne kromatografije, analize masne spektrometrije (MALDI-MS) in *de novo* sekvenciranje. Identificirali so 18 kDa velik protein ortolog BldD. BldD je en od ključnih regulatorjev tvorbe zračnega micelija in produkcije antibiotikov pri *S. coelicolor*. Nima sicer direktnega vpliva na genske skupine za biosintezo antibiotikov in do svojih identificiranih tarč deluje represivno (Elliot in sod., 1998; Eliot in sod., 2001; Kelemen in sod. 2001).

Genska skupina *ery* je znotraj osrednje regije kromosoma *S. erythraea*, ki kodira osrednje gene (Oliynyk in sod., 2007), gen *bldD* pa je blizu roba glavne regije, približno 1,5 Mbp od *ery* skupine. Velika oddaljenost gena *bldD* in *ery* genske skupine v kromosому torej predstavlja poseben primer regulacije, saj so regulatorni geni biosinteznih skupin antibiotikov običajno znotraj same genske skupine (Chng in sod., 2008).

V nadaljevanju je skupina Chng in sod. (2008) preučevala vezavna mesta proteina. Pripravila rekombinantni protein BldD iz *S. erythraea* in določila pet regij v genski skupini za eritromicin, ki so vsebovale promotorska mesta. Potrdila vezavo BldD na vseh pet regij, kot tudi na svoj lastni promotor. Na svoj lastni promotor se BldD veže celo z večjo afiniteto kot na promotorska mesta v genski skupini za eritromicin. Z delecijo *bldD* v *S.*

*erythraea* se je donos eritromicina v tekoči kulturi zmanjšal sedemkrat, na trdi podlagi pa se celice niso mogle diferencirati. Poleg tega je imel OVP med biosintezo eritromicina višjo raven sinteze BldD kot WT. Skupaj ti rezultati kažejo, da BldD hkrati regulira biosintezo eritromicina in morfološko diferenciacijo *S. erythraea*. Geni v genski skupini za eritromicin so tudi prve identificirane direktnne tarče ortologa BldD, ki so pozitivno regulirane (Chng in sod., 2008).

### 2.5.2 Homologi LmbU - domnevni regulatorji

Raziskovalci Acies Bio, Biotehniške fakultete in Instituta Jožefa Stefan so s primerjalnim proteomskim pristopom identificirali proteine, ki so v visokoproduktivnem industrijskem sevu *S. erythraea* bistveno bolj izraženi kot v naravnem sevu *S. erythraea* NRRL23338. En od teh je tudi protein SACE\_5599 (YP\_001107710), homolog regulatorja, ki ga kodira gena *lmbU* (Peschke in sod., 1995; Oliynyk in sod., 2007).

Doslej opisani homologi so omejeni na aktinomicete iz dužine Pseudonocardiaceae in rodu *Streptomyces*. Mehanizem njihovega delovanja ni poznan, v bazah podatkov pa so večinoma označeni kot hipotetični regulatorni proteini. Prvi homolog (60 % identičnost s SACE\_5599), ki so mu določili funkcijo, je kodiran z genom *lmbU* iz bakterije *Streptomyces lincolnensis*, ki proizvaja kemoterapevtsko učinkovino linkomicin. Gen *lmbU* ima redek kodon TTA in je del genske skupine, ki je odgovorna za sintezo linkomicina. Na podlagi tega so mu določili hipotetično regulatorno vlogo (Peschke in sod., 1995).

*lmbU* je podoben tudi genom *novE* (iz *Streptomyces sphaeroides*; 51 % identičnost), *cloE* (iz *Streptomyces roseochromogenes*; 52 % identičnost) in *hmtD* (iz *Streptomyces himastatinicus*; 51 % identičnosti), ki so del genskih skupin za sintezo novobicina, klorobicina in himastatina (Pojer in sod., 2002; Eustaquio in sod., 2003; Ma in sod., 2011). Za vse produkte teh genov so predvideli regulatorno vlogo in vsi so del genske skupine odgovorne za biosintezo. Skupina Eustaquio in sod. (2003) je z inaktivacijo *novE* zmanjšala produkcijo novobiocina za več kot 90 %. To nakazuje, da protein NovE nima esencialne katalitične vloge pri biosintezi novobiocina, ima pa pomemben vpliv na donos, kar kaže na regulatorno vlogo tega proteina.

### 3 MATERIALI IN METODE

Laboratorijsko delo v okviru magistrskega dela je obsegalo tri sklope.

#### a) Molekularnobiološki

Gen SACE\_5599 smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri čemer smo kot matrico uporabili plazmid pVME53. Ta plazmid so predhodno pripravili v laboratoriju Acies Bio, vsebuje pa kloniran gen SACE\_5599, ki so mu s sekvenciranjem tudi potrdili pravilno nukleotidno zaporedje. Pri tem smo s prilagojenim začetnim oligonukleotidom na 3' koncu dodali sekvenco, ki je na karboksiterminalnem delu proteina dodala hemaglutininski epitop (HA-tag), kar omogoča detekcijo proteina v proteinskih ekstraktih s prenosom western. Z uporabo molekularnobioloških metod (restrikcije, ligacije, transformacije) smo gen SACE\_5599-HA vstavili v različne ekspresijske vektorje (pSet152+*ermE\** in pSET152+*ermE\**/RBS). V molekularnobiološki sklop spada tudi preverjanje, ali in kako se je gen vstavil v genom *S. erythraea*, z metodo PCR na osnovi kolonije.

#### b) Mikrobiološki

Pripravljene plazmide (pSet152+*ermE\** oz. pSet152/RBS+*ermE\** + SACE\_5599-HA) smo s pomočjo konjugacije vnesli v bakterijo *S. erythraea*. V naslednji fazi smo konjugante selekcionirali na selekcijskih gojiščih, pripravili kolonije za testiranje in izvedli fermentacijski proces na stresalniku. Za proizvodnjo eritromicina smo konjugante najprej gojili v vegetativnem in nato v produkcijskem gojišču.

#### c) Analitski

Po 7 dnevni rasti v produkcijskem gojišču je sledila ekstrakcija eritromicina in preverjanje vsebnosti z biološkim testom. Del biomase smo porabili za izolacijo proteinov in preverjanje prisotnosti proteina SACE\_5599-HA s prenosom western.

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Začetni oligonukleotidi

Za pomnožitev izbranih delov DNA smo uporabili začetne oligonukleotide proizvajalca Sigma-Aldrich (Preglednica 1). Začetnim delom oligonukleotidov smo dodali restriksijska mesta za encim NdeI (CATATG) in XbaI (TCTAGA). Zaporedje, ki ustreza HA epitopu in smo ga dodali na začetni oligonukleotid SACE\_5599-R-HA, jeobarvano rdeče.

Preglednica 1: Oznake in zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov ter njihove lastnosti. Vsa zaporedja so zapisana od 5'- proti 3'- koncu.

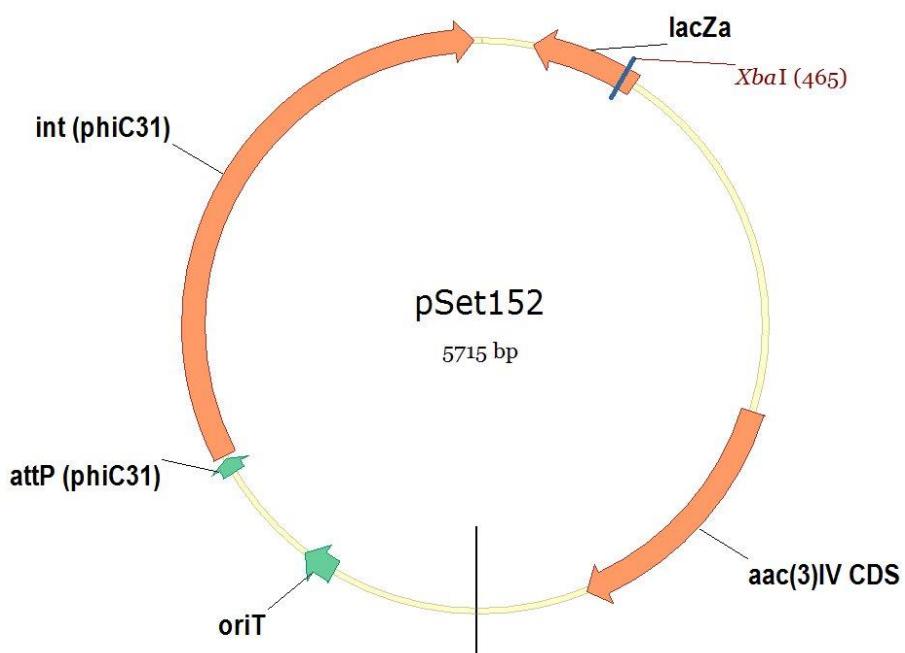
Oznaka	Nukleotidno zaporedje	Dolžina [bp]	%GC	Tm (°C)
SACE_5599-F	AAAATAT <u>CATATGAATT</u> CGTCGGCCTG GTTCCCTCGGTGAC	40	45	65,0
SACE_5599-R-	AAAAAT <u>CTAGAATTAGGCCGTAGTCGG</u>	68	57,4	74,1
HA	<u>GACGTCGTACGGTA</u> TGCCCGGGCGAC CAGTTGCCGGTGCT			
promotor_SAC_E_5599-F	TGCCCGTATGGTGGGATTGAATGCCT	26	53,8	64,3
ermE*-F	ATGCGAGTGTCCGTTCGAGTGG	22	53,4	60,8
HA-tag-R	AAAAT <u>CTAGAATCAGGCGTAGTCGGG</u> ACGTCGTACGGTA	41	64,4	75,4
SACE_5599-R	AAAAAT <u>CTAGAATTATGCCCGGGCGAC</u> CAGTTGCCGGTGCT	41	51,2	69,5

#### 3.1.2 Vektorji

Vektor pSet152 so prvi uporabili in opisali Bierman in sod., 1992 (Slika 5). Ekspresijski vektor pSet152 iz organizma *S. erythraea* omogoča integracijo genov v seve aktinomicet, ki imajo v svojem genomu prepoznavno mesto attB za integrazo iz bakteriofaga ΦC31. Vsebuje še laktozni operator (LacO) in zapis za α-podenoto gena lacZ, ki ob izbiri ustreznegaa gostiteljskega seva omogoča selekcijo transformant z belo-modrim testom; gen *acc(3)IV*, katerega produkt posreduje rezistenco bakterije proti antibiotiku apramicinu; multiplo mesto za kloniranje in mesto začetka prenosa (oriT) (Bierman in sod., 1992; Giebelhaus in sod., 1996). pSet152 je integrativni plazmid, kar pomeni, da se vključi v kromosom tarčne celice, in sicer v specifično mesto za bakteriofag ΦC31 attB. Po

konjugaciji izberemo pogoje, ki so selektivni za celice, ki konstrukt vsebujejo (Combes in sod., 2002; Zeigler, 2002). V našem primeru smo gojišče SM-MgCl<sub>2</sub> po konjugaciji prelili z antibiotikom apramicinom in dalje konjugante gojili na sporulacijskem gojišču ABSM4 ter vegetativnem gojišču ABVM1 z enakim antibiotikom.

Promotor *ermE\** (*ermE* star) smo izbrali, ker gre za zelo močan konstitutivni promotor iz *S. erythraea*. Promotor *ermE\** je zelo podoben promotorju gena *ermE* (Bibb in sod., 1985), zaradi delecie treh nukleotidov pa je promotor *ermE\** dereguliran in omogoča konstitutivno transkripcijo želenega gena (Lefers, 2004). Promotor *ermE\** smo uporabili v dveh različicah; z vezavnim mestom za ribosom (*ermE\*/RBS*) in brez vezavnega mesta za ribosom.



Slika 5: Osnovni vektor pSet152 (Kieser in sod., 2000)

### 3.1.3 Bakterijski sevi

Pri delu smo uporabili naslednje mikroorganizme (Preglednica 2):

Preglednica 2: Seznam uporabljenih mikroorganizmov

Vrsta	Tip	Vir
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	NRRL23338	Acies Bio d.o.o
<i>Escherichia coli</i> DH10β	Sev prilagojen za uporabo v molekularno bioloških laboratorijih	Acies Bio d.o.o
<i>Escherichia coli</i> ET12567	Konjugativni sev s plazmidom pUZ8002	Acies Bio d.o.o
<i>Bacillus subtilis</i>	WT119	Acies Bio d.o.o

### 3.1.4 Gojišča

Vsa gojišča smo načeloma pripravili po naslednjem postopku.

Sestavine gojišč smo odtehtali, dodali ustrezeno količino destilirane vode in po potrebi umerili pH. V primeru priprave trdega gojišča smo agar v steklenice odtehtali ločeno. Ustrezne volumne gojišč smo razdelili v steklenice in sterilizirali. Po avtoklaviranju smo steklenice s tekocim gojiščem shranili do uporabe. Če smo pripravljali trdno gojišče, smo po sterilizaciji gojišče nekoliko ohladili z mešanjem na magnetnem mešalu. Po potrebi smo v brezprašni komori dodali antibiotike in razlili na petrijeve plošče. Ko je bilo gojišče strjeno, smo plošče shranili do uporabe (gojišča z dodanim antibiotikom smo hranili na 4 °C).

#### 3.1.4.1 Gojišče za kultivacijo *E. coli* - 2TY

Tekoče in trdno 2TY gojišče (Sambrook in Russel, 2001) smo uporabili pri vseh postopkih manipulacije s celicami *E. coli* DH10b in *E. coli* ET12567.

Preglednica 3: Sestava tekočega in trdnega gojišča 2TY

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Kazein pepton	16	Biolife
Kvasni ekstrakt	10	Sigma
NaCl	5	Merck
Bakteriološki agar (le za trdno gojišče)	15	Biolife
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*Sterilizacija je potekala 20 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

### 3.1.4.2 Trdno gojišče za konjugante *S. erythraea* - SM-MgCl<sub>2</sub>

Trdno gojišče SM (Kieser in sod., 2000) smo uporabili po konjugaciji, ko smo na gojišče nacepili konjugacijsko mešanico *S. erythraea* in s plazmidom transformiranih celic *E. coli*.

Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča SM

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	20	Cargill Foods
D-manitol	20	Merck
Bakteriološki agar	20	Biolife
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*pH 7; sterilizacija je potekala 30 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

Preglednica 5: Raztopina 1M MgCl<sub>2</sub>

Raztopina	Sestavina	Količina (g)	Proizvajalec
10M MgCl <sub>2</sub> raztopina	MgCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	16,727 g	Carlo Erba
	dH <sub>2</sub> O	Do 100 mL	

Po sterilizaciji smo počakali, da se gojišče ohladilo na okoli 50 °C in nato sterilno dodali 10mL 1M raztopine MgCl<sub>2</sub> v 1 L (do 10 mM MgCl<sub>2</sub>) ter gojišče razlili v petrijeve plošče.

### 3.1.4.3 Trdno sporulacijsko gojišče ABSM4

Trdno sporulacijsko gojišče ABSM4 smo uporabili za precepitev in selekcijo konjugant iz SM-MgCl<sub>2</sub> gojišča ter namnožitev za inokulacijo v vegetativno gojišče ABVM1.

Preglednica 6: Sestava sporulacijskega gojišča ABSM4

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Koruzni škrob	10	Cerestar
Koruzna namakalna vodica (CSL)	11	Cargill Foods
Amonijev sulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	Merck
NaCl	3	Merck
Kalcijev karbonat CaCO <sub>3</sub>	3	Kalcit
Agar	20	Biolife
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*CSL smo najprej posebej zavreli v malo vode, nato dodali suspenzijo škroba, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl in vode do 1 L. Nato smo umerili pH na 7,2 (z NaOH) in šele po tem dodali CaCO<sub>3</sub> in agar; sterilizacija je potekala 30 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

### 3.1.4.4 Tekoče vegetativno gojišče za *S. erythraea* ABVM1

Tekoče vegetativno gojišče ABVM1 smo uporabljali prva 2 dni rasti (vegetativno fazo) izbranih sevov *S. erythraea* za produkcijo eritromicina.

Preglednica 7: Sestava vegetativnega gojišča ABVM1

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
CSL	30	Cargill Foods
Saharoza	30	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	Merck
$\text{CaCO}_3$	6	Kalcit
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*CSL smo najprej posebej segrevali 30 min pri 80 °C in ga nato dodali sestavinam. pH 5,5; sterilizacija je potekala 40 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

### 3.1.4.5 Tekoče produkcijsko gojišče za *S. erythraea* ABPM8

Tekoče produkcijsko gojišče smo uporabili za produkcijsko fazo rasti izbranih sevov *S. erythraea* za produkcijo eritromicina.

Preglednica 8: Sestava produkcijskega gojišča ABPM8

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	36	Cargill Foods
Koruzni škrob	36	Cerestar
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,4	Merck
$\text{CaCO}_3$	7,2	Kalcit
Sojino olje	5	Tovarna olja GEA d.d.
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*Sojino moko smo predhodno zavreli in nato dodali ostale komponente. Preden smo dodali  $\text{CaCO}_3$ , smo umerili pH na 6,3 (po dodatku  $\text{CaCO}_3$  je pH 6,8). Sojino olje smo dodali direktno v mešanico. Sterilizacija je potekala 40 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

### 3.1.4.6 Tekoče gojišče TSB

Tekoče gojišče TSB (Kieser in sod., 2000) smo uporabili za gojenje izbranih sevov za izolacijo proteinov.

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

Preglednica 9: Sestava tekočega gojišča TSB

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Kazein pepton	17	Biolife
Sojin pepton	3	Biolife
Glukoza	2,5	Merck
NaCl	5	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5	Merck
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*Sterilizacija je potekala 30 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

### 3.1.4.7 Trdno gojišče ABA

Trdno gojišče ABA smo uporabili za izvedbo biološkega testa z *B. subtilis*.

Preglednica 10: Sestava trdnega gojišča ABA

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
»Antibiotic base agar A2«	25,5	Biolife
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*pH 7,9; v vodni kopeli smo segreli do 80 °C in nato razlili po 0,5 L v 1 L steklenice. Sterilizacija je potekala 20 min pri 121 °C in tlaku 120 kPa.

### 3.1.5 Raztopine

Pri molekulskemu kloniranju smo za namene postopkov PCR (1), ligacije (2), restrikcije (3) in pripravo gelov za elektroforezo (4) uporabili naslednje pufre:

1. 6x nanašalni pufer za DNA - »DNA loading buffer« (Fermentas)
2. T4 ligacijski pufer (Fermentas)
3. Restrikcijski pufer - »Fast digest buffer« (Fermentas)
4. 50x pufer TAE (tris acetatni pufer z EDTA) za gelsko elektroforezo

Preglednica 11: TAE pufer

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Tris baza	242 g	Merck
Oacetna kislina	57,1 mL	Sigma
0,5 M EDTA	100 mL	/
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

---

Preglednica 12: 0,5 M založna raztopina EDTA

<b>Sestavina</b>	<b>Koncentracija</b>	<b>Proizvajalec</b>
EDTA	146,1	Kemika
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

Pri izolaciji in analizi proteinov s prenosom western smo uporabili več različnih raztopin:

Preglednica 13: 10x elektroforezni pufer za SDS-PAGE

<b>Sestavina</b>	<b>Koncentracija (g/L)</b>	<b>Proizvajalec</b>
Tris baza	30,3	Merck
Glicin	144	Sigma
natrijevega dodecil sulfat (SDS)	10	Sigma
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

Preglednica 14: 10x založna raztopina za prenašalni pufer

<b>Sestavina</b>	<b>Koncentracija (g/L)</b>	<b>Proizvajalec</b>
Tris baza	30,3	Merck
Glicin	144,1	Sigma
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*Sterilizacija 20 min pri 121 °C 120 kPa; shranili na 4 °C.

Preglednica 15: 10x Tris s soljo (TBS)

<b>Sestavina</b>	<b>Koncentracija (g/L)</b>	<b>Proizvajalec</b>
Tris baza	12,1	Merck
NaCl	87,8	Merck
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\* Sterilizacija 20 min pri 121 °C 120 kPa; shranili na 4 °C.

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

---

Preglednica 16: 0,5 M založna raztopina za fosfatni pufer

Raztopina	Sestavina	Količina	Proizvajalec
0,5 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,42 g	Merck
	dH <sub>2</sub> O	do 200 mL	
0,5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,61 g	Riedel-de Haën
	dH <sub>2</sub> O	do 200 mL	

\*Dodali smo 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 200 mL 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> do pH 7,5.

Pufer za čiščenje proteinov:

- 20 mM fosfatni pufer (iz 0,5 M založne raztopine za fosfatni pufer)

Preglednica 17: 100 mM založna raztopina fenilmethylsufonil flourid (PMSF)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
PMSF	174 mg	Sigma
izopropanol	do 10 mL	Sigma

Preglednica 18: Pufer za proteinske vzorce

Sestavina	Koncentracija (mM)
fosfatni pufer (iz 0,5 M založne raztopine za fosfatni pufer)	100
EDTA (iz 0,5 M založna raztopina EDTA)	20
100 mM PMSF	2

Preglednica 19: Prenašalni pufer

Sestavina	Količina (mL)	Proizvajalec
10x založna raztopina za 100 prenašalni pufer	/	
Metanol (MeOH)	200	Fluka
dH <sub>2</sub> O	do 1 L	

\*Hranili smo na 4 oC; pufer moral biti ohlajen ob uporabi.

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013

Preglednica 20: 10x PBS

<b>Sestavina</b>	<b>Koncentracija (g/L)</b>	<b>Proizvajalec</b>
NaCl	8	Merck
KCl	2	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4	Riedel-de Haën
dH <sub>2</sub> O		

\*Voda do 800 mL, uravnali pH na 7,4, dolili vode do 1 L; sterilizacija je potekala 20 min pri 121 °C 120 kPa.

Preglednica 21: Raztopina za detekcijo proteinov na membranah

<b>Sestavina</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
1 % ocetna kislina	30 mL	Sigma
Ponceau S	0,03 g	Sigma

Preglednica 22: 1x TBS in 3 % mleko (TBSM)

<b>Sestavina</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
10x TBS	20 mL	
Instant posneto mleko v prahu	6 g	Pomurske mlekarne Murska Sobota
dH <sub>2</sub> O	do 200 mL	

Preglednica 23: Založna raztopina 1 % DAB:

<b>Sestavina</b>	<b>Količina</b>	<b>Proizvajalec</b>
3,3'-diaminobenzidine (DAB)	0,1 g	Sigma
HCl	0,25 mL	Sigma
dH <sub>2</sub> O	10 mL	

\*Stresali smo 10 min oz. dokler se ni večina raztopila; hranili smo na -20 °C.

Preglednica 24: Raztopina za detekcijo HRP (hrenova peroksidaza) aktivnosti

Sestavina	Količina	Proizvajalec
10x PBS	1 mL	/
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µL	Sigma
1 % DAB	500 µL	
dH <sub>2</sub> O	9 mL	

\*Uporabili takoj po pripravi.

### 3.1.6 Ostali materiali

#### 3.1.6.1 Encimi

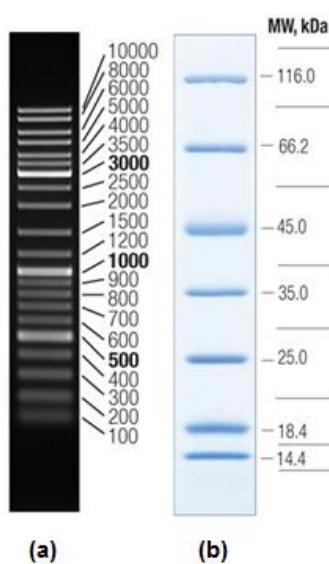
Encimi, ki smo jih uporabili pri delu, so:

- DNA-polimeraza - »Phusion High Fidelity DNA Polymerase« in »GC Phusion« pufer (Finnzymes),
- DNA-polimeraza - »Taq DNA Polymerase« in 10x »Dream Taq buffer« (Fermentars),
- T4 DNA ligaza in pripadajoč 10x ligacijski pufer (Fermentas),
- Restriktijske endonukleaze NdeI, XbaI (Fermentas, FastDigest®).

#### 3.1.6.2 Elektroforezni standardi

Elektroforezni standardi, ki smo jih uporabili pri delu (Slika 6):

- »GeneRuler DNA Ladder Mix«, 100–10000 bp (Fermentas),
- »Unstained protein molecular weight marker« (Fermentas).



Slika 6: DNA in proteinski elektroforezni standardi.  
(a) »GeneRuler DNA Ladder Mix« na 1 % agaroznem gelu z velikostmi standardo v bp. (b) proteinski standard; »Unstained protein molecular weight marker« na 12,5 % poliakrilamidnem gelu v prisotnosti SDS z velikostmi standardov v kDa.

### 3.1.6.3 Kompleti reagentov

Kompleti reagentov, ki smo jih uporabili pri delu:

- »Bio-Rad protein assay« (Bio-Rad) - za merjenje koncentracije proteinov
- »GenElute Plasmid Miniprep Kit« (Sigma) - za izolacijo plazmidne DNA
- »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega) - za izolacijo DNA iz agaroznega gela in čiščenje PCR-produktov
- »GenElute Bacterial Genomic DNA Kit« (Sigma) - za izolacijo genomske DNA

### 3.1.6.4 Antibiotiki

V Preglednici 25 so navedeni antibiotiki, ki smo jih uporabili kot dodatek gojiščem za selekcijo želenih sevov *E. coli* in *S. erythraea*. Izbira antibiotikov je bila odvisna od tipa plazmida in lastnosti mikroorganizma.

Preglednica 25: Uporabljeni antibiotiki

Antibiotik	Koncentracija v gojišču ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proizvajalec
Apramicin [Apr]	50	Sigma
Nalidinska kislina [Nal. k.]	25	Sigma
Kanamicin [Kn]	25	Sigma
Kloramfenikol [Cm]	10	Sigma

Pri pripravi umeritvene krivulje za določitev koncentracije eritromicina na biološkem testu smo uporabili standardne raztopine (koncentracije 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 in 25 µg/mL) eritromicina (Calbiochem).

### 3.1.6.5 Protitelesa (Ab)

Za detekcijo proteinov pri prenosu western smo uporabili primarna in sekundarna Ab:

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

### 3.1.6.6 Ostale kemikalije, reagenti in materiali

Ostali materiali in kemikalije, ki smo jih uporabili pri delu:

6x nanašalni pufer za DNA (Fermentas), acetonitril (Sigma), agarosa (Sigma), akrilamid:bisakrilamid (19:1) (Fluka), DMSO (intravezikalni dimetilsulfoksid; Sigma), nitrocelulozna membrana (Sigma), APS (Sigma), Etanol (Sigma), NaOH (Sigma), fenol (Sigma), barvilo SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), TEMED (Sigma), Tris/HCl (Merck), Tween (J.T. Baker).

### 3.1.6.7 Pomembnejše aparature

Aparature, ki smo jih uporabili pri delu:

- PCR-aparatura »Professional Thermocycler« (Biometra),
- aparatura za agarozno gelsko elektroforezo (Bio-Rad),
- aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo »Mini Protean Tetra Cell« (Bio-Rad),
- aparatura za elektroprenos proteinov »Mini Trans-Blot Cell« (Bio-Rad),
- spektrofotometer »Infinite 200 Pro NanoQuant« (TECAN),
- ultrazvočni razbijjalnik »Labsonic« (Sartorius),
- mala in velika centrifuga (Hettichlab),
- stresalnik Multitron HT (Infors),
- tehtnici PLJ 2100-2M in ALT 220-4NM (Kern & Sohn),
- elektroporator »MicroPulser« (Bio-Rad),
- pH-meter PHS 3D (Qingdao Flom Technology),

- grelec in magnetno mešalo Rotamix 500 (Tehtnica),
- avtoklavi (Sutjeska in Medicinotehnika),
- avtomatske pipete (Gilson),
- brezprašna komora (Telstar),
- hladilnik (4 °C) (LTH),
- zamrzovalna omara (-20 °C) (LTH),
- skrinja (-80 °C) (Heto),
- inkubator za aktinomicete (28 °C) (Sutjeska),
- inkubator za *E. coli* (37 °C) (Sutjeska),
- digestorij (Med-Lab Rauh),
- vodna kopel (UniEquip),
- vrtinčnik (IKA),
- mikrovalovna pečica (Sanyo),
- aparatura oz. kamera za slikanje gelov za elektroforezo (Bio-Rad),
- hibridizacijska pečica (Biometra).

### 3.1.6.8 Uporabljeni steklovina in potrošni material

Pri delu smo uporabili še:

- čaše,
- luknjače za agar plošče,
- magneti,
- merilni valji,
- 1,5 mL in 2 mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- nastavki za avtomatske pipete (Gilson),
- petrijevke,
- pincete,
- plinski gorilnik,
- paličke za razmazovanje,
- 15 mL in 50 mL centrifugirke (Falcon),
- zobotrebci,
- mikrotiterske ploščice (Greiner),
- filter papir pri prenosu western (Biorad).

### 3.2 METODE

Delo je potekalo v treh sklopih. V prvem sklopu (molekularnobiološko kloniranje) smo pripravili plazmide, transformante in preverjali način vstavitve v kromosom; v drugem sklopu (mikrobiološki del) smo konstrukte s konjugacijo prenesli v bakterijo *S. erythraea*, selekcionirali konjugante in jih gojili v produkcijskih gojiščih ter nato v tretjem sklopu z biološkim testom preverjali količino eritromicina in s prenosom western analizirali izražanje proteinov.

#### 3.2.1 Molekularnobiološko kloniranje

##### 3.2.1.1 Izolacija genomske DNA iz kulture *S. erythraea*

Za pomnožitev gena SACE\_5599 smo najprej izolirali genomsko DNA s kompletom reagentov »GenElute Bacterial Genomic DNA Kit«. Ustrezno količino prekonočne bakterijske kulture *S. erythraea* smo lizirali in se ob izolaciji genomske DNA držali navodil proizvajalca. Genomska DNA smo v končnem koraku eluirali v 100 µL dH<sub>2</sub>O.

##### 3.2.1.2 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, pri kateri z uporabo termostabilne DNAPolimeraze, matrične DNA, prilegajočih se začetnih oligonukleotidov ter primernega puferškega sistema pomnožuje izbran del verige DNA. Princip metode temelji na treh ponavljajočih se temperturnih ciklih, odvisnih od nukleotidnega zaporedja, ki ga želimo v reakciji pomnožiti. S prvim korakom v temperturnem območju med 93 °C in 98 °C denaturiramo dvostransko matrično DNA ter tako omogočimo vezavo začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA. V drugem koraku se pri temperaturi prileganja, ki je odvisna od zaporedja prilegajočih se baz, na enoverižno DNA vežejo začetni oligonukleotidi. V tretjem koraku polimeraza dodaja nukleotide v smeri 5' → 3' in tako podaljšuje enoverižno DNA pri temperaturi 72 °C. Cikel denaturacija, prileganja in podaljševanja pri PCR reakciji se ponovi med 30 in 40-krat, temu sledi 10 min inkubacije pri 72 °C (končno podaljševanje - ang. final extension) (Sambrook in Russel, 2001).

PCR reakcije smo izvedli v PCR-aparaturi Professional Thermocycler s programom reakcije, ki je zapisan v Preglednici 26. Reakcijsko mešanico izbrane matrične DNA, prilegajočih se začetnih oligonukleotidov, mešanice deoksiribonukleotidov (2 mM),

DMSO, termostabilne DNA-polimeraze Phusion High Fidelity DNA in ustreznega pufra smo pripravili v mikrocentrifugirkah z volumnom 200 µL, kot je prikazano v Preglednici 27.

Preglednica 26: Program PCR-reakcije za pomnožitev gena SACE-5599+HA-tag

Stopnja reakcije	Čas	T (°C)	Število ciklov
denaturacija	2 min	98	1
denaturacija	15 s	98	
prileganje začetnih oligonukleotidov	30 s	63/65	30
podaljševanje verig	30 s	72	
končno podaljševanje	10 min	72	1

Preglednica 27: Sestava mešanice za PCR reakcijo.

Komponenta	Volumen (µL)
5x GC Phusion buffer	5
mešanica dNTP	2,5
5' začetni oligonukleotid (SACE_5599-F)	1,25
3' začetni oligonukleotid (SACE_5599-R-HA)	1,25
DMSO	0,75
matrična DNA (plazmid pVME53)	0,25
Phusion polimeraza (2 U/µL)	0,25
dH2O	13,75
Skupni volumen	25

### 3.2.1.3 Elektroforeza DNA

Za elektroforezne reakcije smo potrebovali agarozni gel, ki smo ga pripravili tako, da smo 50x razredčenemu TAE pufru dodali agarozo do končne koncentracije 0,8 % in mešanico segreli v mikrovalovni pečici, tako da se je agaroza raztopila v pufru. Raztopino smo nato nekoliko ohladili (~ 50 °C), dodali flourescenčno barvilo (»SYBR safe DNA gel stain«) in jo vlili v stojalo za gel z vstavljenim glavničkom. Ko se je gel strdil, smo ga prenesli v elektroforezno banjico, napolnjeno z 1x razredčenim TAE pufrrom in odstranili glavniček.

Vzorcem smo pred nanosom na elektroforezni gel dodali nanašalni pufer, ki je obtežil DNA, da se je ta usedla na dno jamice. Vzorce smo prenesli v jamice na elektroforezni gel in dodali velikostni standard za kasnejšo identifikacijo produkta. Banjico smo nato za slabo uro priključili na električno napetost (90 V za gel srednje velikosti (80 mL)).

### 3.2.1.4 Čiščenje produktov PCR

Produkte PCR reakcij smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Na 0,8 % agarozni gel smo nanesli celoten volumen mešanice z dodanim nanašalnim puferom ter tako ločili produkte pravih velikosti od prostih deoksiribonukleotidov, začetnih oligonukleotidov in ostalih nečistoč. Del gela, ki je vseboval izbrano liso DNA, smo izrezali in očistili s kompletom reagentov »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System«. V vseh korakih smo sledili navodilom proizvajalca in na koncu DNA eluirali v 50 µL dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.5 Rezanje DNA z restriktijskimi endonukleazami

Rezanje DNA z restriktijskimi endonukleazami smo izvedli pri preverjanju izoliranih plazmidov iz prekonočnih bakterijskih kultur za določitev uspešnosti ligacije pred določevanjem nukleotidnega zaporedja in pri pripravi PCR produkta za ligacijo v vektorje.

Preglednica 28: Reakcijska zmes za rezanje plazmidne DNA z restriktijskimi endonukleazami pri preverjanju izoliranih plazmidov (a) in pri pripravi PCR produkta za ligacijo (b).

Komponenta	Volumen (µL) (a)	Volumen (µL) (b)
10x restriktijski pufer FD	1	5,2
restriktijska endonukleaza 1	0,3	2,5
restriktijska endonukleaza 2	0,3	2,5
DNA	3	42
dH <sub>2</sub> O	5,4	
skupni volumen	10	52,2

### 3.2.1.6 Ligacija v vektor pSet152

Genski zapis SACE\_5599-HA smo vnesli v ekspresijski vektor pSet152. Po rezanju z restriktijskimi endonukleazami NdeI in XbaI (poglavje 3.2.1.5), smo encime inaktivirali (25 min, 65 °C), očistili (poglavje 3.2.1.4) ter ligirali v pripravljen vektor pSet152+ermE\* z in brez vezavnega mesta za ribosom (ang. ribosome binding site - RBS) (odprt z

endonukleazama NdeI in XbaI) s prilegajočimi se konci. Ligacijsko zmes (Preglednica 29) smo inkubirali pri temperaturi 4 °C preko noči. Po pripravi plazmidov smo s sekvenciranjem pri zunanjem partnerju (Macrogen, J. Koreja) preverili še nukleotidno zaporedje.

Preglednica 29: Sestava mešanice za ligacijo inserta v vektor pSet152+*ermE\** z in brez RBS.

Komponenta	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
rezan insert (NdeI/XbaI)	10
rezan vektor (NdeI/XbaI)	1,5
ligacijski pufer	1,5
dH <sub>2</sub> O	1,5
ligaza T4	0,5
Skupni volumen	15

### 3.2.1.7 Izolacija plazmidne DNA

Iz prekonočne bakterijske kulture smo izolirali plazmidno DNA, tako da smo 2 mL kulture 5 min centrifugirali pri 14000 obr./min in celično usedlino resuspendirali v primerenem pufru iz kompleta reagentov »GenElute Plasmid Miniprep Kit«. Med izolacijo plazmidne DNA smo se v vseh korakih držali navodil proizvajalca in v končnem koraku eluirali DNA v 100  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.8 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH10b in *E. coli* ET12567 pUZ8002

Pri vseh postopkih smo v mikrocentrifugirkah najprej pripravili 1 mL medija 2TY. Elektrokompetentne celice bakterij *E. coli* DH10β oz. *E. coli* ET1256 pUZ8002 smo transformirali z elektroporatorjem MicroPulser, ki je generiral električni pulz (2 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$ ). Za posamezno transformacijo smo uporabili 40  $\mu\text{L}$  elektrokompetentnih celic, ki so bile zamrznjene pri -80 °C. Najprej smo jih odtajali na ledu, jim dodali 2  $\mu\text{L}$  pripravljene ligacijske oz. plazmidne DNA in mešanico prenesli v kiveto za elektroporacijo. Električni pulz je v membrani povzročil tvorbo por, kar je omogočalo privzem DNA v celice. Po končani transformaciji smo transformirane celice resuspendirali v 1 mL gojišča 2TY in jih 45 min inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo jih s 3 min centrifugiranjem pri 4500 obr./min zbrali na dnu, resuspendirali

v manjšem volumnu (~ 100 mL) in nacepili na trdne 2TY plošče, ki so vsebovale ustrezné antibiotike, kar je omogočalo selekcijo transformiranih celic. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

### 3.2.1.9 PCR na osnovi kolonije

PCR reakcijo na osnovi kolonije smo uporabili za preverjanje konjugant bakterije *S. erythraea*, tako da smo analizirali uspešnost in mesto vstavitve pSet152 z izbranim insertom SACE\_5599-HA v kromosom izbranega organizma. Posamezno kolonijo smo s konico nastavka na pipeti vnesli v zmes za PCR reakcijo (Preglednica 30) s primernimi oligonukleotidi in izvedli PCR reakcijo pod pogoji opisanimi v Preglednici 31.

Preglednica 30: Sestava mešanice za PCR na osnovi kolonije.

Komponenta	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10x Taq pufer	2,5
mešanica dNTP	2,5
5' začetni oligonukleotid	2
3' začetni oligonukleotid	2
DMSO	0,75
Taq polimeraza	0,2
matrična DNA (na konici nastavka)	/
dH <sub>2</sub> O	13,5
Skupni volumen	25

Preglednica 31: Program PCR reakcije za pomnožitev zapisov SACE\_5599-HA v kombinaciji z različnimi promotorji (začetni oligonukleotidi promotor\_SACE\_5599-F, ermE\*-F, HA-tag-R in SACE\_5599-R).

Stopnja reakcije	Čas	T (°C)	Število ciklov
denaturacija	10 min	95	1
denaturacija	30 s	95	
prileganje začetnih oligonukleotidov	30 s	60/65/70	30
podaljševanje verig	1 min	72	
končno podaljševanje	10 min	72	1

### **3.2.2 Mikrobiološke metode**

#### **3.2.2.1 Prekonočne kulture celic *E.coli* DH10β in *E.coli* ET12567 pUZ8002**

Transformante bakterij *E. coli* DH10β oz. *E. coli* ET12567 pUZ8002, ki so zrasle na agarnih ploščah z ustreznimi antibiotiki, smo prenesli v 5 mL tekočega oz. 10 mL tekočega gojišča 2TY z ustreznimi antibiotiki in jih preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C in 220 obr./min.

#### **3.2.2.2 Konjugacija spor bakterije *S. erythraea***

Prapravljene plazmide smo v bakterije *S. erythraea* vneseli s konjugativnim prenosom iz seva *E. coli* ET12567 pUZ6002. Gre za prenos delov DNA med bakterijama, ki sta v neposrednjem stiku preko celičnih struktur na površini donorske celice, pilov, katerih glavni gradnik je beljakovina pilin. Zapis zanj je v lokusu *tra* v plazmidu pUZ8002, ki je vključen v donorsko bakterijo *E. coli*. Ta tehnika nam je omogočila konstrukcijo in namnoževanje plazmidov v eksperimentalno prilagodljivih celicah in naknadni prenos v *S. erythraea*.

#### **Potek konjugacije**

Bakterije *E. coli* ET12567 pUZ8002, transformirane z izbranim plazmidom pSet152, smo inokulirali v 5 mL gojišča 2TY (z ustreznimi antibiotiki apramicin 50 µL/mL, kanamicin 25 µL/mL, kloramfenikol 10 µL/mL) in jih gojili preko noči na stresalniku pri temperaturi 37 °C ter 220 obr./min. Naslednje jutro smo z 1 mL prekonočne kulture inokulirali 20 mL gojišča 2TY. Bakterije smo gojili do optične gostote 0,4 pri 600 nm. Temu je sledil postopek konjugacije, kjer smo pripravili celice. Kulturo celic (*E. coli* ET12567 pUZ8002) smo najprej centrifugirali 10 min pri 4500 obr./min in nato še 2x spirali s po 15 mL gojišča 2TY z vmesnimi centrifugiranjami. Na koncu smo jih resuspendirali v 1 mL 2TY brez antibiotikov. Med spiranjem *E. coli*, smo na ledu odtajali spore bakterije *S. erythraea*, ki smo jih nato 2x spirali s po 1 mL 2TY gojišča in vmesnim centrifugiranjem pri 5000 obr./min za 5 min. Na koncu smo spore resuspendirali v 1,6 mL 2TY in jih 10 min inkubirali pri temperaturi 52 °C ter jih takoj za tem ohladili na ledu. Temu je sledila združitev celic in spor v volumskem razmerju 2,5:2 ter razmaz 350 µL suspenzije na plošče s trdnim gojiščem SM-MgCl<sub>2</sub>.

## Rast konjugant

Konjugante smo preko noči inkubirali pri temperaturi 28 °C. Zjutraj smo plošče stehtali in jih prelili z raztopino nalidinske kislina do končne koncentracije 25 µg/g gojišča. Z nalidinsko kislino smo zavrli rast bakterij *E. coli*. Plošče smo ponovno inkubirali preko noči pri temperaturi 28 °C. Naslednje jutro smo plošče prelili še z raztopino apramicina do končne koncentracije 50 mg/g gojišča. Z apramicinom smo dosegli selekcijo konjugant; preživele so le tiste, v katere se je prenesel in v kromosom integriral izbran plazmid. Konjugante smo inkubirali nadalnjih 12 dni (14 dni po postopku konjugacije) pri temperaturi 28 °C.

### 3.2.2.3 Gojenje izbranih sevov *S. erythraea* na agarnih ploščah

Po 14 dneh inkubacije konjugant na gojišču SM-MgCl<sub>2</sub>, smo jih precepili na plošče ABSM4 z apramicinom (50 µg/mL) in nalidinsko kislino (25 µg/mL). Po nadalnjih 12–14 dneh inkubacije na 28 °C, smo kolonije (neodvisne klone) precepili na plošče ABSM4 z apramicinom (50 µg/mL). Po nadalnjih 14 dneh rasti na 28 °C so bile kolonije v fazi sporulacije in pripravljene na inokulacijo v vegetativno gojišče. Sočasno smo gojili tudi kontrolne kolonije *S. erythraea* (WT in WT s plazmidom pSet152 brez gena SACE\_5599). Gojili smo jih tako, da smo spore nacepili na ABSM4 gojišče in po 14 dnevih v fazi sporuliranja inokulirali v vegetativno gojišče.

Običajno smo vse kolonije na ploščah ob inokulaciji v ABVM1 ponovno precepili na trdno gojišče ABSM4, saj smo analitske metode izvedli v več ponovitvah v različnih časovnih razmikih.

### 3.2.2.4 Gojenje izbranih sevov *S. erythraea* v tekočem gojišču in vzorčenje fermentacijskih brozg

Fermentacijski proces v laboratorijskem merilu (stresalnik) smo izvedli tako, da smo izbrane kolonije s plošče ABSM4 inokulirali v 5 mL tekočega vegetativnega gojišča ABVM1 z dodatkom apramicina (50 µg/mL). Gojenje je potekalo pri 28 °C in 220 obr./min. Po 48 urah gojenja smo z 10 % inokulumom (0,5 mL v primeru falkonk in 2,5 mL v primeru erlenmajeric) kulture v vegetativnem gojišču inokulirali v produksijsko gojišče ABPM8. Gojenje v ABPM8 gojišču je potekalo 7 dni pri 28 °C in 220 obr./min. Temu je sledila ekstrakcija eritromicina (poglavlje 3.2.3.1).

Iz enakih kultur smo pripravili tudi vzorce za analizo s prenosom western. V ta namen smo kulture vzorčili v več časovnih točkah. Proteinske lizate za analizo s prenosom western smo pripravili tudi iz kultur, ki smo jih gojili v gojišču TSB. V tem primeru smo TSB gojišče inokulirali iz ABSM4 plošče in vzorce pobrali po 4 dneh gojenja na 28 °C in 220 obr./min (poglavlje 3.2.5).

Pri vzorcih, ki so bili inokulirani v erlenmajericah, smo v določenih serijah opravili tudi merjenje pH in PMV (parcialni micelijski volumen). PMV smo merili tako, da smo 10 mL biomase po 7 dnevni inokulaciji v ABPM8 11 minut centrifugirali na 3000 obr./min. Po centrifugiranju smo odmerili delež posedlega micelija v celotni brozgi in izračunali odstotek posedle biomase.

### **3.2.3 Analiza produkije eritromicina z biološkim testom**

#### **3.2.3.1 Ekstrakcija eritromicina brez soli**

Prvi korak v postopku za določanje koncentracije eritromicina v fermentacijski brozgi (poglavlje 3.2.2.4) je ekstrakcija. V falkonko smo dodali 5g brozge in 5 mL acetonitrila (to pomeni, da so vzorci 2x redčeni) in stresali eno uro na 220 obr./min. Po končanem stresanju je sledilo centrifugiranje 3 minute na 4500 obr./min. Po končanem centrifugiranju smo s kapalko prenesli 2 mL supernatanta v novo mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali 10 min na 14000 obr./min. Vzorce smo shranili na –20 °C.

#### **3.2.3.2 Biološki test z *B. subtilis***

Divji sev *S. erythraea* proizvaja nizke koncentracije eritromicina, zato je potrebna občutljiva metoda detekcije. Uporabili smo biološki test z bakterijo *B. subtilis*. Za pripravo biološkega testa je bilo najprej potrebno namnožiti kulturo *B. subtilis*. Za inokulacijo smo uporabilo 100 µL zamrznjene kulture *B. subtilis*. Najprej smo jo odtajali in jo nato dodali v erlenmajerico s 50 mL gojišča 2TY. Temu je sledila 18 urna inkubacija pri 28 °C in 220 obr./min (običajno preko noči). Po 18 urah inokulacije, smo 50 mL kulture *B. subtilis* prelili v falkonko in centrifugirali 10 min na 4500 obr./min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 25 mL svežega 2TY gojišča. Medtem smo ohladili 500 mL ABA gojišča na približno 50 °C in dodali 10 mL resuspendiranih celic. To smo dobro premešali in razlili po 25 mL na ploščo. Po razlitju smo plošče 2 uri inkubirali na 4 °C. Med inkubacijo smo pripravili ustrezne redčitve ekstraktov (10x in 20x z acetonirilom)

in lestvico standardov (koncentracije 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 in 25 µg/mL eritromicina; z metanolom). Po dveh urah smo v trdnem gojišču z luknjačem naredili 4 luknjice in nanesli po 60 µL vzorca ali standarda na luknjico. Plošče smo nato 2 uri inkubirali na 4 °C potem pa še 18 ur pri 37 °C. Temu je sledilo merjenje premera con (na 0,5 mm natančno) in priprava umeritvene krivulje (pri izrisu krivulje smo koncentracije logaritmizirali) standardnih koncentracij. Koncentracije eritromicina smo določili na podlagi umeritvene krivulje.

### **3.2.4 Analiza in statistična obdelava rezultatov biološkega testa**

Rezultate produkcije smo statistično analizirali v programu IBM SPSS Statistics 20. Podatke smo razvrstili v štiri skupine (wtK, wtsK, ha1, ha2) glede na vključen plazmid na osnovi pSet152+ermE\*, ki smo ga vstavili s konjugacijo (poglavje 3.2.2.2). Posamezno skupino smo nato obravnavali z izbranimi statističnimi testi. Ugotoviti smo želeli potencialno statistično značilno razliko v produkciji eritromicina.

Začeli smo s preverjanjem prisotnosti osamelcev v posamezni skupini s pravilom o označevanju osamelcev. Nato smo analizirali normalnost porazdelitve posamezne skupine s testom Shapiro-Wilk, s testom Levene pa smo preverili še homogenost varianc med skupinami. Na podlagi dobljenih rezultatov smo za nadaljnjo analizo uporabili neparametrični test Kruskal-Walis, kateremu je sledilo še testiranje s testom Mann-Whitney ob upoštevanju Bonferroni popravka ravni zaupanja.

#### **3.2.4.1 Analiza osamelcev**

S pravilom o označevanju osamelcev (Hoaglin in sod., 1986; Hoaglin in Iglewicz, 1987) je mogoče predpostaviti prisotnost osamelcev, ne glede na to, ali je porazdelitev podatkov normalna ali ne. Podatke se glede na mediano oz. srednjo vrednost razporedi v kvartile in označi s Q2. Q1 predstavlja tisto vrednost, ki številčno razpolovi podatke pod mediano, Q3 pa vrednost, ki razpolovi podatke nad mediano. 50 % podatkov je med Q1 in Q3 in se imenuje medkvartilno območje (ang. interquartile range - IQR).

Pri označitvi osamelcev najprej določimo zgornjo in spodnjo mejo. Spodnja meja je določena z vrednostjo, ki ustreza  $Q1 - 2,2 \cdot IQR$ , zgornja pa z vrednostjo, ki ustreza  $Q3 + 2,2 \cdot IQR$ . V primeru, da kateri od podatkov preseže zgornjo ali spodnjo mejo, ga lahko označimo kot potencialnega osamelca.

### 3.2.4.2 Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

Test Shapiro-Wilk je statističen test s katerim določimo, ali podatki v izbrani skupini ustrezajo normalni porazdelitvi. Za analizo mora skupina vsebovati od 3 do 2000 podatkov (Royston, 1982). Podatke najprej razporedimo po velikostnem redu in nato vsakemu glede na njegov položaj pripisemo konstanto  $a_i$ . Konstanta je določena na osnovi pričakovane vrednosti podatkov, ki bi pripadali normalni porazdelitvi.

Test je definiran z enačbo:

$$W = \frac{\left( \sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots(1)$$

$a_i$  - konstanta,  $x_{(i)}$  - vrednost na položaju i,  $\bar{x}$  - povprečna vrednost.

Preverjali smo hipotezo,  $H_0$ : podatki prihajajo iz populacije z normalno distribucijo,  $H_1$ : podatki ne prihajajo iz populacije z normalno porazdelitvijo.  $H_0$  lahko zavrnemo, če vrednost  $W$  ne preseže kritične meje in je pripadajoča vrednost  $P$  manjša od mejne vrednosti (Shapiro in Wilk, 1965).

### 3.2.4.3 Analiza homogenosti varianc s testom Levene

Test Levene smo uporabili za analizo homogenosti varianc k-skupin.

Test je definiran z enačbami:

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i\cdot} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i\cdot})^2}, \quad \dots(2)$$

$$Z_{ij} = \begin{cases} |Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot}|, & \bar{Y}_{i\cdot} \text{ is a mean of } i\text{-th group} \\ |Y_{ij} - \tilde{Y}_{i\cdot}|, & \tilde{Y}_{i\cdot} \text{ is a median of } i\text{-th group} \end{cases} \quad \dots(3)$$

$$Z_{..} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} Z_{ij} \quad Z_{i\cdot} = \frac{1}{N_i} \sum_{j=1}^{N_i} Z_{ij} \quad \dots(4)$$

$N$  - število podatkov v vseh skupinah;  $k$  - število skupin;  $N_i$  - število podatkov v skupini  $i$ ;  $Z_{ij}$  - absolutna razlika podatka  $j$  v skupini  $i$  od povprečja skupine  $i$ ,  $Z_{..}$  - povprečje zbranih podatkov  $Z_{ij}$  vseh skupin;  $Z_{i\cdot}$  - povprečje zbranih podatkov  $Z_{ij}$  skupine  $i$ .

Preverjamo hipotezo,  $H_0$ : variance vseh skupin so homogene,  $H_1$ : vsaj en par varianc skupin ni homogen.  $H_0$  zavrnemo, če dobljena vrednost  $W$  preseže zgornjo kritično vrednost  $F$  distribucije s  $k-1$  in  $N-k$  prostostnih stopenj pri izbrani stopnji zaupanja (Olkin, 1960; Brown in Forsythe, 1974).

### 3.2.4.4 Analiza podatkov z neparametričnim testom Kruskal-Walis

Test Kruskal-Walis je neparametrična metoda za analizo enakosti srednjih vrednosti (median) več skupin. Test je osnovan na rangiranju podatkov (Kruskal in Wallis, 1987). Najprej se podatke vseh skupin uredi po velikostnem redu in rangira z vrednostmi od 1 do N. N je število vseh podatkov. Nato se vsakemu podatku namesto njegove osnovne vrednosti določi vrednost ranga, ki ga je zasedel na lestvici. Za vsako skupino se izračuna vsoto pripadajočih rangov in potrdi oz. zavrže hipotezo  $H_0$ : skupine prihajajo iz iste populacije.  $H_0$  lahko zavrnemo, če dobljena vrednost  $H$  preseže kritično vrednost pri izbrani stopnji zaupanja.

Test Kruskal-Walis je definiran z enačbo:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1) \quad \dots(5)$$

$N$  - število vseh podatkov;  $R_i$  - rang podatka na mestu  $i$ ;  $n_i$  - število vrednosti v skupini  $i$ .

V kolikor hipoteza  $H_0$  drži, statistika testa Kruskal-Walis -  $H$  sledi  $\chi^2$  (chi square) porazdelitvi s  $k-1$  prostostnih stopenj.

### 3.2.4.5 Analiza podatkov s testom Mann-Whitney

Test Mann-Whitney je neparametričen test (test-U) za primerjavo dveh neodvisnih skupin preko njunih median. Test je prav tako osnovan na razvrščanju in rangiranju podatkov iz obeh skupin, tako da se jih najprej razvrsti po velikosti, nato pa vsakemu podatku pripiše vrednost ranga (od 1 do N; N je število vseh podatkov). Za vsako skupino se iz dobljenih rangov izračuna vsota rangov R.

Test Mann-Whitney je definiran z enačbo:

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} \quad \dots(6)$$

$R_l$  - vsota rangov skupine l,  $n_l$  - število podatkov v skupini l.

Preverjam hipotezo,  $H_0$ : skupini prihajata iz enakih populacij. Hipotezo  $H_0$  lahko zavrnemo, v kolikor dobljena vrednost  $z$  preseže kritično vrednost pri izbrani stopnji zaupanja (Mann in Whitney, 1947).

Ob predpostavki, da statistika- $U$  sledi normalni distribuciji, se manjšo od dobljenih vrednosti uporabi za izračun  $z$ -vrednosti.

$$z = \frac{U - m_U}{\sigma_U}, m_U = \frac{n_1 n_2}{2}, \sigma_U = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}. \quad \dots(7)$$

$m_U$  - povprečna vrednost  $U$ ;  $\sigma_U$  - standardni odklon  $U$ .

#### a) Korekcija Bonferroni

Pri uporabi testa Mann-Whitney za primerjavo več skupin, je potrebno za vsak par opraviti po en test Mann-Whitney. Ker gre v takšnem primeru za primerjavo k-neodvisnih skupin, se verjetnost za napako *tipa I*, ki predstavlja sprejetje lažno pozitivnih rezultatov, povečuje glede na število vseh izvedenih primerjav. Stopnja zaupanja ( $1-\alpha$ ) za zavrnitev  $H_0$  se s tem sorazmerno zmanjšuje. Da se temu izognemo, je potrebno za analizo k-neodvisnih skupin s testom Mann-Whitney uporabiti korekcijo vrednosti  $\alpha$  s popravkom Bonferroni, ki upošteva število vseh neodvisnih primerjav:  $\alpha_{BF} = \alpha / k$  (Bland in Altman, 1995; Bhandari in sod., 2003).

#### b) Velikost učinka (ang. effect size)

Velikost učinka ovrednotimo s Pearsonovim koreacijskim koeficientom  $r$ . Za izračun  $r$  faktorja se uporabi izraz:

$$r = \frac{Z}{\sqrt{N}} \quad \dots(8)$$

Vrednost  $r$  je med  $-1$  in  $1$ , kjer negativne vrednosti označujejo obratno sorazmerno povezanost primerjanih skupin, vrednost  $0$  označuje, da med skupinama ni povezanosti, pozitivne vrednost  $r$  pa označujejo sorazmerno povezanost primerjanih skupin (Cohen 1988; Field, 2013). Velikost učinka je določena z izračunano vrednostjo  $r$ :

$r = |0,1| \rightarrow$  majhen učinek

$r = |0,3| \rightarrow$  srednje velik učinek

$r = |0,5| \rightarrow$  velik učinek

### 3.2.5 Izolacija in analiza proteinov konjugant *S. erythraea*

#### 3.2.5.1 Izolacija proteinov

Za izolacijo proteinov smo pobrali  $2\text{ mL}$  brozge, centrifugirali ( $3000\text{ g}$ ,  $5\text{ min}$ ), odlili supernatant in s kapalko resuspendirali v  $2\text{ mL}$  pufra za čiščenje proteinov (poglavlje 3.1.5). Temu je sledilo ponovno centrifugiranje ( $3000\text{ g}$ ,  $5\text{ min}$ ). V primeru gojišča bogatega s peptidi (ABPM8 gojišče), smo čiščenje ponovili  $4x$ . Po čiščenju smo odlili supernatant in na vrtinčniku resuspendirali usedlino v  $0,5\text{ mL}$  pufra za proteinske vzorce (poglavlje 3.1.5; Preglednica 18). V primeru velike količine biomase (ABPM8 gojišče) smo dodali  $1\text{ mL}$  pufra. Nadaljevali smo z razbijanjem celic z ultrazvokom ( $4x 15\text{ s}$  s  $30\text{ s}$  intervali; v primeru  $1\text{ mL}$  pufra  $5x 15\text{ s}$  s  $30\text{ s}$  intervali). Celični lizat smo  $10\text{ min}$  centrifugiral pri  $14000$  obr./min na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Za zaviranje neželene proteolize so bili vzorci ves čas na ledu.

#### 3.2.5.2 Merjenje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo izmerili z metodo po Bradfordu. Za umeritveno krivuljo smo pripravili redčitve govejega serumskega albumina s koncentracijami od  $0,2\text{ mg/mL}$  do  $1,2\text{ mg/mL}$ . Za merjenje smo k  $40\text{ }\mu\text{L}$  Bradfordovega reagenta dodali  $160\text{ }\mu\text{L}$  vode ter  $4\text{ }\mu\text{L}$  vzorca, mešanico nekaj minut inkubirali pri sobni temperaturi in pomerili absorbanco pri valovni dolžini  $595\text{ nm}$ . Koncentracije proteinov smo določili na podlagi izmerjenih absorbanc umeritvene krivulje.

### 3.2.5.3 Detekcija HA-tag proteina s prenosom western

Detekcija proteinov s prenosom western obsega naslednje korake: denaturacija vzorcev, elektroforezna ločba s SDS-PAGE, prenos proteinov na nitrocelulozno membrano, inkubacija s protitelesi in detekcija vezanih protiteles.

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

Za analizo proteinov smo najprej pripravili vzorce. K 50 µg proteinov smo dodali ustrezен volumen 6x nanašalnega pufra in 10 minut segrevali pri temperaturi 95 °C. V primeru vzorcev iz ABPM8, smo dodali dvakrat več proteinov. Temu je sledilo centrifugiranje pri 14000 obr./min 5 min.

Za ločitev proteinov po velikosti, smo pripravili poliakriamidni gel iz ločevalnega in koncentracijskega dela različnih zamreženosti (Preglednica 32). Gelska elektroforeza je potekala približno 45 min pri 25 mA na gel (uporabili smo elektroforezni pufer za SDS-PAGE). Poleg vzorcev smo na gel nanesli tudi 7 µL standarda za določanje molekulske mase proteinov.

Preglednica 32: Sestavine za poliakriamidni gel; ločevalni in koncentracijski del (za pripravo enega gela).

	Ločevalni (15 %) gel	Koncentracijski gel
30 % bis-akrilamid	2,82 mL	0,625 mL
1M Tris pH 8,8	1,875 mL	/
1M Tris pH 6,8	/	1,25 mL
10 % SDS	75 µL	50 µL
APS	22,5 µL	15 µL
TEMED	11,25 µL	7,5 µL
dH <sub>2</sub> O	2,135 mL	3,075 mL

\*TEMED smo v zmes dodali neposredno pred vlitjem, s puhalko premešali in zmes vlili med stekelca. Najprej smo vlili ločevalni gel, nanj vlili dH<sub>2</sub>O in počakali, da se je strdil (20-30 min). Temu je sledilo še vlivanje koncentracijskega dela.

b) Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano

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

c) Detekcija HA-tag proteinov s specifičnimi protitelesi

Po prenosu smo preverili uspešnost prenosa z raztopino za detekcijo proteinov na membranah (poglavlje 3.1.5, Preglednica 21). Označili smo položaj lestvice molekulske mase proteinov in nato sprali barvilo z dH<sub>2</sub>O (2–3 spiranja po nekaj minut). Temu je sledila 40 min blokada v TBSM (poglavlje 3.1.5, Preglednica 22) in hibridizacija primarnih protiteles (protitelo + TBSM; 1:500, 5 mL). Hibridizacija je potekala čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo nadaljevali s spiranjem v 1x TBS (3x 10 min) in hibridizacijo sekundarnih protiteles (protitelo + TBSM; 1:1000, 5 mL). Hibridizacija je potekala 75 min na sobni temperaturi in za tem še 4x spiranje v 1x TBS.

d) Detekcija vezanih protiteles z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti

Primarna protitelesa so se vezala na HA-tag, sekundarna protitelesa pa so se vezala na primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP). Za detekcijo vezanih protiteles smo uporabili raztopino DAB. DAB je v prisotnosti peroksidaza reagiral s HRP, tako da smo dobili netopno rjavo liso na lokacijah, kjer so bila s peroksidazo konjugirana protitelesa vezana na vzorce proteinov.

## 4 REZULTATI

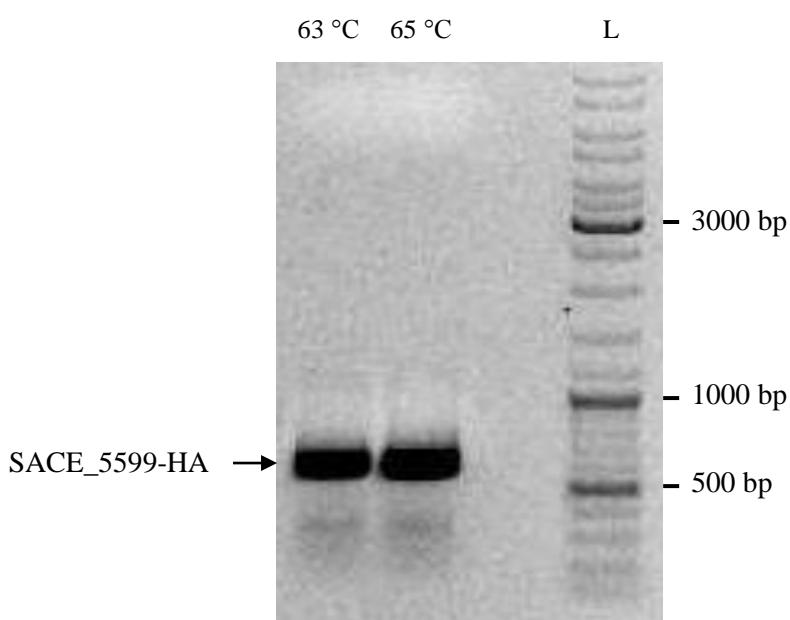
Cilj magistrskega dela je bilo čezmerno izraziti gen SACE\_5599 v WT sevu *S. erythraea* in ugotoviti, ali čezmerno izražanje tega gena in posledično povišana sinteza proteina vplivata na donos eritromicina v laboratorijskem merilu.

### 4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE

Z molekulskim kloniranjem smo pripravili plazmide. Vstavili smo zapis za protein SACE\_5599-HA z močnim konstitutivnim promotorjem *ermE\**. Plazmid smo pripravili v dveh različicah, s promotorjem *ermE\** z vezavnim mestom za ribosom (ang. ribosome bidding site - RBS) - *ermE\*/RBS* in *ermE\** brez vezavnega mesta za ribosom.

#### 4.1.1 Pomnoževanje gena SACE\_5599-HA s pomočjo reakcije PCR

Na začetku raziskovalnega dela smo s PCR reakcijo namnožili nukleotidno zaporedje SACE\_5599 in mu dodali 9 aminokislin, ki sestavljajo HA-epitop (HA-tag) (poglavlje 3.2.1.2). Za to reakcijo smo načrtovali začetna oligonukleotidna SACE\_5599-F in SACE\_5599-R-HA. Pri reakciji PCR, kjer smo za matrico uporabili plazmid pVME53, smo pričakovali pomnožek, ki ustreza velikosti gena SACE\_5599 in zapisu za HA-tag (582 bp).



Slika 7: Analiza produktov reakcije PCR za pomnožitev gena SACE\_5599-HA na 0,8 % agaroznem gelu pri dveh različnih temperaturah.

Pri velikosti približno 600 bp sta vidni močni lisi produktov (levo), ki smo jih pomnožili z začetnima oligonukleotidoma SACE\_5599-F in SACE\_5599-R-HA pri temperaturah 63 °C in 65 °C. Elektroforezni standard velikosti (desno) je označen s črko L.

Na Sliki 7 vidimo, da smo pridobili PCR produkt pričakovane velikosti (600 bp). Ker je skupna dolžina gena in epitopa 582 bp, smo sklepali, da smo z SACE\_5599-F in SACE\_5599-R-HA uspeli pomnožiti želeni produkt pri obeh temperaturah.

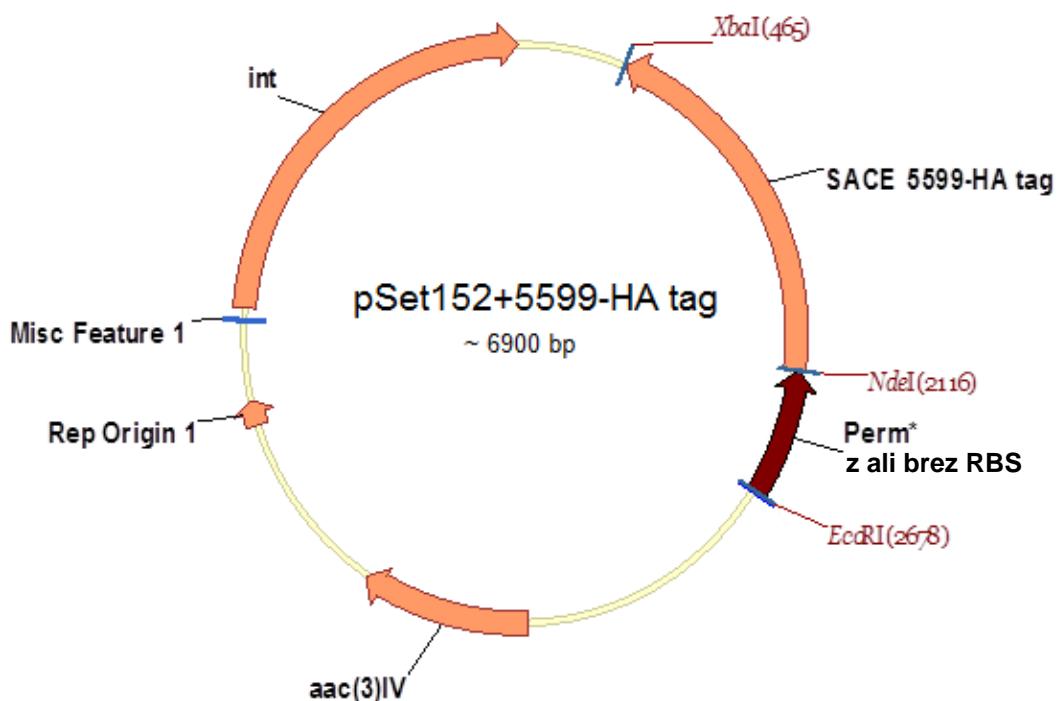
#### **4.1.2 Priprava plazmidnega konstrukta pSet152+ermE\*+SACE\_5599-HA**

Za čezmerno izražanje pomnoženega gena SACE-5599-HA v *S. erythraea* smo morali produkt PCR klonirati v plazmid pSet152 z močnim konstitutivnim promotorjem *ermE\**. Vektor pSet152 omogoča konjugativni prenos plazmida iz bakterije *E. coli* ET12567 pUZ8002 v kromosom *S. erythraea*, uporabljeni promotor *ermE\** pa omogoča konstitutivno izražanje kloniranih genov. Pred konjugacijo smo plazmide namnožili v bakteriji *E. coli* DH10β in s sekvenciranjem pri zunanjem partnerju (Macrogen, J. Koreja) potrdili pravilno zaporedje gena. S tem smo se prepričali, da med pomnoževanjem gena s PCR reakcijo ni prišlo do napak.

##### **4.1.2.1 Plazmid pSet152+*ermE\****

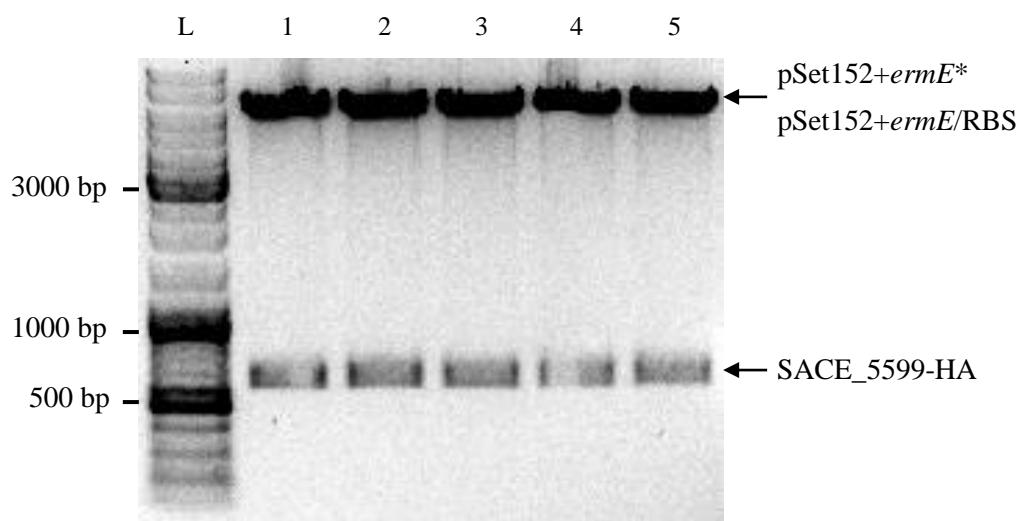
Ekspresijski vektor pSet152 z dodanim močnim promotorjem *ermE\** smo uporabili kot konjugativen plazmid za prenos gena SACE\_5599-HA v kromosom *S. erythraea*.

Za konstrukcijo plazmida smo PCR produkt SACE\_5599-HA po izolaciji iz reakcijske zmesi (poglavlje 3.2.1.4) rezali z restrikcijskima endonukleazama NdeI in XbaI (poglavlje 3.2.1.5) in ga ligirali v ekspresijski vektor pSet152+*ermE\** (poglavlje 3.2.1.6), ki smo ga predhodno odprli z enakima encimoma. Shema pridobljenih plazmidov pSet152+*ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA* oz. pSet+*ermE\*+SACE\_5599-HA* je prikazana na Sliki 8. Tako pripravljen plazmid smo najprej namnožili v bakterijah *E. coli* DH10β (poglavlje 3.2.2.1). Iz izbranih transformant smo nato izolirali plazmidno DNA (poglavlje 3.2.1.7), z restrikcijskimi endonukleazami preverili vstavitev inserta (poglavlje 3.2.1.5) in s sekvenciranjem potrdili pravilno nukleotidno zaporedje vstavljenega gena. S potrjenima plazmidoma smo transformirali sev bakterije *E. coli* ET12567 pUZ8002.



Slika 8: Shematski prikaz plazmidov pSet152+*ermE\**/RBS+SACE\_5599-HA in pSet152+*ermE\**+SACE\_5599-HA

Gen *int* predstavlja gen za integrizo bakteriofaga  $\Phi$ C31, ki omogoča integracijo plazmida v kromosom aktinomicete, RepOrigin1 je odsek za replikacijo plazmida v celicah *E. coli*, aac(3)IV omogoča rezistenco na apramicin, Perm\* pa predstavlja močan konstitutivni promotor (*ermE\**).



Slika 9: Preverjanje vstavitev gena SACE\_5599-HA v ekspresijski vektor pSet152+*ermE\**/RBS in pSet152+*ermE\** na 0,8 % agaroznem gelu.

L - elektroforezni standard velikosti, vzorci od 1-5 - so nanešeni izolirani plazmidi po rezanju z restriktičeskima endonukleazama NdeI in XbaI. Plazmide pSet152+*ermE\**/RBS+5599-HA in pSet152+*ermE\**+5599-HA smo izolirali iz *E. coli* DH10 $\beta$ .

Tome M. Čezmerno izražanje homologa regulatornega gena *lmbU* pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea*.  
Mag. delo. (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2013



Slika 10: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje SACE\_5599-HA.

#### 4.1.3 Pridobitev konjugant *S. erythraea* z vstavljenima plazmidoma

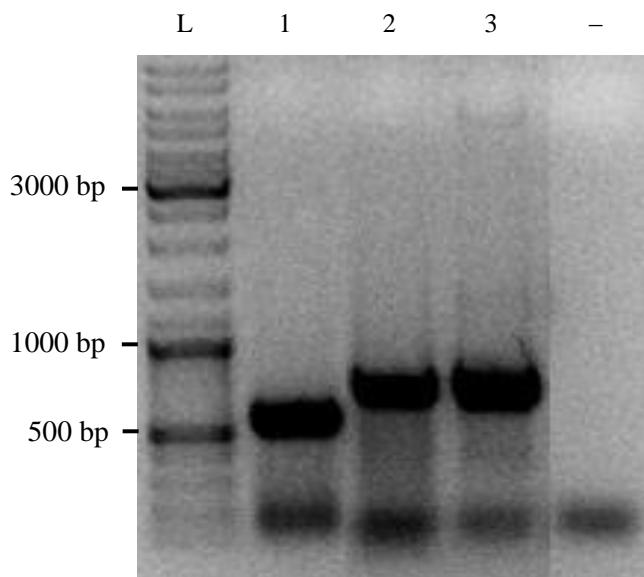
S konjugativnim prenosom smo plazmida na osnovi vektorja pSet152+*ermE*\* prenesli iz donorskega seva bakterije *E. coli* ET12567 pUZ8002 v bakterijo *S. erythraea* (poglavje 3.2.2.2).

Plazmida pSet152+*ermE*/RBS+SACE\_5599-HA in pSet152+*ermE*\*+SACE\_5599-HA smo najprej transformirali v celice *E. coli* ET12567, ki imajo plazmid pUZ8002 (poglavje 3.2.1.8) z zapisom za vse potrebne elemente za konjugativni prenos plazmidov v *S. erythraea*. Transformacijsko zmes smo nacepili na plošče s selekcijskim gojiščem 2TY z apramicinom, kanamicinom in kloramfenikolom. Rezistenca na apramicin je prisotna na plazmidu pSet152, rezistenca na kloramfenikol je prisotna v genomu *E. coli* ET12567, rezistenco na kanamicin pa nosi plazmid pUZ8002.

Transformante *E. coli* ET12567 smo nagojili in uporabili za konjugacijo v *S. erythraea* (poglavje 3.2.2.2). Postopek konjugacije je bil učinkovit, saj smo za oba plazmida pSet152+*ermE*/RBS+SACE\_5599-HA in pSet152+*ermE*\*+SACE\_5599-HA na trdnih gojiščih za sporulacijo (SM-MgCl<sub>2</sub>) pridobili preko 30 morfološko značilnih konjugantov *S. erythraea*. Kontrolne konjugante *S. erythraea* s plazmidom pSet152+*ermE*\* brez gena SACE\_5599 so imeli raziskovalci v Acies Bio že pripravljene po enakem postopku.

#### 4.1.4 Preverjanje uspešnosti konjugacije s PCR na osnovi kolonij

Za vse izbrane neodvisne konjugante *S. erythraea* smo uspešnost in mesto vstavitve plazmida pSet152+*ermE*\* v kromosom preverili z metodo PCR na osnovi kolonije (poglavje 3.2.1.9). Za preverjanje uspešnosti vstavitve plazida z genom SACE\_5599 smo uporabili začetni oligonukleotid *ermE*\*-F (ki se prilega na zaporedju promotorja *ermE*\* v uporabljenem plazmidu) in SACE\_5599-R (pričakovana velikost je 746 bp). Za pozitivno kontrolo smo uporabljali začetna oligonukleotida SACE\_5599-F in SACE\_5599-R in izolirano genomsko DNA naravnega seva *S. erythraea*. S temo oligonukleotidoma smo pomnožili nativni gen SACE\_5599 v genomu bakterije. Pričakovana velikost je bila enaka velikosti gena SACE\_5599, 555 bp. Pomnoženi produkti PCR so prikazani na Sliki 11.



Slika 11: Preverjanje uspešnosti vstavitve plazmida s PCR reakcijo na osnovi kolonije na 0,8 % agaroznem gelu.

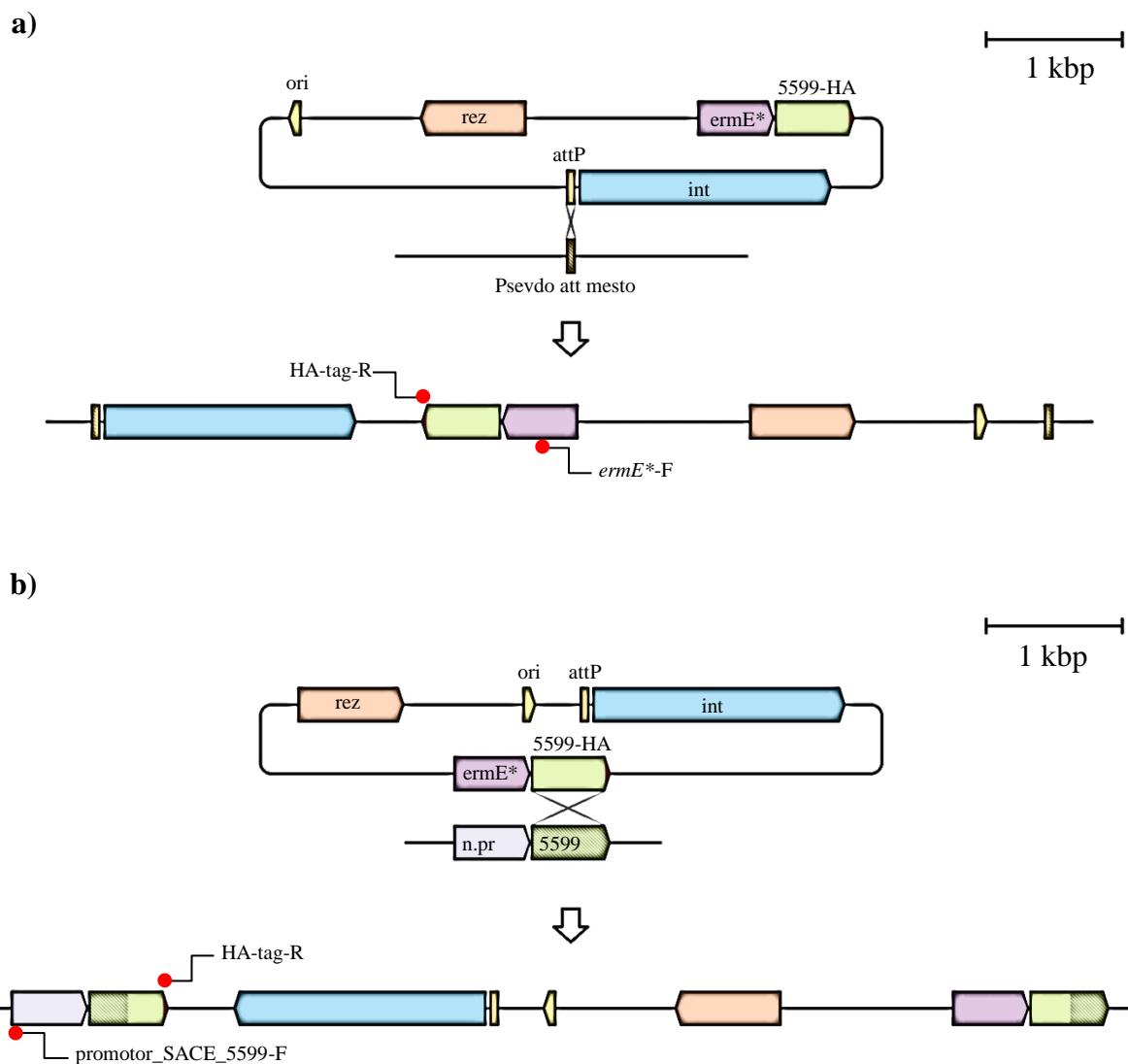
PCR-reakcije pomnoževanja vključenih plazmidov v izbranem neodvisnem klonu *S. erythraea*. **L** - elektroforezni standard velikosti; **1** - pozitivna kontrola z izbranim sevom wt 1.11 in začetnima oligonukleotidoma SACE\_5599-F, SACE\_5599-R; **2** - preverjanje uspešnosti integracije v izbrani konjuganti z začetnima oligonukleotidoma *ermE*\*-F in SACE\_5599-R; **3** - pozitivna kontrola s plazmidom pSet152+*ermE*\*+SACE\_5599-HA in začetnima oligonukleotidoma *ermE*\*-F, SACE\_5599-R; **-** - negativna kontrola z naravnim sevom *S. erythraea* in začetnima oligonukleotidoma *ermE*\*-F, SACE\_5599-R.

Lisa pri vzorcu 3 na Sliki 11, kjer smo preverjali uspešnost vstavitve, je pričakovane velikosti (746 bp). Iz tega smo sklepali, da je v kromosому bakterije prisotna dodatna kopija gena SACE\_5599, ki se nahaja neposredno za promotorjem *ermE*\*, kar potrjuje uspešno integracijo plazmida pSet152+*ermE*\*+SACE\_5599-HA v kromosom.

#### **4.1.5 Preverjanje načina in mesta vstavitve plazmida pSet152+ermE\*+SACE\_5599-HA s PCR na osnovi kolonij**

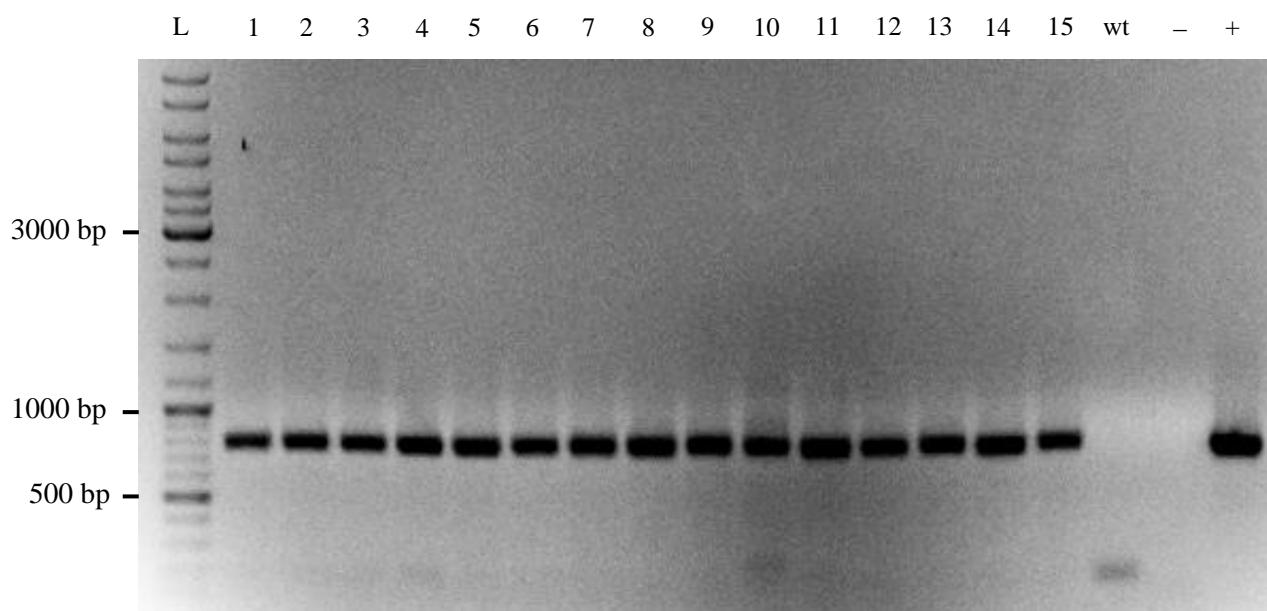
Z reakcijo PCR na osnovi kolonije (Slika 11) smo potrdili uspešno integracijo plazmidnih kontruktov v kromosom. Ta rezultat pa še ne pove, ali se je plazmid vstavil s homologno rekombinacijo na mesto naravne kopije gena SACE\_5599 ali s pomočjo bakteriofagne integraze v psevdo attB mesto v kromosому *S. erythraea*. Za odgovor na to vprašanje smo morali uporabiti začetna oligonukleotida, ki omogočata detekcijo dveh kopij gena SACE\_5599, od katerih ima ena še zaporedje HA-epitopa.

Za preverjanje načina in mesta vstavitve plazmida pSet152+ermE\* v kromosomalno DNA smo uporabili začetne oligonukleotide promotor\_SACE\_5599-F (katerega zaporedje sovpada z nativno promotorsko regijo pred genom SACE\_5599 v *S. erythraea*), ermE\*-F (ki se prilega zaporedju uporabljenega konstitutivnega promotorja ermE\*) in HA-tag-R (ki se prilega zaporedju HA-epitopa, ki smo jo dodali na konec dodatno vstavljeni kopiji gena SACE\_5599). Začetna oligonukleotida SACE\_5599-F in SACE\_5599-R sta služila za pozitivno kontrolo. Pri vstavitvi v psevointegracijsko mesto attB (Slika 12a, pričakovana velikost 773 bp) se neposredno pred genom SACE\_5599-HA nahaja močan promotor ermE\*; pri vstavitvi preko homologne rekombinacije (Slika 12b, pričakovana velikost 857 bp) pa je pred dodatno kopijo gene SACE\_5599-HA nativni promotor. Obe možnosti sta shematsko prikazani na Sliki 12, kjer so tudi označena mesta prileganja začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo določili način in mesto vstavitve plazmidov pSet152+ermE\*+SACE\_5599-HA in pSet152+ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA v kromosom bakterije *S. erythraea*.



Slika 12: Shematski prikaz dveh možnih načinov vstavitev plazmidov pSet152+*ermE\**+SACE\_5599-HA in pSet152+*ermE\*/RBS*+SACE\_5599-HA v kromosom bakterije *S. erythraea*.

**a)** Gen **int** kodira protein integrzano. Ta omogoča vstavitev v psevdo att mesto (v kromosomu bakterije *S. erythraea*) preko attP mesta na plazmidu. Označeni sta mesti in začetna oligonukleotida za preverjanje vstavitev preko mehanizma z integrzano. **ori** - odsek za replikacijo plazmida v celicah *E. coli*; **rez** - rezistenca na apramicin; **ermE\*** - močan konstitutiven promotor; **5599-HA** - gen SACE\_5599-HA; **int** - gen za integrzano iz bakteriofaga ΦC31M; **attP** - prepoznavno mesto attP za vstavitev v kromosom bakterije. **b)** Vstavitev plazmida preko homologne rekombinacije med nativnim genom SACE\_5599 in genom SACE\_5599-HA. Označeni sta mesti in začetna oligonukleotida za preverjanje vstavitev preko homologne rekombinacije. **n.pr** - nativni promotor gena SACE\_5599 v bakteriji *S. erythraea*; **5599** - gen SACE\_5599 v bakteriji *S. erythraea*.



Slika 13: Preverjanje mesta vstavitve konstrukta s PCR reakcijo na osnovi kolonije z *ermE\**-F in HA-tag-R (vzorci ha1.1-1.15) na 0,8 % agaroznem gelu.

Opis: PCR-reakcije pomnoževanja vključenih plazmidov v izbranem neodvisnem klonu *S. erythraea*. **L** - elektroforezni standard velikosti; **1-15** preverjanje uspešnosti z izbranimi sevi ha1.1 do ha1.15 z začetnima oligonukleotidoma *ermE\**-F in HA-tag-R; **wt** - kontrola z naravnim sevom *S. erythraea* z *ermE\**-F in HA-tag-R; **-** - negativna kontrola; **+** - pozitivna kontrola s plazmidom pSet152+*ermE\**+SACE\_5599-HA z *ermE\**-F in HA-tag-R.

Pri vseh izbranih sevih smo z začetnima oligonukleotidoma *ermE\**-F in HA-tag-R dobili lise ustrezne velikosti (773 bp). Iz tega smo sklepali, da se je v vseh izbranih kolonijah konstrukt vstavil preko bakteriofagne integraze. Vstavljeni dodatni kopiji gena SACE\_5599-HA je torej pod transkripcijskim nadzorom močnega konstitutivnega promotorja *ermE\**. Pri preverjanju vstavitve s homologno rekombinacijo nismo dobili lise pri nobenem izbranem sevu. Iz tega smo sklepali, da se je dodaten gen SACE\_5599-HA vstavil le preko bakteriofagne integraze.

Po preverjanju uspešnosti in mesta vstavitve plazmida smo izbrane seve razdelili v 4 skupine. Razdelili smo jih na podlagi vstavljenega plazmida.

#### Skupine kombinacij sevov in konstruktorov:

- **ha1:** *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\** +SACE\_5599-HA
- **ha2:** *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA*
- kontrola (**wtsK**): *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\**
- kontrola (**wtK**): *S. erythraea* NRRL23338

## 4.2 PRODUKCIJA ERITROMICINA V SEVIH *S. erythraea* Z DODATNO KOPIO GENA SACE\_5599

### 4.2.1 Kultivacija konjugant *S. erythraea* in analiza produkcije eritromicina z biološkim testom

Pridobljene seve *S. erythraea* z dodatno kopijo gena SACE\_5599 in ustrezne kontrolne seve smo razdelili v več skupin. V skupini hal smo testirali 25 vzorcev, v ha2 20, v wtK 19 in v wtsK 14 vzorcev. Izbrane konjugante in kolonije kontrolnih sevov smo najprej gojili na trdnem sporulacijskem gojišču ABSM4 (poglavlje 3.2.2.3). Za analizo produkcije eritromicina smo namnožili biomaso v tekočem vegetativnem gojišču ABVM1 in jo nato inokulirali v tekoče produksijsko gojišče ABPM8 (poglavlje 3.2.2.4). Gojenje smo ponovili v več neodvisnih poskusih, kjer smo vsakega od neodvisnih klonov gojili v paralelkah. Po končanem gojenju smo opravili ekstrakcijo eritromicina brez soli (poglavlje 3.2.3.1) ter z mikrobiološkim testom aktivnosti določili koncentracije antibiotika (poglavlje 3.2.3.2). Uspešnost mikrobiološkega testa smo preverjali z internim standardom. Rezultate produkcije uspešno opravljenih bioloških testov smo statistično obdelali s programom IBM SPSS Statistics 20. Zbrane podatke smo glede na vstavljen plazmid razvrstili v štiri skupine (wtK, wtsK, ha1, ha2) in jih analizirali z izbranimi statističnimi testi (poglavlje 3.2.4).

### 4.2.2 Statistična obdelava podatkov produkcije eritromicina

Cilj statistične obdelave podatkov je bil, da smo preverili, ali med posameznimi skupinami obstajajo statistično značilne razlike v produkciji eritromicina. Najprej smo morali določiti lastnosti vseh skupin, npr.: porazdelitev podatkov v skupini, homogenost varianc med skupinami. Na podlagi teh lastnosti smo določili, da sta za analizo razlik primerna neparametrični test Kruskal-Walis in post-test Mann-Whitney (kjer smo upoštevali Bonferronijevo korelacijo). Pri vseh statističnih testih smo določili 95 % stopnjo zaupanja.

Preglednica 33: Povzetek rezultatov statistične analize podatkov.

Potek analize*	Skupina	wtK	wtsK	ha1	ha2
1)	Končno število meritev	19	14	77	49
2)	Analiza osamelcev <b>(število osamelcev)</b>	0	0	1	0
3)	Test Shapiro-Wilk <b>(normalna distribucija)</b>	DA	NE	NE	DA
4)	Test Levene <b>(homogenost varianc)</b>	Variance skupin niso homogene.			
5)	Test Kruskal-Walis	Vsaj dve skupini sta med seboj značilno različni.			
6)	Test Mann-Whitney <b>(statistično značilno različne skupine)**</b>	X	X	X	X

\* Oznaka v tem stolpcu se nanaša na potek analize, ki je razložena v nadaljevanju.

\*\* S simbolom X so označeni pari skupin, ki so na podlagi testov Mann-Whitney med seboj statistično značilno različni.

### 1) Odstranitev neustreznih podatkov

Najprej smo izločili rezultate tistih bioloških testov, pri katerih z različnimi koncentracijami internega standarda nismo dobili ustrezne umeritvene krivulje. Izločili smo tudi rezultate tistih vzorcev, pri katerih je pri postopku gojenja bakterij prišlo do očitnih napak (okužba), ki so vplivale na rast in produkcijo eritromicina. V Prilogi 1 je preglednica produkcije eritromicina v neodvisnih klonih bakterije *S. erythraea*.

### 2) Preverjanje prisotnosti osamelcev s pravilom o označevanju osamelcev

Prisotnost osamelcev smo preverili s pravilom o označevanju osamelcev (poglavlje 3.2.4.1). Ugotovili smo, da en podatek pri skupini ha1 (ha1.15, gojenje 1 - 203,95 mg/L) presega določeno zgornjo mejo in tako predstavlja potencialnega osamelca. Podatek smo na podlagi velikega odstopanja od ostalih pet podatkov tega neodvisnega klena (130,8, 126,35, 79,6, 70,54 in 128,57 mg/L) izločili iz nadaljnjih analiz (Priloga B).

### 3) Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

S testom Shapiro-Wilk smo preverili, ali so posamezne skupine podatkov normalno porazdeljene (poglavlje 3.2.4.2). Ugotovili smo, da podatki v skupini wtsK in ha1 ne ustrezajo normalni porazdelitvi, v ostalih dveh (wtK in ha2) pa normalni porazdelitvi ustrezajo (Priloga C).

#### 4) Analiza homogenosti varianc s testom Levene

S testom Levene smo preverili homogenost varianc med skupinami (poglavlje 3.2.4.3). Ugotovili smo, da variance skupin pri 95 % stopnji zaupanja med seboj niso homogene (Priloga D).

#### 5) Izbira ustreznega testa za analizo statistično značilnih razlik med skupinami

Izbirali smo med:

- parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom, ki se uporablja v primeru, ko so podatki v vseh skupinah normalno porazdeljeni in so variance med skupinami homogene;
- neparametričnim testom Kruskal-Walis s post-testom Mann-Whitney, ki se uporablja v primeru, če vsaj ena od skupin ni v normalni porazdelitvi, ali če variance med skupinami niso homogene.

Ugotovili smo, da podatki v skupinah wtsK in ha1 ne ustrezajo normalni porazdelitvi in da variance med skupinami niso homogene. Zaradi tega smo za medsebojno primerjavo skupin uporabili neparametrični test Kruskal-Walis s post-testom Mann-Whitney in Bonferronijevo korelacijo.

#### 6) Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

S testom Kruskal-Walis (poglavlje 3.2.4.4) smo ugotovili, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni (Priloga E). Test Kruskal-Walis nam ne pove katere skupine se med seboj statistično značilno razlikujejo. Da bi to ugotovili, smo uporabili še serijo post-testov Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo.

#### 7) Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom Mann-Whitney in Bonferronijevo korelacijo

S testom Mann-Whitney smo med seboj posamično primerjali vseh pet skupin. Zaradi večjega števila testov se povečuje verjetnost za sprejetje lažno pozitivnih rezultatov, zato smo upoštevali še Bonferronijevo korelacijo stopnje zavrnitve testa (poglavlje 3.2.4.5). Iz rezultatov vseh testov Mann-Whitney smo ugotovili, da se pri izbrani stopnji zavrnitve  $\alpha = 0,0125$  med seboj statistično značilno razlikujejo trije pari skupin. Prvi par je wtK in ha2, drugi par je wtsK in ha2, tretji par pa je ha1 in ha2 (Priloga F).

#### 4.2.3 Rezultati produkcije eritromicina

Končni rezultati analize produkcije antibiotika eritromicin so prikazani v Preglednici 33. Vsi podatki, ki smo jih pridobili pri uspešnih bioloških testih, so zbrani v Prilogi 1. Povprečne vrednosti in standardni odkloni posameznih skupin so izračunani iz podatkov, ki so jim bili predhodno odstranjeni podatki okuženih neodvisnih klonov.

Preglednica 34: Rezultati produkcije eritromicina v različnih sevih bakterije *S. erythraea*

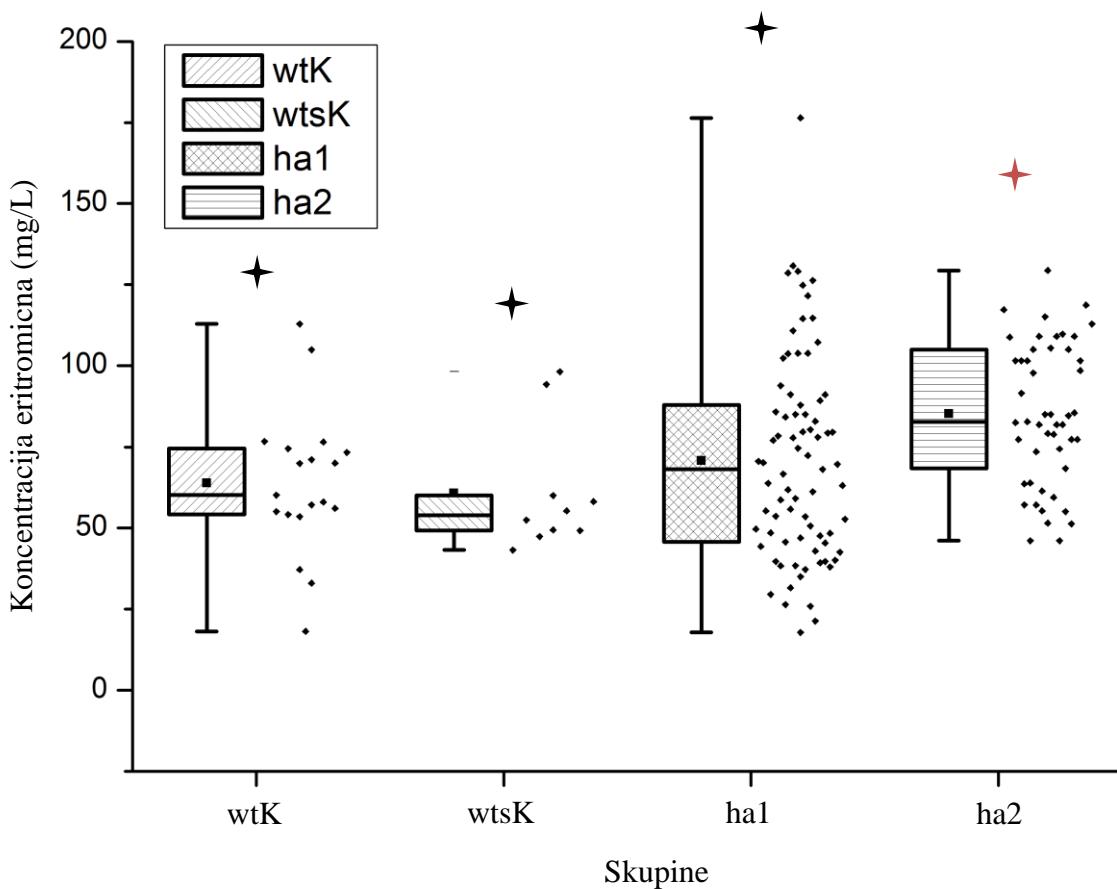
Oznaka skupine	Oznaka seva	Povprečna vrednost eritromicina (mg/L)	Standardni odklon (mg/L)	Sprememba produkcije eritromicina glede na wtK (%)	Sprememba produkcije glede na wtsK (%)
<b>wtK</b>	<i>S. erythraea</i> WT	63,8	22,3	-	-
<b>wtsK</b>	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE*</i>	60,5	17,7	-5,2	-
<b>ha1</b>	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE*</i> SACE_5599HA	70,5	31,4	10,5	16,5
<b>ha2</b>	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE*/RBS</i> SACE_5599HA	85,2	21,9	33,5	40,8

Rezultati produkcije kažejo, da so neodvisni kloni iz skupine ha2 (konjugante *S. erythraea* pSet152 *ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA*) v povprečju proizvajali največje količine eritromicina (85,2 mg/L). Najnižjo količino sta proizvajali obe kontrolni skupini, in sicer wtK (*S. erythraea* brez plazmida) s povprečno proizvodnjo 63,8 mg/L in wtsK (*S.*

*erythraea* s plazmidom pSet152 *ermE\** brez gena SACE\_5599) malo manj (60,5 mg/L). Skupina ha1 (konjugante *S. erythraea* pSet152 *ermE\** SACE\_5599-HA) pa je proizvajala nekoliko več od kontrolnih skupin (70,5 mg/L), a skupine med seboj niso statistično različne. Vpliv prekomernega izražanja gena SACE\_5599 na produkcijo eritromicina v skupinah ha1 in ha2 smo ovrednotili glede na koncentracije eritromicina v obeh kontrolnih skupinah, saj se kontroli med seboj nista statistično razlikovali.

Prekomerno izražanje gena SACE\_5599-HA je v primeru skupine ha2 (plazmid pSet152 *ermE\*/RBS SACE\_5599HA*, promotorska regija *ermE\** z vezavnim mestom za ribosom) pozitivno vplivalo na produkcijo eritromicina. Povprečna vrednost eritromicina je bila višja od povprečne vrednosti v kontrolnih skupinah wtK in wtsK (za 33,5 % in 40,8 % v enakem vrstnem redu). Izboljšanje pri skupini ha2 se statistično značilno razlikuje od produkcije pri obeh kontrolnih skupinah. Zanimivo je tudi, da je imela skupina ha2 statistično značilno razliko tudi z drugo skupino konjugant ha1 (in sicer za 20,9 % višjo produkcijo). Skupina ha1 je imela plazmid, ki je bil v promotorski regiji *ermE\** brez vezavnega mesta za ribosom. Kljub temu ima tudi ha1 skupina višjo produkcijo od kontrolnih skupin wtK in wtsK (10,5 % in 16,5 % v enakem vrstnem redu), a razlika ni statistično značilna (Priloga F).

Slika 14 je grafični prikaz podatkov vseh skupin z grafikoni kvartilov. Iz grafikonov lahko razberemo vrednosti median in povprečnih vrednosti. Grafikoni z določenimi odseki pregledno prikažejo distribucijo podatkov po skupinah. Odseki, ki grafikon opišejo, so: spodnja meja, ki predstavlja nad 5 % podatkov; meja nad 25 % podatkov - Q1; meja nad 50 % podatkov - Q2 ali mediana; meja nad 75 % podatkov - Q3 in zgornja meja pri  $2,2 * \text{IQR}$ . Poleg grafikona kvartilov je še prikaz razpršenosti podatkov v posamezni skupini.



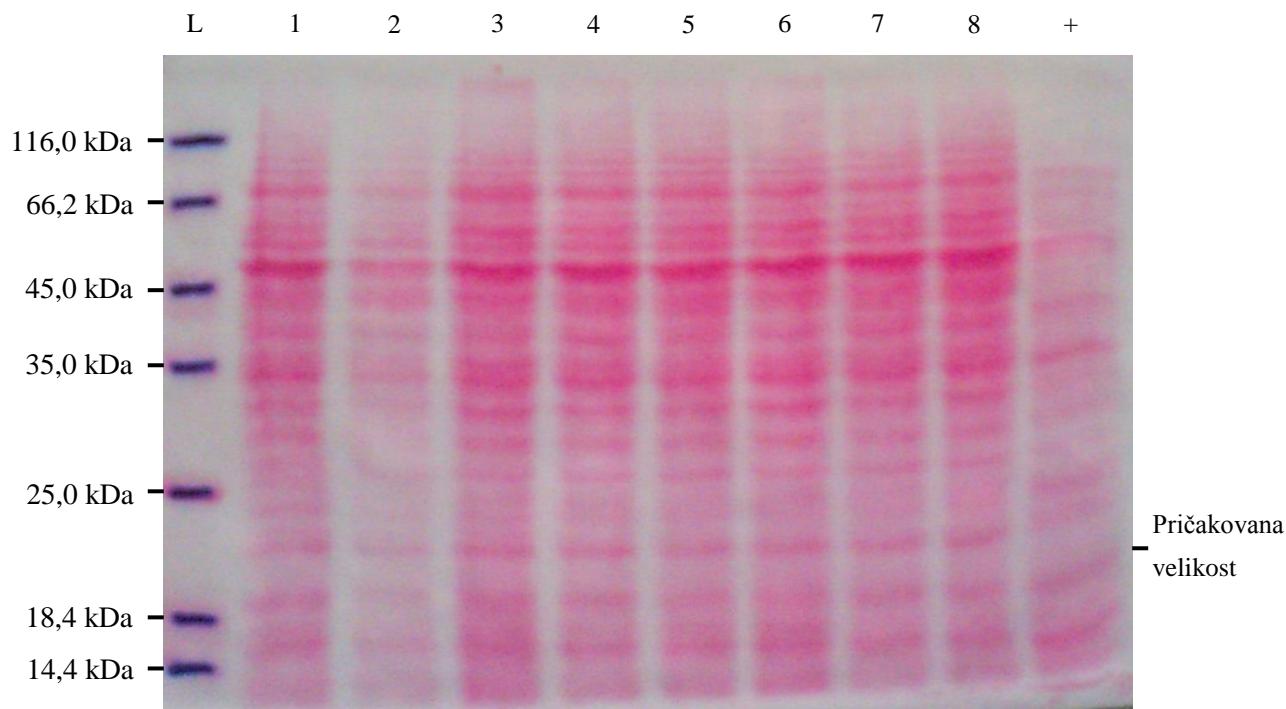
Slika 14: Rezultati produkcije antibiotika eritromicina prikazani z grafikoni kvartilov in razpršenostjo podatkov.

Kvadrat v sredini vsakega grafikona je označena povprečna vrednost, sredinska vodoravna črta je mediana. Grafikoni so razdeljeni na pet odsekov. Na odseku nad in pod mediano do vodoravnih črt je IQR (50 % podatkov). Statistično značilno različne skupine podatkov ha2 z wtK, ha2 z wtsK in ha2 z ha1 so označene z zvezdico. Iz grafične predstavitev podatkov je razvidno, da se razporeditev pri skupini ha2 očitno razlikuje od ostalih treh.

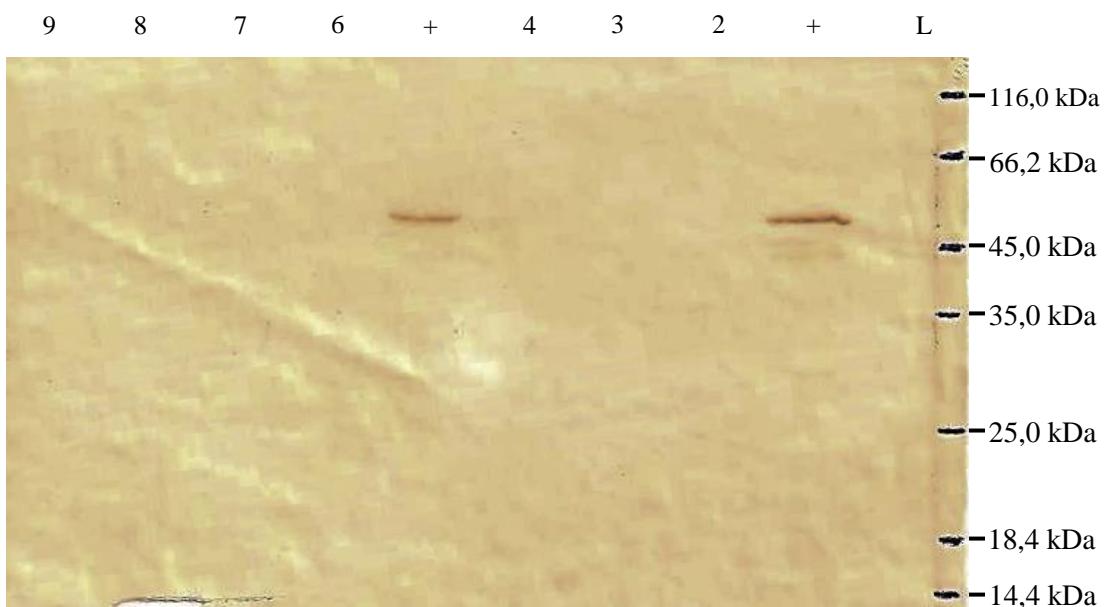
#### 4.3 ANALIZA SINTEZE PROTEINOV S PRENOSOM WESTERN

Po analizi produkcije eritromicina v različnih sevih bakterije *S. erythraea* smo želeli potrditi še sintezo dodatne kopije proteina SACE\_5599-HA z metodo prenosa western. Izbrali smo različne neodvisne klone (različne skupine konjugant bakterije *S. erythraea* s konstruktom pSet152+ermE\*+SACE\_5599-HA oz. pSet152+ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA), izolirali proteine (poglavje 3.2.5.1) in izmerili njihovo koncentracijo (poglavje 3.2.5.2). Izolirane proteinske ekstrakte ustrezne koncentracije smo ločili na 15 % poliakrilamidnem gelu ob prisotnosti SDS (poglavje 3.2.5.3 a). Temu je sledil prenos

proteinov na nitrocelulozno membrano (poglavlje 3.2.5.3 b). Po prenosu smo vedno preverili uspešnost le-tega z barvanjem s Ponceau S. (Slika 15). Temu je sledila vezava primarnih in sekundarnih protiteles. Na sekundarnih protitelesih je bil konjugiran encim HRP. V večini primerov smo detekcijo specifično vezanih protiteles opravili z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti (poglavlje 3.2.5.3 c in d), v enem primeru pa smo s pomočjo raziskovalcev na Inštitutu Jožef Stefan opravili še detekcijo s kemiluminiscenčno reakcijo. Pričakovana velikost proteina je bila 21,47 kDa. Za pozitivno kontrolo smo uporabljali lizat s proteinom EryK, ki je imel dodan epitop HA (EryK-HA). Pozitivno kontrolo so predhodno pripravili raziskovalci v laboratoriju Acies Bio. Pričakovana velikost kontrole je 44,85 kDa.



Slika 15: Preverjanje prenosa proteinov na nitrocelulozno membrano z barvanjem s Ponceau S.  
Na sliki je prikazan uspešen prenos proteinov na nitrocelulozno membrano. L - proteinski standard velikosti; 1-8 vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha1.3, ha1.6, ha1.7, ha1.8, ha1.9, ha1.12, ha1.13, ha1.14 in ha1.15 v enakem vrstnem redu) z integriranim plazmidom Set152+*ermE\**+SACE\_5599-HA; + - pozitivna kontrola EryK-HA.



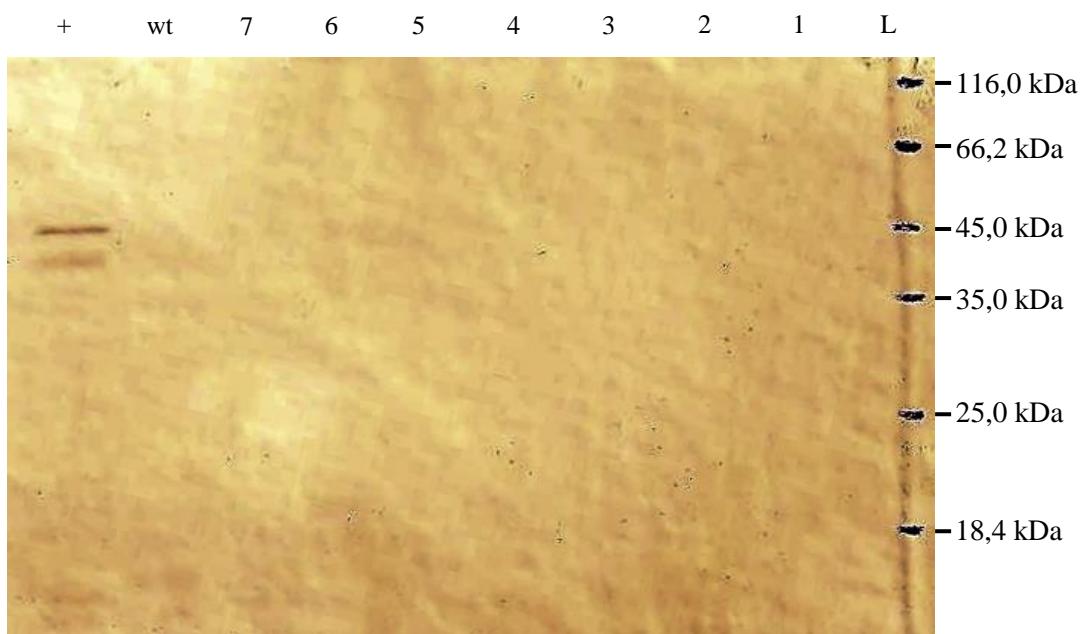
Slika 16: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča TSB in ABPM8) na nitrocelulozni membrani.

Na sliki je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji specifičnih protiteles, konjugiranih z encimom HRP z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti. **L** - proteinski standard velikosti; **+** - pozitivna kontrola EryK-HA; **2–4** - vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha1.3, ha1.9 in ha1.15 v enakem vrstnem redu) gojenih 4 dni v TSB gojišču; **6–9** - vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha1.3, ha1.7, ha1.9 in ha1.15 v enakem vrstnem redu) gojenih 3 dni v ABPM8.



Slika 17: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorec ha1.11 iz gojišča ABPM8, časovno vzorčenje) na nitrocelulozni membrani.

Na sliki je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji specifičnih protiteles, konjugiranih z encimom HRP z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti. **L** - proteinski standard velikosti; **+** - pozitivna kontrola; **wt** - negativna kontrola, 3. dan vzorčenja *S. erythraea* s plazmidom pSet152+ermE\* brez gena SACE\_5599; **1–5** - vzorci proteinov iz neodvisnega klena ha1.11, ki je bil gojen v ABPM8 gojišču, vzorčilo se jih je časovno, začelo s 3. dnevom gojenja (vzorec 1), 4. dnevom (vzorec 2) in tako naprej do 7. dne (vzorec 5).



Slika 18: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča ABPM8) na nitrocelulozni membrani.

Na sliki je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji specifičnih protiteles, konjugiranih z encimom HRP z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti. **L** - proteinski standard velikosti; + - pozitivna kontrola EryK-HA; **1–7** - vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha1.16, ha1.17, ha1.18, ha1.20, ha1.21, ha1.23 in ha1.24 v enakem vrstnem redu) gojenih 3 dni v ABPM8; **wt** - negativna kontrola, proteini 3. dan vzorčenja *S. erythraea* s plazmidom pSet152+ermE\* brez gena SACE\_5599.



Slika 19: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha2 skupine iz gojišča ABPM8) na nitrocelulozni membrani.

Na sliki je prikazana nitrocelulozna membrana po detekciji specifičnih protiteles, konjugiranih z encimom HRP z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti. **L** - proteinski standard velikosti; + - pozitivna kontrola EryK-HA; **1–8** - vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha2.2, ha2.3, ha2.4, ha2.6, ha2.8, ha2.9, ha2.10 in ha2.11 v enakem vrstnem redu) gojenih 3 dni v ABPM8.



Slika 20: Detekcija SACE\_5599-HA z metodo prenosa western (vzorci ha1 skupine iz gojišča ABPM8) na razvitem filmu po kemiluminiscenčni reakciji.

Na sliki je prikazan razviti film po detekciji specifičnih protiteles konjugiranih z encimom HRP s kemiluminiscenčno reakcijo. **L** - proteinski standard velikosti; **+** - pozitivna kontrola EryK-HA; **1–7** - vzorci proteinov iz neodvisnih klonov (ha1.1, ha1.3, ha1.5, ha1.8, ha1.11, ha1.14 in ha1.15 v enakem vrstnem redu) gojenih 3 dni v ABPM8; **8** - negativna kontrola, proteini iz 3. vzorčenja *S. erythraea* s plazmidom pSet152+*ermE\** brez gena SACE\_5599.

Opravili smo veliko ponovitev in različnih kombinacij z vsemi skupinami konjugant. Vedno smo dobili podobne rezultate. Pozitivna kontrola nam je služila kot indikator, da prenos western opravljam uspešno, kljub temu pa nam v proteinskih lizatih ni uspelo detektirati proteina SACE\_5599-HA. Rezultati kažejo, da se je protein SACE\_5599-HA izražal v zelo majhnih količinah. Glede na uporabljen močan promotor *ermE\** je to presenetljivo, očitno pa te količine zadostujejo za dvig donosa, kar je tudi v skladu z našo osrednjo hipotezo in zelo verjetno regulatorno vlogo SACE\_5599.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

*S. erythraea* je bakterija, ki se uporablja za industrijsko proizvodnjo eritromicina, sekundarnega metabolita, ki sodi med komercialno pomembne makrolidne antibiotike. Visoko donosni sevi, ki se uporabljajo v industrijskih bioprocесih, so rezultat dolgoletne selekcije sevov, v katere so vnašali mutacije s pomočjo mutageneze s kemijskimi in fizikalnimi postopki. Te metode so se izkazale za zelo uspešne, saj je pri nekaterih mikroorganizmih prišlo tudi do več stokratnega povečanja donosa ciljnega metabolita glede na izhodni sev. Žal pa na ta način pridobljeni sevi ne omogočajo vpogleda v regulatorne in metabolne mehanizme, ki omogočajo tako povečane donose metabolitov. Posebej slabo poznani so ostali regulatorni mehanizmi, ki omogočajo povečanje donosa eritromicina, saj ima genom *S. erythraea* več kot tisoč predvidenih regulatornih genov, genska skupina za biosintezo tega antibiotika pa nima regulatornih genov.

Raziskovalci Acies Bio, Biotehniške fakultete in Instituta Jožef Stefan so zato s primerjalnim proteomskim pristopom identificirali proteine, pri katerih je raven sinteze v visoko donosnem industrijskem sevu *S. erythraea* bistveno višja kot v naravnem sevu *S. erythraea* NRRL23338. Identificirali so večje število diferencialno izraženih proteinov, vendar pa dejanski vpliv posameznih diferencialno izraženih proteinov na donos produkta ostaja nepoznan. Cilj te naloge je bil čezmerno izraziti gen, ki kodira enega od diferencialno izraženih proteinov (SACE\_5599) v divjem tipu *S. erythraea* NRRL23338 in ugotoviti, ali je čezmerno izražanje tega gena, in posledično proteina, vzročno-posledično povezano z donosom eritromicina v laboratorijskem merilu.

Predhodno odkriti homologi proteina SACE\_5599 v drugih aktinomicetah so večinoma označeni kot hipotetični regulatorni proteini, a mehanizmi njihovega delovanja niso poznani. Prvi je bil opisan homolog iz *S. lincolnensis*, ki ga kodira gen *lmbU*. Ta ima redek kodon TTA, ki je posredno povezan z regulacijo biosinteze sekundarnih metabolitov (Leskiw in sod., 1993). Gen *lmbU* je del genske skupine, ki je odgovorna za sintezo linkomicina. Na podlagi tega so mu določili hipotetično regulatorno vlogo (Peschke in sod., 1995). Tudi vsi ostali homologi so del genskih skupin za sintezo sekundarnih metabolitov in zanje predvidevajo regulatorno vlogo (Pojer in sod., 2002; Eustaquio in sod., 2003; Ma in sod., 2011). Večina homologov (le NovE - 6,85 pH) ima prav tako kot

SACE\_5599 visoko izoelektrično točko (nad 8 pH), kar nakazuje zmožnost vezave na nukleinsko kislino in potencialno regulatorno vlogo pri transkripciji ali translaciji. Pri inaktivaciji homologa *novE*, se je produkcija novobicina zmanjšala za več kot 90 %, iz česar so sklepali, da protein nima esencialne katalitične vloge pri biosintezi, ima pa pomemben vpliv na donos. Ta rezultat še dodatno nakazuje na regulatorno vlogo te skupine genov/proteinov (Eustaquio in sod., 2003).

Za razliko od homologov *lmbU* in *novE*, ki sta znotraj biosinteznih genskih skupin, je gen SACE\_5599 približno 2,7 Mbp stran od genske skupine za biosintezo eritromicina (*ery*) in nima redkega TTA kodona, zato smo za potrditev vloge SACE\_5599 na donos eritromicina izvedli dodatne eksperimente. Genska skupina *ery* za biosintezo eritromicina v *S. erythraea* nima specifičnega regulatornega gena, kljub temu pa je transkripcija te genske skupine tekom biosinteze usklajena in natančno regulirana (Lum in sod., 2004). Identifikacija regulatornih mehanizmov tega zelo pomembnega antibiotika je že dolgo zelo zanimivo znanstveno vprašanje, ki ima iz vidika razvoja izboljšanih industrijskih visoko donosnih sevov tudi velik ekonomski pomen. Skupina Chng in sod. (2008) je uspela odkriti do sedaj edini znani regulator, pleiotropni regulator *BldD*, ki regulira transkripcijo genov za biosintezo eritromicina, hkrati pa tudi določene morfološke spremembe v *S. erythraea*. Gen *bldD* in genska skupina *ery* sta v kromosomu *S. erythraea* približno 1,5 Mbp narazen, kar nakazuje, da je lahko regulatorni gen izven genske skupine, ki jo regulira in kar bi lahko veljalo tudi za SACE\_5599, ki je predmet tega magistrskega dela.

Naslednji korak v potrditvi vpliva SACE\_5599 na donos eritromicina so predstavljeni laboratorijski eksperimenti za preverjanje osnovne hipoteze, da bo čezmerno izražanje potencialnega regulatornega gena SACE\_5599 v naravnem sevu *S. erythraea* imelo vpliv na donos eritromicina v laboratorijskem merilu. Gen SACE\_5599 z dodanim hemaglutininškim epitopom-HA smo v naravnem sevu izrazili pod kontrolo močnega konstitutivnega promotorja *ermE\**. Z metodami molekulskega kloniranja smo na podlagi plazmida pSet152 pripravili dva različna plazmida (z in brez vezavnega mesta za ribosom - RBS), ki smo ju s konjugativnim prenosom vnesli v bakterijo *S. erythraea* in tako dobili naslednje skupine sevov, za katere smo nato določili donos eritromicina v laboratorijskem merilu:

- **ha1:** *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\** +SACE\_5599-HA,
- **ha2:** *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\*/RBS+SACE\_5599-HA*,
- **wtsK:** *S. erythraea* NRRL23338 + pSet152+*ermE\**,

- **wtK:** *S. erythraea* NRRL23338.

Kot kontrolni sev smo uporabili divji tip bakterije *S. erythraea* NRRL23338 (wtK). Za dodatno kontrolo smo uporabili tudi sev z vstavljenim plazmidom pSet152+*ermE*\* brez gena SACE\_5599 (wtsK), saj lahko prisotnost antibiotika v gojiščih pri sevih z vključenimi plazmidi vpliva na produktivnost in rast. Razvoj rezistence namreč do neke mere fiziološko obremeniti mikroorganizem in nekoliko upočasni začetno rast oz. podaljša fazo prilagajanja. Skupina wtsK tako predstavlja realnejšo kontrolo, saj so sevi iz skupin ha1 in ha2 prav tako fiziološko obremenjeni z izražanjem dejavnikov rezistence.

Da bi ovrednotili vpliv čezmernega izražanja SACE\_5599 na produkcijo sekundarnega metabolita eritromicina, smo vse pridobljene neodvisne klone gojili v laboratorijskem merilu, z biološkim testom določili koncentracije proizvedenega eritromicina (poglavlje 4.2.1) in podatke statistično obdelali (poglavlje 4.2.2). Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da je produkcija eritromicina v kontrolnih skupinah sevov (wtK, wtsK) nižja od produkcije v obeh ostalih skupinah, hkrati pa je opaziti tudi, da je v neodvisnih klonih brez vezavnega mesta za ribosom (ha1) produkcija nižja kot v skupini, kjer je plazmid vseboval tudi vezavno mesto za ribosom (ha2) (poglavlje 4.2.3).

Iz rezultatov je razvidno, da so med povprečno vsebnostjo eritromicina znotraj merjenja produkcije posameznega seva vidna nihanja (priloga A), kar je posledica običajne visoke biološke variabilnosti pri kultivaciji aktinomicet, ki so povezne s kompleksno fiziologijo te skupine bakterij, in majhnimi razlikami v eksperimentalnih pogojih (avtoklaviranje gojišč in pogoji kultivacije, ekstrakcije, ter analize z biološkim testom).

Vstavitev zapisa SACE\_5599-HA in njegovo čezmerno izražanje pod kontrolo močnega konstitutivnega promotorja *ermE*\* je pozitivno vplivalo na produkcijo eritromicina, saj sta povprečni vrednosti antibiotika v obeh skupinah (ha1, ha2) za 16,5 % oz. 40,8 % višji od povprečne vrednosti eritromicina v kontrolni skupini wtsK (poglavlje 4.2.3). Razlike v donosu pa so relativno majhne, saj se je samo skupina ha2 statistično značilno razlikovala od kontrolnih skupin. Primerjava produkcije eritromicina med skupinama ha1 in ha2 pokaže, da je bil povprečen donos eritromicina v skupini ha2 za 20,9 % višji kot v skupini ha1 in da je razlika statistično značilna. Na podlagi tega rezultata lahko sklepamo, da pride zaradi vključitve vezavnega mesta do bolj učinkovite translacije in posledično do večjega učinka čezmerno sintetiziranega proteina SACE\_5599. Kontrolna skupina wtK je imela

nekoliko višjo produkcijo (za 5,2 %) od kontrolne skupine wtsK, kar je v skladu s predpostavko, da razvoj rezistence nekoliko obremeniti mikroorganizem. Vendar ta razlika ni bila statistično značilna.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da nam je uspelo potrditi vpliv čezmerno izraženega homolognega gena SACE\_5599 na produkcijo eritromicina v bakteriji *S. erythraea*. To do neke mere potrjuje našo osnovno hipotezo - s čezmerno ekspresijo potencialno regulatornega proteina smo uspeli povišati produkcijo sekundarnega metabolita. Dodaten način potrditve bi bila inaktivacija nativnega gena SACE\_5599, po možnosti v visoko donosnem industrijskem sevu, saj divji sev *S. erythraea* proizvaja relativno nizke koncentracije in razlike bi bile težko merljive, v primeru industrijskega seva pa bi bile te razlike verjetno veliko bolj izrazite. S tem pristopom je skupina Eustaquio in sod. (2003) potrdila vpliv in dodatno predpostavila regulatorno vlogo homologa *novE*, saj se je produkcija novobicina zmanjšala za več kot 90 %. Vendar še vedno ne moremo z gotovostjo trditi, da ima SACE\_5599 regulatorno vlogo. Za nedvoumno potrditev regulatorne vloge bi bile potrebne dodatne raziskave. Potrebno bi bilo dokazati vezavo izoliranega proteina SACE\_5599 na DNA ali RNA, vendar ne nujno na gene za biosintezo eritromicina - SACE\_5599 lahko regulira druge gene, ki so pomembni za donos, na primer gene za oskrbo s substrati. Na ta način je skupina Chng in sod. (2008) potrdila vlogo proteina BldD kot transkripcijskega regulatorja v *S. erythraea*.

Kljub povišanju donosa eritromicina nam s prenosom western ni uspelo dokazati produkcije proteina SACE\_5599-HA v konjugantah na proteinskem nivoju. Opravili smo več ponovitev, spremajali pogoje prenosa, uporabili različne načine detekcije (z raztopino za detekcijo HRP aktivnosti in s kemiluminiscenčno reakcijo), a rezultat je bil vedno enak - pozitivna kontrola prenosa western je dokazovala uspešno izvedbo eksperimenta, proteina SACE\_5599-HA pa nismo detektirali. Iz tega smo sklepalni, da je bila produkcija prenizka, posledično pa je bila koncentracija proteina pod mejo detekcije. Način, kako bi mogoče lahko izboljšali detekcijo, je s čiščenjem proteinih ekstraktov preko afinitetne kromatografije, kar pa bi bistveno preseglo predviden obseg dela v okviru te naloge.

Edini primer, ko smo s kemiluminiscenčno reakcijo lahko detektirali produkcijo proteina SACE\_5599-HA, je bil proteinski ekstrakt visoko donosnega seva *S. erythraea*, v katerega smo prav tako vnesli dodatno kopijo gena pod močnim konstitutivnim promotorjem *ermE*\*. Na podlagi tega rezultata sklepamo, da je raven sinteze proteina SACE\_5599 del

kompleksnejše regulatorne mreže, kot je na primer dobro poznana regulatorna mreža za biosintezo tilozina pri *Streptomyces fradiae*, kjer se ob vezavi določenih členov preneha represija, s tem se omogoči izražanje ostalih regulatornih genov in tako pride do aktivacije biosinteze (Stratigopoulos in sod., 2004). Zato v primeru visoko donosnega seva sklepamo, da je represija določenih členov v regulaciji prekinjena/oslabljena, tako da ne pride do negativne regulacije čezmerne izražanja gena SACE\_5599.

Da bi potrdili uspešno transkripcijo vstavljenega gena SACE\_5599-HA, smo v sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za biologijo opravili še transkriptomsko analizo izražanja mRNA v konjugiranih sevih *S. erythraea*. Rezultati so pokazali, da smo v konjugantah (skupini ha1 in ha2 v primerjavi s kontrolami wtK in wtsK) uspeli nekoliko povišati izražanje tega gena, a je bila raven izražanja še vedno veliko nižja od ravni, ki jo dosegajo visoko donosni sevi. Ta rezultat je bil presenetljiv, saj je močno konstitutivno delovanje promotorja *ermE\** dobro poznano (Bibb in sod., 1985; Lefers, 2004), zato smo pričakovali, da bodo ravni izražanja podobno visoke ali še višje kot pri visoko donosnem sevu. Po drugi strani pa ti rezultati kažejo, da je gen/protein SACE\_5599 morda udeležen v kompleksnejšo regulatorno mrežo, kjer pride do določenih posttranskripcijskih vezav oz. represije. Možno je, da je pri skupinah ha1 in ha2 čezmerno izražanje gena SACE\_5599-HA negativno regulirano s strani drugih proteinov, ki so del kompleksnejše regulatorne mreže. Vseeno pa smo z uporabljenim sistemom za čezmerno izražanje količino proteina SACE\_5599 dovolj povišali, da smo lahko opazili razlike v produkciji eritromicina. Da bi potrdili morebitni vpliv regulatorne mreže na translacijo SACE\_5599, bi lahko v nadaljnjih študijah pripravili sintetični gen s spremenjenim nukleotidnim zaporedjem in ohranjenim aminokislinskim zaporedjem SACE\_5599. Izražanje takega gena bi lahko preprečilo morebitne vplive negativne posttranskripcijske regulacije, kar bi omogočilo jasnejše ovrednotenje vpliva ravni izražanja SACE\_5599 na donos eritromicina.

V okviru nadaljnjih študij tega proteina bi bilo smiselno inaktivirati gen SACE\_5599 v visoko donosnem sevu in opazovati vpliv inaktivacije na donos antibiotika. V prihodnje bo ključna tudi potrditev regulatorne vloge proteina SACE\_5599 oz. njegovih homologov v drugih aktinomicetah. Za natančno karakterizacijo mehanizma delovanja teh proteinov bi morali enega od njih izraziti in izolirati kot rekombinantni protein ter opraviti študije interakcije tega proteina s promotorskimi regijami ključnih genov, ki sodelujejo v biosinteznem procesu.

## 5.2 SKLEPI

- Z molekulskim kloniranjem smo pripravili dva nova plazmida na osnovi pSet152 *ermE\** z zapisom za gen SACE\_5599 z dodanim hemaglutininskim epitopom-HA na karboksiterminalnem delu proteina, ki ga kodira. En plazmid je vseboval vezavno mesto za ribosom v promotorski regiji, drugi ne.
- Z metodo PCR na osnovi kolonij smo potrdili uspešnost in mesto vstavitve našega plazmida v kromosom bakterije *S. erythraea* NRRL23338.
- Z analizo produkcije eritromicina in s statistično obdelavo podatkov smo uspeli ovrednotiti vpliv čezmernega izražanja gena SACE\_5599-HA v bakteriji *S. erythraea* NRRL23338.
- Čezmerno izražanje gena je pozitivno vplivalo na produkcijo eritromicina v bakteriji *S. erythraea* NRRL23338. Razlika v produkciji je bila statistično značilna v primeru skupine konjugant, pri katerih je promotorska regija vsebovala tudi vezavno mesto za ribosom (skupina ha2).
- Neodvisni kloni skupine ha2 so imeli v povprečju 40,8 % višjo produkcijo eritromicina kot neodvisni kloni s plazmidom pSet152 *ermE\** brez gena SACE\_5599.
- Čezmerno izraženega gena SACE\_5599-HA nam ni uspelo detektirati na proteinskem nivoju s prenosom western.

## 6 POVZETEK

S primerjavo proteomov naravnega seva *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338 in visoko donosnega industrijskega seva *S. erythraea* je raziskovalcem iz Acies Bio, Biotehniške fakultete in Instituta Jožef Stefan uspelo identificirati proteine, ki imajo različno raven sinteze med produkcijo eritromicina v izbranih sevih. Identificirani proteini tako predstavljajo potencialne kandidate za izboljšavo oz. razumevanje kompleksnega procesa regulacije in metabolizma eritromicina. Prav proces regulacije je pri biosintezi eritromicina relativno slabo poznan (Lum in sod., 2004; Chng in sod., 2008) in identifikacija določenih regulatornih mehanizmov bi lahko prinesla nova dognanja pri pripravi pomembnih visoko donosnih industrijskih sevov.

Po identifikaciji določenih kandidatov, je potrebno te okarakterizirati. V sklopu magistrskega dela smo ovrednotili vpliv čezmernega izražanja enega od kandidatov, SACE\_5599, na produkcijo eritromicina v naravnem sevu bakterije *S. erythraea*. Glede na to, da je SACE\_5599 pri visoko donosnem sevu veliko bolj izražen kot pri naravnem sevu, smo sklepalni, da bo čezmerno izražanje povišalo produkcijo eritromicina. Eksperimentalno smo to dosegli tako, da smo pripravili plazmide na osnovi pSet152 *ermE\** z zapisom za gen SACE\_5599-HA in jih konjugirali v naravni sev *S. erythraea* NRRL23338. Promotor *ermE\** je močan konstitutivni promotor, ki je zagotovljal čezmerno izražanje gena SACE\_5599-HA. Temu je sledila analiza produkcije v laboratorijskem merilu in statistična obdelava pridobljenih rezultatov.

V skupini ha2 (promotorska regija z mestom vezave na ribosom) smo uspeli zaznati statistično značilno povišanje produkcije eritromicina glede na kontrolne seve, in sicer produkcija je bila višja za 40,8 %. To je potrdilo, da je čezmerno izražanje tega gena vzročno-posledično povezano z donosom eritromicina. To je še posebej zanimivo, saj so homologi proteina, ki jih kodira gen SACE\_5599, opisani kot hipotetični regulatorni proteini (Peschke in sod., 1995; Pojer in sod., 2002; Eustaquio in sod., 2003; Ma in sod., 2011). Po teh sklepih sodeč (in po transkriptomski analizi ter analizi čezmernega izražanja SACE\_5599-HA v visoko donosnem sevu, ki nista bili del tega magistrskega dela, vendar del širšega raziskovalnega projekta v podjetju Acies Bio) ne moremo zavreči domneve, da imamo opravka z določim tipom regulacije produkcije eritromicina. Poleg tega pa ne moremo samo s temi rezultati zagotovo potrditi regulatorne vloge, niti ne za kakšen tip regulacije bi lahko šlo. Glede na to, da smo s transkriptomsko analizo opazilo, da nam ni

uspelo povišati ravni izražanja na raven v visoko donosnem sevu, lahko sklepamo, da je gen SACE\_5599 mogoče udeležen v kompleksnejšo regulatorno mrežo.

Poleg povišanja v produkciji smo želeli opaziti in z gotovostjo potrditi izražanje vstavljenega zapisa za protein SACE\_5599. Tega smo se lotili tako, da smo zapisu SACE\_5599 dodali zapis za hemaglutininskim epitopom-HA na karboksiterminalnem delu kodirajočega proteina. Ta bi nam lahko omogočal detekcijo v proteinskih ekstraktih s prenosom western, vendar do tega ni prišlo. Razloge se lahko išče v še vedno prenizki produkciji proteina, ki bi bila potrebna za mejo detekcije. Kljub temu smo uspešno dokazali pozitiven vpliv na produkcijo eritromicina in to je bila osrednja naloga magistrskega dela.

SACE\_5599 ostaja zanimiv kandidat za nadaljnje študije. V prihodnje bo ključna potrditev regulatorne vloge proteina in natančna karakterizacija mehanizma delovanja - študije interakcije s promotorskimi regijami ključnih genov, ki sodelujejo v biosintезнem procesu, to je od oskrbe s prekurzorji v primarnem metabolizmu do specifičnih interakcij v genski skupini za eritromicin.

## 7 VIRI

- Angert E.R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 3: 214–224
- Apel A.K., Sola-Landa A., Rodriguez-Garcia A., Martin J.F. 2007. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology-SGM*, 153: 3527–3537
- Banskota A.H., McAlpine J.B., Sorensen D., Aouidate M., Pirae M., Alarco A.M., Omura S., Shiomi K., Farnet C.M., Zazopoulos E. 2006. Isolation and identification of three new 5-alkenyl-3,3(2H)-furanones from two *Streptomyces* species using a genomic screening approach. *Journal of Antibiotics*, 59, 3: 168–176
- Bhandari M., Whang W., Kuo J.C., Devereaux P.J., Sprague S., Tornetta P. 2003. The risk of false-positive results in orthopaedic surgical trials. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 413: 63–69
- Bibb M.J., Janssen G.R., Ward J.M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 41, 2-3: E357–E368
- Bibb M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 2: 208–215
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N., Schoner B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116: 43–49
- Bland J.M., Altman D.G. 1995. Multiple significance tests - the Bonferroni method. *British Medical Journal*, 310, 6973: 170–170
- Boakes S., Oliynyk M., Cortes J., Bohm I., Rudd B.A.M., Revill W.P., Staunton J., Leadlay P.F. 2004. A new modular polyketide synthase in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 8, 2: 73–80
- Brautaset T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strøm A.R., Valla S., Zotchev S.B. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry & Biology*, 7, 6: 395–403

- Brown M.B., Forsythe A.B. 1974. Robust tests for equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69, 346: 364–367
- Chakraburty R., Bibb M. 1997. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology*, 179, 18: 5854–5861
- Chandra G., Chater K.F. 2008. Evolutionary flux of potentially *bldA*-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 1: 111–126
- Chng C., Lum A.M., Vroom J.A., Kao C.M. 2008. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 32: 11346–11351
- Cohen J. 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2<sup>nd</sup> ed. Mahwah, Lawrence Erlbaum Associates: 567 str.
- Combes P., Till R., Bee S., Smith M.C.M. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the ΦC31-encoded site-specific recombination system. *Journal of Bacteriology*, 184: 5746–5752
- Cortés J., Haydock S.F., Roberts G.A., Bevitt D.J., Leadlay P.F. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, 348, 6297: 176–178
- Cortés J., Velasco J., Foster G., Blackaby A.P., Rudd B.A.M., Wilkinson B. 2002. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology*, 44, 5: 1213–1224
- Cundliffe E. 2006. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33, 7: 500–506
- Dalebroux Z.D., Swanson M.S. 2012. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews. Microbiology*, 10, 3: 203–212
- Demain A.L., Fang A. 1995. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologica*, 9, 2: 98–117
- Donadio S., Staver M.J., McAlpine J.B., Swanson S.J., Katz L. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, 252, 5006: 657–679

- Elliot M., Damji F., Passantino R., Chater K., Leskiw B. 1998. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): A regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *Journal of Bacteriology*, 180: 1549–1555
- Elliot M.A., Bibb M.J., Buttner M.J., Leskiw B.K. 2001. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 40: 257–269
- Elliot M.A., Talbot N.J. 2004. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 6: 594–601
- Eustáquio A.S., Luft T., Wang Z.X., Gust B., Chater K.F., Li S.M., Heide L. 2003. Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Archives of Microbiology*, 180: 25–32
- Fernandez-Moreno M.A., Martin-Triana A.J., Martinez E., Niemi J., Kieser H.M., Hopwood D.A., Malpartida F. 1992. *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 174, 9: 2958–2967
- Field A. 2013. Discovering statistics using SPSS, Ltd. 4<sup>th</sup> ed. London, SAGE Publications: 856 str.
- Floriano B., Bibb M. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 21, 2: 385–396
- Giebelhaus L.A., Frost L., Lanka E., Gormley E.P., Davies J.E., Leskiw B. 1996. The Tra2 core of the IncPα plasmid RP4 is required for intergeneric mating between *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 178: 6378–6381
- Goranovič D., Blažič M., Magdevska V., Horvat J., Kuščer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martinez-Castro M., Barreiro C., Mrak P., Kopitar G., Kosec G., Fujs Š., Martin J.F., Petković H. 2012. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. *BMC Microbiology*, 12, 1: doi: 10.1186/1471-2180-12-238: 31 str.
- Guerra S.M., Rodriguez-Garcia A., Santos-Aberturas J., Vicente C.M., Payero T.D., Martin J.F., Aparicio J.F. 2012. LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin

- biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. PLoS One, 7, 2: e31475, doi: 10.1371/journal.pone.0031475: 11 str.
- Henikoff S., Wallace J.C., Brown J.P. 1990. Finding protein similarities with nucleotide sequence databases. Methods in Enzymology, 183: 111–132
- Hesketh A., Chen W.J., Ryding J., Chang S., Bibb M. 2007. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Genome Biology, 8, 8: R161, doi: 10.1186/gb-2007-8-8-r161: 18 str.
- Hoaglin D.C., Iglewicz B., Tukey J.W. 1986. Performance of some resistant rules for outlier labeling. Journal of American Statistical Association, 81: 991–999
- Hoaglin D. C., Iglewicz B. 1987. Fine tuning some resistant rules for outlier labeling. Journal of American Statistical Association, 82: 1147–1149
- Hobbs G., Obanye A.I., Petty J., Mason J.C., Barratt E., Gardner D.C., Flett F., Smith C.P., Broda P., Oliver S.G. 1992. An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology, 174, 5: 1487–1494
- Hood D.W., Heidstra R., Swoboda U.K., Hodgson D.A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism--a review. Gene, 115, 1–2: 5–12
- Horinouchi S., Beppu T. 1994. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Molecular Microbiology, 12, 6: 859–864
- Horinouchi S. 2003. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 30, 8: 462–467
- Hoyt S., Jones G.H. 1999. *relA* is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. Journal of Bacteriology, 181, 12: 3824–3829
- Kato J.Y., Miyahisa I., Mashiko M., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2004. A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. Journal of Bacteriology, 186, 7: 2206–2211
- Keiser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, The John Innes Foundation: 613 str.

- Kelemen G.H., Viollier P.H., Tenor J., Marri L., Buttner M.J., Thompson C.J. 2001. A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 40: 804–814
- Knapp G.S., Hu J.C. 2010. Specificity of the *E. coli* LysR-type transcriptional regulators. *PLoS One*, 5, 12: e15189, doi: 10.1371/journal.pone.0015189: 4 str.
- Kruskal W.H., Wallis W.A. 1987. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of American Statistical Association*, 260, 47: 583–621
- Kuščer E., Coates N., Challis I., Gregory M., Wilkinson B., Sheridan R., Petković H. 2007. Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology*, 189, 13: 4756–4763
- Labeda D.P. 1987. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a notype strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1: 19–22
- Lal R., Kumari R., Kaur H., Khanna R., Dhingra N., Tuteja D. 2000. Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type-I PKSs. *Trends in Biotechnology*, 18, 6: 264–274
- Lau J., Fu, H., Cane D.E., Khosla C. 1999. Dissecting the role of acyltransferase domains of modular polyketide synthases in the choice and stereochemical fate of extender units. *Biochemistry*, 38, 5: 1643–1651
- Lefers M. 2004. Hedgehog signaling glossary. Chicago, Northwestren University: 1 str.  
[http://groups.molbiosci.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-C/constitutive\\_promoter.html](http://groups.molbiosci.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-C/constitutive_promoter.html) (julij, 2013)
- Leskiw B.K., Mah R., Lawlor E.J., Chater K.F. 1993. Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 175, 7: 1995–2005
- Li C., Florova G., Akopiants K., Reynolds K.A. 2004. Crotonyl-coenzyme A reductase provides methylmalonyl-CoA precursors for monensin biosynthesis by *Streptomyces cinnamonensis* in an oil-based extended fermentation. *Microbiology*, 150: 3463–3472
- Liu G., Tian Y., Yang H., Tan H. 2005. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Molecular Microbiology*, 55, 6: 1855–1866

- Lum A.M., Huang J., Hutchinson C.R., Kao C.M. 2004. Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays. *Metabolic Engineering*, 6: 186–196
- Ma J., Wang Z., Huang H., Luo M., Zuo D., Wang B., Sun A., Cheng Y.Q., Zhang C., Ju J. 2011. Biosynthesis of himastatin: assembly line and characterization of three cytochrome P450 enzymes involved in the post-tailoring oxidative steps. *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 7797–7802
- Maddocks S.E., Oyston P.C. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154, 12: 3609–3623
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2009. *Brock biology of microorganisms*. 13<sup>th</sup> ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 1152 str.
- Mann H.B., Whitney D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Institute of Mathematical Statistics*, 18, 1: 50-60
- Martin J.F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology*, 186, 16: 5197–5201
- Martin J.F., Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 263–273
- Martinez-Costa O.H., Fernandez-Moreno M.A., Malpartida F. 1998. The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. *Journal of Bacteriology*, 180, 16: 4123–4132
- Merrick M.J. 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, 96, 2: 299–315
- Mironov V.A., Sergienko O.V., Nastasyak I.N., Danilenko V.N. 2004. Biogenesis and regulation of biosynthesis of erythromycins in *Saccharopolyspora erythraea*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 6: 531–541
- Nett M., Ikeda H., Moore B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26, 11: 1362–1384
- Nguyen K.T., Tenor J., Stettler H., Nguyen L.T., Nguyen L.D., Thompson C.J. 2003. Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *Journal of Bacteriology*, 185, 24: 7291–7296

- Ochi K. 1987. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *Journal of Bacteriology*, 169, 8: 3608–3616
- Oliynyk M., Samborskyy M., Lester J.B., Mironenko T., Scott N., Dickens S., Haydock S.F., Leadlay P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature Biotechnology*, 25, 4: 447–453
- Olkin I. 1960. Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling. Stanford, Stanford University Press: 517 str.
- Peano C., Bicciato S., Corti G., Ferrari F., Rizzi E., Bonnal R.J.P., Bordoni R., Albertini A., Bernardi L.R., Donadio S., Bellis G.D. 2007. Complete gene expression profiling of *Saccharopolyspora erythraea* using GeneChip DNA microarrays. *Microbial Cell Factories*, 6, 37: doi: 10.1186/1475-2859-6-37: 15 str.
- Perez-Redondo R., Rodriguez-Garcia A., Martin J.F., Liras P. 1998. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. *Gene*, 211, 2: 311–321
- Peschke U., Schmidt H., Zhang H.Z., Piepersberg W. 1995. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology*, 16, 6: 1137–1156
- Pojer F., Li S.M., Heide L. 2002. Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology*, 148: 3901–3911
- Potrykus K., Cashel M. 2008. (p)ppGpp: still magical?. *Annual Review of Microbiology*, 62: 35–51
- Rawlings B.J. 2001. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A-erythromycin biosynthesis). *Natural Product Reports*, 18: 190–227
- Riesenber D., Bergter F., Kari C. 1984. Effect of serine hydroxamate and methyl alpha-D-glucopyranoside treatment on nucleoside polyphosphate pools, RNA and protein accumulation in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of General Microbiology*, 130, 10: 2549–2558
- Royston J.P. 1982. The W test for normality. *Applied Statistics Journal of the Royal Statistical Society Series C*, 31, 2: 176–180

- Sambrook J., Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2100 str.
- Santos-Beneit F., Rodriguez-Garcia A., Sola-Landa A., Martin J.F. 2009. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Molecular Microbiology*, 72, 1: 53–68
- Santos-Beneit F., Rodriguez-Garcia A., Martin J.F. 2011. Complex transcriptional control of the antibiotic regulator *afsS* in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators. *Journal of Bacteriology*, 193, 9: 2242–2251
- Sello J.K., Buttner M.J. 2008. The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation. *Journal of Bacteriology*, 190, 11: 4079–4083
- Shapiro S.S., Wilk M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591–611
- Sola-Landa A., Moura R.S., Martin J.F. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10: 6133–6138
- Stackebrandt E., Schumann P. 2006. Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. V: The prokaryotes: Archaea. Bacteria, Firmicutes, actinomycetes. 3<sup>rd</sup> ed. Dworkin M. (ed.). New York, Springer Science+Business Media: 297–321
- Staunton J., Wilkinson B. 1997. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chemical Reviews*, 97: 2611–2629
- Staunton J., Weissman K.J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 18: 380–416
- Stratigopoulos G., Bate N., Cundliffe E. 2004. Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TylR. *Molecular Microbiology*, 54, 5: 1326–1334
- Takano E., Tao M., Long F., Bibb M.J., Wang L., Li W., Buttner M.J., Deng Z.X., Chater K.F. 2003. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 50, 2: 475–486
- Tanaka A., Takano Y., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2007. AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARP. *Journal of Molecular Biology*, 369, 2: 322–333

- Tomono A., Tsai Y., Yamazaki H., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2005. Transcriptional control by A-factor of *strR*, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 187, 16: 5595–5604
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, 1, 8: 945–951
- Weber T., Welzel K., Pelzer S., Vente A., Wohlleben W. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, 106: 221–232
- White J., Bibb M. 1997. *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology*, 179, 3: 627–633
- Yang K., Han L., Vining L.C. 1995. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, *jadR2*. *Journal of Bacteriology*, 177, 21: 6111–6117
- Yavari S., Rafieenia R. 2011. Effect of medium composition fermentation conditions on erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*. *Clinical Biochemistry*, 44, 13: 310–310
- Zeigler D.R. 2002. Integration vectors for Gram-positive bacteria. Catalog of strains. 7<sup>th</sup> ed. Columbus, Ohio State University, Department of Biochemistry, The Bacillus Genetic Stock Center: 56 str.
- Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 589–608
- Zou X., Zeng W., Chen C., Qi X., Qian J., Chu J., Zhuang Y., Zhang S., Li W. 2010. Fermentation optimization and industrialization of recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strains for improved erythromycin A production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 959–968

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za pomoč, popravke in nasvete pri pripravi magistrskega dela in predstavitve.

Zahvaljujem se tudi somentorju dr. Gregorju Koscu za sprejetje in predanost svoji vlogi, predvsem za pomoč pri načrtovanju izvedbe laboratorijskega dela, pri samem pisanju in oblikovanju naloge ter pri interpretaciji rezultatov. Brez njegove pomoči bi bila kvaliteta dela bistveno nižja.

Zahvala gre tudi moji delovni mentorici Vasilki Magdevska za uspešno vpeljavo v delovno okolje podjetja Acies Bio d.o.o. in za pomoč pri načrtovanju ter izvedbi laboratorijskega dela. Njena vztrajnost in predanost delu sta mi bili v veliko inspiracijo; vedno sem se lahko obrnil nanjo za določene strokovne nasvete.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v podjetju Acies Bio d.o.o., predvsem Marinki Horvat za delovno mentorstvo in sodelovanje pri projektu, Tini Lenče za pomoč pri statistični analizi, Dušanu Goranoviču za pomoč pri pripravi pregleda objav in vsem ostalim, ki so mi pomagali pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se podjetju Acies Bio d.o.o., ki mi je omogočilo delo na tem zanimivem projektu.

Zahvaljujem se tudi Vanji za moralno podporo in prebiranje mojih nerazumljivih, nesmiselnih povedi ter Marku Vercetu za vir malih uporabnih nasvetov.

Zahvaljujem se tudi mami za vso (včasih prekomerno) moralno in finančno podporo med časom študija in priprave magistrskega dela.

## PRILOGE

### Priloga A: Producija eritromicina v neodvisnih klonih *S. erythraea*.

Oznaka skupine	Sev	Neodvisni klon	Gojenje (mg/L)	Povprečna vrednost (mg/L)	Standardni odklon (mg/L)
wt	<i>S. erythraea</i>	wtK1 wtK2 wtK3 wtK4 wtK5 wtK6 wtK7 wtK8 wtK9 wtK10	33,00 18,15 37,15 57,15 53,50 71,05 69,90 104,95 112,90 57,98 54,14 76,52 56,03 74,45 69,93 55,03 60,12 73,30 76,73	63,8	22,3
wts	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE</i> *	wtsK1 wtsK2 wtsK3 wtsK4 wtsK5 wtsK6 wtsK7	49,36 47,36 55,26 52,46 49,20 43,24 98,20 94,30 60,00 58,09 54,41 41,41 74,45 69,93	60,5	17,7
ha1	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE</i> * SACE_5599-HA	ha1.16 ha1.17 ha1.18 ha1.19 ha1.20 ha1.22 ha1.24	46,95 35,00 38,40 37,20 31,55 25,90 59,10 53,50 79,65 74,60 72,30 87,90 85,05 85,05	70,5	31,4

Nadaljevanje Priloge A: Producija eritromicina v neodvisnih klonih *S. erythraea*.

Oznaka skupine	Sev	Neodvisni klon	Gojenje 1 (mg/L)	Gojenje 2 (mg/L)	Gojenje 3 (mg/L)	Povprečna vrednost (mg/L)	Standardni odklon (mg/L)
ha1	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE</i> * SACE_5599-HA	ha1.1	124,80	45,35	89,29	70,5	31,4
			114,55		102,36		
			103,85				
		ha1.2	77,85		39,21		
			61,15				
		ha1.3	91,15		48,48		
			103,85				
			61,75				
		ha1.4	55,75		48,35		
			50,65				
		ha1.5	78,05	107,25	39,69		
			176,45				
			80,35				
		ha1.6	26,4		39,69		
			17,85				
		ha1.7	21,35		63,79		
			38,3				
		ha1.8	129,15		29,53		
			110,85				
			84,20				
		ha1.9	45,70		55,23		
			42,90		69,63		
		ha1.10	58,65		40,10		
			66,65		44,32		
		ha1.11	121,6		42,53		
			114,75		49,68		
			68,05				
		ha1.12	47,55		37,99		
			53,60		70,09		
		ha1.13	78,45		52,70		
			79,30		63,06		
		ha1.14	77,05	93,90	85,82		
			103,75		91,10		
			82,90				
		ha1.15	203,95*	79,60	70,54		
			130,80		128,57		
			126,35				

\*Rezultat smo izločili na podlagi analize osamelcev.

Nadaljevanje Priloge A: Producije eritromicina v neodvisnih klonih *S. erythraea*.

Oznaka skupine	Sev	Neodvisni klon	Gojenje 1 (mg/L)	Gojenje 2 (mg/L)	Povprečna vrednost (mg/L)	Standardni odklon (mg/L)
ha2	<i>S. erythraea</i> pSet152 <i>ermE*/RBS</i> SACE_5599-HA	wt3.1	105,5	82,8	85,2	21,9
			85,05	85,5		
		wt3.2	115,15	77,3		
			85,05	77,3		
		wt3.3	81,85			
		wt3.4	79,15			
			81,85			
		wt3.6	109,05	91,55		
			109,05	101,6		
		wt3.8	51,45			
			61,4			
		wt3.9	55,25			
		wt3.10	59,4			
			57,05			
		wt3.11	46,05			
			46,05			
		wt3.12	78,85			
			73,45			
		wt3.13	55,05			
			57,15			
		wt3.14	74,4	98,5		
			109,8	101,6		
		wt3.15	105,05	77,3		
			105,05	82,55		
		wt3.16	101,5	101,6		
			81,85	118,7		
		wt3.17	109,05	108,8		
				129,4		
		wt3.18	97,8	112,9		
			84,7	117,3		
		wt3.19	51,3			
			63,85			
		wt3.20	68,3			
			63,55			

## Priloga B: Preverjanje prisotnosti osamelcev s pravilom o označevanju osamelcev

S pravilom o označevanju osamelcev smo najprej izračunali zgornjo ( $Q3 + 2,2 \cdot IQR$ ) in spodnjo mejo ( $Q1 - 2,2 \cdot IQR$ ).

Preglednica B1: Izračunani zgornja in spodnja meja za posamezno skupino podatkov.

Oznaka skupine	Zgornja meja	Spodnja meja
<b>wtK</b>	119,132	9,458
<b>wtsK</b>	120,164	-0,364
<b>ha1</b>	183,349	-49,229
<b>ha2</b>	190,795	-19,67

S podatki iz Priloge A smo preverili, če je kateri izven teh meja. V skupini ha1 smo identificirali 1 osamelec (ha1.15, gojenje 1 - 203,95 mg/L) in ga na podlagi velikega odstopanja od ostalih petih podatkov tega neodvisnega klonu (130,8, 126,35, 79,6, 70,54 in 128,57 mg/L) izločili iz nadaljnje analize.

### Priloga C: Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

Za vsako skupino smo naredili test Shapiro-wilk (poglavlje 3.2.4.2) in s tem preverili, če so vzorci normalno porazdeljeni.

Preglednica C1: Rezultati testa Shapiro-Wilk za analizo normalne porazdelitve.

Oznaka skupine	DF	W statistika	Prob<W
<b>wtK</b>	9	0,948	0,325
<b>wtsK</b>	8	0,721	0,024
<b>ha1</b>	77	0,957	0,011
<b>ha2</b>	49	0,961	0,109

Opis: DF - prostostne stopnje

Iz rezultatov je razvidno, da podatki iz skupin wtsK in ha1 ne predstavljajo populacij z normalno porazdelitvijo. V ostalih dveh skupinah (wtK in ha2) pa predstavljajo populacije z normalno porazdelitvijo.

Hipotezo  $H_0$ : vzorci prihajajo iz populacije z normalno porazdelitvijo, lahko zavrnemo, če je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti  $\alpha = 0,05$ .

### Priloga D: Analiza homogenosti varianc s testom Levene

Za primerjavo k-skupin podatkov med seboj s parametričnimi testi (ANOVA) je potrebno zadostiti predpogoju homogenosti varianc. To smo preverili s testom Levene (poglavlje 3.2.4.3).

Preglednica D1: Rezultati testa Levene za analizo homogenosti.

	DF	SS	Kvadratna vrednost	F-vrednost	Prob>F
model	3	11413,407	3804,469	5,307	0,007
napaka		111113,981	716,864		

Opis: DF - prostostne stopnje, SS - vsote kvadratov, F-vrednost - rezultat testa.

Dobljena vrednost F testa Levene presega kritično vrednost F-distribucije s  $k-1$  in  $N-k$  prostostnih stopenj, pri izbirni stopnji zaupanja 95 % in pripadajoča vrednost P je manjša od mejne vrednosti  $\alpha = 0,05$ . Zato lahko zavrnemo hipotezo  $H_0$ : variance skupin so homogene, in zaključimo, da variance skupin med seboj niso homogene.

## Priloga E: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

Ugotovili smo, da podatki vseh skupin niso normalno porazdeljeni in da variance med njimi niso homogene. Zaradi teh lastnosti smo za nadaljnji korak izbrali neparametrični test Kruskal-Walis (poglavje 3.2.4.4). Z njim smo preverjali, če sta vsaj dve skupini med seboj statistično različni.

Preglednica E1: Rezultati testa Kruskal-Walis.

	N	Povprečni rang
wtK	19	64,45
wtsK	14	56,79
ha1	77	73,98
ha2	49	102,12
H ( $\chi^2$ )	DF	Prob > H ( $\chi^2$ )
18,355	3	0,000

Opis: N - število podatkov v skupini, DF - prostostne skupine, H - statistika testa, ki sledi distribuciji  $\chi^2$ .

Hipotezo  $H_0$ : skupine prihajajo iz iste populacije, lahko zavrnemo, ker je dobljena vrednost H presegla kritično vrednost distribucije  $\chi^2$  pri 95 % stopnji zaupanja in je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti  $\alpha = 0,05$ .

Izvedeli smo, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni, ne pa tudi kateri dve. Da bi to izvedeli, smo uporabili še neparametrični post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo ravni zavrnitev.

## Priloga F: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom Mann-Whitney in Bonferronijevo korelacijo

Test Mann-Whitney (poglavlje 3.2.4.5) smo uporabili, da smo izvedeli, katere skupine so si med seboj statistično značilno različne. Izvedli smo ga tako, da smo naredili po en test za vsak par primerjanih skupin. Z uporabo Bonferronijeve korelacije ravni zavrnitve glede na število vseh primerjav, smo ob 95 % stopnji zaupanja določili kritično vrednost zavrnitve  $\alpha = 0,0125$ .

Preglednica F1: Rezultati testov Mann-Whitney

Test Mann-Whitney	N	Srednji rang	Vsota rangov	U	Z	Prob> U	r
1 wtK wtsK	19	18,37	349	107	-0,947	<b>0,344</b>	-0,16^
	14	15,14	212				
2 wtK ha1	19	44,50	845,5	655,5	-0,699	<b>0,485</b>	-0,07^
	77	49,49	3810,5				
3 wtK ha2	19	21,58	410	220	-3,356	<b>0,001</b>	-0,41^^
	49	39,51	1936				
4 wtsK ha1	14	40,14	562	457	-0,902	<b>0,367</b>	-0,09^
	77	47,06	3624				
5 wtsK ha2	14	16,50	231	126	-3,588	<b>0,000</b>	-0,45^^
	49	36,43	1785				
6 ha1 ha2	77	55,43	4268	1265	-3,110	<b>0,002</b>	-0,28^
	49	76,18	3733				

Opis: N - število podatkov v skupini, U - statistika testa, ki sledi normalni distribuciji, Z - pripadajoča Z-vrednost testa, r - koeficient velikosti efekta, \* - oznaka značilno različnih skupin pri stopnji  $\alpha = 0,0125$ , ^ - majhen vpliv ( $r < |+/-0,3|$ ), ^^ - srednje velik vpliv ( $r < |+/-0,5|$ ), ^^^ - velik vpliv ( $r > |+/-0,5|$ ).

Skupina ha2 je statistično različna od skupin ha1 ( $Bf_{corr} p < 0,0125$ ,  $r < |-0,3|$ ), wtsK ( $Bf_{corr} p < 0,0125$ ,  $r > |-0,5|$ ) in wtK ( $Bf_{corr} p < 0,0125$ ,  $r < |-0,5|$ ). Ostale skupine med seboj niso statistično značilno različne.