

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok GABER

**RAZVOJ AKTINOMICETNEGA
REPORTERSKEGA SISTEMA
NA OSNOVI KALKON SINTAZE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok GABER

**RAZVOJ AKTINOMICETNEGA REPORTERSKEGA SISTEMA
NA OSNOVI KALKON SINTAZE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF AN CHALCONE SYNTHASE BASED
ACTINOMYCETE REPORTER SYSTEM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Hrvoje Petković in za recenzenta prof. dr. Peter Raspor.

Mentor: doc. dr. Hrvoje Petković

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
zootehniko

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

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
živilstvo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je del večjega projekta pri katerem sem sodeloval v okviru programa doktorantov Vasilke Magdevske in Dušana Goranoviča. Transformante vrst *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces rimosus* sem dobil od njiju. Prav tako tudi plazmide pVMC1-*ermE*, pVMC1-*ermE**, pVMC2-*ermE* in pVMC2-*ermE**. Pri kultivacijah transformant *S. tsukubaensis* in *S. rimosus* sem imel občasno pomoč s strani doktorskih študentov, predvsem pri uvajanju v mikrobiološka dela. Vse meritve supernatantov vseh transformiranih kultur, ki so vključene v diplomsko nalogo sem opravil in obdelal sam. Vse ostalo delo, ki tu ni omenjeno, je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Gaber

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 601.4:577.21.08:604.4(043)=163.6
KG	<i>Actinomyces/Streptomyces</i> /sekundarni metaboliti/poročevalski sistem/poliketid sintaze/kalkon sintaza/ <i>rppA</i> /flaviolin
AV	GABER, Rok
SA	PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)/RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	RAZVOJ AKTINOMICETNEGA REPORTERSKEGA SISTEMA NA OSNOVI KALKON SINTAZE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 79 str., 16 pregl., 29 sl., 1 pril., 70 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo optimizirali in bistveno izboljšali poročevalski sistem na osnovi streptomicetnega gena <i>rppA</i> , ki kodira encim kalkon sintazo. Končni produkt tega encima je rdeče rjavo obarvan flaviolin. Z novim pristopom smo uspeli relativno koncentracijo flaviolina v raztopini kvantitativno določiti z enostavno spektrofotometrično meritvijo. Taka meritev je hitra, in cenena. Z eksperimenti smo ovrednotili uporabnost novega poročevalskega sistema v štirih različnih vrstah streptomicet (<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptomyces rimosus</i> , <i>Streptomyces cinnamonensis</i> in <i>Streptomyces tsukubaensis</i>) ter v kombinaciji s tremi različno močnimi promotorji. Dve streptomicetni vrsti, v katerih smo preizkusili naš sistem, sta industrijska seva (<i>S. cinnamonensis</i> in <i>S. tsukubaensis</i>), ki se uporabljata v proizvodnjih kapacitetah velikega merila. Sistem se je pokazal kot enostaven, hiter in robusten ne glede na sev v katerem se je izražal <i>rppA</i> ali gojišče v katerem smo izvajali meritve.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 601.4:577.21.08:604.4(043)=163.6
CX *Actinomyces/Streptomyces*/secondary metabolites/reporter system/polyketide synthases/chalcone synthase/*rppA*/flaviolin
AU GABER, Rok
AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)/ RASPOR, Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI DEVELOPMENT OF AN CHALCONE SYNTHASE BASED ACTINOMYCETE REPORTER SYSTEM
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 79 p., 16 tab., 29 fig., 1 ann., 70 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Reporter system based on *Streptomyces rppA* gene was optimized and significantly improved in this work. RppA is chalcone synthase like protein, which produces red-brown colored polyketide flaviolin. Relative concentration of flaviolin can be easily quantitatively determined with simple spectrophotometric analysis. Such measurement is fast and cheap. With several experiments applicability of new reporter system in four different *Streptomyces* species was evaluated (*Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces cinnamonensis* and *Streptomyces tsukubaensis*). Also three promoters with different strengths were tested. Two of the tested species were industrial strains, which are used in high scale secondary metabolite production (*S. cinnamonensis* and *S. tsukubaensis*). Therefore applicability of new system in industrial experiments was also evaluated. System proved to be successful in all tested strains independently of media type. It was easy to use, fast and robust.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 AKTINOMICETE	3
2.1.1 Splošne lastnosti aktinomicet	3
2.1.2 Rod <i>Streptomyces</i>	4
2.1.2.1 Taksonomija streptomicet	4
2.1.2.2 Ekologija streptomicet	5
2.1.2.3 Morfologija streptomicet	6
2.1.2.4 Fiziologija streptomicet	7
2.1.2.5 Genom streptomicet	8
2.1.2.6 Streptomicete kot proizvajalke sekundarnih metabolitov	8
2.2 OBSTOJEČI POROČEVALSKI SISTEMI ZA AKTINOMICETE	10
2.2.1 Poročevalski sistem na osnovi genov za antibiotično rezistenco (<i>neo</i> in <i>cat</i>)	11
2.2.2 Poročevalski sistem na osnovi <i>melC</i> operona	12
2.2.3 Poročevalski sistem na osnovi <i>whiE</i> operona	12
2.2.4 Poročevalski sistem na osnovi <i>xylE</i>	13
2.2.5 Poročevalski sistem na osnovi <i>luxAB</i>	14
2.2.6 Poročevalski sistem na osnovi <i>luxCDABE</i>	15
2.2.7 Poročevalski sistem na osnovi ojačanega zelenega fluorescentnega proteina (EGFP)	16

2.2.8	Poročevalski sistem na osnovi <i>redD</i> gena	17
2.2.9	Poročevalski sistem na osnovi <i>βgal</i> (β-galaktozidaze)	18
2.2.10	Sistem na osnovi termostabilne malat dehidrogenaze (<i>mdh</i>)	18
2.2.11	Sistem na osnovi β-laktamaze (<i>ampC</i>)	19
2.3	RAZVOJ POROČEVALSKEGA SISTEMA NA OSNOVI GENA <i>rppA</i>	19
2.3.1	Poliketidi	19
2.3.2	Razdelitev poliketidnih sintaz glede na mehanizem biosinteze	21
2.3.2.1	Poliketid sintaze tipa I	21
2.3.2.2	Poliketid sintaze tipa II	21
2.3.2.3	Poliketid sintaze tipa III	22
2.3.3	Gen <i>rppA</i> in produkt tega gena	23
2.3.4	<i>rppA</i> kot poročevalski gen	26
2.4	TESTIRANI PROMOTORJI	28
2.4.1	Promotor <i>actI</i>	28
2.4.2	Promotorja <i>ermE</i> in <i>ermE*</i>	28
3	MATERIALI IN METODE	29
3.1	SHEMA DELA	30
3.2	MATERIALI	32
3.2.1	Plazmidi	32
3.2.1.1	Plazmida pVMC1 in pTS55	32
3.2.1.2	Plazmid pVMC1- <i>ermE</i>	33
3.2.1.3	Plazmid pVMC1- <i>ermE*</i>	33
3.2.1.4	Plazmida pVMC2- <i>ermE</i> in pVMC2- <i>ermE*</i>	34
3.2.2	Mikroorganizmi	34
3.2.3	Gojišča	35
3.2.3.1	2TY ("triptone yeast extract media")	35
3.2.3.2	Soja manitol (SM)	35
3.2.3.3	SAM (sporulacijsko gojišče za bakterijo <i>S. cinnamonensis</i>)	36
3.2.3.4	STS (sporulacijsko gojišče za bakterijo <i>S. tsukubaensis</i>)	36
3.2.3.5	MMAM (sporulacijsko gojišče za streptomicete)	36

3.2.3.6	TSB ("tryptic soy broth")	37
3.2.3.7	VEG-MON (gojišče za vegetativno fazo kultivacije bakterije <i>S. cinnamonensis</i>)	37
3.2.3.8	PROD-MON (gojišče za produkcijsko fazo kultivacije bakterije <i>S. cinnamonensis</i>)	37
3.2.3.9	VSTS (gojišče za vegetativno fazo kultivacije bakterije <i>S. tsukubaensis</i>)	38
3.2.3.10	PSTS (gojišče za produkcijsko fazo kultivacije bakterije <i>S. tsukubaensis</i>)	38
3.2.3.11	CRM	38
3.2.4	Pufri	39
3.2.4.1	50-kratni pufer TAE (Tris-acetatni pufer z EDTA) za agarozno elektroforezo	39
3.2.5	Komercialni kompleti za delo v genskem laboratoriju	39
3.2.6	Ostali reagenti, encimi, standardi, pufri, barvila in spojine	39
3.2.7	Antibiotiki	40
3.2.8	Aparature	41
3.2.9	Steklovina in potrošni material	42
3.3	METODE DELA	42
3.3.1	Priprava plazmidov z molekularno biološkimi tehnikami	42
3.3.1.1	Priprava plazmida pVMC1- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i>	42
3.3.1.2	Priprava plazmida pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i>	44
3.3.2	Transformacija streptomicet	45
3.3.2.1	Priprava spor divjih tipov izbranih streptomicetnih gostiteljev	45
3.3.2.2	Transformacija s pomočjo postopka konjugacije	45
3.3.2.3	Priprava elektrokompetentnih celic bakterije <i>S. rimosus</i>	47
3.3.2.4	Elektrotransformacija celic bakterije <i>S. rimosus</i>	47
3.3.2.5	Priprava in shranjevanje spor transformiranih streptomicet	47
3.3.3	Testiranje transformant streptomicet za produkcijo flaviolina	48
3.3.3.1	Kultivacija v gojišču TSB	48
3.3.3.2	Izbor pozitivnih transformant streptomicet	48
3.3.4	Kultivacija pozitivnih transformant streptomicet v tekočem gojišču	49
3.3.4.1	Kultivacija v gojišču TSB	49

3.3.4.2	Kultivacija v kompleksnih gojiščih	50
3.3.4.3	Spektrofotometrična analiza vzorcev	50
3.3.4.4	Analiza podatkov	51
4	REZULTATI	52
4.1	PRIPRAVA PLAZMIDOV Z MOLEKULARNO BIOLOŠKIMI METODAMI	52
4.1.1	Kontrolna restrikcija pVMC1- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i>	52
4.1.2	Kontrolna restrikcija pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i>	53
4.2	USPEŠNOST TRANSFORMACIJE STREPTOMICETNIH GOSTITELJEV	54
4.2.1	Meritve absorbance pri valovni dolžini 370 nm	54
4.2.2	Izbor pozitivnih streptomicetnih transformant	54
4.3	KVALITATIVNA OCENA MOČI IZRAŽANJA <i>rppA</i> NA AGAR PLOŠČAH	55
4.4	KULTIVACIJA POZITIVNIH KOLONIJ V TEKOČEM GOJIŠČU IN KVANTITATIVNA DOLOČITEV IZRAŽANJA GENA <i>rppA</i>	57
4.4.1	Izbor optimalne valovne dolžine za detekcijo flaviolina	57
4.4.2	Delovanje promotorjev v izbranih streptomicetnih gostiteljih	62
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	OBSTOJEČI POROČEVALSKI SISTEMI ZA AKTINOMICETE	65
5.2	OVREDNOTENJE POROČEVALSKEGA SISTEMA NA OSNOVI <i>rppA</i>	66
5.3	KVALITATIVNA OCENA MOČI PROMOTORJEV	69
5.4	IZBIRA USTREZNE VALOVNE DOLŽINE ZA KVANTITATIVNO DETEKCIJO FLAVIOLINA	69
5.5	DELOVANJE PROMOTORJEV V RAZLIČNIH SEVIH IZBRANIH STREPTOMICET	70
5.6	SKLEPI	71
6	POVZETEK	72
7	VIRI	73
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Približno število naravnih sekundarnih metabolitov razvrščenih po proizvodajalskih organizmih (Kieser in sod., 2000).	9
Preglednica 2: Seznam mikroorganizmov.	34
Preglednica 3: Sestava gojišča 2TY (Sambrook in sod., 1989).	35
Preglednica 4: Sestava gojišča SM.	35
Preglednica 5: Sestava gojišča MMAM.	36
Preglednica 6: Sestava gojišča TSB.	37
Preglednica 7: Sestava gojišča CRM.	38
Preglednica 8: Komercialni kompleti za delo v genskem laboratoriju.	39
Preglednica 9: Ostali reagenti, encimi, standardi, barvila in spojine.	39
Preglednica 10: Uporabljeni antibiotiki.	40
Preglednica 11: Aparature uporabljene med diplomskim delom.	41
Preglednica 12: Pogoji za encimske reakcije, ki smo jih uporabili pri pripravi plazmida pVMC1- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> .	44
Preglednica 13: Pogoji za encimske reakcije, ki smo jih uporabili pri pripravi plazmida pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> .	45
Preglednica 14: Volumen/količina spor in vrste trdnih gojišč, ki smo jih uporabili pri postopku transformacije izbranih sevov s postopkom konjugacije.	46
Preglednica 15: Priprava vzorcev za spektrofotometrično analizo.	51
Preglednica 16: Učinkovitost transfekcije pri različnih sevih in izbranih promotorjih.	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Poenostavljeno filogenetsko drevo mikroorganizmov iz skupine aktinomicet	4
Slika 2: Shema življenjskega kroga vrste <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	7
Slika 3: Poročevalski sistem na osnovi <i>whiE</i> operona testiran v vrsti <i>Streptomyces lividans</i>	13
Slika 4: Poročevalski sistem na osnovi <i>xylE</i> gena testiran v vrsti <i>S. lividans</i>	14
Slika 5: Poročevalski sistem na osnovi <i>luxAB</i> gena testiran v vrsti <i>S. coelicolor</i>	15
Slika 6: Poročevalski sistem na osnovi gena za EGFP testiran v vrsti <i>S. coelicolor</i>	17
Slika 7: Poročevalski sistem na osnovi <i>redD</i> gena testiran v vrsti <i>S. coelicolor</i>	18
Slika 8: Encimske aktivnosti poliketid sintaz in njihovi poliketidni produkti	20
Slika 9: Organiziranost genskega zapisa vseh treh tipov PKS	22
Slika 10: Filogenetsko drevo bakterijskih in rastlinskih PKS tipa III	23
Slika 11: Rast mutiranega seva <i>S. griseus</i> s prekinjenim genom <i>rppA</i> v primerjavi z divjim tipom	24
Slika 12: Sinteza flaviolina iz malonil-CoA, ki jo katalizira encim RppA	25
Slika 13: Organiziranost operona <i>rppA</i> v različnih bakterijah	25
Slika 14: Sinteza HPQ melanina iz malonil-CoA preko RppA in P-450mel (RppB)	26
Slika 15: Shema laboratorijskega dela v molekularno biološkem laboratoriju.	30
Slika 16: Shema laboratorijskega dela v mikrobiološkem laboratoriju.	31
Slika 17: Restriksijski mapi plazmida pVMC1 in plazmida pTS55	33
Slika 18: Vzorec velikostnega standarda GeneRuler™ DNA Ladder Mix	40
Slika 19: Restriksijski profili plazmidov pVMC1- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> , in pVMC1 rezanih z encimom <i>AatII</i> .	53
Slika 20: Restriksijski profili plazmidov pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> in pTS55 rezanih z encimom <i>PstI</i>	54
Slika 21: Transformante vrste <i>Streptomyces cinnamonensis</i> po 14 dnevni inkubaciji na SAM agar ploščah pri 28°C	56
Slika 22: Transformante vrste <i>Streptomyces rimosus</i> po 14 dnevni inkubaciji na SM agarnih ploščah pri 28°C	56
Slika 23: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste <i>Streptomyces coelicolor</i> , z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB.	58

Slika 24: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces cinnamonensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. 59

Slika 25: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces rimosus*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. 60

Slika 26: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces tsukubaensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. 60

Slika 27: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces cinnamonensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PROD-MON. 61

Slika 28: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces tsukubaensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PSTS. 62

Slika 29: Sprememba absorbance gojišča v katerem so rasli transformirani sevi streptomicet. 64

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidno zaporedje uporabljenega gena *rppA* iz organizma *Saccharopolispora erythraea*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2TY	okrajšava za "triptone yeast extract media". Enostavno mikrobiološko gojišče, ki se uporablja za namnoževanje bakterij.
ABS	absorbanca ali optična gostota.
Δ ABS	sprememba absorbance.
ACP	proteinski prenašalec acilne skupine. Je encim oziroma encimska domena na katero se med sintezo poliketidov veže nastajajoča poliketidna veriga. ACP sodelujejo tudi pri sintezi maščobnih kislin.
AT	acil transferaza oziroma acil transferazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo acil transferazno encimsko aktivnost. Odgovorne so za aktivacijo posameznih molekul substrata, ki je vključen v sintezo poliketidne verige.
CoA	koencim A. Koencim, ki sodeluje pri sintezi poliketidov in tudi maščobnih kislin.
CRM	enostavno tekoče gojišče, ki se uporablja za kultivacijo bakterije <i>S. rimosus</i> (pri postopku priprave elektrokompetentnih celic).
DH	dehidrataza oziroma dehidratazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo dehidratazno aktivnost. Katalizirajo odcepitev vode iz nastajajoče poliketidne verige, kar ima za posledico dvojno vez med atomoma ogljika v verigi.
ER	enoil reduktaza oziroma enoil reduktazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo enoil reduktazno aktivnost. Odgovorne so za dokončno redukcijo β -ogljikovega atoma v poliketidni verigi.
FAS	sintaza maščobnih kislin. Encim, ki sodeluje pri sintezi maščobnih kislin. Obstajajo dokazi, da so encimi PKS in FAS evolucijsko sorodni.
HPQ melanin	kompleksni pigmenti, katerih osnovni gradnik so molekule flaviolina. Proizvajalske organizme ščitijo pred UV sevanjem.
HPQ	1,4,6,7,9,12-heksahidroksiperilen-3,10-kinon. Je flaviolinski dimer, katerega nastanek katalizira encim RppB. Je intermediat v reakciji nastajanja kompleksnih HPQ melaninov.
KR	keto reduktaza oziroma ketoreduktazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo keto reduktazno aktivnost. Te domene so odgovorne za redukcijo karbonilnih skupin poliketidne verige v alkohole.
KS	keto sintaza oziroma ketosintazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo ketosintazno aktivnost. So domene s kondenzacijsko aktivnostjo, odgovorne za podaljševanje poliketidne verige.
Mbp	mega bazni pari. Mera za dolžino nukleotidnega zaporedja. 1 Mbp je 1 milijon baznih parov.
MMAM	kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo streptomicet.
ORF	odprt bralni okvir (open reading frame). Je del v molekuli DNA, kjer zaporedni nukleotidni trojčki v kodonih določajo aminokislino in niso prekinjani s stop kodoni.
PROD-MON	kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za produkcijsko fazo kultivacije bakterije <i>S. cinnamonensis</i> .
PKS	poliketid sintaza. Encim, ki sodeluje pri sintezi poliketidov.

PSTS	kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za produkcijsko fazo kultivacije bakterije <i>S. tsukubaensis</i> .
SAM	kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo bakterije <i>S. cinnamonensis</i> .
SM	okrajšava za "soja manitol". Kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo streptomicet.
STS	kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo bakterije <i>S. tsukubaensis</i> .
TE	tioesteraza oziroma tioesterazna aktivnost. Posamezne proteinske domene poliketid sintaz imajo tioesterazno aktivnost. Domene s tioesterazno aktivnostjo omogočijo sprostitve nastajajoče poliketidne verige iz encimskega kompleksa in tako zaključijo podaljševanje poliketida.
THN	1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen. Primarni produkt encima RppA. THN je nestabilen, zato hitro oksidira v flaviolin.
THN	1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen. Je osnovni produkt encima RppA, ki je nestabilen in oksidira v flaviolin.
TSB	okrajšava za "tryptic soy broth". Enostavno tekoče gojišče, ki se uporablja za kultivacijo streptomicet.
VEG-MON	kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za vegetativno fazo kultivacije bakterije <i>S. cinnamonensis</i> .
VSTS	kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za vegetativno fazo kultivacije bakterije <i>S. tsukubaensis</i> .
<i>x-gal</i>	bromo-kloro-indolil-galaktopiranozid. Je galaktozid z vezanim indolom. Ob prisotnosti β -galaktozidaze <i>x-gal</i> razpade na galaktozo in 5-bromo-4-kloro-3-hidroksiindol. Slednji spontano oksidira v netopen moder produkt. <i>x-gal</i> se uporablja v molekularni biologiji v modro belem testu.
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov.

SLOVARČEK

- »Ojačan« zeleni fluorescenčni protein - oziroma "enhanced green fluorescent protein" je oblika zelenega fluorescenčnega proteina, ki je prilagojen na izražanje v sesalskih celicah in se dobro izraža tudi v aktinomicetah. Zeleni fluorescenčni protein je poročevalski gen, ki ob svetlobnem vzbujanju emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Emitirano svetlobo lahko zaznamo, določimo njen prostorski izvor in delno tudi moč.
- Biosintezni inženiring - je novejši pristop k izdelavi novih (poliketidnih) učinkovin, pri katerem s pomočjo genskih manipulacij proizvodnega organizma dosežemo, da ta izdeluje načrtovane spojine.
- Ekstracelularni protein - je protein, ki se po nastanku izloči iz celice ven v gojišče.
- Heterologen gen - je gen, ki ga s pomočjo molekularno bioloških metod vnesemo v nek organizem in naravno v njem ni prisoten.
- Iterativen - pomeni ponavljajoč. V diplomskem delu se izraz uporablja za opis načina sinteze poliketidov. Pri iterativnem načinu sinteze poliketidov je en encim oziroma aktivno mesto na encimu pri sintezi poliketida uporabljen večkrat.
- Poliketidi - so sekundarni metaboliti bakterij, gliv, rastlin in živali. Nastanejo s polimerizacijo acetilnih in propionilnih podenot. Polimerizacijo katalizirajo encimi poliketid sintaze, ki so podobne sintazam maščobnih kislin. So osnovni gradniki številnih naravnih produktov, pogosto imajo tudi biološko aktivnost.
- Poročevalski sistem - je kombinacija genov s katerimi lahko ugotovimo moč promoterjev. Običajno je osnovni element poročevalskega sistema gen, katerega produkt je enostavno kvantitativno določiti v laboratoriju. Pred genom se v sistemu nahaja poliklonsko mesto, kamor vstavimo testirana zaporedja, vse skupaj je obdano s terminatorskimi zaporedji, ki preprečijo spontan prepis poročevalskega gena.
- Presejalni test - je metodološki postopek s katerim preiščemo veliko število primerkov (kolonij, nukleotidnih zaporedij, oseb) pri katerih iščemo določeno značilnost.
- Promotor - je nukleotidno zaporedje, ki se nahaja na 5' koncu gena in regulira njegovo izražanje.
- Transformanta - je bakterija, ki je prejela plazmid. V primeru, da ga je prejela od druge bakterije s konjugacijo, ji lahko rečemo tudi konjuganta.

1 UVOD

Aktinomicete so bakterije, ki proizvajajo širok nabor sekundarnih metabolitov. Številni med njimi so biološko aktivni, ter se uporabljajo kot aktivne učinkovine za zdravljenje različnih bolezni. Do nedavnega je bil poglavitni princip odkrivanja novih spojin iskanje le teh v naravi s pomočjo obsežnih presejalnih testov. Zadnje čase se vedno bolj uveljavljajo napredni postopki, kot je na primer biosintezni inženiring. Rezultat tega so popolnoma nove, v naravi do sedaj še nepoznane strukture z izboljšanimi farmacevtskimi lastnostmi.

Razvoj novih spojin s pomočjo novih pristopov zahteva tudi dobra molekularno biološka orodja. Teh v aktinomicetni biologiji še vedno primanjkuje. Težave nastopijo že pri poizkusu ocenitve moči promotorjev, ki bi jih želeli uporabiti za promocijo ekspresije heterolognih genov. Z naslednjim problemom se spopademo, ko želimo ugotoviti, kdaj se tekom življenjskega cikla neke aktinomicete pričnejo izražati določeni geni ter kako močno se izražajo. Pogosto je razlog je v odsotnosti učinkovitega poročevalskega sistema, s katerim bi lahko na enostaven način ovrednotili moč promotorjev v določeni vrsti. Obstaja več poročevalskih sistemov za uporabo v aktinomicetah, vendar noben med njimi ne doseže zanesljivosti in predvsem enostavnosti v primerjavi z *lacZ* sistemom, ki se najpogosteje uporablja pri tovrstnih študijah drugih mikroorganizmov. Slednji v aktinomicetah zaradi več razlogov ne deluje (glej poglavje 2.2).

1.1 NAMEN DELA

Namen tega diplomskega dela je razvoj in ovrednotenje novega poročevalskega sistema za uporabo v aktinomicetah. Poskusili bomo razviti sistem na osnovi streptomicetnega gena *rppA*, ki kodira encim kalkon sintazo. Končni produkt tega encima je rjavo obarvan poliketid flaviolin. Predvidevamo, da bo naš sistem v aktinomicetah deloval bolje kot večina obstoječih sistemov. Njegov temeljni gen (*rppA*) je namreč izoliran ravno iz aktinomicet (Cortes in sod., 2002) in zato lahko upravičeno pričakujemo dobro izražanje v tej skupini organizmov. Predvidevamo, da bo prednost sistema tudi v enostavnih in cenenih kvantitativnih meritvah relativne koncentracije končnega produkta. Flaviolin se izloča iz celic, zato se njegovo relativno koncentracijo lahko enostavno določi s spektrofotometrično meritvijo supernatanta kulture. Ker je substrat, ki ga ta encim uporablja prisoten v vsaki celici (malonil-CoA), pričakujemo univerzalno uporabnost sistema v vseh vrstah aktinomicet. Z enostavnostjo postopka meritev in uporabnostjo v vseh vrstah aktinomicet, se trenutno ne more pohvaliti noben od obstoječih poročevalskih sistemov.

Sistem bomo ovrednotili s testiranjem v štirih različnih vrstah streptomicet. Testirali bomo dva industrijska seva, ki se v praksi uporabljata za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Kot taka sta potencialni tarči za manipulacije z biosinteznim inženiringom. To sta *Streptomyces cinnamonensis* (proizvajalec polieterskega kokcidostatika monenzina) in *Streptomyces*

tsukubaensis, ki je proizvajalec medicinsko pomembnega imunosupresorja FK506. Sistem bomo ovrednotili tudi v modelni vrsti *Streptomyces coelicolor* in v vrsti *Streptomyces rimosus* 4018.

2 PREGLED OBJAV

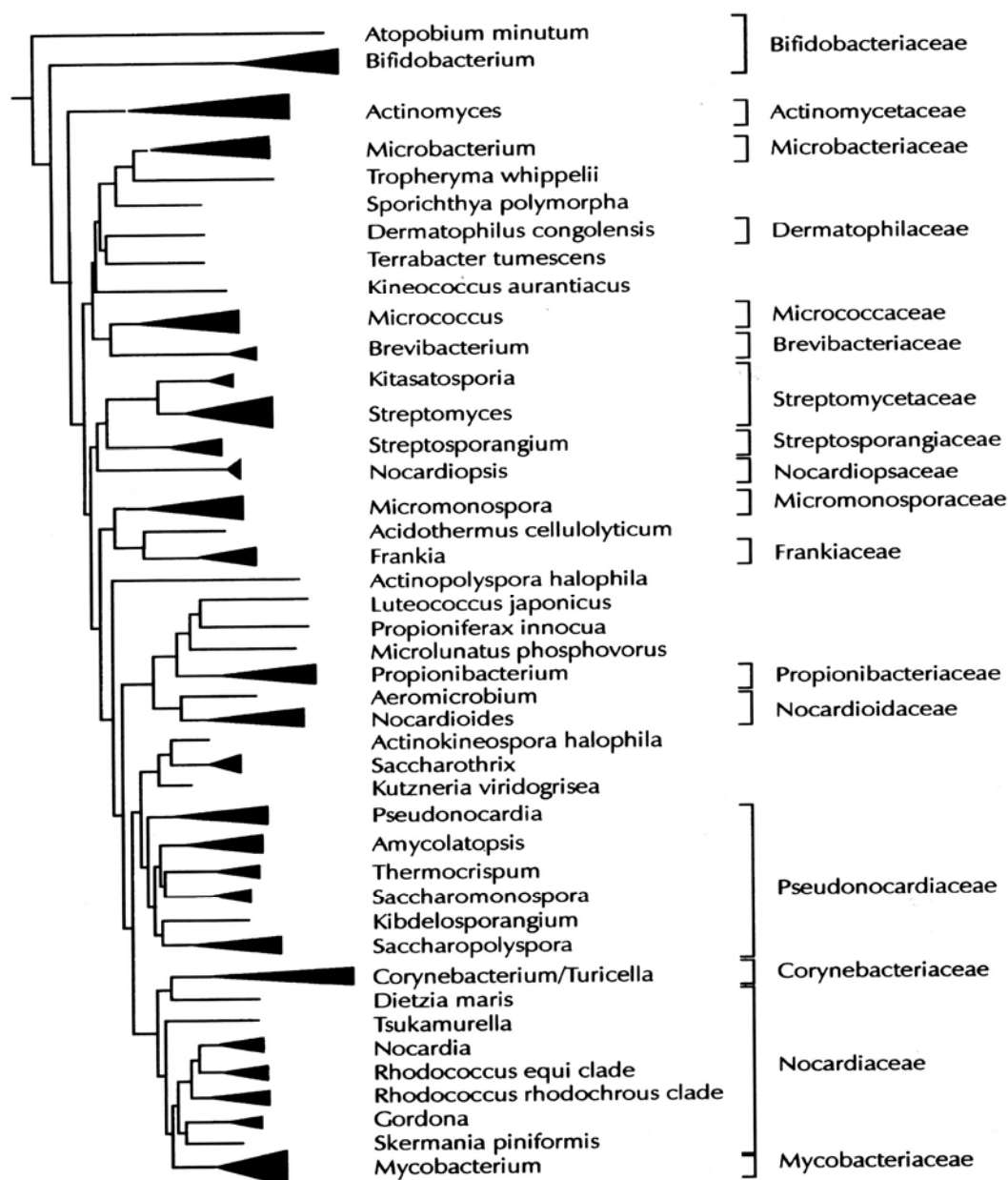
2.1 AKTINOMICETE

2.1.1 Splošne lastnosti aktinomicet

Aktinomicete so velika skupina pogosto filamentoznih, po Gramu pozitivnih bakterij z visoko vsebnostjo GC baznih parov. Njihov genom vsebuje 63-78 molskih % GC. Značilnost večine aktinomicet je rast v obliki razvejanega micelija, ki je morfološko podoben miceliju višjih gliv, čeprav je v resnici bakterijski. Aktinomicete so znane tudi po tvorbi vegetativnih spor. Te se razlikujejo od endospor tako po odpornosti, kot po nastanku. So bolj dovzetne za okoljske dejavnike kot endospore, nastanejo s septiranjem več jedrnega micelija in ne z endosporulacijo. Ravno tako kot endospore so tudi spore aktinomicet namenjene preživetju v težkih razmerah, poleg tega pa tudi širjenju v okolju (Madigan in sod., 2003).

V skupino aktinomicet uvrščamo več različnih bakterijskih družin. Skupina je zelo razširjena v okolju. Razdelimo jih na aerobne, ki so prisotne predvsem v zemlji in anaerobne, ki jih najdemo tudi v ljudeh in živalih (Abou-Zeid, 1995). Najbolj raziskane so vrste iz rodu *Streptomyces*. Ta rod je znan po proizvodnji številnih sekundarnih metabolitov s protibakterijskimi, proti glivnimi, imunosupresivnimi, proti rakavimi in drugimi medicinsko uporabnimi lastnostmi (Menzella in Reeves, 2007). Med aktinomicete spadajo tudi nekateri patogeni mikroorganizmi, na primer vrste iz rodov *Nocardia*, *Rhodococcus* in *Mycobacterium* (Georgiew, 1998).

Raznolikost aktinomicet in sorodstvena razmerja med družinami, ki jih uvrščamo v ta red, prikazuje poenostavljeno filogenetsko drevo, pripravljeno na osnovi 16S rRNK nukleotidnega zaporedja (slika 1). Drevo je pripravljeno s pomočjo metode združevanja najbližjih sosedov z vrsto *Bacillus subtilis*, kot primerom najmanj sorodnega organizma (Keiser in sod., 2000).



Slika 1: Poenostavljeno filogenetsko drevo mikroorganizmov iz skupine aktinomicet (Keiser in sod., 2000).

2.1.2 Rod *Streptomyces*

2.1.2.1 Taksonomija streptomicet

Taksonomija streptomicet je bila v preteklosti neurejena. Zaradi pomena, ki ga imajo sekundarni metaboliti v zdravstvu in njihovega industrijskega oziroma ekonomskega pomena, so streptomicete industrijsko zelo zanimivi mikroorganizmi. V preteklosti so tako opisali prek 3000 različnih streptomicetnih vrst (Anderson in Wellington, 2001), kar pa je bilo večinoma posledica potrebe po poimenovanju proizvodnih organizmov v patentni zakonodaji. Kasnejše

taksonomske študije so pokazale, da je število vrst močno precenjeno in ne ustreza kriterijem za razvrstitev v taksonomske enote (Kieser in sod., 2000).

Prva študija z namenom razrešiti filogenetska razmerja med streptomicetami je bila objavljena leta 1983 (Williams in sod., 1983). Temeljila je na primerjavi fenotipskih lastnosti med kandidatnimi vrstami. Kasneje je Kämpfer s sodelavci objavil podobno študijo, pri katerih so bile uporabljene enake metode za razvrščanje mikroorganizmov v taksonomske enote. Študija je potrdila prvotne ugotovitve (Kämpfer in sod., 1991). V devetdesetih letih so avtorji objavili tudi prve študije, ki so temeljile na analizi zaporedja gena za 16S rRNA (Witt in Stackebrandt, 1990; Stackebrandt in sod., 1991; Stackebrandt in sod. 1992). Poizkusi razvrščanja streptomicet na podlagi gena za 16S rRNA so bili le delno uspešni. Marsikdaj so si bila zaporedja preveč podobna, da bi jih lahko uporabili za filogenetsko analizo. Kljub temu so na podlagi pridobljenih podatkov med streptomicete uvrstili nekatere vrste, ki so se pred tem uvrščale v druge taksonomske enote. Tako so imena *Chainia*, *Kitasatoa* in *Streptoverticillium* postali sinonimi za *Streptomyces* (Anderson in Wellington, 2001). Približno v istem obdobju so bile objavljene tudi prve filogenetske študije, ki so temeljile na primerjavi homologije celotne DNA. V teh študijah se je izkazalo, da obstaja določena filogenetska heterogenost znotraj vrst, ki so bile oblikovane na podlagi fenotipskih primerjav (Labeda in Lyons, 1991; Labeda, 1992).

Danes se za potrebe filogenetskega razvrščanja streptomicet uporablja številne metode. Nekatere temeljijo na primerjavi fenotipskih lastnosti, druge na kemotaksonomiji, tretje na analizi genoma. Rezultati pridobljeni z različnimi postopki so zelo podobni, vendar se vseeno dovolj razlikujejo med seboj, da je uporaba različnih metod smiselna. Univerzalno veljavna taksonomska razvrstitev streptomicetnih vrst po sorodnosti zato ne obstaja (Anderson in Wellington, 2001).

2.1.2.2 Ekologija streptomicet

Streptomicete večinoma najdemo v zemlji, manj pogosto tudi v vodi. Na življenje v zemlji so dobro prilagojene, saj tvorijo spore, ki pripomorejo k preživetju v neugodnih, predvsem sušnih pogojih. Ker rastejo v micelarni obliki, imajo zelo dobro sposobnost prostorskega širjenja v suhih tleh, v mokrih pa se ta prednost pred gibljivimi bakterijami z bički izgubi. Ravno zato jih pogosteje najdemo v tleh, ki so dobro drenirana (osušena), kot pa v vlažnih tleh, kjer se voda zadržuje dalj časa. Poleg nekaterih cianobakterij so streptomicete poglavitne proizvajalke skupine snovi, ki jim pravimo geozmini. Ti dajejo zemlji značilen vonj (Madigan in sod., 2003).

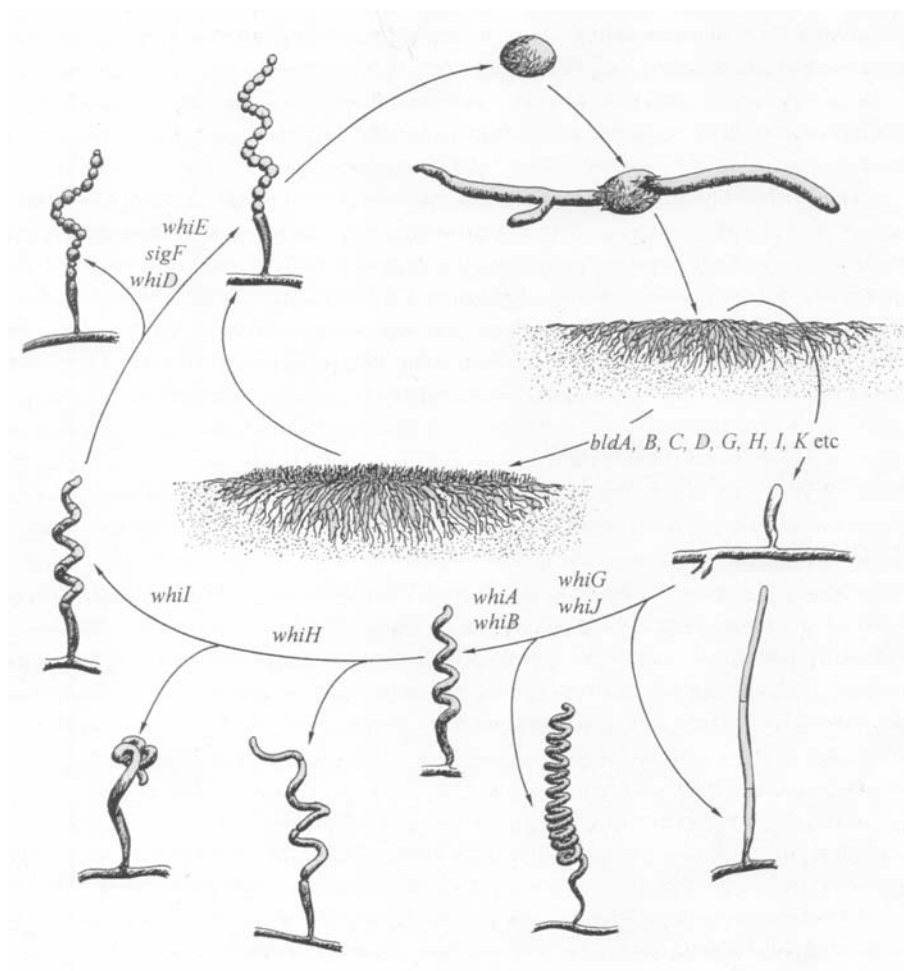
Večino časa streptomicete obstajajo v obliki metabolno neaktivnih spor, ki so odporne na pomanjkanje hranil in vode. Spore so odporne na različne stresne dejavnike, kar dokazuje dejstvo, da so živo kulturo namnožili celo iz 70 let starega vzorca zemlje. Tudi ob nastopu za kalitev ugodnih razmer vse spore ne kalijo. Obstajajo teorije, da so streptomicete sposobne

medceličnega komuniciranja, ki uravnava število kalečih spor. S tem se doseže optimalno število vegetativnih celic, glede na dostopnost hranil v okolju. Streptomicete so sposobne razgradnje številnih kompleksnih substratov, pri katerih si pomagajo z encimi, ki jih izločajo v okolje. Znale so kot proizvajalke celulaz, ksilanaz, amilaz, maltaz in drugih biotehnološko zanimivih encimov. Poleg običajne zemlje streptomicete kolonizirajo tudi rizosfero, to je območje tik ob rastlinskih koreninah. Verjetno gre za neke vrste simbiozo. V območju okrog korenin je namreč povišana koncentracija hranil, ki jih izločajo rastline. Streptomicete ta hranila izkoriščajo, v zameno pa proizvajajo antibiotike, ki preprečijo rast ostalih, potencialno patogenih mikroorganizmov. Vendar vse streptomicete ne živijo v sožitju z rastlinami. Nekatere so rastlinski patogeni. Vrste *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* in *Streptomyces ipomoea* povzročajo bolezni krompirja, *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces sparsogenes* in *Streptomyces flavovirens* pa drevesne bolezni (Kieser in sod., 2000).

2.1.2.3 Morfologija streptomicet

Kot že omenjeno so streptomicete večino časa v obliki spor. Ob ugodnih razmerah se prične kalitev, ki predstavlja začetek življenjskega kroga. Takoj po kalitvi nastanejo hife, te se kmalu razrastejo v razvejan micelij. Filamenti v miceliju imajo navadno premer 0,5-10 μm . Rast se odvija na koncih hif, kjer tudi prihaja do razvejanja. V tekočem gojišču skoraj vse streptomicete rastejo v obliki majhnih prepletov hif, nastalih iz posameznih spor. Tem prepletom pravimo peleti. S staranjem kulture in ob nastopu neugodnih razmer, običajno je to pomanjkanje hranil, se prične sporulacija. Na trdnem gojišču pride do izraščanja zračnih hif, ki štrlijo navzgor iz micelija. Sčasoma iz teh hif nastane več jedrni sporofor, ki se z nastankom prečnih sten loči na posamezne spore. Ta način nastajanja spor se razlikuje od nastanka endospor. Endospore so tudi precej bolj odporne na okoljske dejavnike, kot pa spore streptomicet. Ob sporulaciji streptomicete pričnejo izdelovati tudi sekundarne metabolite. Verjetno si z njimi v kritičnih trenutkih zagotovijo prednost pred drugimi organizmi prisotnimi v okolju, ter tako uspešno zaključijo procesa sporulacije (Madigan in sod., 2003).

Sporulacija in sekundarni metabolizem sta podvržena kompleksni regulaciji, ki je predmet intenzivnih raziskav. Poznavanje regulacijskih mehanizmov sinteze antibiotikov je namreč izjemnega pomena za izboljšanje donosov le teh v industrijskih sevih streptomicet. Na sliki 2 je shematsko prikazan življenjski krog vrste *Streptomyces coelicolor* A3(2). Predstavljen je celoten krog, ki se prične s kalitvijo spore, razrastom micelija, pojavom zračnega micelija, njegovim spiralnim ovijanjem in septiranjem. Cikel se konča s popolnim razpadom sporofora na posamezne spore. Na sliki so označeni tudi pomembni regulatorni geni, ki kontrolirajo vstop v posamezno stopnjo življenjskega kroga. Stranske puščice kažejo na fenotipe mutiranih sevov, ki imajo okvarjene posamezne regulatorne gene (Kieser in sod., 2000).



Slika 2: Shema življenjskega kroga vrste *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Kieser in sod., 2000).

2.1.2.4 Fiziologija streptomicet

Metabolizem streptomicet je večinoma zelo zapleten in je posledica prilagajanja na kompleksne substrate v njihovem naravnem okolju - zemlji. Kot vir ogljika lahko uporabljajo enostavne molekule, na primer sladkorje, alkohole, organske kisline, aminokisline ter nekatere aromatske snovi. Poleg enostavnih virov ogljika izkoriščajo tudi kompleksne polisaharide, na primer škrob, celulozo, hemicelulozo ter celo lignin, tanin in gumo. Izkoriščajo tudi proteine in maščobe. Razgradnjo omenjenih kompleksnih substratov jim omogočajo številni ekstracelularni encimi, ki jih izločijo v okolico (Madigan in sod., 2003).

Pri večini vrst katabolizem glukoze poteka po poti Embden-Mayerhof-Parnas (glukoza-1-6-bisfosfatna pot glikolize), pri nekaterih tudi po poti pentoze-fosfata. Glavni način asimilacije dušika je pot glutamat-sintetaze in glutamat-2-oksiglutarat-transaminaze. Ta kombinacija je energijsko precej potratna, vendar deluje tudi v razmerah z nizko koncentracijo amonija, kar je za streptomicete ključnega pomena. Sinteza in razgradnja aminokislin ne odstopata bistveno od poti poznanih pri ostalih bakterijah (Kieser in sod., 2000).

Poleg primarnega metabolizma imajo streptomicete tudi kompleksno uravnavan in raznovrsten sekundarni metabolizem. Pomen sekundarnega metabolizma ni natančno poznan. Verjetno je namenjen pridobivanju prednosti pri tekmovanju z ostalimi organizmi in sicer v pogojih s pomanjkanjem hranil. Marsikateri produkt sekundarnega metabolizma je medicinsko uporaben, ze številne pa biološke vloge ne poznamo (Kieser in sod., 2000).

2.1.2.5 Genom streptomicet

Genom streptomicet vsebuje velik delež GC baznih parov. Teh je v povprečju 70-74 molskih %. Kromosom skoraj vseh streptomicet je linearen in je velik 7,8-8,0 Mbp. Na koncih ima dolge obrnjene ponovitve (terminal inverted repeats), nanje pa vezane proteine, ki sodelujejo pri podvojevanju genoma. Ravno linearen kromosom je verjetno vzrok za obsežne delecije genoma, ki so pogoste pri streptomicetah (Kieser in sod., 2000).

Večina streptomicetnih sevov vsebuje plazmide. Ti so lahko krožni ali linearni. Nekateri plazmidi nosijo fagnim podobna *int* in *xis* mesta, ki posredujejo mestno specifično nemutageno integracijo v genom. Zanimivo je, da skoraj vsi plazmidi, tudi tisti najmanjši, nosijo vse gene potrebne za konjugacijo. Nasprotno od pričakovanj, plazmidi večinoma ne nosijo zapisov za rezistenco na antibiotike, kot tudi ne zapisov za njihovo sintezo (Kieser in sod., 2000).

Zelo pogosti so tudi fagi, ki okužujejo streptomicete. Podobno kot transpozicijski elementi so tudi fagi zanimivi predvsem kot genetsko orodje za spreminjanje genoma streptomicet. Poleg tega so fagi pomembni kontaminanti v proizvodnji sekundarnih metabolitov s streptomicetami. Ob okužbi proizvodnega bioreaktorja s fagom, lahko namreč pride do popolne lize kulture v njem, kar posledično pomeni izgubo celotne polnitve in precejšnjo finančno škodo (Kieser in sod., 2000).

2.1.2.6 Streptomicete kot proizvajalke sekundarnih metabolitov

Sekundarni metaboliti so produkti celičnega metabolizma, ki niso nujno potrebni za rast organizma. V sintezi sekundarnih metabolitov običajno sodeluje veriga encimov, ki enega ali več produktov primarnega metabolizma preoblikujejo v novo obliko – sekundarni metabolit. Osnovni gradniki za sintezo le teh so lahko različni. Najpogosteje v tej vlogi nastopajo: monosaharidi, oligosaharidi, polisaharidi, aminokisline, acilni prekursorji in nukleotidi (Hanson, 2003). Sekundarne metabolite proizvaja veliko skupin živih organizmov. Najdlje so poznani sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo rastline, čeprav teh še zdaleč ni največ. Poleg rastlin jih proizvajajo tudi drugi višji organizmi, na primer alge, lišaji ter nekatere živali (Crozier in sod., 2006). Hiter biotehnološki napredek v zadnjem stoletju je vodil v odkritje številnih sekundarnih metabolitov, ki jih proizvajajo mikroorganizmi. Iz tega stališča je rod

Streptomyces zanimiv. Znano je, da so aktinomicete vir približno tretjine poznanih antibiotikov in drugih biološko aktivnih spojin. Od teh jih 80 % proizvajajo streptomicete. Sekundarni metaboliti streptomicet imajo predvsem antibiotske lastnosti. Poznamo pa tudi take, ki delujejo imunosupresivno, protirakavo in nevroregenerativno. Nekateri so specifični inhibitorji encimov ter se na primer uporabljajo za zniževanje količine holesterola v krvi, drugi za zaviranje prevzema maščob iz črevesja. Iz preglednice 1 je razvidno kako pomembne proizvajalke sekundarnih metabolitov so streptomicete (Kuščer in sod., 2005; Kieser in sod., 2000).

Preglednica 1: Približno število naravnih sekundarnih metabolitov razvrščenih po proizvodjskih organizmih (Kieser in sod., 2000).

Organizmi proizvajalci	Biološko aktivni sekundarni metaboliti			Neaktivni sekundarni metaboliti
	Antibiotiki	Drugo	Skupaj	
Bakterije, ki niso aktinomicete	1.400 (12%)	240 (9%)	1.640 (11%)	2.000 – 5.000
Aktinomicete	7.900 (66%)	1.220 (40%)	9.120 (61%)	8.000 – 10.000
Glive	2.600 (22%)	1.540 (51%)	4.140 (28%)	15.000 – 25.000
Vsi mikroorganizmi	11.900 (100%)	3.000 (100%)	14.900 (100%)	25.000 – 40.000
Lišaji	150	200 - 500		1.000
Alge	700	800 - 900		1.000 – 2.000
Višje rastline	5.000	25.000 – 35.000		500.000 – 800.000
Kopenske živali	500	10.000 – 15.000		200.000 – 300.000
Morske živali	1.200	1.500 – 2.000		2.000 – 3.000
Vsi višji organizmi	7.500	35.000 – 50.000		> 1.000.000

Sekundarni metaboliti so pogosto zelo reducirane molekule, zato je njihova sinteza energetsko potratna. Razlog, zakaj jih nekateri organizmi proizvajajo, ni popolnoma jasn. Najverjetneje si s tem zagotovijo prednost pred tekmeci v okolju. Ko govorimo o sekundarnih metabolitih mikroorganizmov, se sinteza vedno prične ob stresnih situacijah. Običajno je to pomanjkanje hranil. V taki situaciji prisotnost na primer antibiotika zavre rast občutljivih organizmov. Proizvajalcu, ki je nanj odporen, pa zagotovi dovolj hranil za dokončanje življenjskega cikla (Madigan in sod., 2003; Challis in Hopwood, 2003).

Zaradi velikega števila že poznanih biološko aktivnih učinkovin, ki jih proizvajajo aktinomicete in predvsem streptomicete, so te iz biotehnološkega vidika zanimive. Po nekaterih predvidevanjih naj bi bilo do danes odkritih le okoli 3 % vseh sekundarnih metabolitov, ki jih proizvajajo streptomicete (Watve in sod., 2001). Poleg tega se zadnje čase vedno bolj uveljavljajo tudi novejši pristopi pri razvoju biološko aktivnih učinkovin. Z biosinteznim inženiringom se na primer načrtno spremeni industrijske seve streptomicet tako, da ti proizvajajo nove v naravi še neodkrite spojine, ki imajo boljše farmakološke značilnosti (Kuščer in sod., 2005).

Tako kot pri večini sekundarnih metabolitov je njihova sinteza tudi pri streptomicetah podvržena kompleksnim kontrolnim mehanizmom. Sintaza je običajno povezana s sporulacijo in je inhibirana z visokimi koncentracijami hranil. Genetsko ozadje kontrole pričetka sekundarnega metabolizma je zapleteno in dokaj nepoznano. Pri vrsti *Streptomyces coelicolor*

A3(2) je tako v kontrolo sinteze štirih antibiotikov vključenih vsaj 20 regulatornih genov. Za večino vloga ni poznana (Kieser in sod., 2000). Natančnejše poznavanje regulacijskih in tudi biosinteznih poti v streptomicetah bi zagotovo vodilo v povečanje donosa sekundarnih metabolitov pri industrijskih sevih. Olajšano bi bilo tudi načrtovanje novih oblik učinkovin s pomočjo biosinteznega inženiringa. Vendar za preučevanje genetskega ozadja sinteze sekundarnih metabolitov v streptomicetah in drugih aktinomicetah potrebujemo močna molekularno biološka orodja prilagojena tej skupini mikroorganizmov. Eno izmed osnovnih in nujno potrebnih orodij so poročevalski sistemi, s katerimi preučujemo moč, časovno odvisnost in lokalizacijo izražanja posameznih genov. Zaradi specifičnih lastnosti aktinomicet, kot na primer visoka vsebnost GC baznih parov in posebne vloge TTA kodonov, se obstoječi poročevalski sistemi pri uporabi v streptomicetah slabo odrežejo. Zato še vedno obstaja potreba po učinkovitem poročevalskem sistemu, ki bi bil univerzalno uporaben v aktinomicetah.

2.2 OBSTOJEČI POROČEVALSKI SISTEMI ZA AKTINOMICETE

Poznavanje genetskih mehanizmov in načina kontrole izražanja genov bistveno pripomore k razumevanju fiziologije določenega organizma. Pri streptomicetah je tako znanje nujno potrebno za povečevanje donosa sekundarnih metabolitov s pomočjo novejših biotehnoloških postopkov. Primer takega postopka je biosintezni inženiring, pri katerem s pomočjo natančno domišljenih genskih manipulacij, povečamo donos spojine ali spremenimo njeno strukturo tako, da ima izboljšane lastnosti. Neposredna analiza količine specifične mRNA v celici je najnatančnejši način določanja moči izražanja nekega gena na transkripcijski stopnji. Vendar so metode, ki se pri tem uporabljajo, časovno potratne in delovno intenzivne. Taki postopki so na primer: zaščita z DNazo, metoda z reverzno transkriptazo ali postopki na osnovi mikromrež. Ker je pri delu s streptomicetami običajno potrebna analiza večjega števila vzorcev, je direktni pristop v tem primeru še bolj neuporaben in predvsem predrag. Genetski poročevalski sistemi so zato nujno potrebni za študij regulatornih nukleotidnih zaporedij ter za študij vpliva različnih transkripcijskih faktorjev. Običajno eksperiment poteka tako, da preiskovano regulatorno nukleotidno zaporedje spojimo s poročevalskim genom, katerega produkt je relativno enostavno kvantitativno določiti. Količina produkta poročevalskega gena nam posredno pove, kako močna je transkripcijska aktivnost preiskovanega nukleotidnega zaporedja (Kuščer in sod., 2007; Kieser in sod., 2000).

Specifična genska zgradba aktinomicet in streptomicet na žalost preprečuje uporabo večine poznanih genetskih poročevalcev. Velik problem predstavlja visoka vsebnost GC baznih parov v streptomicetah. Translacijski sistem streptomicet je tej značilnosti prilagojen, zato se heterologni geni z višjo vsebnostjo AT baznih parov izredno slabo izražajo. Naslednji problem je specifičen pomen TTA kodonov v streptomicetah. Edina tRNA molekula, ki prepozna UUA kodon na mRNA, je namreč produkt gena *bldA*. Ta je povezan s tvorbo sekundarnih metabolitov in regulacijo drugih morfoloških značilnosti v stacionarni fazi. Citoplazemska koncentracija tRNA molekul za UUA kodone je večino življenjskega cikla

streptomicet izredno nizka, zato se geni s temi kodoni slabo izražajo (Kieser in sod., 2000; Craney in sod., 2007). Vsi poročevalski geni, ki delujejo v drugih organizmih, imajo nižjo vsebnost GC baznih parov kot streptomicete ter vsaj nekaj TTA kodonov. Prvi poizkusi uporabe teh poročevalcev v streptomicetah so se zato izkazali kot neuspešni. Sledilo je prilagajanje zaporedja, predvsem menjava AT baznih parov na tretjem mestu kodonov z ustreznimi GC baznimi pari, ter menjava TTA kodonov z drugimi kodoni, ki kodirajo levcin. Tak pristop je precej dobro uspel pri zelenem fluorescentnem proteinu (Sun in sod., 1999) in pri vpeljavi luciferaznega operona *luxCDABE* v streptomicete (Craney in sod., 2007). Žal pa pristop ni bil uspešen pri poizkusu prilagoditve *lacZ* operona na streptomicete, saj skoraj vse vrste tega rodu proizvajajo zunajcelični encime z β -galaktozidazno aktivnostjo (Bassford in sod., 1978; King in Chater, 1986). Mutante brez β -galaktozidazne aktivnosti ne rastejo tako dobro kot divji sevi, poleg tega običajno ne tvorijo zračnega micelija in ne sporulirajo. Kot take so popolnoma neuporabne za preučevanje ali uporabo v industriji (Eckhardt in Smith, 1986). Na žalost noben izmed številnih poročevalnih genov, ki se danes uporabljajo v aktinomicetah, po učinkovitosti ter predvsem enostavnosti ni primerljiv z *lacZ* operonom. Iskanje boljših poročevalcev se zato intenzivno nadaljuje. Idealen aktinomicetni poročevalski sistem bi moral imeti naslednje lastnosti (Craney in sod., 2007; Horinouchi in Beppu, 1985; Ingram in sod., 1989; Sohaskey in sod., 1991; Sun in sod., 1999; Wezel in sod., 2000):

- univerzalna uporabnost v številnih aktinomicetah
- enostavna uporaba
- hitra in delovno neintenzivna detekcija
- uporabnost v različnih gojiščih
- uporabnost v industrijskih aplikacijah
- nizka cena, po možnosti brez potrebe po dodatnih reagentih
- količina produkta čim bolj odvisna od moči izražanja (brez drugih ozkih grl)
- stabilen produkt, kar omogoča vzporedno obdelavo več vzorcev hkrati
- možnost natančne kvantitativne analize
- hitra kvalitativna vizualna ocena izražanja genov na agar ploščah
- odsotnost signala ozadja (ni lažno pozitivnih rezultatov)
- kratek genski zapis za poročevalski gen
- produkt poročevalskega gena ni toksičen za celice

2.2.1 Poročevalski sistem na osnovi genov za antibiotično rezistenco (*neo* in *cat*)

Prva poročevalska gena uporabljena v streptomicetah, sta bila gena za antibiotični rezistenci *neo* iz transpozona Tn5, ki kodira neomicinsko rezistenco (Ward in sod., 1986) in *cat* iz transpozona Tn9, ki kodira rezistenco na kloramfenikol (Bibb in Cohen, 1982). Prednost omenjenih poročevalskih genov je relativno enostavna selekcija kolonij z neomicinsko ali kloramfenikolno rezistenco. Slabost pa ta, da je sistem le delno uporaben za kvantitativne eksperimente. Kljub temu, da stopnja odpornosti na antibiotik korelira z močjo promotorja, s katerim je poročevalski gen povezan, je kvantitativno ovrednotenje moči rezistence izredno

težko. Poleg tega je sistem uporaben le v primerih, ko preučujemo konstitutivno aktivne promotorje, saj je stalno izražanje *neo* oziroma *cat* gena nujno potrebno za rast na gojišču z antibiotikom. Sistema torej nista uporabna za študije časovnega zaporedja izražanja genov (Kieser in sod., 2000).

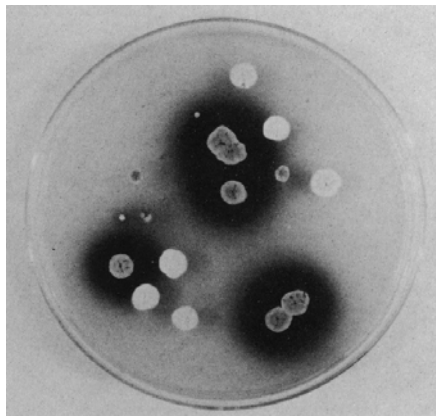
2.2.2 Poročevalski sistem na osnovi *melC* operona

melC operon iz organizma *Streptomyces glaucescens* sestavljata dva gena. Prvi gen *melC1* kodira majhen protein, ki je vključen v prenos bakra na apotirozinazo. Drugi kodira tirozinazo. V mediju, ki vsebuje CuSO_4 in tirozin, organizmi z izraženim *melC* operonom sintetizirajo temno rjavo barvilo melanin. Ta je dobro viden na ploščah okoli kolonij, spektrofotometrično ga je moč določiti tudi v tekočem gojišču (Chen in sod., 1991). Na osnovi *melC* operona je bil leta 1994 razvit poročevalski sistem v dveh variantah. V prvi je bil uporabljen plazmid z visokim številom kopij v celici. V drugi pa plazmid z integracijskim elementom *IS117* iz organizma *Streptomyces coelicolor*. Oba sistema sta se izkazala kot primerna za semi-kvantitativne študije moči promotorjev. Ker pridobljeni rezultati običajno le delno korelirajo z močjo promotorja, z njima ni moč pridobiti popolnoma zanesljivih kvantitativnih podatkov. Za poročevalske sisteme je bolje, da je število kopij preučevanega regulatornega zaporedja in z njim povezanega poročevalca natančno definirano. Ravno zato so bolj natančni sistemi razviti na integracijskih plazmidih, pri katerih se lahko v plazmid vnesen gen integrira le na eno mesto v genomu. S tem izključimo vpliv variabilnosti števila kopij poročevalskega gena na končne rezultate. Sistem na osnovi omenjenega integracijskega elementa *IS117* na žalost ni preveč uporaben, ker precej sevov streptomicet v genomu že vsebuje nekaj kopij tega elementa. Vanje se zato plazmid ne more integrirati. Izkazalo se je tudi, da pri zelo šibkih promotorjih sistem na osnovi *melC* operona ni uporaben, ker končnega produkta v nizkih koncentracijah ni moč zaznati (Paget in sod., 1994; Kieser in sod., 2000).

2.2.3 Poročevalski sistem na osnovi *whiE* operona

Sivo rjava obarvanost spor organizma *Streptomyces coelicolor* je posledica pigmenta s poliketidno strukturo. Zapis za sintezo pigmenta se nahaja na vsaj osmih genih, ki so vključeni v gensko gručo *whiE* operona (Davis in Chater, 1990). Popoln zapis za sintezo rjavega difuzibilnega pigmenta pa se nahaja na samo šestih genih tega operona. Ti geni so se izkazali kot primerni za uporabo v poročevalskem sistemu. Sistem je uporaben predvsem zato, ker je preprost. V gojišče za testiranje ni potrebno dodajati specifičnih substratov. Poleg tega je operon streptomicetnega izvora in se zato v tej skupini organizmov odlično izraža. Pigment, ki je produkt omenjenega operona, je naravno prisoten v številnih vrstah streptomicet, vendar je z razliko od modificiranega poročevalskega pigmenta, ki prosto prehaja ven iz celice, vedno vezan na celično steno. S tega stališča signal ozadja ne moti meritev (Horinouchi in Beppu, 1985). Slabosti sistema so v tem, da je izražanje poročevalca

težko kvantitativno ovrednotiti, zaradi difuzibilnosti pa ne daje prostorskih informacij o izražanju (Kieser in sod., 2000). Na sliki 3 je prikazana plošča s transformantami vrste *Streptomyces lividans*. Okrog kolonij, ki izražajo *whiE* operon, je opazno področje temne pigmentacije (Beppu, 1985).



Slika 3: Poročevalski sistem na osnovi *whiE* operona testiran v vrsti *Streptomyces lividans*. Jasno se vidi temna pigmentacija okoli kolonij, ki izražajo poročevalski operon (Horinouchi in Beppu, 1985).

2.2.4 Poročevalski sistem na osnovi *xylE*

Produkt gena *xylE* iz bakterije *Pseudomonas putida* je encim (katehol 2,3-dioksigenaza), ki pretvarja brezbarven katehol v intenzivno rumeno obarvan 2-hidroksimukoničen semialdehid. Kot poročevalski gen je bil prvič uporabljen že leta 1983, in sicer v bakteriji *Bacillus subtilis* (Zukovski in sod., 1983). Zaradi enostavnega načina merjenja produkta, ki ga je moč tudi kvantitativno zelo dobro določiti in predvsem zaradi dejstva, da redki organizmi naravno proizvajajo katehol 2,3-dioksigenazo, je reporterski sistem na osnovi tega gena precej pogosto uporabljan. Tudi v streptomicetah se je sistem izkazal kot uporaben (Ingram in sod., 1989), zato je danes najpogosteje uporabljen poročevalski gen v tej skupini organizmov.

Načinov uporabe sistema je več. Možna je *in situ* detekcija pozitivnih kolonij na ploščah. Test izvedemo tako, da ploščo s potencialno pozitivnimi kolonijami poškopimo z raztopino katehola. Sledi inkubacija, ki traja od 5 minut do 3 ure. Po tem času se kolonije, ki izražajo katehol 2,3-dioksigenazo, rumeno obarvajo. Možno je tudi kvantitativno merjenje moči izražanja določenega gena v tekočem gojišču. V tem primeru je postopek bolj zapleten. Suspenzijo celic v gojišču je potrebno najprej sonificirati na ledu (vse celice lizirajo), da ves poročevalski encim preide v gojišče. Nato v sonificirano kulturo dodamo detergent in jo centrifugiramo. Del supernatanta (vzorca) prenesemo v meritveni pufer, ki vsebuje katehol. Merimo spremembo barve pri valovni dolžini 375 nm po določenem času (Kieser in sod., 2000).

Kvantitativno določanje količine katehol 2,3-dioksigenaze je sicer natančno, vendar je postopek dolgotrajen, kar otežuje predvsem delo z večjim številom vzorcev. Sonificiranje namreč poteka v več različnih korakih, ki si morajo slediti eden za drugim v točno določenih

časovnih presledkih. Poleg tega po sonificiranju vzorci niso stabilni niti na ledu in jih je potrebno hitro uporabiti v eksperimentu. Zato je večje število vzorcev marsikdaj potrebno obdelovati zaporedno (enega za drugim) in ne več na enkrat. Omenjeno dejstvo še poveča zamudnost eksperimentov, kar je tudi največja slabost sistema. Poleg tega je sistem manj uporaben pri študiju genov, ki se izražajo v poznih fazah življenjskega cikla aktinomicet, ko te že vstopijo v sporulacijo. Pri tem procesu se pogosto tvorijo močni pigmenti, ki prekrijejo šibko rumeno barvo poročevalskega semialdehida (Kieser in sod., 2000).

Na sliki 4 je predstavljen primer kvalitativne ocene moči promotorja *galP1* s pomočjo poročevalskega sistema na osnovi katehol dioksigenaze. Na levi so kontrolne kolonije, transformirane s praznim poročevalskim plazmidom (brez promotorja). Na desni so transformante s plazmidom, ki ima pred gen *xyle* vključen promotor *galP1*. Plošča je bila pred slikanjem poškopljena z raztopino katehola (Ingram in sod., 1989).



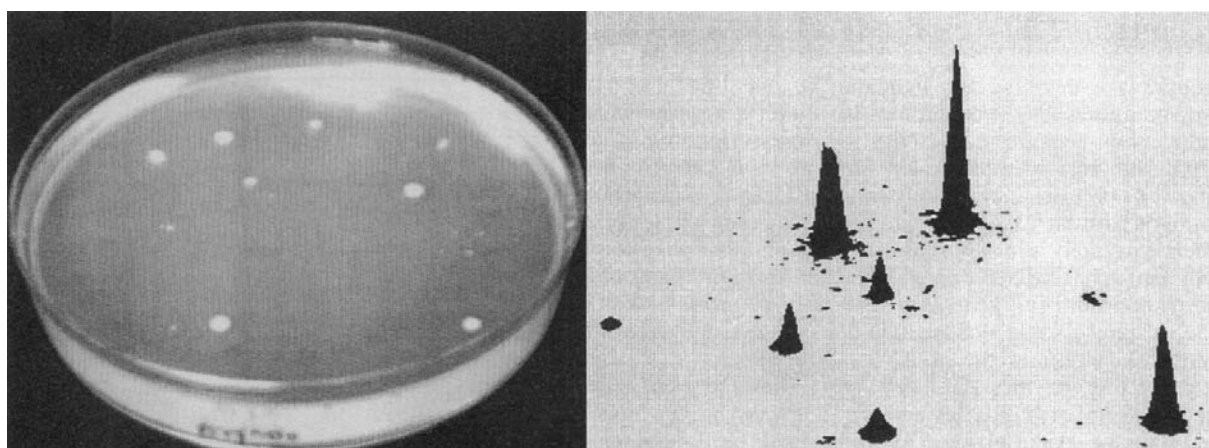
Slika 4: Poročevalski sistem na osnovi *xyle* gena testiran v vrsti *S. lividans*. Na desni strani slike so kolonije, ki izražajo katehol dioksigenazo. Te se zlahka ločijo od kolonij, ki encima ne izražajo (Ingram in sod., 1989).

2.2.5 Poročevalski sistem na osnovi *luxAB*

Luciferaza je encim odgovoren za bioluminiscenco. Katalizira oksidacijo aldehida n-dekanala, ob čemer se sprošča svetloba. Intenziteta emitirane svetlobe je v širokem območju linearno odvisna od koncentracije luciferaze. Poleg enostavnosti metode merjenja produkta je linearna odvisnost med količino poročevalske molekule in signalom, ki ga lahko izmerimo, bistvenega pomena za učinkovitost poročevalskega sistema. Poznamo dve vrsti luciferaze, ki sta bili že konec 80ih let prejšnjega stoletja uporabljeni kot poročevalska encima. Prva je luciferaza iz kresničke (*Photinus pyralis*), druga pa iz bakterije *Vibrio harveyi*. Slednja je bila v času pionirskih študij genetike streptomicet preizkušena tudi v tej skupini mikroorganizmov (Sohaskey in sod., 1991). Sistem se je izkazal kot problematičen, ker operon *luxAB* vsebuje nekaj TTA kodonov. Ta problem je bil kasneje rešen s prilagoditvijo nukleotidnega zaporedja za izražanje v aktinomicetah (Kieser in sod., 2000).

Testni protokoli so optimizirani za analizo kolonij na petrijevih ter tudi na mikrotiterskih ploščah. Osnovni princip temelji na inkubaciji kolonij skupaj s filter papirjem omočenim z n-dekanalom. Ta nato hlapi in prehaja v bakterijske celice. Kolonije, ki izražajo luciferazo, začnejo emitirati svetlobo. V tekočem mediju n-dekanal dodajamo v manjšo količino celične suspenzije in merimo intenziteto emitirane svetlobe (Kieser in sod., 2000).

Na sliki 5 je prikazan primer uporabe poročevalskega sistema na osnovi *luxAB* gena. Sistem je bil testiran v vrsti *Streptomyces coelicolor*. Na levi strani slike vidimo fotografijo plošče s transformantami, ki emitirajo svetlobo. Na desni je prikazana grafična ponazoritev intenzitete emitirane svetlobe pri posameznih kolonijah ter posledično moči testiranega promotorja.



Slika 5: Poročevalski sistem na osnovi *luxAB* gena testiran v vrsti *S. coelicolor*. S sistemom je mogoče natančno oceniti moč izražanja genov. Slabost sistema je v relativni zahtevnosti izvedbe eksperimentov (Sohaskey in sod., 1991).

2.2.6 Poročevalski sistem na osnovi *luxCDABE*

Luciferazni poročevalski sistemi so se izkazali za učinkovite v marsikaterem mikroorganizmu. Njihova glavna prednost je predvsem linearna odvisnost intenzitete emitirane svetlobe od količine encima luciferaze v gojišču. Odvisnost med tema dvema parametra je linearna na zelo širokem območju koncentracije luciferaze. Poglavitna slabost sistema je potreba po dodajanju substrata n-dekanala celicam. Postopek je namreč precej zamuden. Slabost se še močneje izrazi pri presejalnih testih, kjer imamo opravka z večjim številom vzorcev. Presejalni testi so v industrijskih raziskavah dokaj pogosti in ker vemo, da so streptomicete industrijsko zanimivi mikroorganizmi, je pomembno, da so eksperimentalni protokoli za delo z njimi enostavni in delovno neintenzivni ter jih je možno čim bolj avtomatizirati. Poleg omenjenega je dodajanje n-dekanala streptomicetam problematično tudi zato, ker ni jasno, kako dobro prehaja celično steno različnih vrst streptomicet (Craney in sod., 2007).

Kot odgovor na omenjene probleme je Craney s sodelavci (2007) razvil nov poročevalski sistem na osnovi *luxCDABE* operona bakterije *Photobacterium luminescens*. Operon je

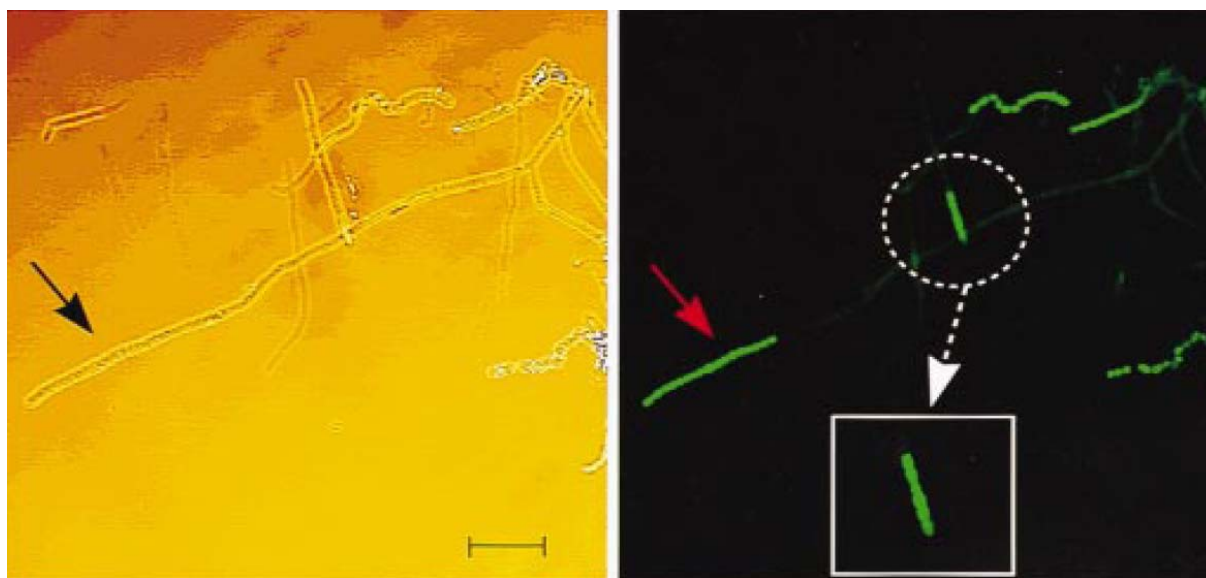
sestavljen iz dveh genov, ki kodirata luciferazo (*luxAB*) in treh genov za encime, ki sintetizirajo nastanek luciferaznega substrata tetradekanala (*luxCDE*). Ker celice s celotnim operonom same proizvajajo tako encim luciferazo kot tudi substrat za njo, v eksperimentih s tem sistemom ni potrebe po dodajanju substrata n-dekanala, kar poenostavi postopek. Nukleotidno zaporedje operona je prilagojeno na streptomicete, saj ne vsebuje TTA kodonov, vsebnost GC baznih parov pa je umetno dvignjena. Operon *luxCDABE* je bil preizkušen v vrsti *S. coelicolor*. V eksperimentu je ekipa uspela pridobiti kvantitativne in časovno odvisne podatke o aktivnosti določenih promotorjev, za katere je že znano kdaj in kako močno se izražajo. Pridobljeni podatki so ustrezali predhodno poznanim, torej lahko sklepamo, da poročevalski sistem na osnovi *luxCDABE* operona deluje. Glavna slabost sistema je slabša uporabnost pri šibkejših promotorjih. Izkazalo se je, da je v primeru testiranja takih promotorjev emitirana svetloba tako šibka, da jo je nemogoče izmeriti. V teh primerih je kolonijam oziroma kulturi v tekočem gojišču še vedno potrebno dodajati substrat n-dekanal (Craney in sod., 2007).

2.2.7 Poročevalski sistem na osnovi ojačanega zelenega fluorescentnega proteina (EGFP)

Zeleni fluorescenčni protein (GFP) je verjetno najpogostejše uporabljen poročevalski gen. Njegova uporabna vrednost je tako velika, da je skupina znanstvenikov za njegovo odkritje dobila Nobelovo nagrado iz kemije za leto 2008 (Nobel foundation, 2008). Že kmalu po odkritju so uporabnost GFP preizkusili tudi v streptomicetah, kjer se je izkazal kot neuporaben. Zaradi prenizke vsebnosti GC baznih parov in treh TTA kodonov se je GFP v streptomicetah izredno slabo izražal. Meritve je močno motila tudi avtofluorescenca testne vrste *S. coelicolor*, ki je popolnoma zadušila signal. Raziskovalci so kasneje divji tip GFP prilagodili izražanju v sesalskih celicah. Novi tip imenujemo ojačani zeleni fluorescenčni protein ali "enhanced green fluorescent protein" (EGFP). EGFP ima v primerjavi z divjim tipom zamenjani dve aminokislini (S65T in F64L). Posledica omenjene zamenjave je 35-kratna ojačitev fluorescence. Uporaba kodonov EGFP je prilagojena izražanju v sesalskih celicah. Prilagoditev pa slučajno ustreza tudi izražanju v streptomicetah. EGFP ima tako le 7 kodonov, ki se končajo z A ali T, divji tip jih ima kar 163, poleg tega nima nobenega TTA kodona. Zaradi omenjenih prednosti EGFP je bil ta preizkušen tudi v streptomicetah, kjer je deloval veliko bolje kot divji tip GFP (Sun in sod., 1999).

GFP je uporaben predvsem pri preučevanju prostorske lokalizacije preiskovanih proteinov v celicah. Poizkus z GFP pogosto poteka tako, da pripravimo fuzijski protein med proteinom, ki nas zanima in med GFP. Taki fuzijski proteini večinoma obdržijo aktivnost primarnega proteina, pridobijo pa fluorescenco GFP. Zapis za fuzijski protein nato vnesemo v organizem in s fluorescenčnim mikroskopom opazujemo, kje se izraža. Kvantifikacija izražanja GFP je težja, zato v primeru ugotavljanja moči izražanja genov raje uporabljamo druge poročevalske sisteme (Kieser in sod., 2000).

Na sliki 6 je prikazano delovanje poročevalskega sistema na osnovi EGFP v vrsti *S. coelicolor*. V plazmid je bil pred gen za EGFP vstavljen promotor, ki se specifično izraža le v sporah. Na levi strani slike so transformante slikane s svetlobnim mikroskopom, na desni pa je posnetek iste kulture posnet s fluorescenčnim mikroskopom. Zelena barva na desni sliki predstavlja mesta, kjer se izraža EGFP. Opazno je, da se izraža skoraj izključno v sporah (Sun in sod., 1999).

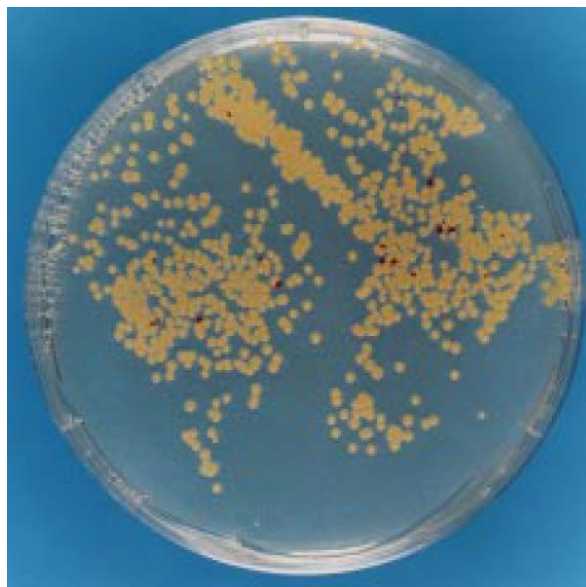


Slika 6: Poročevalski sistem na osnovi gena za EGFP testiran v vrsti *S. coelicolor*. Sistem je primeren za raziskovanje lokalizacije ekspresije genov. Na desni strani slike jasno vidimo lokalizirano izražanje EGFP v sporah (Sun in sod., 1999).

2.2.8 Poročevalski sistem na osnovi *redD* gena

Undecilprodiozin je pigment rdeče rjave barve, ki ga producirata vrsti *S. coelicolor* in *S. lividans*. Produkt gena *redD* je transkripcijski aktivator operona za sintezo undecilprodiozina. Mutante omenjenih vrst z delecijo gena *redD* niso pigmentirane, ob vnosu dodatne kopije s pravilnim zapisom za RedD se jim pigmentacija povrne. Gen *redD* je zato možno uporabiti kot poročevalski sistem, vendar samo v posebej pripravljenih sevih vrst *S. coelicolor* in *S. lividans*, kar močno zmanjša uporabnost sistema. Pozitivne transformante, ki izražajo RedD so intenzivno rdeče barve in se na agar plošči enostavno ločijo od seva divjega tipa. Avtorji trdijo, da je z merjenjem intenzitete obarvanosti možno pridobiti tudi semikvantitativne podatke (Wezel in sod., 2000).

Na sliki 7 je prikazana agar plošča z mešano kulturo transformant albino tipa vrste *S. coelicolor*, ki dokazuje uspešnost poročevalskega sistema na osnovi *redD* gena. Večina transformant nosi prazen kontrolni plazmid brez promotorja. Nekaj med njimi je transformiranih s plazmidom, ki ima pred genom *redD* vstavljen promotor *glnRp*. Vidimo, da se rdeče obarvane pozitivne transformante v mešani kulturi na čvrstem gojišču zlahka loči od negativnih že s prostim očesom (Wezel in sod., 2000).



Slika 7: Poročevalski sistem na osnovi *redD* gena testiran v vrsti *S. coelicolor*. Prednost sistema je v tem, da v mešani kulturi zlahka ločimo pozitivne kolonije od negativnih (Wezel in sod., 2000).

2.2.9 Poročevalski sistem na osnovi *βgal* (β-galaktozidaze)

Odlične lastnosti *lacZ* poročevalskega gena in frustrirajoča neuporabnost tega sistema v aktinomicetah, so verjetno razlog za poizkus uporabe naravno prisotnih streptomicetnih β-galaktozidaz v poročevalskih sistemih, ki so namenjeni tej skupini mikroorganizmov. Tako *S. lividans* kot tudi *S. coelicolor* proizvajata ekstracelularni protein z β-galaktozidazno aktivnostjo. Protein sicer ni homologen tistemu v bakteriji *Escherichia coli*, njegovo encimsko aktivnost pa je mogoče določiti na enak način kot tistemu v *lacZ* sistemu (s substratom X-Gal ali MUG). Sistem se je v poizkusih izkazal kot uporaben, vendar samo v mutiranih sevih, ki sami ne proizvajajo β-galaktozidaz. V aktinomicetnih sevih z nativno β-galaktozidazno aktivnostjo je signal ozadja izredno velik, zato so v njih poročevalski sistemi na osnovi β-galaktozidaz popolnoma neuporabni (Stein in sod., 1989).

2.2.10 Sistem na osnovi termostabilne malat dehidrogenaze (*mdh*)

Sistem na osnovi termostabilne malat dehidrogenaze (*mdh*) iz organizma *Thermus flavus* se redko uporablja. Med meritvijo je potrebno temperaturo vzorca povišati toliko, da proteini v njem denaturirajo. S povišanjem temperature dosežemo denaturacijo v organizmu naravno prisotne malat dehidrogenaze. S tem znižamo šum ozadja in izmerimo le aktivnost heterolognega encima. To pa onemogoča kakršnekoli native študije izražanja genov, pri katerih moramo delati z živimi celicami (Vujaklija in sod., 1991).

2.2.11 Sistem na osnovi β -laktamaze (*ampC*)

Sistem zasnovan na osnovi β -laktamaze (*ampC*) iz bakterije *E. coli* se tudi zelo redko uporablja. Aktivnost β -laktamaze je enostavno določiti z uporabo kromogenih β -laktamskih substratov. Tak je na primer nitrocefín, ki se ob hidrolizi s pomočjo β -laktamaze spremeni v rdeče rjav produkt. S pomočjo tega sistema so raziskovalci preučevali promotorje v vrsti *S. lividans*, vendar se kasneje ni močneje uveljavil (Forsman in Jaurin, 1987). Gen *ampC* namreč vsebuje kar nekaj TTA kodonov, za širšo uporabnost bi bila potrebna vsaj optimizacija zaporedja za izražanje v aktinomicetah. To pa nebi rešilo vseh problemov, ker imajo aktinomicete pogosto že same po sebi β -laktamazno aktivnost (Leskiw in sod., 1991).

2.3 RAZVOJ POROČEVALSKEGA SISTEMA NA OSNOVI GENA *rppA*

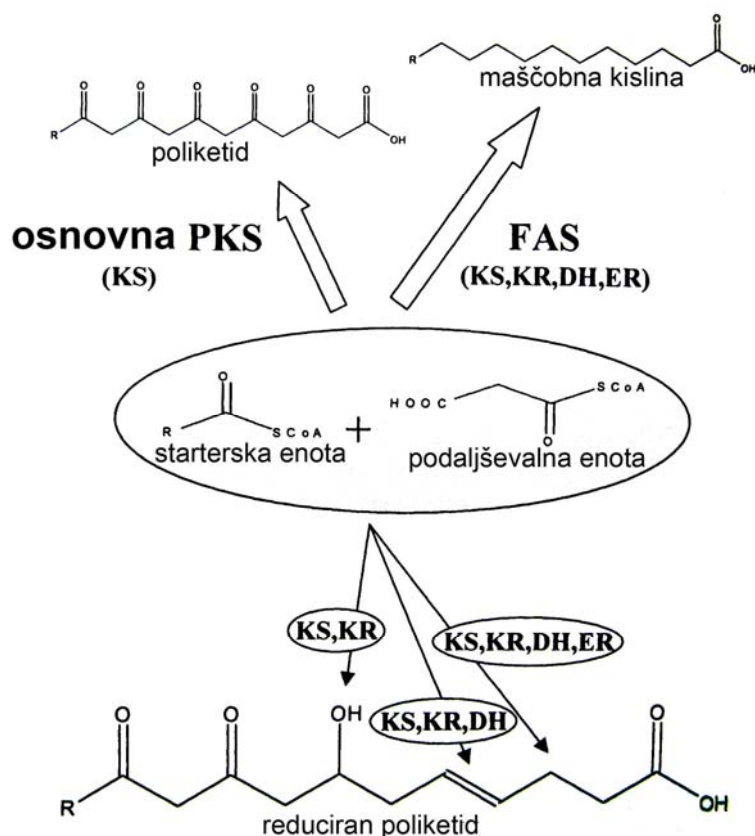
2.3.1 Poliketidi

Poliketidi so spojine s precej raznolikimi strukturami. Veliko med njimi je biološko aktivnih, zato so zanimivi tudi za farmacevtsko industrijo. Znani so po protibakterijski, protiglivi, protirakavi in imunosupresivni aktivnosti. Kot specifični inhibitorji nekaterih encimov v človeških celicah se uporabljajo tudi za zdravljenje povišanega krvnega tlaka, debelosti in številnih drugih popolnoma neodvisnih bolezni. Imajo 20 % delež med najbolje prodajanimi zdravili na svetu, trg z njimi je trenutno vreden več kot 18 milijard dolarjev letno. Večino poliketidov proizvedejo bakterije, velik delež med njimi je streptomicetnih. Poleg bakterij jih proizvajajo tudi rastline (sintetizirajo na primer flavonoide), insekti (sintetizirajo na primer hidroksiacetofenone), mehkužci (sintetizirajo na primer haminole), spužve, alge in lišaji (Petković in sod., 2006; Kuščer in sod., 2005; Blažič in sod., 2009).

Čeprav so poliketidi strukturno različni, vsi nastanejo na podoben način. Sintetizirajo se preko kaskade dekarboksilacijskih kondenzacij krajših organskih kislin, ki se predhodno aktivirajo s koencimom A (CoA). Ta način je zelo podoben sintezi maščobnih kislin. Sinteza se prične s kondenzacijo starterske enote, ki je največkrat malonil-CoA oziroma acetil-CoA. Nadaljuje se s pripenjanjem podaljševalnih enot, kar vodi v nastanek daljših poliketidnih verig. Tudi podaljševalni enoti sta največkrat malonil-CoA ali metilmalonil-CoA, v verigo pa se lahko vgradijo tudi številne druge kratke organske kisline. Poleg številnih možnih gradbenih enot, ki se lahko vgradijo v poliketidno verigo, strukturno raznolikost povečujejo tudi različni načini kondenzacij posameznih enot. Kondenzacije katalizirajo poliketid sintaze (PKS). Encimi PKS se med seboj razlikujejo po različnih katalitičnih funkcijah, ki jih posedujejo. Nekatere imajo le ketosintazno aktivnost, zato v verigo vgrajujejo nereducirane keto skupine. Druge imajo poleg ketosintazne še ketoreduktazno aktivnost in v verigo vgrajujejo podenote s hidroksilno skupino. PKS z dehidratazno aktivnostjo v nastajajočo verigo vgradijo dvojne vezi. PKS, ki imajo poleg vseh naštetih še enoilreduktazno aktivnost v verigo vgradijo popolnoma reducirano alkilno skupino. Slednje PKS so tudi najbolj podobne sintazam maščobnih kislin

(FAS). Dodatno raznolikost v strukture poliketidov vnašajo še alternativni načini terminacije nastalih verig, različne znotraj molekulske ciklizacije in od PKS neodvisne modifikacije (post PKS modifikacije) (Baerson in Rimando, 2007).

Na sliki 8 je prikazan odnos med različnimi encimskimi aktivnostmi poliketid sintaz in njihovimi produkti. Predstavljene so razlike v strukturi poliketidov, ki nastanejo kot posledica različnih encimskih aktivnosti poliketid sintaz.



Slika 8: Encimske aktivnosti poliketid sintaz in njihovi poliketidni produkti. Iz slike je razvidno, kako posamezne podenote PKS katalizirajo ključne stopnje v biosintezi in kako te vplivajo na strukturo nastajajočega poliketida. PKS, ki imajo vse štiri možne encimske aktivnosti, izvedejo popolno redukcijo keto skupine nastajajoče poliketidne verige. Take poliketidne verige so najbolj podobne verigam maščobnih kislin. Oznake encimskih aktivnosti so: KS – ketosintazna aktivnost; KR – ketoreduktazna aktivnost; DH – dehidratazna aktivnost; ER – enoilreduktazna aktivnost (Baerson in Rimando, 2007).

Poliketidi so strukturno pestri, kar je posledica raznolikih poti sinteze. Za marsikaterega med njimi ne vemo, zakaj ga organizem sintetizira. Predpostavljamo, da si z njimi pridobi prednost pred ostalimi organizmi v okolju, služijo tudi komunikaciji med posameznimi celicami v okolju, nekateri so namenjeni zaščiti pred ultravijoličnim sevanjem (Challis in Hopwood, 2003). Zaradi številnih bioloških funkcij, ki jih imajo poliketidi, so številni med njimi uporabni v medicini. Aktinomicete sintetizirajo mnogo poliketidov in so zato zanimive za natančnejše preučevanje. Zato potrebujemo ustrezna molekularna biološka orodja, med katere lahko štejemo tudi genske poročevalce.

2.3.2 Razdelitev poliketidnih sintaz glede na mehanizem biosinteze

Glede na strukturo in predvsem način delovanja PKS delimo v tri razrede. PKS tipa I so strukturno analogne sintazam maščobnih kislin tipa I (FAS tip I), ki jih najdemo v glivah, živalih in nekaterih rastlinah. PKS tipa II so analogne FAS tipa II v bakterijah in vseh vrstah rastlin. Poleg strukturne podobnosti so si omenjene skupine encimov tudi evolucijsko sorodne. Slednje se je potrdilo z nedavnimi analizami nukleotidnih zaporedij genov za FAS in PKS (Weissman in Leadlay, 2005). PKS tipa III so evolucijsko oddaljene od preostalih dveh skupin. Med njimi in ostalimi tipi PKS ter tudi FAS ne najdemo nobenih podobnosti v nukleotidnem zaporedju. PKS tipa III so strukturno in katalitično veliko manj zapletene kot ostala dva tipa, vendar so PKS tipa III najmanj raziskane. Za PKS tipa III so do nedavnega mislili, da so prisotne le v rastlinah. Danes vemo, da jih imajo tudi nekatere bakterije (Baerson in Rimando, 2007).

2.3.2.1 Poliketid sintaze tipa I

Modularne PKS tipa I so encimi veliki 100 – 10.000 kDa. Vsaka katalitična podenota encima se nahaja na svoji proteinski domeni in je tekom sinteze enega poliketida uporabljena le enkrat. Vsak tak modul ima keto-sintazno in acil-transferazno domeno ter domeno, ki ji pravimo proteinski prenašalec acilne skupine. Te domene so nujne za sintezo poliketidne verige. Natančna zgradba nastale verige je odvisna od ostalih aktivnih domen, ki jih lahko vsebuje modul. Ti imajo lahko še keto-reduktazno, dehidratazno ali enoilreduktazno aktivnost (Kuščer in sod., 2005; Hopwood, 1997; McDaniel in sod., 2005).

Modularna organiziranost PKS tipa I in neiterativni (neponavljajoči) način sinteze poliketidne verige, pri katerem je vsak modul v proces sinteze vključen samo enkrat, nastajajoča veriga pa potuje od enega modula do drugega v točno določenem vrstnem redu, omogoča relativno enostavno konstrukcijo novih poliketidnih spojin s pomočjo genskega inženiringa. Zato so PKS tipa I predmet intenzivnih industrijskih raziskav s ciljem izdelati nove učinkovine z boljšimi farmakološkimi lastnostmi (Kuščer in sod., 2005).

2.3.2.2 Poliketid sintaze tipa II

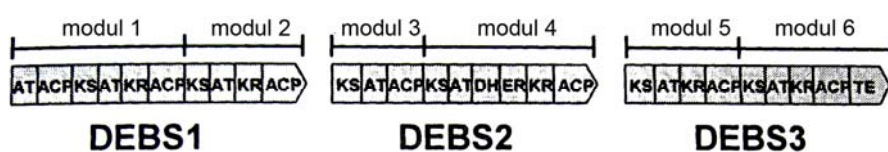
PKS tipa II so multiencimski kompleksi, sestavljeni iz velikega števila majhnih proteinov. Vsaka izmed teh proteinskih podenot poseduje svojo katalitično aktivnost. Posamezni katalitični centri so med sintezo ene poliketidne verige uporabljeni večkrat. Takem načinu pravimo iterativni (ponavljajoči) način sinteze poliketida. Natančen mehanizem, ki določa kolikokrat bo katera izmed enot uporabljena pri sintezi enega poliketida, večinoma ni poznan. To je velika ovira za biosintezni inženiring novih poliketidov, katerih nastanek katalizirajo PKS tipa II (Baerson in Rimando, 2007).

2.3.2.3 Poliketid sintaze tipa III

Za PKS tipa III so do pred kratkim domnevali, da so prisotne le v rastlinah. Nedavno pa se je izkazalo, da so prisotne tudi v bakterijah (Funa in sod., 1999). PKS iz te skupine so strukturno najenostavnejše in najmanjše. Prva odkrita bakterijska PKS tipa III je iz bakterije *Streptomyces griseus*. Dolga je le 372 aminokislinskih ostankov. PKS tipa III v celici običajno dimerizirajo v homodimere, ki nato katalizirajo ponavljajoče dekarboksilacijske kondenzacije osnovnih poliketidnih podenot. Z razliko od ostalih dveh tipov PKS, se pri PKS tipa III vse reakcije katalizirajo na istem aktivnem mestu encima. Osnovna gradbena enota, ki jo uporabljajo PKS III je največkrat malonil-CoA. Nabor vseh možnih gradbenih enot, ki jih lahko uporabljajo PKS tipa III pa je veliko širši kot pri ostalih dveh tipih PKS. Z razliko od ostalih dveh tipov, PKS tipa III nimajo ACP domene, ki bi skrbela za prenos nastajajočega poliketida med aktivnimi domenami. Namesto tega PKS tipa III vedno delujejo kot homodimeri, nastajajočo poliketidno verigo pa si obe enoti podajata med seboj (Baerson in Rimando, 2007).

Na sliki 9 je shematski prikaz genske organiziranosti vseh treh tipov poliketid sintaz. Kot primer PKS tipa I je predstavljen operon za sintezo eritromicina A. Sestavljen je iz treh odprtih bralnih okvirov, vsak izmed njih pa iz dveh modulov. Oba modula imata več domen z različnimi encimskimi aktivnostmi. Kot primer PKS tipa II je predstavljen operon za sintezo aktinorodina. Sestavljen je iz številnih odprtih bralnih okvirov. Vsak izmed njih nosi zapis za protein z eno samo encimsko aktivnostjo. Kot primer PKS tipa III je predstavljen gen, ki kodira encim za sintezo tetrahidroksikalkona. Encim se po sintezi združi v homodimer. Sintaza celotne poliketidne verige se izmenjujoče odvije na dveh enakih aktivnih mestih obeh enot homodimera (Baerson in Rimando, 2007).

PKS tip I (eritromicin A)



PKS tip II (aktinorodin)



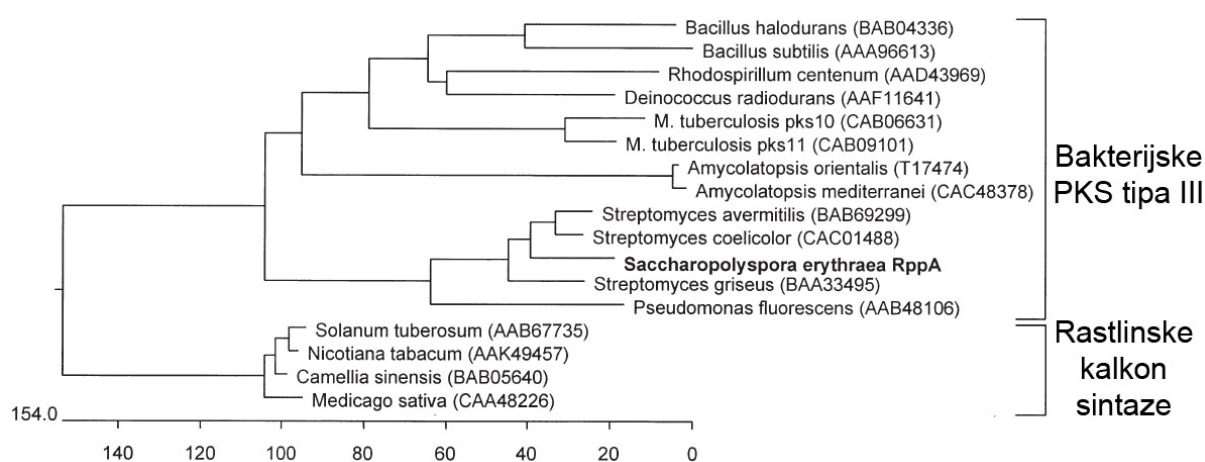
PKS tip III (tetrahidroksikalkon)



Slika 9: Organiziranost genskega zapisa vseh treh tipov PKS (Baerson in Rimando, 2007).

2.3.3 Gen *rppA* in produkt tega gena

Kalkon sintaze so poliketidne sintaze tipa III, ki sintetizirajo kalkone. To so osnovni gradniki flavonoidov. Flavonoidi so rastlinski sekundarni metaboliti, znani po svojih antioksidativnih lastnostih. Kalkoni ne predstavljajo molekulske hrbtenice le flavonoidom, ampak tudi številnim drugim rastlinskim produktom, ki so potrebni za obarvanost cvetov, zaščito pred UV žarki, obrambo pred patogeni, komunikacijo z mikroorganizmi in za celično signalizacijo. Pri preučevanju številnih derivatov kalkonov se je pokazal njihov pozitiven vpliv na zdravje človeka, predvsem zaradi njihovega antioksidativnega potenciala. Včasih so domnevali, da so kalkon sintaze prisotne le v rastlinah, nedavno pa so odkrili prve bakterijske PKS tipa III, ki so izjemno homologne rastlinskim (Funa in sod., 1999). Tudi produkti teh encimov so strukturno podobni, v nekaterih primerih celo enaki kot produkti rastlinskih kalkon sintaz. To nakazuje, da so PKS tipa III evolucijsko precej starejše, kot so sprva domnevali (Schröder, 1997). Analiza sekvenc rastlinskih in bakterijskih poliketidnih sintaz tipa III je pokazala na izjemno homologijo med geni. Še posebno je zanimiva homologija med aminokislinami v aktivnih mestih encima, ta je skoraj 100 % pri vseh znanih PKS tipa III (tako rastlinskih kot bakterijskih) (Funa in sod., 2002). Tudi filogenetska primerjava nukleotidnih zaporedij PKS tipa III pokaže skupni izvor te skupine encimov. Na sliki 10 je prikazano filogenetsko drevo bakterijskih in rastlinskih PKS tipa III. Iz slike je jasno razvidno, da imajo vsi analizirani encimi skupen filogenetski izvor (Cortes in sod., 2002).

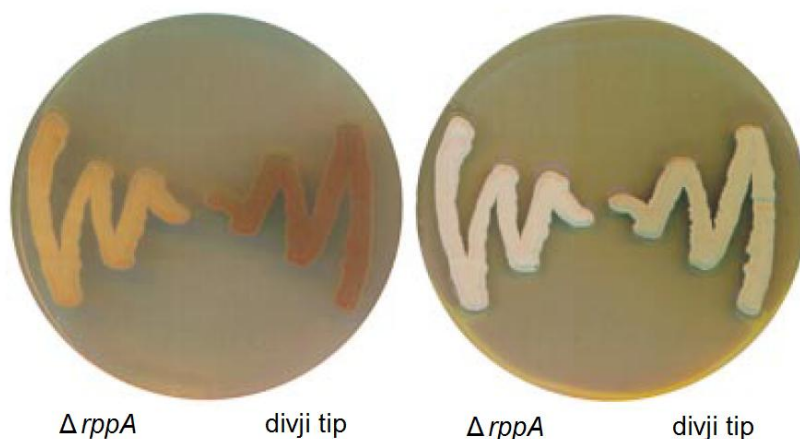


Slika 10: Filogenetsko drevo bakterijskih in rastlinskih PKS tipa III. Iz drevesa je razviden skupen izvor vseh analiziranih encimov (Cortes in sod., 2002).

Prva odkrita streptomicetna kalkon sintaza je bila iz vrste *Streptomyces griseus*. Ueda s sodelavci je pokazal, da je odgovorna za sintezo rdečč rjavega pigmenta, ki ga producira ta organizem. Pokazal je tudi, da gre za encim homologen rastlinskim kalkon sintazam. Ob analizi drugih aktinomicet se je izkazalo, da imajo skoraj vse v genomu zaporedja, homologna kalkon sintazi v vrsti *S. griseus* (Ueda in sod., 1995). Z raziskavami omenjene kalkon sintaze je kasneje nadaljeval Funa s sodelavci in natančneje določil funkcije posameznih odprtih bralnih okvirjev v segmentu genoma, za katerega je bilo dokazano, da je odgovoren za produkcijo rdečč-rjavega pigmenta. Izkazalo se je, da je za pigmentacijo nujno potreben le

gen *rppA*. V bakteriji *E. coli* je pripravil rekombinanten protein RppA in ga natančneje preučil (Funa in sod., 1999).

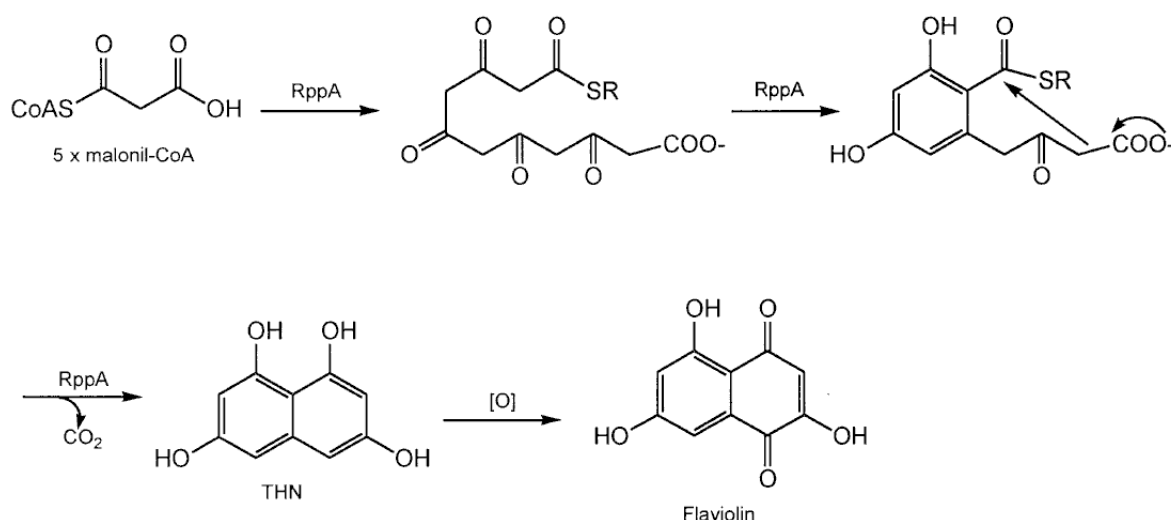
Na sliki 11 je prikazana agar plošča iz spodnje (levo) in zgornje (desno) strani. Na plošči levo raste mutiran sev vrste *S. griseus*, ki ima prekinjen gen *rppA* (gen kodira PKS tipa III). Na plošči desno raste divji tip iste vrste. Jasno se opazi, da je sev z izbitim genom *rppA* mnogo svetlejši barve, kot njegov divji tip (Funa in sod., 1999).



Slika 11: Rast mutiranega seva *S. griseus* s prekinjenim genom *rppA* v primerjavi z divjim tipom (Funa in sod., 1999).

RppA iz *S. griseus* je 327 aminokislin dolg encim, ki odraža približno 30 % homologijo z rastlinskimi kalkon sintazami. Poleg tega vsebuje cistein na isti poziciji v aktivnem mestu, kot vse druge poznane PKS tipa III, oziroma kalkon sintaze pri rastlinah. RppA v celici homodimerizira in je le tak aktiven. Kot osnovni gradnik poliketidne verige, katere nastanek katalizira, uporablja malonil-CoA. Posamezne enote malonil-CoA se ob posredovanju RppA v iterativni (ponavljajoči se) reakciji povežejo v linearen pentaketid, ki se po sintezi sprostí z encima in v citosolu spontano ciklizira. To vodi v nastanek 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalena (THN). THN je zelo nestabilen, zato hitro spontano oksidira v flaviolin. Nazadnje posamezne molekule flaviolina dimerizirajo, ti dimeri pa se združijo v še večje polimerne strukture (Funa in sod., 1999).

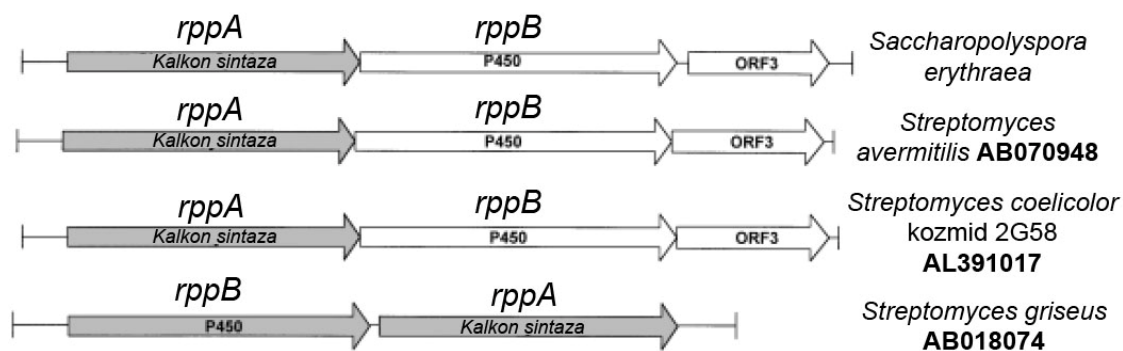
Na sliki 12 je prikazano sosledje reakcij, ki vodijo v nastanek flaviolinskih monomerov. Vse reakcije, razen zadnje, ki je spontana, katalizira encim *rppA*. Simbol R predstavlja CoA oziroma cistein tiolno skupino encima RppA (Cortes in sod., 2002).



Slika 12: Sinteza flaviolina iz malonil-CoA, ki jo katalizira encim RppA (Cortes in sod., 2002).

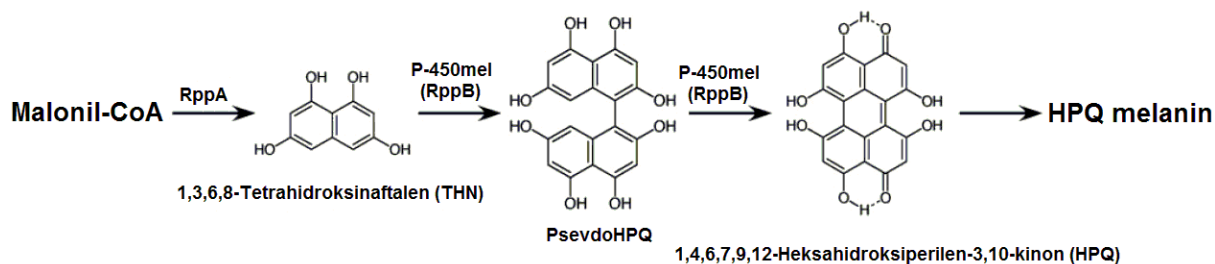
Po odkritju gena *rppA* v streptomicetah in s tem dokaza, da imajo tudi bakterije PKS sistem tipa III, se je raziskovanje na tem področju intenzivno nadaljevalo. Izkazalo se je, da skoraj vse testirane aktinomicete vsebujejo homologe *rppA*. *rppA* je bil najden tudi v bakteriji *Saccharopolyspora erythraea*. Cortes je s sodelavci predstavil organiziranost operona, ki sodeluje pri sintezi rdeče rjavega pigmenta flaviolina. V operonu se poleg gena *rppA*, ki je sicer edini potreben za sintezo flaviolina, nahajata še gen *rppB*, ki kodira P450 oksidazo in odprt bralni okvir ORF3, katerega funkcija ni poznana. Za RppB je Cortes s sodelavci predlagal, da katalizira dimerizacijo flaviolinov, ki se sicer v majhni meri zgodi tudi spontano. RppB naj bi bil posredno odgovoren tudi za nadaljnje stopnje polimerizacije flaviolinov. Zaradi encimske aktivnosti RppB, v njegovi neposredni okolici pride do začasnega povišanja koncentracije flaviolinskih dimerov. Hitrost spontane dimerizacije le teh se zato še dodatno poviša (Cortes in sod., 2002).

Na sliki 13 je shematski prikaz organiziranosti operona *rppA* v štirih različnih bakterijah. Kot je razvidno je pri vrstah *S. erythraea*, *S. coelicolor* in *Streptomyces avermitilis* postavitve vseh treh odprtih bralnih okvirjev enaka. Nasprotno pa vrsta *S. griseus* nima ORF3 zaporedja, tudi postavitve genov *rppA* in *rppB* je zamenjana (Cortes in sod., 2002).

Slika 13: Organiziranost operona *rppA* v različnih bakterijah (Cortes in sod., 2002).

Funa in njegovi sodelavci so kasneje potrdili teorijo, da gen *rppB*, ki kodira P450 oksidazo, sodeluje v dimerizaciji posameznih molekul flaviolina. To vodi v nastanek 1,4,6,7,9,12-heksahidroksiperilen-3,10-kinona (HPQ). HPQ nadalje spontano polimerizira in tako nastane HPQ melanin. Melanini so visokomolekularne temno rjave do črne molekule, po katerih so znane streptomicete. Vrsta melanina, ki ga proizvajajo streptomicete, je bil tudi en izmed prvih kriterijev za njihovo taksonomsko razvrstitev. Vloga, ki jo HPQ melanin igra v strptomicetah, je še vedno predmet diskusije. Funa s sodelavci je dokazal, da so sevi, ki proizvajajo HPQ melanin, bistveno bolj odporni na UV sevanje kot sevi, ki ga ne proizvajajo (Funa in sod., 2005).

Na sliki 14 je prikazana pot sinteze HPQ melanina in malonil-CoA preko encimov RppA in P-450mel (RppB), kot jo predlaga Funa s sodelavci. RppA je po tej hipotezi odgovoren za primarno kondenzacijo malonil-CoA v THN, dimerizacijo slednjega v HPQ pa katalizira P-450 oksidaza (RppB). Nazadnje molekule HPQ spontano polimerizirajo v visokomolekularne HPQ melanine (Funa in sod., 2005).



Slika 14: Sinteza HPQ melanina iz malonil-CoA preko RppA in P-450mel (RppB) (Funa in sod., 2005).

2.3.4 *rppA* kot poročevalski gen

Popoln aktinomicetni poročevalski sistem (glej poglavje 2.2) ne obstaja. Med obstoječimi sistemi ima vsak kakšno ključno pomanjkljivost. Predhodno omenjeni problemi z obstoječimi sistemi so razlog za iskanje novega sistema, ki bi bil vsaj tako učinkovit in preprost kot sistem na osnovi *lacZ* operona. *rppA* gen iz organizma *S. erythraea* bi lahko bil zanimiv kandidat. Predvidevamo, da ima ta gen nekaj lastnosti, ki morajo biti prisotne v vsakem potencialnem aktinomicetnem poročevalskem sistemu. To so: hitra in poceni metoda detekcije produkta, dobro izražanje v aktinomicetah, netoksičnost za producerski organizem, prisotnost osnovnega gradnika (malonil-CoA) v vseh organizmih, ter možnost določanja pozitivnih kolonij že z ogledom agar plošče. Produkt *rppA* gena je stabilen, kar pomeni da je možno vzorce shranjevati dalj časa in kasneje ponoviti meritve. Gre za neinvazivno spektrofotometrično metodo merjenja, ki je enostavna in hitra.

Poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* ima tudi nekaj potencialnih slabosti. Prva med njimi je polimerizacija posameznih molekul flaviolina. Polimerizacija je encimsko katalizirana, katalizira jo encim RppB, v manjši meri poteka tudi spontano. Končni produkt polimerizacije so visokomolekularni melanini katerih struktura se od seva do seva rahlo razlikuje. Prav tako

kot struktura se med sevi razlikuje tudi povprečni absorpcijski vrh mešanice flaviolinskih polimerov. V literaturi se kot absorpcijski vrh flaviolinskih monomerov najpogosteje omenjata valovni dolžini 254 nm (Funa in sod., 1999; Funa in sod., 2005; Izumikava in sod., 2003) in 280 nm (Funa in sod., 2002a; Funa in sod., 2002b). V nasprotju s tem je Kuščer s sodelavci pokazal, da je najprimernejša valovna dolžina za detekcijo mešanice flaviolinskih polimerov izoliranih iz vrste *Streptomyces hygroscopicus*, ki je heterologno izražala gen *rppA* pri 488 nm (Kuščer in sod., 2007). Eksperimenti opisani v omenjenem članku so primer, kako se lahko valovna dolžina absorpcijskega vrha v različnih vrstah razlikuje. Problem smo v naših eksperimentih rešili tako, da smo za vsak sev posebej določili optimalno valovno dolžino detekcije. To smo storili s primerjavo absorpcijskih spektrov negativne kontrole in transformant, ki so izražale *rppA*. Izkazalo se je, da imajo vsi sevi primarni (najvišji) absorpcijski vrh pri valovni dolžini okrog 270 nm, valovne dolžine sekundarnih absorpcijskih vrhov, ki so v vidnem spektru svetlobe, pa se razlikujejo.

Homologi gena *rppA* so prisotni v večini poznanih aktinomicetnih vrstah (Cortes in sod., 2002). Omenjeno dejstvo lahko predstavlja precejšnjo oviro za uporabnost našega poročevalskega sistema v aktinomicetah, saj lahko pri eksperimentih pričakujemo znaten signal ozadja. Tekom našega dela, smo ta problem reševali z odštevanjem absorpcijskega spektra negativne kontrole od spektra transformant. Kot vrednost iz katere smo ocenili relativno koncentracijo flaviolina smo torej privzeli spremembo absorbance pri 270 nm v primerjavi z divjim tipom in ne same absorbance pri tej valovni dolžini.

Osnovni gradnik iz katerega se sintetizira poliketid flaviolin je malonil-CoA. To je metabolit primarnega metabolizma. Njegova koncentracija v celici lahko vpliva na količino produkta RppA (flaviolina). Vendar je malonil-CoA prisoten v vseh organizmih in tudi v zadostnih količinah za delovanje poročevalskega sistema. Pričakovali smo, da bo količina končnega produkta v metabolno bolj aktivnih sevih večja kot v metabolno manj aktivnih, kar lahko ovira primerjave med sevi. Ker je količina malonil-CoA v celicah iste vrste običajno enaka, pa to ne predstavlja ovire za primerjavo moči promotorjev znotraj posameznih vrst.

V preliminarnih poizkusih je gen *rppA* iz organizma *S. erythraea* že bil uporabljen kot poročevalski gen. Kuščer in sodelavci so ga uporabili v raziskavi, kjer so preučevali vpliv dveh transkripcijskih faktorjev na produkcijo rapamicina v organizmu *Streptomyces hygroscopicus*. Poročevalski sistem se je takrat izkazal kot zanesljiv (Kuščer in sod., 2007). Ocenili smo, da bi bilo potrebno uporabnost gena *rppA* preizkusiti vsaj še v nekaj dodatnih vrstah in v kombinaciji z različno močnimi promotorji.

V naših eksperimentih smo kot poročevalski gen uporabili gen *rppA* iz organizma *S. erythraea*. Nukleotidno zaporedje tega gena je dostopno v spletni bazi GenBank pod zaporedno številko AY078067.

2.4 TESTIRANI PROMOTORJI

2.4.1 Promotor *actI*

Promotor *actI* je naravno prisoten v bakteriji *S. coelicolor*. Predstavlja del aktinorodinske genske gruče in je odgovoren za kontrolo izražanja enega izmed genov, ki so vključeni v sintezo antibiotika aktinorodina. Geni pod kontrolo promotorja *actI* se izražajo le v prisotnosti transkripcijskega aktivatorja ActII-ORF4. Ta transkripcijski regulator je protein, ki z vezavo na različne promotorje v aktinorodinski genski gruči nadzira izražanje genov pod njihovo kontrolo (Arias in sod., 1999).

Delovanje promotorja *actI* je bilo testirano v različnih streptomicetah. Vedno se je izkazalo, da se ob odsotnosti transkripcijskega aktivatorja ActII-ORF4 geni pod kontrolo promotorja *actI* ne izražajo (Paro in sod., 1991). Kombinacija promotorja *actI* in gena za njegov transkripcijski aktivator *actII-ORF4* (slednji je v tem sistemu pod kontrolo konstitutivnega promotorja) preverjeno vodi v dobro izražanje genov v bakterijah *S. coelicolor*, *S. lividans* in *S. erythraea*. V bakteriji *S. erythraea* aktivacijsko promotorski sistem ActII-ORF4/*PactI* vodi v tako dobro izražanje genov, da je bil na njegovi osnovi razvit streptomicetni vektor za čezmerno ekspresijo genov (Rowe in sod., 1998).

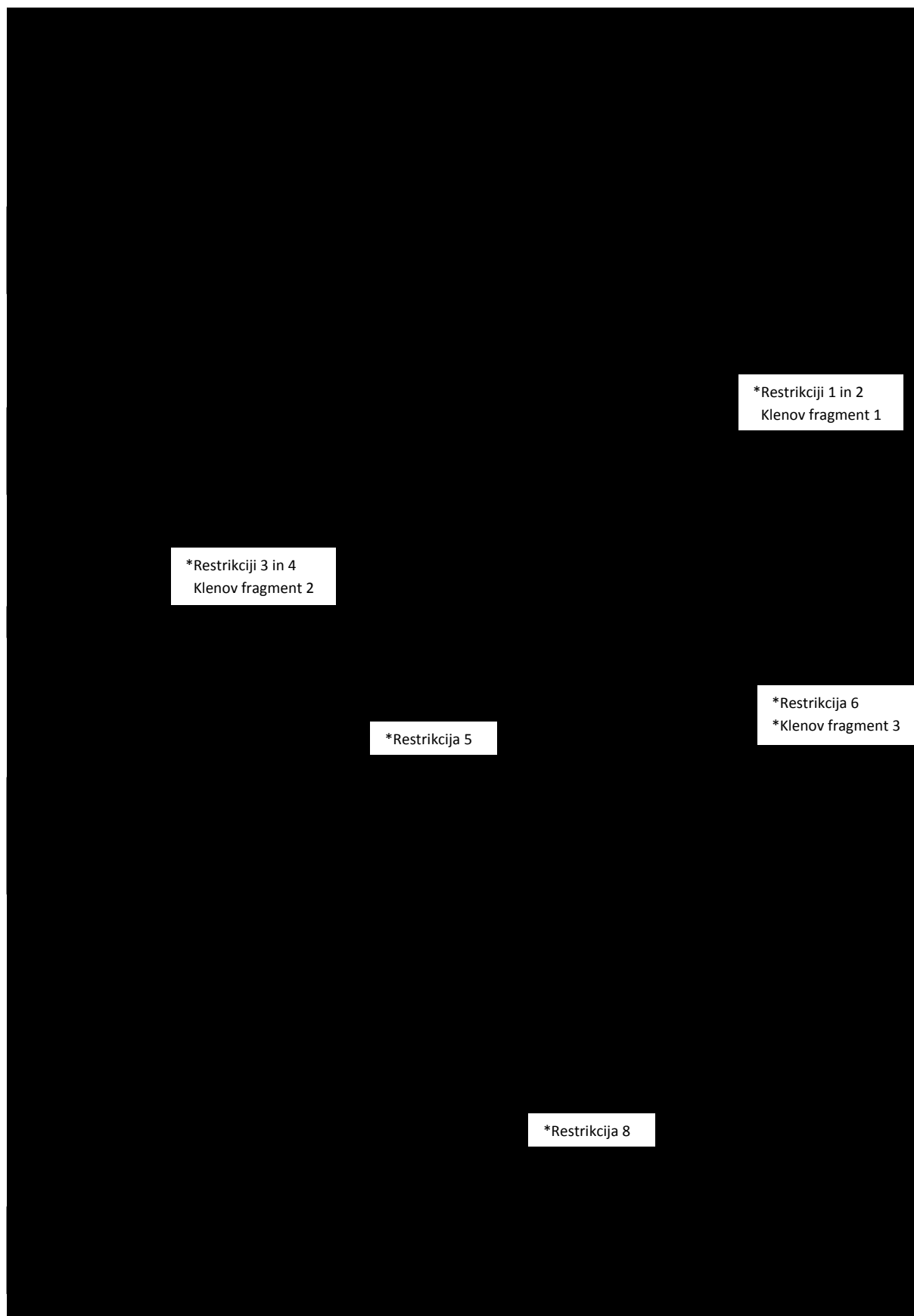
2.4.2 Promotorja *ermE* in *ermE**

Promotor *ermE* je močan konstitutiven promotor izoliran iz bakterije *S. erythraea*. Vključen je v eritromicinsko gensko gručo. Različica tega promotorja, ki ima v regiji -35 nukleotidov od točke začetka transkripcije, delecijo 3 nukleotidov, se imenuje *ermE** (Bibb in sod., 1985). Slednji promotor se je že v številnih raziskavah izkazal kot izjemno močan promotor in se pogosto uporablja za prekomerno ekspresijo heterolognih proteinov v streptomicetah (Schmitt in Engels, 1991; Chang in Chang, 1988; Binnie in sod., 1997). Do danes še nihče ni izvedel primerjalne analize obeh promotorjev in tudi aktivacijsko promotorskega sistema *actII-ORF4/PactI* v različnih sevih streptomicet.

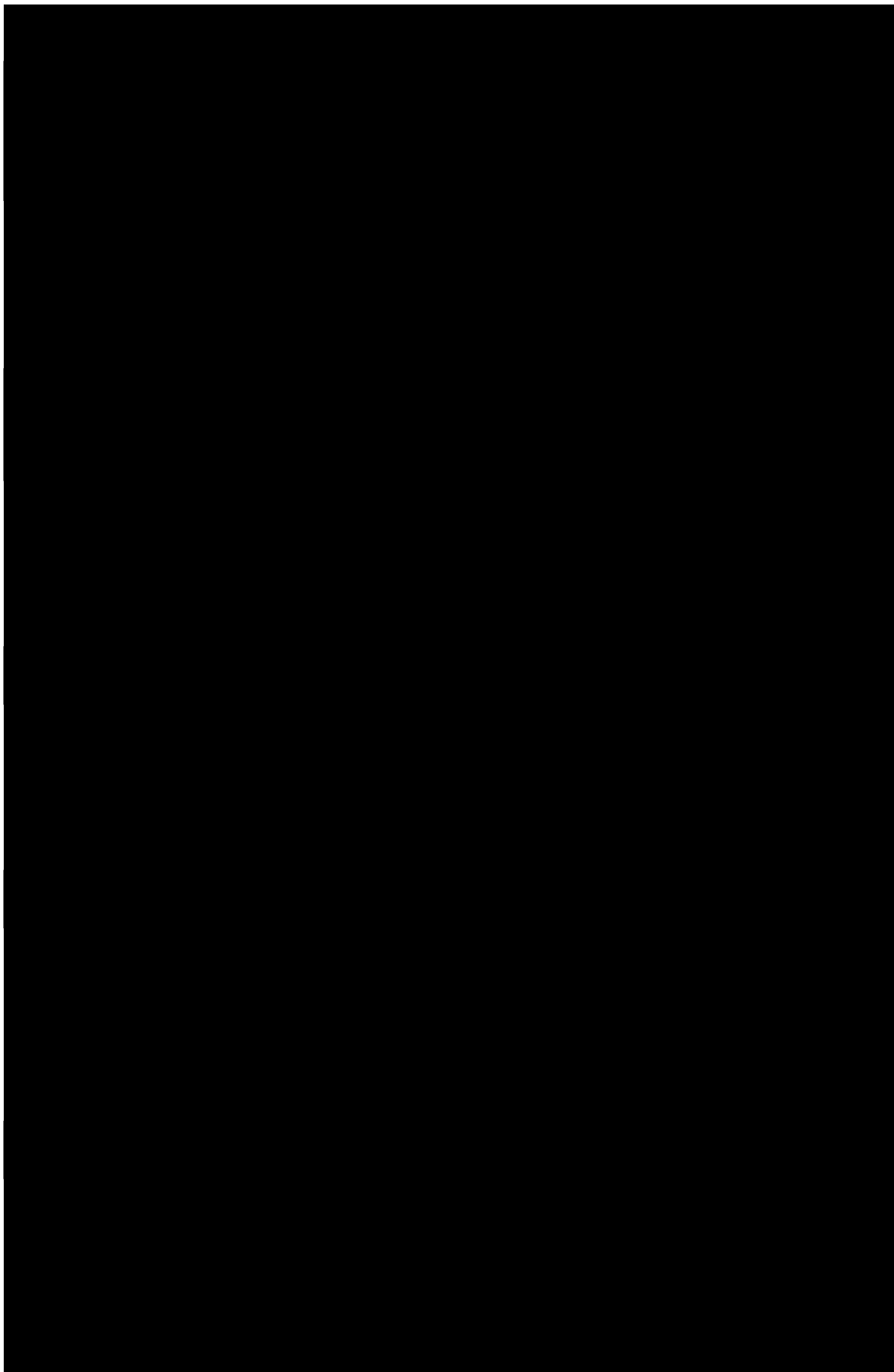
3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalni proces s katerim smo pridobili rezultate podane v tem diplomskem delu, je potekal v treh stopnjah. V prvi stopnji smo s pomočjo molekularno bioloških metod pripravili vse potrebne genske konstrukte. V drugi stopnji smo genske konstrukte vnesli v testirane aktinomicetne vrste, transformante smo kultivirali in pobrali vzorce, ki smo jih spektrofotometrično analizirali. V tretji stopnji smo vse pridobljene meritve računalniško obdelali in tako ocenili učinkovitost poročevalskega sistema na osnovi gena *rppA*. Na slikah 15 in 16 je shematsko predstavljen potek eksperimentalnega dela.

3.1 SHEMA DELA



Slika 15: Shematski prikaz poteka priprave genskih konstruktov.



Slika 16: Shematski prikaz poteka kultivacije aktinomicet ter priprave in analize vzorcev.

3.2 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spodaj naštetе materiale, ki so glede na vrsto razvrščeni v posamezne skupine. Naštete so tudi vse aparature, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentov.

3.2.1 Plazmidi

Spodaj so opisani vsi plazmidi, ki smo jih uporabljali v naših eksperimentih, vendar so bili na katedri pripravljeni še pred začetkom tega diplomskega dela.

3.2.1.1 Plazmida pVMC1 in pTS55

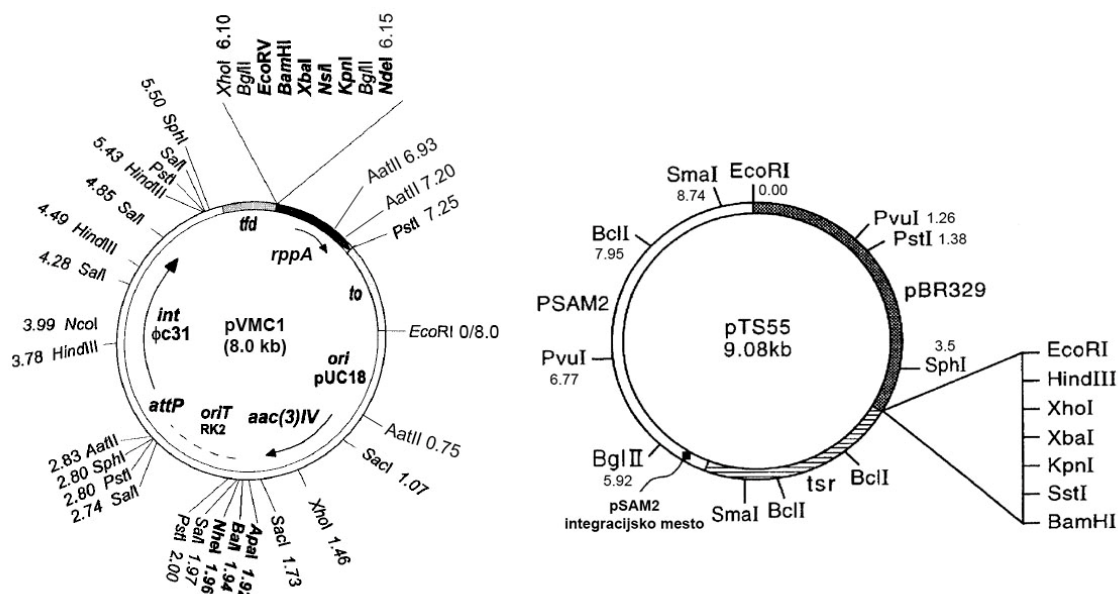
Gen *rppA* je bil še pred pričetkom mojega diplomskega dela s PCR pomnožen iz kromosomske DNA organizma *S. erythraea*. Postopek je bil enak, kot ga je opisal že Cortes (Cortes in sod., 2002). Tudi zaporedje začetnih oligonukleotidov je bilo enako kot v omenjeni raziskavi. Kromosomska DNK je bila izolirana iz divjega tipa vrste *S. erythraea*.

PCR pomnožek gena *rppA* je bil rezan z ustreznimi restrikcijskimi endonukleazami in s pomočjo DNA ligaze prenesen v plazmid pIJ8660 (Sun in sod., 1999) iz katerega je bil predhodno odstranjen poročevalski gen EGFP. Vstavljen gen *rppA* je bil poslan na nukleotidno sekvenciranje (sekvenca je v prilogi A), v katerem je bilo potrjeno, da se zaporedje ujema z vnosom v bazi GenBank pod zaporedno številko AY078067.1.

Nastali plazmid je bil poimenovan pVMC1. Zgrajen je iz multiklonskega mesta, ki mu sledi poročevalski gen *rppA*. Obe nukleotidni zaporedji sta obdani s močnima transkripcijskima terminatorjema: *tfd* (iz faga fd) in *to* (iz faga λ). Plazmid nosi tudi zapis za apramicinsko rezistenco in dve *ori* mesti: *ori* pUC18 (za pomnoževanje v *E. coli*) ter *oriT* RK2 (za pomnoževanje v aktinomicetah). Zaradi integracije v genom streptomicet je v plazmidu tudi zapis za integrazo (*int* ϕ C31) in integracijsko zaporedje (*attP*).

Ker bakterijska vrsta *S. rimosus* v genomu nima integracijskega mesta *attP*, smo morali plazmide za transformacijo te vrste pripraviti na osnovi plazmida pTS55. Ta plazmid se v genom integrira v integracijsko mesto pSAM2.

Na sliki 17 sta prikazani restrikcijski mapi plazmidov pVMC1 in pTS55.



Slika 17: Restriksijski mapi plazmida pVMC1 (levo) in plazmida pTS55 (desno). Na podlagi teh dveh plazmidov smo pripravili vse plazmide za transformacijo streptomiset. Podatke o restriksijskih mestih smo dobili iz literature, nekatere pa smo s pomočjo poizkusnih restrikcij določili tudi sami. Celotno zaporedje plazmidov nam ni bilo na voljo (Sun in sod., 1999; Smokvina in sod., 1997).

3.2.1.2 Plazmid pVMC1-*ermE*

Plazmid je bil pripravljen pred pričetkom diplomskega dela. Promotor *ermE* je bil z restriksijskima encimoma *SpeI* in *NdeI* izrezan iz plazmida pSGSet2 (Gregory in sod., 2004). Lepljiv konec, ki je nastal pri rezanju z encimom *SpeI* je bil zapolnjen s klenovim fragmentom. Plazmid pVMC je bil rezan z encimoma *NdeI* in *EcoRV*, slednji DNA molekulo reže tako, da po rezanju nastanejo topi konci. Uporaba klenovega fragmenta v tem primeru torej ni bila potrebna. Oba produkta sta bila nato s pomočjo T4 DNK ligaze zlepljena skupaj in elektrotransformirana v sev *E. coli* DH10B (parametri elektroporatorja so bili nastavljeni na 2,5 kV, 200 Ω , 25 μ F). Plazmidi so bili izolirani iz petih različnih klonov *E. coli* in preverjeni z restriksijskim encimom *PvuI*. Sharnjen je bil en ustrezen plazmid. Poimenovan je bil pVMC1-*ermE*.

3.2.1.3 Plazmid pVMC1-*ermE**

Promotor *ermE** je bil z encimoma *EcoRI* in *NdeI* izrezan iz plazmida pVM1 (plazmid iz zbirke podjetja Acies Bio). Štrleči konci, ki so nastali po rezanju z encimom *EcoRI* so bili zapolnjeni s klenovim fragmentom. Fragment z *ermE** promotorjem je bil nato ligiran z že rezanim plazmidom pVMC1 (*EcoRV/NdeI*), ter elektrotransformiran v sev *E. coli* DH10B. Izoliranih je bilo pet različnih plazmidov iz petih različnih klonov. Preverjeni so bili s kontrolno

restrikcijo z encimom *PvuI*. En ustrezen plazmid je bil shranjen in poimenovan pVMC1-*ermE**.

3.2.1.4 Plazmida pVMC2-*ermE* in pVMC2-*ermE**

Ker plazmid pVMC1 nima ustreznega integracijskega mesta za integracijo v genom bakterije *S. rimosus* so bili vsi plazmidi, ki so bili namenjeni transformaciji v to vrsto pripravljeni na osnovi plazmida pTS55 (Smokvina in sod., 1997). Plazmid pTS55 je bil rezan z restriksijskim encimom *HindIII*, lepljivi konci so bili zapolnjeni s klenovim fragmentom. Fragmenti za ligacijo s plazmidom pTS55 so bili pridobljeni z rezanjem plazmidov pVMC1-*erm* in pVMC1-*ermE**. Pri tem sta bila v vseh primerih uporabljena restriksijska encima *EcoRI* in *HindIII*. Nastali štrleči konci so bili zapolnjeni s klenovim fragmentom. S pomočjo omenjene kombinacije restriksijskih encimov so izpadli fragmenti, ki so poleg promotorja vsebovali tudi gen *rppA* in transkripcijska terminatorja na vsaki strani. Fragmenta, ki sta vsebovala promotorja *ermE* in *ermE**, sta bila dolga približno 2650 baznih parov. Fragmenta sta bila v reakciji z ligazo zlepljena z odprtim plazmidom pTS55 (*HindIII*→KF). Ligacijska mešanica je bila transformirana v sev *E. coli* DH10B. Vsak plazmid je bil izoliran iz petih različnih kolonij, vsi so bili preverjeni s kontrolno restrikcijo z encimom *PstI*. Shranjena je bila po ena različica za vsak promotor. Nastala plazmida sta bila poimenovana pVMC2-*ermE* in pVMC2-*ermE**.

3.2.2 Mikroorganizmi

V preglednici 2 so navedeni vsi delovni mikroorganizmi uporabljeni v tem diplomskem delu.

Preglednica 2: Seznam mikroorganizmov.

Vrsta	Tip	Vir
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Divji tip.	ZIM
<i>Streptomyces rimosus</i> 4018	Divji tip.	ZIM
<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Industrijski sev.	Acies Bio d.o.o.
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	Industrijski sev.	Acies Bio d.o.o.
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Sev prilagojen za uporabo v molekularno bioloških laboratorijih.	ZIM
<i>Escherichia coli</i> ET12567	Konjugabilni sev s plazmidom pUZ8002, ki nosi zapis za vse proteine potrebne pri konjugaciji.	ZIM

3.2.3 Gojišča

Vsa uporabljena gojišča so rezultat predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter raziskovalnega dela v podjetju Acies Bio d.o.o. Osnovne recepture so iz Kieserjevega priročnika (Kieser in sod., 2000), vendar so bile kasneje optimizirane za posamezne streptomicetne seve.

3.2.3.1 2TY ("Tryptone Yeast Extract Media")

Gojišče 2TY (Sambrook in sod., 1989) smo uporabljali za kultivacijo vseh sevov bakterije *E. coli*. Pripravili smo ga tako, da smo zatehtali vse sestavine navedene v preglednici 3, jim dodali ustrezno količino dvakrat destilirane vode ter 20 minut avtoklavirali na 121°C in tlaku 120 kPa. Po avtoklaviranju smo steklenice s tekočim gojiščem aseptično zaprli ter jih shranili do uporabe. V primeru, da smo gojišču dodali tudi agar, smo ga po avtoklaviranju pustili, da se rahlo ohladi, po potrebi dodali antibiotik, premešali in razlili v sterilne petrijeve plošče. Petrijevke smo nato 4 ure pustili na sobni temperaturi, da se je gojišče strdilo. Po tem času smo jih do uporabe shranili v hladilniku na 4°C.

Preglednica 3: Sestava gojišča 2TY (Sambrook in sod., 1989).

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Kazein pepton	16 g/L	Biolife
Kvasni ekstrakt	10 g/L	Sigma
NaCl	5 g/L	Merck
Bakteriološki agar (za trdo gojišče)	15 g/L	Biolife

*Sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

3.2.3.2 Soja manitol (SM)

Gojišče SM (Kieser in sod., 2000) smo pripravljali v obliki agar plošč za kultivacijo vrst *S. coelicolor* in *S. rimosus*. Proces priprave je enak, kot pri gojišču 2TY, le da smo čas avtoklaviranja podaljšali na 30 minut. Ker smo pripravljali samo trdno gojišče SM, smo agar vedno dodali. Sestavine gojišča so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava gojišča SM.

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Sojina moka	20 g/L	Cargill Foods
D-manitol	20 g/L	Merck
Bakteriološki agar	20 g/L	Biolife

*Sterilizacija traja 30 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

3.2.3.3 SAM (sporulacijsko gojišče za bakterijo *S. cinnamonensis*)

Gojišče smo pripravljali v obliki agar plošč za kultivacijo vrste *S. cinnamonensis*. Gojišče smo pripravili tako, da smo najprej zatehtali škrob, ga vsuli v vodo in kuhali pri temperaturi vrelišča 20 minut ob mešanju. S tem smo preprečili sprijemanje grudic škroba. Potem smo dodali ostale komponente gojišča. Nadaljnji proces priprave agar nih plošč je enak kot pri pripravi agar plošč z gojiščem 2TY. Avtoklaviranje traja 30 minut. Gojišče kot glavni vir ogljika vsebuje koruzni škrob. Vsebuje še soli, kot so K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $FeSO_4$ in $NaCl$. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.4 STS (sporulacijsko gojišče za bakterijo *S. tsukubaensis*)

Gojišče STS smo pripravljali v obliki čvrstega gojišča v petrijevih pločah, za kultivacijo vrste *S. tsukubaensis*. Podobno kot pri gojišču SAM smo tudi v tem primeru koruzni škrob pred dodatkom ostalih sestavin 20 minut kuhali ob mešanju. Posebnost pri pripravi tega gojišča je še mineralna raztopina, ki smo jo dodali vanj, ko je to že vsebovalo vse ostale sestavine. Mineralno raztopino smo pripravili vnaprej v večji količini. Gojišče kot glavni vir ogljika vsebuje koruzni škrob. Vsebuje tudi soli, kot so K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $FeSO_4$ in $NaCl$. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.5 MMAM (sporulacijsko gojišče za streptomicete)

Iz gojišča MMAM (Kieser in sod., 2000) smo pripravljali agar plošče, na katere smo nacepili konjugacijsko mešanico streptomicet in transformirane kulture *E. coli* ET12567. Vse sestavine iz preglednice 5 smo v ustreznih razmerjih vmešali v dvakrat destilirano vodo, ter z mešanjem pripravili homogeno suspenzijo. Nato smo uravnali pH na vrednost 5,8 in 30 minut avtoklavirali pri 121°C in tlaku 120 kPa.

Preglednica 5: Sestava gojišča MMAM.

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Koruzni škrob	10 g/L	Cerestar
Koruzna namakalna vodica	5 mL/L	Cargill
Kvasni ekstrakt	3 g/L	Sigma
$CaCO_3$	3 g/L	Kalcit
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,3 g/L	Kemika
Agar	20 g/L	Biolife

*Sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

3.2.3.6 TSB ("Tryptic Soy Broth")

V tekočem gojišču TSB (Kieser in sod., 2000) smo kultivirali vse vrste streptomicet za kvantitativno detekcijo flaviolina. Priprava je potekala tako, da smo vse sestavine navedene v preglednici 6 vmešali v dvakrat destilirano vodo in 20 minut avtoklavirali pri temperaturi 121°C ter tlaku 120 kPa.

Preglednica 6: Sestava gojišča TSB.

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Kazein pepton	17 g/L	Biolife
Sojin pepton	3 g/L	Biolife
Glukoza	2,5 g/L	Merck
NaCl	5 g/L	Merck
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L	Merck

*Sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

3.2.3.7 VEG-MON (gojišče za vegetativno fazo kultivacije bakterije *S. cinnamonensis*)

Gojišče VEG-MON je kompleksno tekoče gojišče za vegetativno fazo kultivacije vrste *S. cinnamonensis*. Priprava gojišča je potekala tako, da smo v posebno čašo najprej zatehtali sojino moko in kvas, dolili vso potrebno vodo, ter ob mešanju kuhali 30 minut. Uporabili smo vodovodno vodo. Ostale sestavine smo zatehtali ločeno in jih kasneje vsuli v prej omenjeno suspenzijo sojine moke in kvasa. Gojišču smo pH vrednost uravnali na 6,4 in ga 20 minut avtoklavirali pri temperaturi 121°C in tlaku 120 kPa. Gojišče kot glavni vir ogljika in dušika vsebuje dekstrin, sojino moko in kvas. Vsebuje še CaCO₃. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.8 PROD-MON (gojišče za produkcijsko fazo kultivacije bakterije *S. cinnamonensis*)

Gojišče PROD-MON je kompleksno tekoče gojišče za produkcijsko fazo kultivacije vrste *S. cinnamonensis*. Podobno kot pri pripravi gojišča VEG-MON smo tudi v tem primeru sojino moko v celotnem volumnu vodovodne vode najprej kuhali 30 minut, šele nato smo dodali preostale sestavine, ki smo jih zatehtali ločeno. pH smo uravnali na vrednost med 6,6 in 6,9. Gojišče vsebuje tudi sončnično olje, ki smo ga še pred avtoklaviranjem dodali v vsako centrifugirko posebej. Avtoklaviranje je trajalo 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa. Gojišče kot glavni vir ogljika in dušika vsebuje sojino moko in rastlinsko olje. Vsebuje še soli, kot so K₂HPO₄, MgSO₄, FeSO₄ in NaCl. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.9 VSTS (gojišče za vegetativno fazo kultivacije bakterije *S. tsukubaensis*)

Gojišče VSTS je kompleksno tekoče gojišče za vegetativno fazo kultivacije vrste *S. tsukubaensis*. Pripravili smo ga tako, da smo v dvakrat destilirano vodo vmešali ustrezne količine sestavin. Potem smo dodali še mineralno raztopino. Vse skupaj smo 25 minut avtoklavirali pri temperaturi 121°C in tlaku 120 kPa. Gojišče kot glavni vir ogljika in dušika vsebuje sojino moko in dekstrin. Vsebuje še soli, kot so K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $FeSO_4$ in NaCl. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.10 PSTS (gojišče za produkcijsko fazo kultivacije bakterije *S. tsukubaensis*)

Gojišče PSTS je kompleksno tekoče gojišče v katerem smo izvajali produktivno kultivacijo vrste *S. tsukubaensis*. Pripravili smo ga tako, da smo v dvakrat destilirano vodo vmešali ustrezne količine sestavin. Gojišče smo 25 minut avtoklavirali pri temperaturi 121°C in tlaku 12 kPa. Gojišče kot glavni vir ogljika in dušika vsebuje sojino moko, glukozo in dekstrin. Vsebuje še soli, kot so K_2HPO_4 in NaCl. Ker gre za komercialno industrijsko gojišče natančne sestave gojišča ni mogoče opisati. Recepturo za gojišče je zagotovilo podjetje AciesBio d.o.o.

3.2.3.11 CRM

Gojišče CRM (Pigac in Schrempf, 1995) smo potrebovali za kultivacijo vrste *Streptomyces rimosus*, in sicer v postopku priprave elektrokompetentnih celic. Priprava je potekala tako, da smo zatehtali vse sestavine iz preglednice 7, dodali ustrezno količino vode, umerili pH na vrednost 7,3 ter avtoklavirali 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa. V procesu priprave gojišča CRM smo uporabili tudi vse sestavine za gojišče TSB.

Preglednica 7: Sestava gojišča CRM.

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Glukoza	10 g/L	Merck
Saharoza	103 g/L	Merck
$MgCl_2 \times 6H_2O$	10,12 g/L	Sigma
Kvasni ekstrakt	5 g/L	Biolife
TSB	15 g/L	

*Pred avtoklaviranjem je potrebno umeriti pH na vrednost 7,3.

3.2.4 Pufri

3.2.4.1 50-kratni pufer TAE (Tris-acetatni pufer z EDTA) za agarozno elektroforezo

Za pripravo enega litra TAE pufra smo zatehtali 242 g tris baze (končna koncentracija v TAE pufru je bila 2 M). Dodali smo 57,1 mL ledocetne kisline, ter 100 mL 0,5 M EDTA. Raztopini smo dolili dvakrat destilirano vodo do 1 L, ter dobro premešali. Nazadnje smo s KOH uravnali pH na vrednost 8.

3.2.5 Komercialni kompleti za delo v genskem laboratoriju

Preglednica 8: Komercialni kompleti za delo v genskem laboratoriju.

Ime kompleta	Namen	Proizvajalec
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Komplet za izolacijo plazmidne DNA iz transformant <i>E. coli</i> .	Sigma Aldrich, Nemčija
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Komplet za izolacijo DNA fragmentov iz agaroznega gela.	Promega

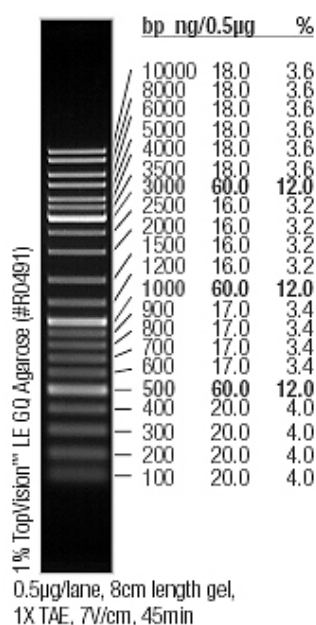
3.2.6 Ostali reagenti, encimi, standardi, pufri, barvila in spojine

Preglednica 9: Ostali reagenti, encimi, standardi, barvila in spojine.

Material	Proizvajalec
SYBR Safe DNA gel stain (DNA barvilo za agarozne gele)	Invitrogen
DNA velikostni standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix – SM0331)	Fermentas
DNA 6x loading buffer (nanašalni pufer za nanos DNA na agarozni gel)	Fermentas
Restriksijski encim <i>SpeI</i>	New England Biolabs
Restriksijski encim <i>NdeI</i>	New England Biolabs
Restriksijski encim <i>XbaI</i>	Fermentas
Restriksijski encim <i>EcoRV</i>	New England Biolabs
Restriksijski encim <i>HindIII</i>	Fermentas
Restriksijski encim <i>EcoRI</i>	Fermentas
Restriksijski encim <i>PstI</i>	New England Biolabs
Restriksijski encim <i>AatI</i>	New England Biolabs
Restriksijski encim <i>PvuI</i>	New England Biolabs
Restriksijski pufer NEB2	New England Biolabs
Restriksijski pufer NEB3	New England Biolabs
Restriksijski pufer NEB4	New England Biolabs
T4 DNK ligaza	New England Biolabs

Klenow fragment	New England Biolabs
T4 ligazni pufer	New England Biolabs
dNTP	New England Biolabs
ATP	New England Biolabs
Agarozna za elektroforezo	Sigma
Tris	Sigma
Glicerol	Merck
MiliQ voda (za encimske reakcije)	New England Biolabs

Uporabili smo DNA velikostni standard "GeneRuler™ DNA Ladder Mix", ki ga proizvaja podjetje Fermentas in ima v njihovem katalogu zaporedno oznako "SM0331". Vzorec DNA standarda je predstavljen na sliki 18.



Slika 18: Vzorec velikostnega standarda GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ki se po elektroforezi naredi na agaroznem gelu (Fermentas, 2009).

3.2.7 Antibiotiki

Preglednica 10: Uporabljeni antibiotiki.

Antibiotik	Uporaba	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Apramicin	Selekcija transformant vrst <i>S. coelicolor</i> , <i>S. cinnamonensis</i> in <i>S. tsukubaensis</i> transformiranih s plazmidi pVMC1, pVMC1-actII-ORF4/PactI, pVMC1-ermE in pVMC1-ermE*. Z istim antibiotikom smo selekcionalirali tudi bakterije <i>E. coli</i> transformirane z zgornjimi plazmidi.	100 µg/mL	Sigma

Tiostrepton	Selekcija transformant vrst <i>S. rimosus</i> transformiranih s plazmidi pTS55, pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> , pVMC2- <i>ermE</i> in pVMC2- <i>ermE</i> *.	30 µg/mL (trdno gojišče), 5 µg/mL (tekoče gojišče)	Sigma
Nalidinska kislina	Preprečevanje rasti bakterije <i>E. coli</i> na ploščah s konjugacijsko mešanico.	25 µg/mL	Krka
Kloramfenikol	Selekcija bakterije <i>E. coli</i> ET12567	10 µg/mL	Sigma
Kanamycin	Selekcija bakterije <i>E. coli</i> ET12567 na plazmid pUZ8002, ki omogoča konjugacijo s streptomicetami.	25 µg/mL	Sigma
Ampicilin	Selekcija bakterije <i>E. coli</i> ET12567 na plazmide pTS55, pVMC2- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> , pVMC2- <i>ermE</i> in pVMC2- <i>ermE</i> *.	100 µg/mL	Sigma

3.2.8 Aparature

Preglednica 11: Aparature uporabljene med diplomskim delom.

Aparatura	Oznaka modela	Proizvajalec
Avtoklav	SU 300	Sutjeska
Avtomatske pipete	P1, P20, P100, P200, P1000, P10000	Gilson
Brezprašna komora	PIO SMBC 122	Iskra PIO
Mala centrifuga	5415C	Eppendorf
Velika centrifuga	Centric 322A	Tehtnica
Digestorij		Med-lab Rauh
Hladilnik (4°C)	4°C	Gorenje
Zamrzovalna omara (-20°C)		LTH
Skrinja (-80°C)	Ultrafreeze	Heto
Inkubator (za <i>E. coli</i>)	I-115C	Kambič
Inkubator (za streptomicete)		Sutjeska
Magnetno mešalo	RH basic 2	IKA Works
Mikrovalovna pečica	Super Shower Wave	Sanyo
pH meter	Sevenmulti	Metler Toledo
Stresalnik	Multitron	HT Infors
Sušilnik		Medikotehnika
Pomivalni stroj		Gorenje
Analitska tehtnica	Sartorius analytic	Sartorius
Tehtnica	Sartorius excellence	Sartorius
Vodna kopel		Kambič
Vrtinčnik 1	MS3 Basic	IKA
Vrtinčnik 2	Lab Dancer Vario	IKA
Naprava za PCR reakcijo	I Cyclor	Biorad
Elektroforezna banjica	Sub Cell GT	Biorad

Kamera za slikanje elektroforeznih gelov in pripadajoča programska oprema	Gel Doc 2000	Biorad
Napajalnik za elektroforezo		Biorad
Spektrofotometer	Safire 2	Tecan

3.2.9 Steklovina in potrošni material

- Čaše (20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1500 mL, 2500 mL)
- Erlenmajerjeve steklenice (250 mL)
- Falcon centrifugirke
- Merilni valji (100 mL, 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2500 mL)
- Nastavki za pipete (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Petrijeve plošče (premer 9 cm)
- Steklenice
- Pasterjeve pipete
- Membranski filtri
- Mikrotiterske ploščice Nunc (za merjenje v vidnem spektru svetlobe)
- Mikrotiterske ploščice Greiner (za merjenje v UV spektru svetlobe)
- Mikrocentrifugirke
- Sterilni zobotrebeci
- Sterilne palčke za ušesa
- Luknjači za agar plošče

3.3 METODE DELA

3.3.1 Priprava plazmidov z molekularno biološkimi tehnikami

3.3.1.1 Priprava plazmida pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*

V besedilu je podan potek laboratorijskega dela, natančnejši podatki o reakcijskih pogojih in o vseh sestavinah reakcijskih mešanic so navedeni v preglednicah. Vsi molekularno biološki postopki, uporabljeni pri pripravi plazmidov, so opisani tudi v Sambrookovem priročniku za molekularno kloniranje (Sambrook in sod., 1989).

Promotorsko aktivacijsko zaporedje *actII*-ORF4/*PactI* smo pridobili iz plazmida pSGSet1 (Gregory in sod., 2004). Plazmid smo najprej rezali z restrikcijskim encimom *SpeI* (restrikcija 1). Po 2 urni inkubaciji na 37°C smo mešanici dodali klenov fragment (klenov fragment 1), da smo zapolnili štrleče konce na DNA vijačnici. Mešanico smo inkubirali 40 minut na 37°C in

jo nato očistili s pomočjo komercialnega kompleta Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, da smo odstranili vse encime in sestavine uporabljenih pufrov. Pri izolaciji smo natančno sledili protokolu za izolacijo (Promega, 2009), ki je bil priložen kompletu. Sledilo je 2 urno rezanje z encimom *NdeI* (restrikcija 2). Restriksijsko mešanico smo nanesti na agarozni gel in po končani elektroforezi izolirali približno 1200 baznih parov dolg DNA fragment, ki je predstavljal zaporedje *actII*-ORF4/*PactI*.

Uporabili smo 1 % agarozni gel, ki smo ga pripravili tako, da smo v 100 mL 1x TAE pufru vmešali 1 g agaroze v prahu. S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo omogočili, da se je agaroz raztopila v pufru. Raztopino agaroze smo ohladili na približno 60°C, dodali 1 µL barvila CYBR Safe, ki je omogočilo kasnejše fotografiranje gela. Raztopino agaroze z barvilom smo vlili v stojalo za gele z vstavljenim glavničkom ter pustili stati približno pol ure, da se je gel strdil. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj s stojalom prestavili v elektroforezno banjico z 1x TAE pufrom ter odstranili glavniček. V luknjice na gelu smo nanesti vzorce DNA v 6x nanašalnem pufru. Poleg vzorcev smo na gel nanesti tudi ustrezen velikostni standard. Elektroforezno banjico z gelom smo nato priključili na električno napetost ter skozi gel pustili teči električni tok (100V, 100A, 60 min).

Po končani elektroforezi smo gel fotografirali z elektroforezno kamero. Ko smo preverili velikost fragmenta, smo ga pod UV lučjo izrezali iz gela ter ga izolirali s komercialnim kompletom Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Pri tem smo natančno sledili protokolu za izolacijo (Promega, 2009), ki je bil priložen kompletu.

Vzporedno smo rezali tudi plazmid pVMC1, in sicer najprej z encimom *XbaI* (restrikcija 3). Po 2 urni inkubaciji smo restriksijski mešanici dodali klenov fragment (klenov fragment 2) in s tem zapolnili štrleče konce. Mešanico smo s klenovim fragmentom inkubirali 40 minut na 37°C in jo po inkubaciji očistili s pomočjo komercialnega kompleta Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, 2009). Sledilo je 2 urno rezanje z encimom *NdeI* (restrikcija 4). Restriksijsko mešanico smo nanesti na agarozni gel in po končani elektroforezi izolirali približno 8200 baznih parov dolg DNK fragment, ki je predstavljal odprt plazmid pVMC1.

S pomočjo DNA ligaze smo zlepili fragmenta *actII*-ORF4/*PactI* in odprt plazmid pVMC1 (ligacija 1) ter tako dobili plazmid pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*. Ligacijsko mešanico smo z elektroporacijo vnesli v sev *E. coli* DH10B. To smo storili tako, da smo elektrokompetentne celice skupaj z 1 µL plazmida vnesli v kiveto za elektroporacijo, nato smo skozi kiveto spustili sunek električnega toka. Parametri elektroporatorja so bili nastavljeni na 2,5 kV, 200Ω, 25 µF. Transformirano kulturo smo po izpostavitvi električnemu toku eno uro inkubirali v 2TY tekočem gojišču pri 37°C, nato smo suspenzijo celic nacepili na 2TY agar ploščo z ampicilinom. Ploščo smo čez noč inkubirali pri 37°C. Naslednji dan smo 5 kolonij iz plošče nacepili v 5 mL gojišča 2TY z ampicilinom in inkubirali čez noč s stresanjem pri 220 obratih na minuto ter temperaturi 37°C. Po inkubaciji smo s komercialnim kompletom GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit izolirali plazmidno DNA iz celic. Pri tem smo natančno sledili protokolu za izolacijo (Sigma Aldrich, 2008), ki je bil priložen kompletu. Pravilnost ligacije smo preverili s kontrolno restrikcijo. Plazmide smo rezali 2 uri pri 37°C, z encimom

AatII (restrikcija 5). Eno različico ustreznega plazmida smo shranili za nadaljnjo uporabo in jo poimenovali pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*, ostale smo zavrgli.

Preglednica 12: Pogoji za encimske reakcije, ki smo jih uporabili pri pripravi plazmida pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*.

Reakcija (vol)	Uporabljena DNK	Reagenti	Pufer	H ₂ O	Pogoji
Restrikcija 1 (50 µL)	pSGSet1 (35 µL)	<i>SpeI</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 2 (50 µL)	DNK iz restrikcije 1 (35 µL)	<i>NdeI</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 3 (50 µL)	pVMC1 (35 µL)	<i>XbaI</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 4 (50 µL)	DNK iz restrikcije 3 (35 µL)	<i>NdeI</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 5 (10 µL)	pVMC1- <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> 1-5 (5 µL)	<i>AatII</i> (0,5 µL)	NEB 4 (1 µL)	3 µL	37°C, 2 h
Klenov f. 1 (60 µL)	Restriksijska mešanica 1 (50 µL)	Klenov f. (3 µL), dNTP (3 µL)	NEB 2 (1 µL)	3 µL	37°C, 40 min
Klenov f. 2 (60 µL)	Restriksijska mešanica 3 (50 µL)	Klenov f. (3 µL), dNTP (3 µL)	NEB 2 (1 µL)	3 µL	37°C, 40 min
Ligacija 1 (15 µL)	pVMC1 (<i>XbaI</i> →KF/ <i>NdeI</i>) (2 µL), <i>actII</i> -ORF4/ <i>PactI</i> (<i>SpeI</i> →KF/ <i>NdeI</i>) (8 µL)	T4 DNK ligaza (1 µL), ATP (1 µL)	T4 ligazni pufer (1,5 µL)	1,5 µL	16°C, 18 h

*Rezali smo 5 različic plazmidov pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI* izoliranih iz različnih kolonij transformirane *E. coli*.

3.3.1.2 Priprava plazmida pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*

Ker plazmid pVMC1 nima ustreznega integracijskega mesta za integracijo v genom bakterije *S. rimosus* smo vse plazmide, ki smo jih transformirali v to vrsto pripravili na osnovi plazmida pTS55 (Smokvina in sod., 1997). Plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* smo pripravili po enakem postopku kot plazmida pVMC1-*ermE* in pVMC1-*ermE** (glej poglavje 3.2.1.4).

Plazmid pTS55 smo rezali z restriksijskim encimom *HindIII* (restrikcija 6, tabela 13) ter lepljive konce zapolnili s klenovim fragmentom (klenov fragment 3). Fragment za ligacijo s plazmidom pTS55 smo pridobili z rezanjem plazmida pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI* (restrikcija 7). Pri tem smo uporabili restriksijska encima *EcoRI* in *HindIII*, nastale štrleče konce smo zapolnili s klenovim fragmentom (klenov fragment 4). S pomočjo omenjene kombinacije restriksijskih encimov smo izrezali fragment, ki je poleg promotorja vseboval tudi gen *rppA* in transkripcijska terminatorja na vsaki strani. Fragment s promotorsko aktivacijskim sistemom *actII*-ORF4/*PactI* je bil dolg približno 3700 baznih parov. Fragment smo v reakciji z ligazo (ligacija 2) zlepili z odprtim plazmidom pTS55 (*HindIII*→KF), ligacijsko mešanico transformirali v sev *E. coli* DH10B. Plazmid smo izolirali iz petih različnih kolonij in vse preverili s kontrolno restrikcijo z encimom *PstI* (restrikcija 8). Shranili smo en ustrezen plazmid in ga poimenovali pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*.

Preglednica 13: Pogoji za encimske reakcije, ki smo jih uporabili pri pripravi plazmida pVMC2-actII-ORF4/PactI.

Reakcija (vol)	Uporabljena DNK	Reagenti	Pufer	H ₂ O	Pogoji
Restrikcija 6 (50 µL)	pTS55 (35 µL)	<i>HindIII</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 7 (50 µL)	pVMC1-actII-ORF4/PactI (35 µL)	<i>EcoRI</i> (2 µL), <i>HindIII</i> (2 µL)	NEB 2 (5 µL)	8 µL	37°C, 2 h
Restrikcija 8 (10 µL)	pVMC2-actII-ORF4/PactI' 1-5 (5 µL)	<i>PstI</i> (0,5 µL)	NEB 3 (1 µL)	3 µL	37°C, 2 h
Klenov f. 3 (60 µL)	Restriksijska mešanica 6 (50 µL)	Klenov f. (3 µL), dNTP (3 µL)	NEB 2 (1 µL)	3 µL	37°C, 40 min
Klenov f. 4 (60 µL)	Restriksijska mešanica 7 (50 µL)	Klenov f. (3 µL), dNTP (3 µL)	NEB 2 (1 µL)	3 µL	37°C, 40 min
Ligacija 2 (15 µL)	pTS55 (<i>HindIII</i> →KF) (2 µL), <i>tfd</i> -(actII-ORF4/PactI)- <i>rppA-to</i> (<i>HindIII/EcoRI</i>)→KF (8 µL)	T4 DNK ligaza (1 µL), ATP (1 µL)	T4 ligazni pufer (1,5 µL)	1,5 µL	16°C, 18 h

*Rezali smo 5 različic plazmidov pVMC2-actII-ORF4/PactI' izoliranih iz različnih kolonij transformirane *E. coli*.

3.3.2 Transformacija streptomicet

3.3.2.1 Priprava spor divjih tipov izbranih streptomicetnih gostiteljev

Za pripravo transformant streptomicet smo morali najprej pripraviti 14 dni stare spore vseh uporabljenih sevov. To smo storili tako, da smo na agar plošče nacepili zamrznjene spore divjih tipov streptomicet. Po 14 dnevni inkubaciji na 28°C, ko so vse kulture že sporulirale, smo jih enakomerno nacepili na sveže plošče in zopet inkubirali 14 dni na 28°C. Po inkubaciji smo spore iz plošč resuspendirali v 20% sterilnem glicerolu in jih do uporabe shranili v zamrzovalniku na -20°C.

3.3.2.2 Transformacija s pomočjo postopka konjugacije

Seve *S. coelicolor*, *S. cinnamonensis* in *S. tsukubaensis* smo transformirali s pomočjo konjugacije, ki je opisana tudi v priročniku Practical streptomyces genetics (Kieser in sod., 2000). Plazmide pVMC1-actII-ORF4/PactI, pVMC1-ermE in pVMC1-ermE* smo najprej transformirali v sev *E. coli* ET12567, ki je predhodno vseboval plazmid pUZ8002 z zapisom za vse gene potrebne pri konjugaciji (Paget in sod., 1999). Omenjen sev je znan tudi po tem, da ne metilira DNK, kar je pogoj za vnos plazmidov v streptomicete. Te imajo drugačen restriksijsko metilacijski sistem kot *E. coli*, zato bi vnos metiliranih plazmidov povzročil njihovo razgradnjo.

Transformacijo *E. coli* ET12567 smo izvedli s pomočjo elektroporacije s parametri elektroporatorja nastavljenimi na 2,5 kV, 200Ω, 25 µF. Po izpostavitvi električnemu toku smo kulturo 45 minut inkubirali v tekočem 2TY gojišču na temperaturi 37°C s stresanjem pri 220

obratni na minuto. Nato smo suspenzijo celic nacepili na petrijevo ploščo s čvrstim 2TY gojiščem in antibiotiki: kloramfenikol, kanamicin in ampicilin oziroma apramicin. Sev *E. coli* ET12567 je odporen na kloramfenikol, plazmid pUZ8002 nosi rezistenco na kanamicin, tretji antibiotik smo izbrali glede na to kateri plazmid smo transformirali v *E. coli*. Če so bili to plazmidi iz serije pVMC1, smo uporabili apramicin, če so bili plazmidi iz serije pVMC2 oziroma pTS55, smo uporabili ampicilin. Plošče smo inkubirali čez noč na 37°C. Naslednje jutro smo plošče prestavili v hladilnik na 4°C in popoldne iz vsake plošče nacepili nekaj kolonij v eno centrifugirko s 5 mL tekočega 2TY z dodanimi antibiotiki (enakimi kot na ploščah). Centrifugirke smo inkubirali na 37°C s stresanjem pri 220 obrati na minuto. Naslednje jutro smo 1 mL celic precepili v sterilne centrifugirke z 21 mL svežega 2TY gojišča ter inkubirali na 37°C s stresanjem pri 220 obrati na minuto, dokler ni absorbanca kulture dosegla 0,5. Ko je kultura dosegla ustrezno gostoto, smo jo 10 minut centrifugirali pri 4000 obratih na minuto, odlili supernatant ter resuspendirali v 10 mL svežega 2TY. Zadnja dva koraka smo še enkrat ponovili, nazadnje smo celice resuspendirali v 1 mL 2TY gojišča.

Vzporedno s spiranjem celic *E. coli* ET12567 smo na konjugacijo pripravljali tudi spore streptomicet. Mikrocentrifugirko s sporami smo centrifugirali 5 minut pri 5000 obratih na minuto. Supernatant smo odlili ter usedlino spor resuspendirali v 1 mL 2TY gojišča. Izpiranje smo še enkrat ponovili in spore resuspendirali v 1 mL 2TY gojišča. Izprane spore smo 10 minut inkubirali v vodni kopeli pri 50°C in jih nato ohladili na ledu.

Nazadnje smo celice *E. coli* ET12567, ki so vsebovale naš plazmid in plazmid pUZ8002, združili, razmazali na ustrezne agar plošče brez antibiotikov ter inkubirali čez noč pri 28°C. V tem času je potekla konjugacija in reporterski plazmidi s testiranimi promotorji so se iz *E. coli* prenesli v streptomicete. Volumen spor, ki smo jih dodali 1 mL kulture *E. coli*, smo optimizirali glede na sev. Podatki so v preglednici 24. Vsako konjugacijsko mešanico smo nanesti na 4 agar plošče.

Preglednica 14: Volumen/količina spor in vrste trdnih gojišč, ki smo jih uporabili pri postopku transformacije izbranih sevov s postopkom konjugacije.

Sev streptomicete	Volumen spor	Volumen <i>E. coli</i> ET12567	Vrsta gojišča
<i>S. coelicolor</i>	120 µL	1 mL	SM
<i>S. monensin</i>	250 µL	1 mL	SAM
<i>S. tsukubaensis</i>	250 µL	1 mL	STS

Naslednje jutro (čez 16 ur) smo vsako ploščo prelili z 1 mL raztopine antibiotikov, ki je vsebovala 40 µL nalidinske kisline, 15 µL apramicina in 945 µL sterilne vode. Nalidinska kislina je preprečila rast bakteriji *E. coli*, apramicin pa netransformiranim sporam streptomicet. Tako prelite plošče smo v brezprašni komori posušili in jih nato inkubirali 1 teden pri 28°C.

3.3.2.3 Priprava elektrokompetentnih celic bakterije *S. rimosus*

100 mL gojišča CRM smo inokulirali z 1% inokulumom 24 urne kulture *S. rimosus*. Inkubirali smo 48 ur pri 30°C in stresanju z 220 obrati na minuto. Po inkubaciji smo prenesli steklenice na led in jih ohlajali 15 minut, jih v hlajeni centrifugi centrifugirali 15 minut pri 10.000 obratih na minuto, supernatant smo odlili, usedlino resuspendirali v 100 mL 10% saharoze. Celice smo ponovno centrifugirali in usedlino tokrat resuspendirali v 50 mL 10% saharoze. Sledilo je ponovno centrifugiranje, resuspendiranje v 20 mL 15% ledenega glicerola, ponovno centrifugiranje in resuspendiranje v 10 mL 15% ledenega glicerola. Dodali smo 4 mg lizocima ter inkubirali 30 minut na 37°C. Po inkubaciji smo celice centrifugirali 15 minut pri 10.000 obratih na minuto, jih resuspendirali v 20 mL 15% ledenem glicerolu, ponovno centrifugirali in resuspendirali v 5 mL ET pufru. Elektrokompetentne celice smo alikvotirali po 50 µL v sterilne epice in jih zamrznili na suhem ledu. Do uporabe smo jih shranili pri -80°C.

3.3.2.4 Elektrotransformacija celic bakterije *S. rimosus*

Vrsta *S. rimosus* se slabo konjugira, zato smo jo transformirali s pomočjo elektrotransformacije. Plazmide pTS55, pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*, pVMC2-*ermE* in pVMC2-*ermE** smo najprej transformirali v sev *E. coli* ET12567, ki ne metilira DNK. Transformante *E. coli* smo nacepili na plošče z antibiotikoma kloramfenikol in ampicilin. Inkubirali smo jih 18 ur pri 37°C (preko noči). Naslednje jutro smo jih pospravili v hladilnik na 4 °C ter jih isti dan popoldne nacepili v tekoč medij 2TY z enakima antibiotikoma kot prej. Po ponovni prekonočni inkubaciji (18 ur) smo iz kulture izolirali nemetilirane plazmide ter jih elektrotransformirali v elektrokompetentne celice *S. rimosus*. Elektrotransformacija je potekala tako, da smo 8µl plazmida dali v 50µl kompetentnih celic ter prenesli v elektrotransformacijsko kiveto. Kiveto smo vstavili v elektroporator ter skozi njo spustili električni pulz. Elektroporator je bil nastavljen na naslednje parametre: 2 kV, 600 Ω, 25 µF. Takoj za tem smo celice iz kivete resuspendirali v 950µl svežega TSB gojišča ter jih 3 ure inkubirali na 30°C. Po inkubaciji smo jih razmazali na petrijeve plošče z ustreznim čvrstim gojiščem (glej poglavje 3.2.3) in antibiotikom tiostrepton ter jih inkubirali 1 teden na 28°C. Nadaljni postopki za pripravo spor transformant, se niso razlikovali od tistih pri drugih vrstah streptomicet.

3.3.2.5 Priprava in shranjevanje spor transformiranih streptomicet

Posamezne kolonije transformiranih streptomicet, ki so zrasle na ploščah po konjugaciji oziroma elektroporaciji, smo nacepili na sveže petrijeve plošče s čvrstim gojiščem. Nacepili smo jih v obliki kvadratkov (8 na posamezno ploščo). Agar plošče so vsebovale antibiotika nalidinsko kislino in apramicin, oziroma nalidinsko kislino in tiostrepton, v primeru ko smo

nanje nacepili vrsto *S. rimosus*. Plošče smo inkubirali 14 dni pri 28°C. Po 14. dneh smo posamezne kvadratke precepili na sveže plošče z apramicinom oziroma tiostreptonom, če smo nanje nacepili vrsto *S. rimosus*. Plošče smo ponovno inkubirali 14 dni pri 28°C. V tem času so transformante vseh sevov sporulirale.

3.3.3 Testiranje transformant streptomicet za produkcijo flaviolina

Genom streptomicet ima več možnih mest, v katera se lahko integrira plazmid. Nekatera so za integracijo heterolognih genov ugodna, druga ne. Z integracijo na neugodno mesto se lahko prekinajo pomembni geni, kar ima za posledico slabšo rast takega seva. Možna je tudi integracija v robne dele genoma, kjer pogosteje prihaja do obsežnejših delecij. Po integrativni transformaciji streptomicet je zato potrebno opraviti selekcijo, v kateri iz vseh transformant izberemo tiste, pri katerih uspemo zaznati zelen produkt, sev pa kaže normalno morfologijo. V našem primeru smo transformante najprej testirali v enostavnem gojišču TSB. Izvedli smo inkubacijo, po kateri smo spektrofotometrično določili relativno količino flaviolina v gojišču in na podlagi dobljenih rezultatov izbrali po 7 pozitivnih kolonij za vsako kombinacijo vrsta streptomicete / promotor.

3.3.3.1 Kultivacija v gojišču TSB

Iz plošč s 14 dni starimi sporami smo z mikrobiološkim luknjačem izrezali majhne valjčke, ki smo jih prenesli v centrifugirke s 5 mL gojišča TSB. Gojišču TSB smo predhodno dodali antibiotik, in sicer apramicin, če smo ga nacepili z vrstami *S. coelicolor*, *S. cinnamomensis* ali *S. tsukubaensis*. Če smo gojišče nacepili z vrsto *S. rimosus* (ta vrsta je bila transformirana s plazmidi na osnovi pTS55), smo dodali antibiotik tiostrepton. Po inokulaciji gojišča smo pričeli z vegetativno inkubacijo, ki je za vse vrste trajala 24 ur, razen za vrsto *S. coelicolor*, pri kateri je trajala 36 ur. Centrifugirke smo inkubirali v stresalniku pri 220 obratih na minuto in temperaturi 28°C.

Vegetativni stopnji inkubacije je sledila produktivna stopnja inkubacije. 10 % vegetativne kulture smo prenesli v sveže centrifugirke s 5 mL svežega TSB gojišča z dodanim ustreznim antibiotikom (glej 3.2.7). Produktivna inkubacija je trajala 48 ur, razen pri vrsti *S. coelicolor*, kjer je trajala 72 ur. Inkubirali smo s stresanjem pri 220 obratih na minuto in temperaturi 28°C.

3.3.3.2 Izbor pozitivnih transformant streptomicet

Po končani produktivni inkubaciji smo 1,5 mL kulture iz vsake centrifugirke prenesli v mikrocenrifugirke ter jih 10 minut centrifugirali pri 14000 obratih na minuto. Po 200 µL

supernatanta smo prenesli v luknjice na mikrotitrski plošči in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 370 nm. Predhodno se je kot najprimernejša valovna dolžina za detekcijo flaviolina v vidnem spektru svetlobe sicer izkazala valovna dolžina 488 nm (Kuščer in sod., 2007). Vendar je omenjeni eksperiment potekal z bakterijo *Streptomyces hygroscopicus*. V naših sevih se je kot primernejša izkazala valovna dolžina 370 nm. V kasnejših poizkusih smo valovno dolžino še optimizirali glede na naše seve. Kasnejše kvantitativne meritve smo izvajali v UV območju, ker se je tak način izkazal za natančnejšega in primernega za vse gostiteljske seve. Ker smo transformante streptomicet gojili v gojišču z antibiotikom, smo kot negativno kontrolo upoštevali seve transformirane s plazmidom brez vstavljenih promotorjev (plazmid pVMC1 oziroma pTS55). Kot pozitivne kolonije smo privzeli vse tiste, od katerih gojišče je imelo absorbanco pri 370 nm za 20 % višjo od povprečne negativne kontrole.

V nadaljnje poizkuse smo za vsako kombinacijo vrsta / promotor vključili 7 pozitivnih kolonij, ki so imele najvišjo absorbanco pri 370 nm. Spore teh kolonij smo konfluentno nacepili na ustrezne agar plošče z antibiotikom in jih 14 dni inkubirali na 28°C. V tem času so vsi sevi sporulirali. Spore smo resuspendirali v 20 % sterilnem glicerolu in jih do uporabe shranili na -20°C.

3.3.4 Kultivacija pozitivnih transformant streptomicet v tekočem gojišču

Za pridobitev kvantitativnih rezultatov smo 7 pozitivnih kolonij za vsako kombinacijo vrsta / promotor ponovno kultivirali v tekočem mediju. Pri ponovni kultivaciji smo bili še posebej pozorni, da smo zagotovili enake pogoje za vse vključene seve. Najprej smo revitalizirali zamrznjene spore. Nacepili smo jih na ustrezne agar plošče z antibiotikom ter inkubirali 14 dni na 28°C. V tem času so vsi sevi sporulirali.

3.3.4.1 Kultivacija v gojišču TSB

Našo metodo smo želeli preizkusiti v enostavnem TSB gojišču. Ker se to gojišče hitro pripravi, je idealno za uporabo v obsežnih presejalnih testih, v katerih preverjamo fragmente genoma za vsebnost promotorjev. Zanesljivost naše metode v gojišču TSB bi močno povečala njeno uporabno vrednost.

V centrifugirke s 5 mL gojišča TSB z ustreznim antibiotikom smo s sterilnim luknjačem iz agar plošč prenesli koščke gojišča s 14 dni starimi spori transformiranih streptomicet. Centrifugirke z vrstami *S. cinnamonensis*, *S. rimosus* in *S. tsukubaensis* smo 24 ur inkubirali na temperaturi 28°C pri stresanju z 220 obrati na minuto. Centrifugirke z vrsto *S. coelicolor* smo v enakih pogojih inkubirali 36 ur. Po končani vegetativni inkubaciji smo 10 % vegetativne kulture prenesli v centrifugirke s 5 mL svežega TSB gojišča z ustreznim antibiotikom. Vrste *S. cinnamonensis*, *S. rimosus* in *S. tsukubaensis* smo 48 ur inkubirali na

temperaturi 28°C pri stresanju z 220 obrati na minuto, vrsto *S. coelicolor* pa 72 ur pri enakih pogojih.

3.3.4.2 Kultivacija v kompleksnih gojiščih

V industrijskih bioprocesih se pri proizvodnji sekundarnih metabolitov s streptomicetami v velikem merilu uporabljajo kompleksna gojišča. Ta so bolj bogata in predvsem cenejša kot enostavna gojišča, ki kot glavni vir ogljika vsebujejo glukozo. Poleg tega so razmerja med sestavinami optimizirana za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Številne komponente kompleksnega gojišča marsikdaj motijo analitske procese. Profil izražanja genov bakterije je v kompleksnem gojišču običajno drugačen kot v enostavnem. Aktivnost določenih promotorjev je torej različna v različnih gojiščih. Delovanje našega poročevalskega sistema smo želeli preveriti tudi v kompleksnih gojiščih.

Transformante vrst *S. cinnamomensis* in *S. tsukubaensis* smo inkubirali v dveh različnih kompleksnih gojiščih, ki sta prilagojeni na posamezni vrsti. V centrifugirke s 5 mL ustreznega vegetativnega kompleksnega gojišča z antibiotikom smo s sterilnim luknjačem iz petrijevih plošč prenesli koščke gojišča s 14 dni starimi sporami transformiranih streptomicet. Vegetativna inkubacija je v obeh primerih trajala 24 ur. Inkubirali smo na 28°C s stresanjem pri 220 obratih na minuto. Po zaključeni vegetativni inkubaciji smo 10 % vegetativne kulture prenesli v ustrezno produktivno kompleksno gojišče. Vrsto *S. cinnamomensis* smo inkubirali 14 dni na 28°C, s stresanjem pri 220 obratih na minuto. Vrsto *S. tsukubaensis* pa 7 dni pri enakih pogojih.

3.3.4.3 Spektrofotometrična analiza vzorcev

Po zaključeni produktivni inkubaciji smo v mikrocentrifugirke prenesli 1,5 mL kulture streptomicet. Mikrocentrifugirke smo 10 minut centrifugirali pri 14000 obratih na minuto. Supernatante smo prenesli v sveže mikrocentrifugirke in jih do analize shranili na -20°C.

V literaturi smo zasledili več različnih podatkov o valovni dolžini, pri kateri ima flaviolin absorpcijski vrh. Najpogosteje se omenjajo naslednje valovne dolžine: 254 nm (Funa in sod., 1999; Funa in sod., 2005; Izumikava in sod., 2003), 262 nm (Funa in sod., 2002a), 280 nm (Funa in sod., 2002a; Funa in sod., 2002b), 282 nm (Funa in sod., 2002a), 286 nm (Funa in sod., 2002b), 340 nm (Izumikava in sod., 2003) in 488 nm (Kuščer in sod., 2007). Iz literature je razvidno, da je relativno količino flaviolina v gojišču moč določiti tako z merjenjem absorbance v UV kot tudi v vidnem delu svetlobnega spektra. Predvidevali smo, da določena variabilnost izhaja tudi iz lastnosti posameznih sevov. Flaviolin namreč dimerizira, dimeri flaviolina pa kasneje dodatno polimerizirajo v različne melanine. Dimeri in polimeri flaviolina imajo absorpcijski vrh pri drugačni valovni dolžini kot posamezne molekule

flaviolina. Ker nismo natančno vedeli kje pričakovati absorpcijski vrh flaviolina pri naših vrstah, smo se odločili izmeriti absorbanco po svetlobnem spektru med 240 in 500 nm. Meritve absorbance pri vrednostih nad 3,5 niso več natančne, zato smo pred meritvami z redčenjem vzorcev zagotovili, da absorbanca ni nikoli presegla te meje.

Vzorci smo redčili z destilirano vodo v ustreznih razmerjih, ki so podana v preglednici 15. Po 200 μ L redčenih vzorcev smo prenesli v luknjice na mikrotiterskih ploščicah, ki prepuščajo UV svetlobo in s spektrofotometrom izmerili absorbanco na območju med 240 in 500 nm.

Preglednica 15: Priprava vzorcev za spektrofotometrično analizo.

Skupina vzorcev	Volumen vzorca (μ L)	Volumen dH ₂ O (μ L)	Redčitev
<i>S. coelicolor</i> (TSB)	25	175	1:7
<i>S. cinnamensis</i> (TSB)	25	175	1:7
<i>S. rimosus</i> (TSB)	25	175	1:7
<i>S. tsukubaensis</i> (TSB)	25	175	1:7
<i>S. cinnamensis</i> (PROD-MON)	10	190	1:19
<i>S. tsukubaensis</i> (PSTS)	15	185	1:12,3

3.3.4.4 Analiza podatkov

Pridobljene podatke smo obdelali z računalniškim programom Excel. Najprej smo določili optimalno valovno dolžino za detekcijo flaviolina. Za vsako kombinacijo promotor / vrsta smo od povprečnega absorpcijskega spektra vseh transformant odšteli povprečen absorpcijski spekter vseh kontrol. Dobili smo spektrogram, ki je predstavljal razlike v absorbanci med kontrolo in vzorci na celotnem spektru od 240 do 500 nm. Pri valovni dolžini 270 nm smo opazili največjo razliko med vrednostjo absorbance vzorcev transformant in negativnih kontrol.

Sledila je analiza moči promotorjev. Pri tej analizi smo obdelovali le podatke za absorbcijo pri valovni dolžini 270 nm. Podatke smo statistično obdelali s programom SAS/STAT. Izločili smo osamelce. Te smo definirali kot vrednosti, ki so od vrednosti prvega kvartila navzdol odstopale za 1,5 x kvartilni razmik ter tiste, ki so za enako vrednost odstopale od vrednosti tretjega kvartila navzgor. Iz preostalih podatkov smo izračunali povprečno vrednost za posamezno kombinacijo promotor / vrsta, ter določili standardno deviacijo. Vse izračune smo ponazorili s slikami.

4 REZULTATI

V delovni hipotezi smo predvideli, da bo poročevalski sistem na osnovi aktinomicetnega gena *rppA* dobro deloval v tej skupini organizmov. Za potrditev delovne hipoteze smo pripravili šest genskih konstruktov. Tri za testiranje sistema v vrstah *S. coelicolor*, *S. tsukubaensis* in *S. cinnamonnensis* in tri za testiranje sistema v vrsti *S. rimosus*. V vsaki vrsti smo sistem preizkusili v kombinaciji s tremi različno močnimi promotorji. Po vnosu genskih konstruktov v testirane vrste smo najprej selekcionirali pozitivne kolonije. Sedem pozitivnih kolonij za vsako kombinacijo vrsta / promotor smo ponovno kultivirali v tekočem gojišču, ter izmerili absorpcijski spekter supernatanta kulture. Določili smo optimalno valovno dolžino za detekcijo flaviolina ter podatke pridobljene pri tej valovni dolžini statistično obdelali. Vrsti *S. cinnamonnensis* in *S. tsukubaensis* smo kultivirali tudi v kompleksnem industrijskem gojišču. Vse kultivacije smo izvedli v dveh ponovitvah. Končne rezultate smo pridobili na osnovi 168 kulturacij v enostavnem gojišču in 84 kulturacij v kompleksnem gojišču. Rezultate vseh meritev smo statistično obdelali, ter pred nadaljnjo računalniško analizo izločili osamelce.

4.1 PRIPRAVA PLAZMIDOV Z MOLEKULARNO BIOLOŠKIMI METODAMI

V postopku priprave plazmidov, nismo uporabljali reakcije PCR. Zato smo se pri preverjanju pravilnosti pripravljenih plazmidov zadovoljili s kontrolno restrikcijo. Genskih konstruktov torej nismo pošiljali na sekvenciranje. Spodaj sta predstavljeni fotografiji restrikcijskih gelov, ki sta nas prepričala, da so ligacije uspele (sliki 19 in 20).

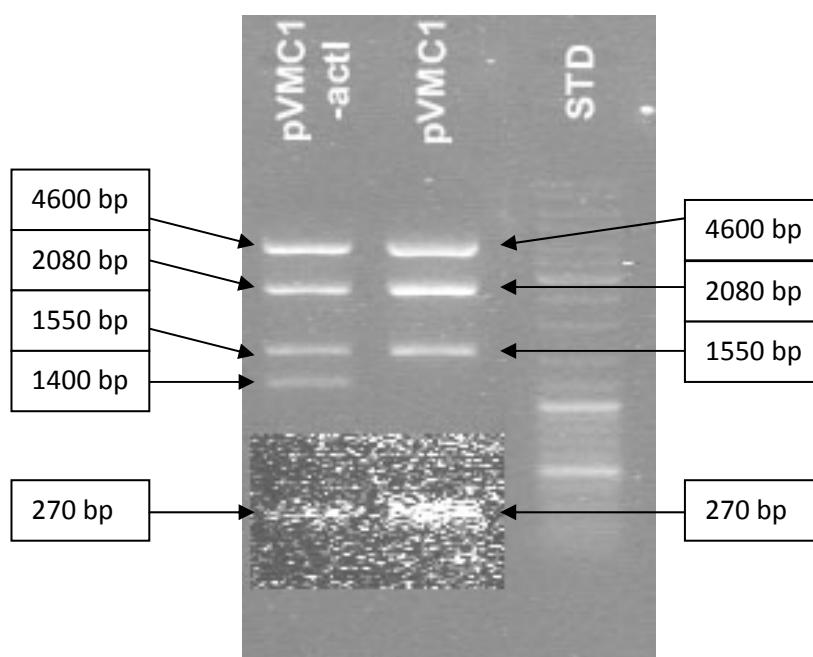
Ker nismo poznali natančnega zaporedja plazmidov pIJ8660 in pTS55, iz katerih smo pripravili naše plazmide, smo se morali v nekaterih primerih zanesti na primerjanje restrikcijskih vzorcev med praznim plazmidom brez promotorja in tistim s promotorjem. Vedno smo poizkušali izbrati restrikcijske encime, ki so rezali znotraj vstavljenih promotorjev, da bi tako zagotovili še večjo zanesljivost kontrolnih restrikcij.

V vseh primerih smo kot DNA velikostni standard uporabili "GeneRuler™ DNA Ladder Mix" (glej poglavje 3.2.6).

4.1.1 Kontrolna restrikcija pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*

Po analizi restrikcijske mape plazmida pVMC1 in zaporedja aktivatorsko promotorskega sistema *actII*-ORF4/*PactI* smo se odločili, da bomo kontrolno restrikcijo plazmida pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI* izvedli z restrikcijskim encimom *AatII*. Po restrikciji kontrolnega plazmida pVMC1 z encimom *AatII* smo pričakovali fragmente naslednjih dolžin: 270, 1550, 2080 in 4100 baznih parov. Po vstavitvi promotorsko aktivacijskega sistema *actII*-ORF4/*PactI*, ki tudi

vsebuje eno restrikcijsko mesto *AatII* smo pričakovali, da se bo najdaljši fragment podaljšal za približno 500 baznih parov, pojavil pa se bo tudi nov fragment dolžine približno 1400 baznih parov (700 baznih parov predstavlja ostanek promotorja, 700 baznih parov pa ostanek gena *rppA*). Iz slike 19 je razvidno, da smo dobili pričakovane vzorce restrikcijskih profilov. Na sliki 19 prvi pas iz leve proti desni na elektroforeznem gelu predstavlja restrikcijski vzorec plazmida pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*, drugi pas restrikcijski vzorec kontrolnega praznega plazmida pVMC1, popolnoma desni pas je velikostni standard. Jasno se vidi nov fragment, ki se pojavi v prvem pasu v primerjavi s srednjim pasom. Zaradi velikih dolžin se manj jasno vidi podaljšanje najdaljšega fragmenta. Naknadno smo z računalniškim programom Adobe Photoshop CS3 povečali kontrast slike na območju, kjer se nahajata najkrajša fragmenta.

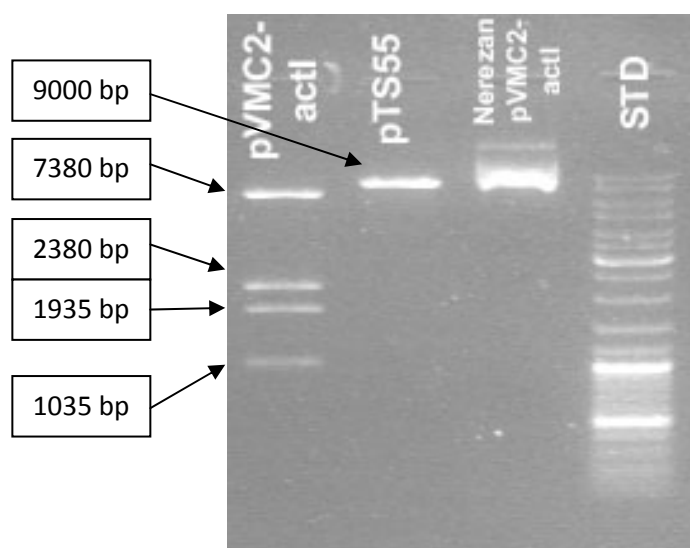


Slika 19: Restrikcijski profili plazmidov pVMC1-*actII*-ORF4/*PactI*, in pVMC1 rezanih z encimom *AatII*. Na sliki skrajno desno je še vzorec DNK velikostnega standarda.

4.1.2 Kontrolna restrikcija pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*

Pri ligaciji odseka *tfd*-(*actII*-ORF4/*PactI*)-*rppA*-to v plazmid pTS55, smo pridobili plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*. Odločili smo se, da bomo pravilnost ligacije preverili z restrikcijskim encimom *PstI*, ki prazen plazmid pTS55 reže samo enkrat. Zaporedje *tfd*-(*actII*-ORF4/*PactI*)-*rppA*-to ima tri restrikcijska mesta *PstI*. Na podlagi teh podatkov smo predvideli, da bo plazmid pTS55 po rezanju z *PstI* razpadel na en linearen fragment dolg približno 9000 baznih parov. Plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* pa bo po rezanju s *PstI* razpadel na več fragmentov, katerih velikost bo odvisna od orientacije vstavljenega fragmenta *tfd*-(*actII*-ORF4/*PactI*)-*rppA*-to v plazmidu pTS55. Pričakovali smo dve različni možnosti. V prvi bi dobili fragmenta velikosti 7380, 2380, 1935 in 1035 baznih parov. Druga možnost pa bi bili fragmenti dolžin 6630, 3130, 1935 in 1035. Na sliki 20 so prikazani restrikcijski profili posameznih plazmidov. Od leve proti desni si sledijo plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI*

rezan z *PstI*, plazmid pTS55 rezan s *PstI*, nerezan plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* in velikostni standard. Restriksijski profil plazmida pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* (prvi pas na levi) ustreza prvi od predvidenih možnosti. Na podlagi tega sklepamo, da je ligacija uspela.



Slika 20: Restriksijski profili plazmidov pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* in pTS55 rezanih z encimom *PstI*. Na sliki sta še vzorec DNK velikostnega standarda (skrajno desno) in nerezan plazmid pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* (drugi pas iz desne).

4.2 USPEŠNOST TRANSFORMACIJE STREPTOMICETNIH GOSTITELJEV

4.2.1 Meritve absorbance pri valovni dolžini 370 nm

Supernatantom gojišča smo po prvi produktivni kultivaciji (seleksijski) izmerili absorbanco pri 370 nm. S tem smo iz nadaljnjih poizkusov želeli izločiti kolonije streptomicet, ki so sicer bile transformirane in so zrasle na seleksijskem gojišču z antibiotikom, vendar zaradi neznanega razloga niso proizvajale flaviolina, oziroma so ga proizvajale izjemno majhne količine.

4.2.2 Izbor pozitivnih streptomicetnih transformant

Kot pozitivne kolonije smo definirali vse kolonije, pri katerih smo po končani produktivni seleksijski kultivaciji zaznali vsaj 20 % povečanje absorbance pri 370 nm v primerjavi s povprečno negativno kontrolo. V spodnji tabeli so predstavljeni rezultati tega izračuna.

Preglednica 16: Učinkovitost transfekcije pri različnih sevih in izbranih promotorjih.

Vrsta	Promotor <i>actI</i>			Promotor <i>ermE</i>			Promotor <i>ermE*</i>		
	Pozitivne kolonije	Vse kolonije	% pozitivnih	Pozitivne kolonije	Vse kolonije	% pozitivnih	Pozitivne kolonije	Vse kolonije	% pozitivnih
<i>S. coelicolor</i>	9	28	32 %	6	26	23 %	10	24	42 %
<i>S. cinnamonensis</i>	3	24	13 %	22	39	56 %	23	24	96 %
<i>S. rimosus</i>	N/A	23	N/A	11	30	37 %	17	18	94 %
<i>S. tsukubaensis</i>	22	24	92 %	20	21	95 %	26	26	100 %

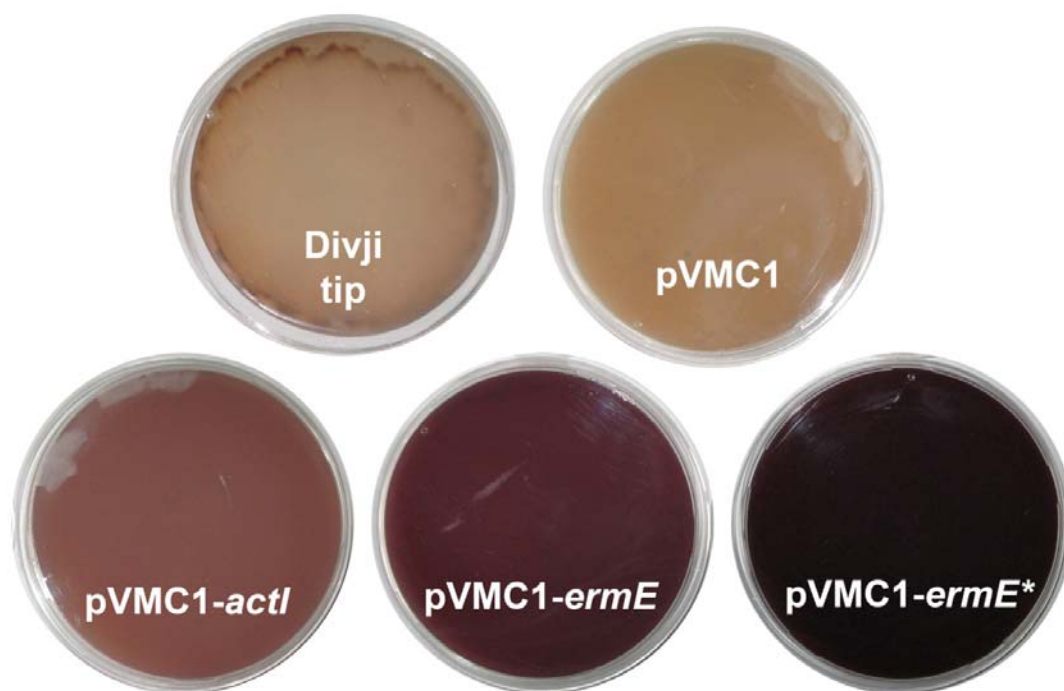
Zdi se, da na učinkovitost transfekcije vpliva predvsem moč promotorja, vgrajenega v plazmid. V resnici gre verjetno za dejstvo, da močan promotor *ermE** uspe zagotoviti dovolj močno izražanje *rppA* tudi če je vgrajen na neugodna mesta v genomu. Flaviolin v gojišču torej zaznamo ne glede na to kje v genomu je vgrajen poročevalski sistem. Z razliko od *ermE** je aktivacijsko promotorski sistem *actII-ORF4/PactI* že v osnovi šibak. Vgradnja na neugodno mesto v genomu zato močno vpliva na moč izražanja poročevalskega gena. Kot pozitivne zaznamo torej le kolonije z optimalnim mestom integracije. Pri vrsti *S. rimosus* transformirani s pVMC2-*actII-ORF4/PactI*, pozitivnih kolonij sploh nismo zaznali.

Da bi se izognili variabilnosti, ki nastane zaradi različnih mest integracije v genom, smo v nadaljnje poizkuse vključili le 7 najboljših kolonij za vsako kombinacijo vrsta / promotor. Kot najboljše smo definirali tiste kolonije, katerih gojišče po produktivni kultivaciji je imelo najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 370 nm (za obrazložitev izbora valovne dolžine glej poglavje 3.3.3.2).

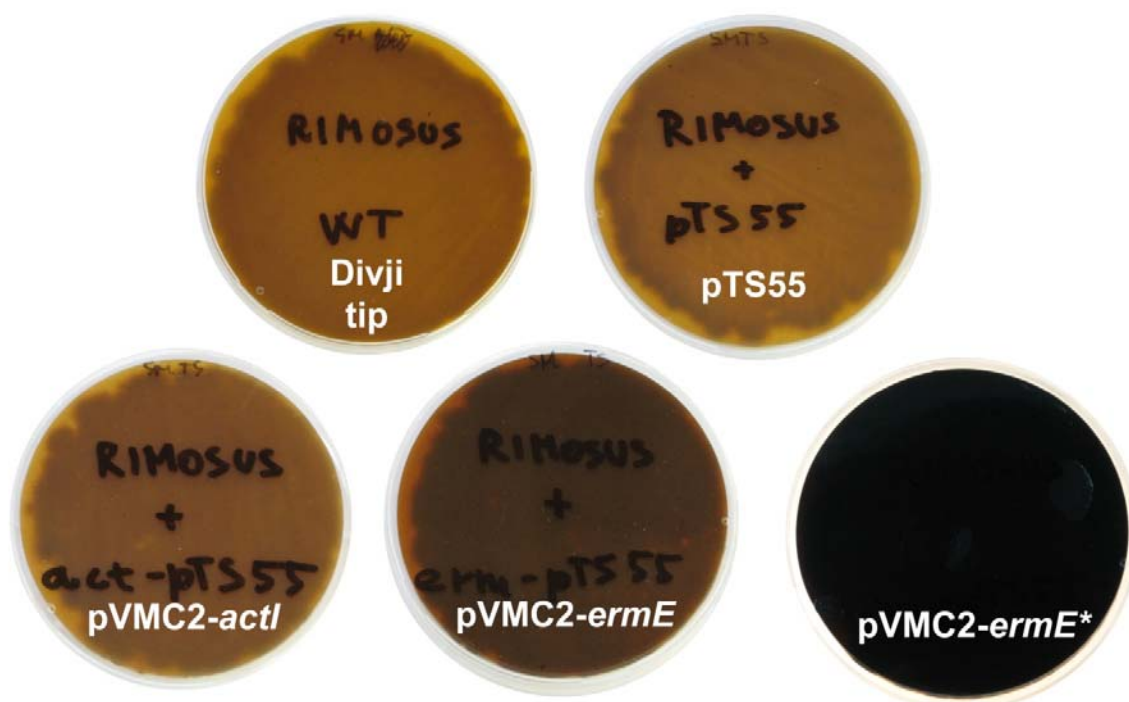
4.3 KVALITATIVNA OCENA MOČI IZRAŽANJA *rppA* NA AGAR PLOŠČAH

Pozitivne transformante streptomicet smo konfluentno nacepili na ustrezne agarozne plošče z dodanim antibiotikom. Po 14 dnevni inkubaciji smo pri sevih *S. cinnamonensis*, *S. rimosus* in *S. tsukubaensis* opazili jasno odvisnost med močjo vstavljenega promotorja in intenziteto obarvanosti plošče. S tem kvalitativnim testom smo torej pridobili več informacije kot samo osnovni podatek: se izraža / se ne izraža. Na sliki 21 je predstavljena obarvanost agar plošč, na kateri so rasle transformante vrste *S. cinnamonensis*. Na sliki 22 pa obarvanost agar plošč, na kateri so rasle transformante vrste *S. rimosus*. Odvisnost obarvanosti od promotorja je v obeh primerih jasno razvidna. Pri vrsti *S. cinnamonensis* se obarvanost pojavi pri transformantah z vsemi tremi promotorji. Pri vrsti *S. rimosus* se že na ploščah vidi, da aktivatorsko / promotorski sistem ne deluje. Zanimiva je tudi razlika med odtenki pigmenta pri obeh vrstah. *S. cinnamonensis* je proizvedel vijoličen pigment, medtem ko je obarvanost plošč *S. rimosus* temno rjava, v primeru promotorja *ermE** skoraj črna.

Obarvanost na ploščah z vrsto *S. tsukubaensis* ni bila tako izrazita. Razlog je mogoče v tem, da gojišče STS ni popolnoma optimizirano za to vrsto. Vrsta *S. coelicolor* proizvaja modro obarvan sekundarni metabolit aktinorodin, ki po intenziteti obarvanosti močno prekaša flaviolin. Rdeče rjave barve na ploščah z vrsto *S. coelicolor* zato nismo zaznali.



Slika 21: Transformante vrste *Streptomyces cinnamonensis* po 14 dnevni inkubaciji na SAM agar ploščah pri 28°C. V zgornji vrstici si od leve proti desni sledita: divji tip *S. cinnamonensis* in transformanta s praznim plazmidom brez promotorja. V spodnji vrstici si spet od leve proti desni sledijo transformante s plazmidi z vključenimi promotorji: *actII*-ORF4/*PactI*, *ermE* in *ermE**.



Slika 22: Transformante vrste *Streptomyces rimosus* po 14 dnevni inkubaciji na SM agarnih ploščah pri 28°C. V zgornji vrstici si od leve proti desni sledita: divji tip *S. Rimosus* in transformanta s praznim plazmidom brez promotorja. V spodnji vrstici si od leve proti desni sledijo transformante s plazmidi z vključenimi promotorji: *actII*-ORF4/*PactI*, *ermE* in *ermE**. Pri transformanti s plazmidom pVMC2-*actII*-ORF4/*PactI* ni opaziti obarvanosti. To je že drugi rezultat, ki nakazuje, da aktivatorsko promotorski sistem *actII*-ORF4/*PactI* v vrsti *S. rimosus* ne deluje.

4.4 KULTIVACIJA POZITIVNIH KOLONIJ V TEKOČEM GOJIŠČU IN KVANTITATIVNA DOLOČITEV IZRAŽANJA GENA *rppA*

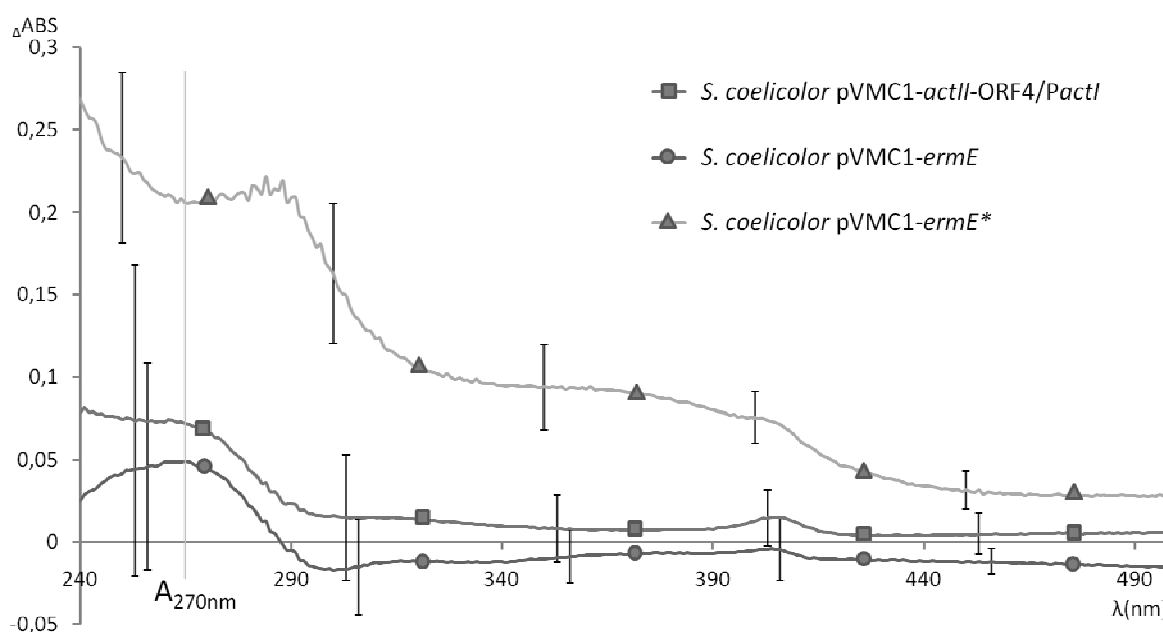
Vizualna ocena obarvanosti agar plošč, na katerih so rasle transformante streptomicet, omogoča kvalitativno oceno moči izražanja *rppA* oziroma oceno moči promotorja. Za pridobitev natančnejših kvantitativnih podatkov je potrebno izvesti kultivacijo v tekočem mediju in izvesti spektrofotometrično analizo supernatanta kulture. Analiza s spektrofotometrom je objektivna meritev, s katero pridobimo kvantitativne podatke. Kultivacijo za kvantitativne meritve smo izvajali v treh različnih tekočih gojiščih. Prvo je bilo enostavno TSB gojišče. Ker gojišče vsebuje enostavne vire ogljika (glukoza), omogoča hitro rast, vendar se tudi hitro iztroši. V industrijskih bioprocesih se uporablja kompleksna gojišča, ki so cenejša a so bolj hranljiva in streptomicetam omogočajo daljšo rast. Posledica daljše rasti je večji donos sekundarnih metabolitov. Ker smo želeli pokazati, da naš poročevalski sistem deluje tudi v kompleksnih gojiščih in je torej uporaben v industrijskih aplikacijah, smo transformante dveh vrst, ki se uporabljata za produkcijo sekundarnih metabolitov, kultivirali še v kompleksnem industrijskem gojišču. Sistem se je v obeh primerih izkazal kot učinkovit, podatki pridobljeni v obeh tipih gojišč so bili primerljivi med seboj (glej sliko 29).

4.4.1 Izbor optimalne valovne dolžine za detekcijo flaviolina

Pred kultivacijo v tekočem gojišču smo se soočali z dilemo, pri kateri valovni dolžini flaviolin in njegovi polimeri najbolj absorbirajo svetlobo. Da bi rešili ta problem, smo izmerili absorbance vzorcev na širšem območju absorpcijskega spektra. Meritve smo izvajali na območju med 230 in 700 nm. Valovna dolžina nižja kot 240 se je izkazala kot neprimerna. Pod to valovno dolžino smo namreč zaznali preveliko ozadje, ki je bilo lahko posledica nečistoč v gojišču. Valovna dolžina nad 500 nm prav tako ni primerna, ker so razlike med transformantami nad to mejo izredno majhne. Osredotočili smo se torej na valovne dolžine med 240 in 500 nm. S tem so se ujemali tudi podatki iz literature. Povsod se kot absorpcijski vrh flaviolina in njegovih polimerov omenjajo valovne dolžine med 254 in 488 nm.

Posneli smo absorpcijske spektre vseh sevov z vsemi tremi promotorji. Od teh spektrov smo kasneje odšteli povprečni spekter posameznih negativnih kontrol, za katere smo vzeli transformante vrst s praznim plazmidom (pVMC1 oziroma pTS55). Vsi pogoji kultivacije ene vrste z različnimi promotorji so bili konstantni. Edina spremenljivka je bil torej promotor pred genom *rppA* v plazmidu. Predpostavili smo, da bodo vse razlike v absorpcijskem spektru, ki jih bomo opazili med različnimi transformantami iste vrste, posledica različno močnega izražanja *rppA*. V spodnjih slikah so predstavljeni povprečni spektri vzorcev posameznih kombinacij vrsta / promotor. Vsem spektrom smo odšteli povprečen spekter negativne kontrole.

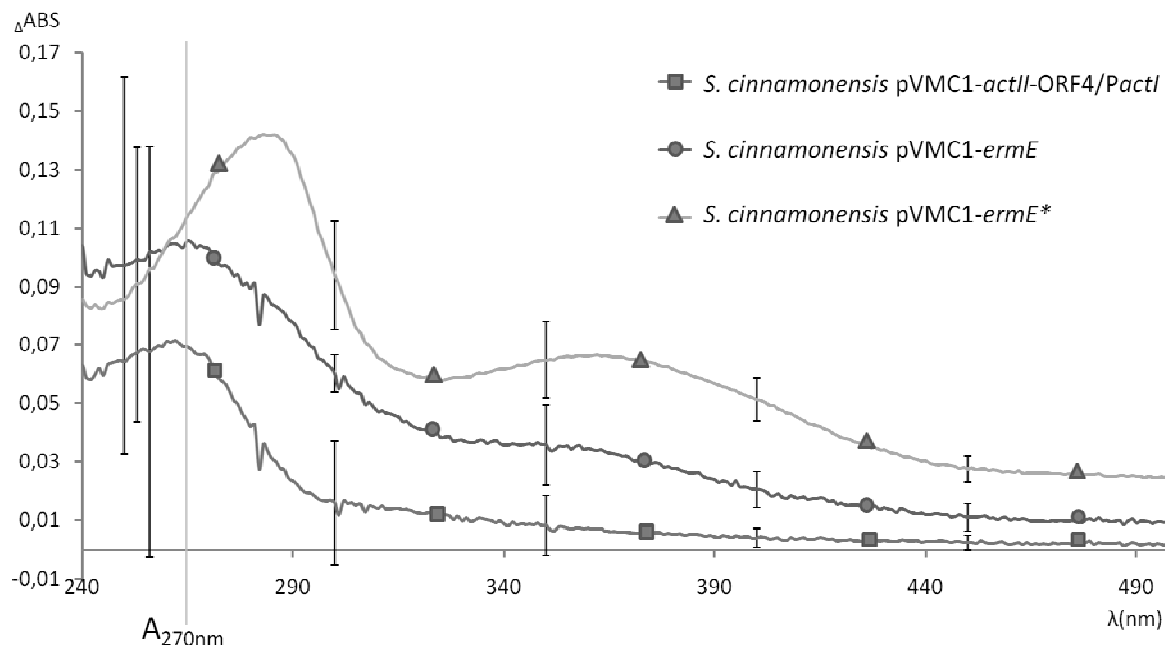
Na sliki 23 je prikazan povprečen spekter transformant vrste *S. coelicolor*, z odštetim povprečnim spektrom negativne kontrole. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. Pri



Slika 23: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces coelicolor*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB.

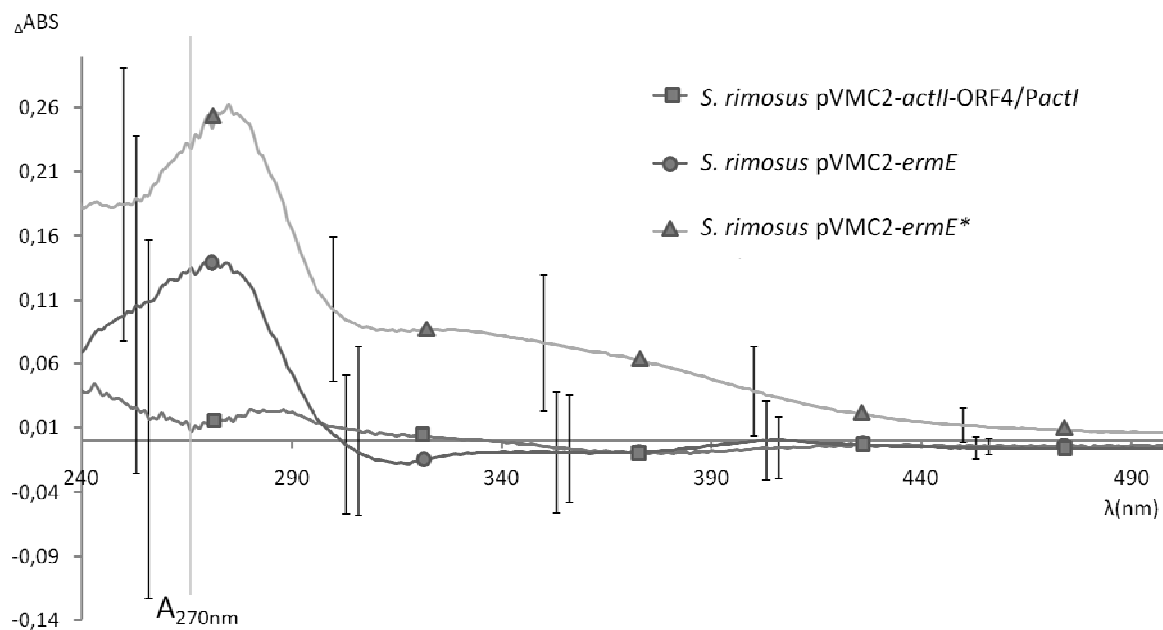
Na sliki 24 je prikazan povprečen absorpcijski spekter transformant vrste *S. cinnamomensis* z odštetim povprečnim spektrom negativne kontrole. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. Podobno kot pri transformantah vrste *S. coelicolor*, je tudi pri vrsti *S. cinnamomensis* v primeru šibkejših dveh promotorjev jasno viden absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 270 nm. Prav tako je v primeru transformant z močnejšim promotorjem *ermE** vrh rahlo premaknjen k višjim valovnim dolžinam. Predvidevamo, da je premik slednjega vrha v obeh primerih posledica dimerizacije molekul flaviolina. Glede na to, da je krivulja absorpcijskega spektra pri transformantah s promotorjem *ermE** pri vrsti *S. cinnamomensis* gladka, lahko izključimo možnost njenega premika zaradi variabilnosti, ki bi nastala pri merjenju. Zanimiv je tudi drugi absorpcijski vrh, ki je opazen pri transformantah s promotorjem *ermE*, še posebej pa je izrazit pri transformantah s promotorjem *ermE**. Ta se pojavi pri valovni dolžini okrog

360 nm in je blizu valovnim dolžinam, ki so v literaturi tudi omenjane kot valovne dolžine pri katerih flaviolin in njegovi polimeri močno absorbira svetlobo (Izumikava in sod., 2003).



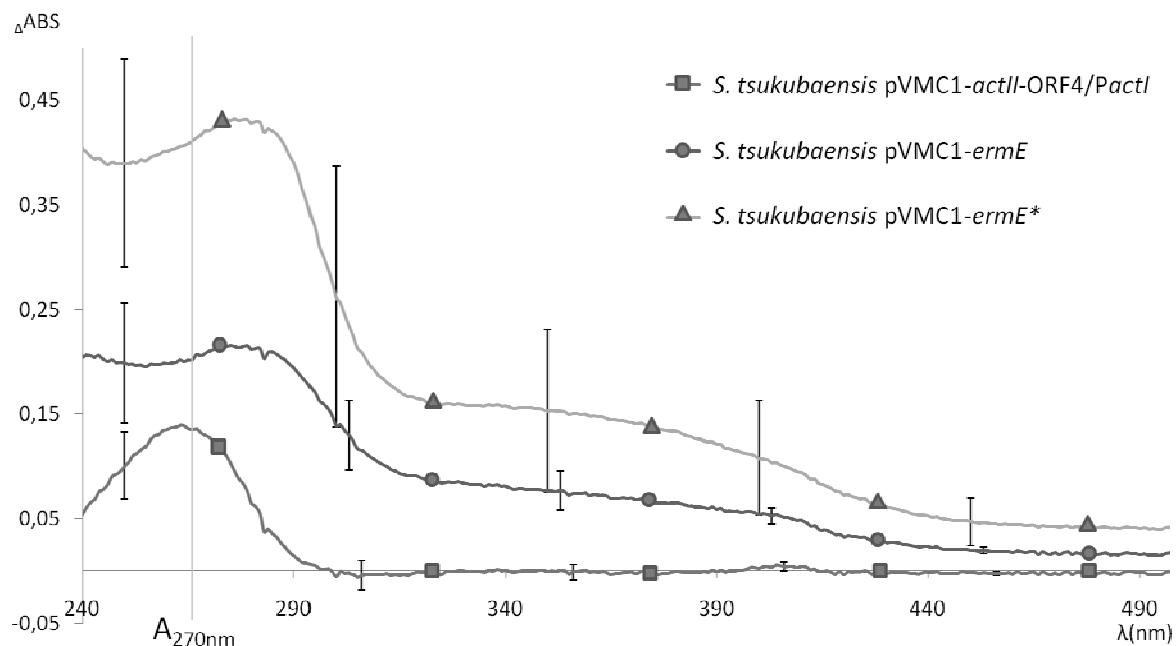
Slika 24: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces cinnamonensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB.

Na sliki 25 je prikazan povprečen absorpcijski spekter transformant vrste *S. rimosus* z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativne kontrole, za katero smo vzeli transformante s plazmidom pTS55. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. Enako kot v prejšnjih dveh primerih se pojavi absorpcijski vrh pri valovni dolžini 270 nm. Absorpcijski vrh pri transformantah s promotorjem *ermE** je pri vrsti *S. rimosus* le rahlo zamaknjen k višjim valovnim dolžinam. Opazen je tudi drugi absorpcijski vrh pri valovni dolžini okrog 340 nm, vendar je izrazit le pri transformantah s promotorjem *ermE**. Na povprečnem absorpcijskem spektru transformant s promotorjem *actII-ORF4/PactI* nismo opazili nobenega izrazitega vrha. Iz teh podatkov bi lahko sklepali da promotor *actII-ORF4/PactI* v sevu *S. rimosus* ne deluje. To se je izkazalo tudi v predhodnih raziskavah (Petković, 1998). Poleg tega smo že pri izračunu učinkovitosti transformacije in pri vizualnem ogledu plošč opazili, da vrsta *S. rimosus* transformirana s plazmidom pVMC2-*actII-ORF4/PactI* ne proizvaja flaviolina.



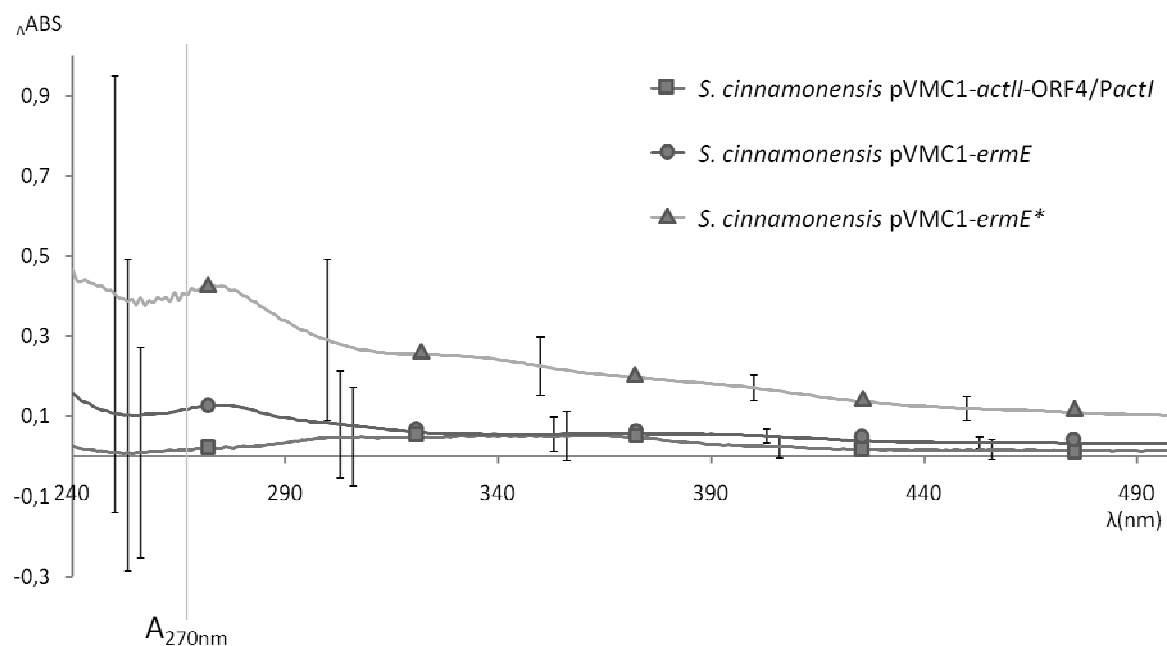
Slika 25: Povprečni absorpcijski spektri transformantov vrste *Streptomyces rimosus*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB.

Na sliki 26 je prikazan povprečen absorpcijski spekter transformantov vrste *S. tsukubaensis* z odštetim povprečnim spektrom negativne kontrole. Kultivacija je potekala v gojišču TSB. Pri vseh transformantih je opazen absorpcijski vrh pri valovni dolžini približno 270 nm. Podobno kot v prejšnjih primerih je vrh pri šibkem promotorju *actII-ORF4/PactI* pozicioniran pri nižji valovni dolžini kot pri transformantih s promotorjem *ermE**. Pri vrsti *S. tsukubaensis* se vrhova transformant *ermE* in *ermE** nahajata pri isti valovni dolžini.



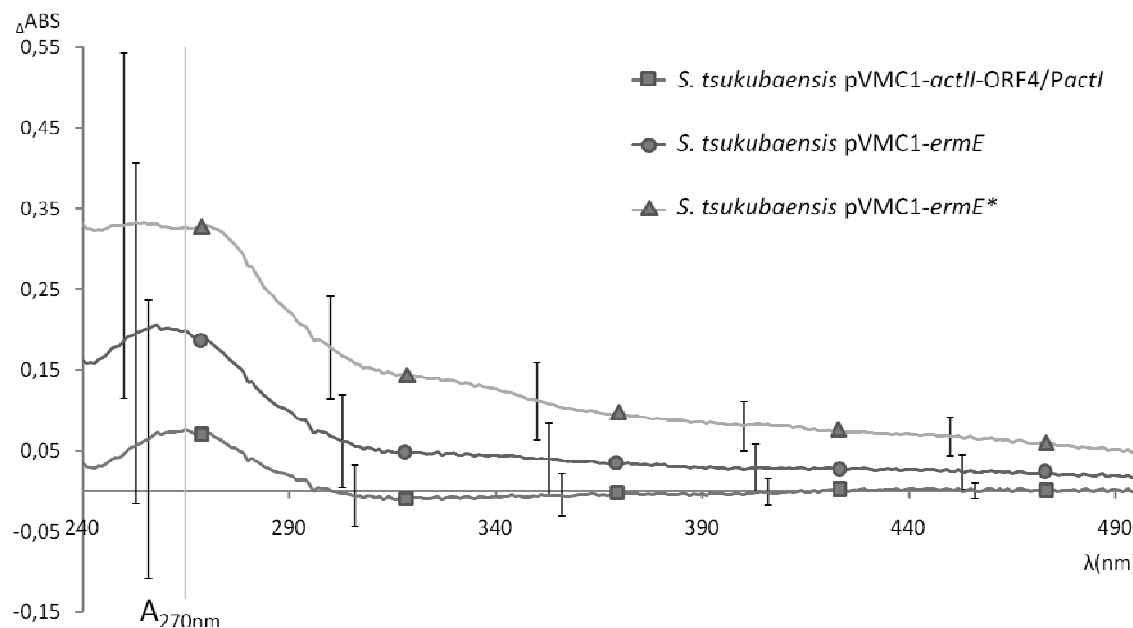
Slika 26: Povprečni absorpcijski spektri transformantov vrste *Streptomyces tsukubaensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v gojišču TSB.

Na sliki 27 je prikazan povprečni absorpcijski spekter transformant vrste *S. cinnamonensis* z odštetim povprečnim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PROD-MON. Pri transformantah s promotorjem *ermE* in *ermE** opazimo jasen absorpcijski vrh pri valovni dolžini približno 270 nm. Pri transformantah s promotorjem *actII-ORF4/PactI* vrh ni opazen, kljub temu je v območju okoli 270 nm absorbanca v primerjavi z negativno kontrolo povečana. Med absorpcijskim spektrom transformant kutiviranih v gojišču TSB in v kompleksnem gojišču PROD-MON torej ni bistvenih razlik, razen morda slabše aktivnosti promotorja *actII-ORF4/PactI*, kar pa smo v nadaljnjih poizkusih ovrgli.



Slika 27: Povprečni absorpcijski spektri transformant vrste *Streptomyces cinnamonensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PROD-MON.

Na sliki 28 je prikazan povprečen absorpcijski spekter transformant vrste *S. tsukubaensis* z odštetim povprečnim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PSTS. Pri transformantah z vsemi promotorji so opazni zelo jasni absorpcijski vrhovi pri valovni dolžini približno 270 nm. Tudi ta absorpcijski spekter se ne razlikuje bistveno od absorpcijskega spektra transformant *S. tsukubaensis* kultiviranih v gojišču TSB.



Slika 28: Povprečni absorpcijski spektri transformantov vrste *Streptomyces tsukubaensis*, z odštetim povprečnim absorpcijskim spektrom negativnih kontrol. Kultivacija je potekala v kompleksnem gojišču PSTS.

4.4.2 Delovanje promotorjev v izbranih streptomicetnih gostiteljih

Po določitvi optimalne valovne dolžine za detekcijo flaviolina smo vsem vzorcem izmerili absorbance pri 270 nm. Podatke smo statistično obdelali z računalniškima programoma SAS/STAT in Excel. Rezultati analize so predstavljeni v spodnjih slikah.

Slika 31 predstavlja spremembo absorbance transformantov v primerjavi z negativno kontrolo. Predstavljene so vse kombinacije vrsta / promotor. Črni stolpci prikazujejo rezultate pridobljene s kultivacijo v enostavnem gojišču TSB, svetli pa rezultate pridobljene s kultivacijo v kompleksnem gojišču prilagojenem na posamezno vrsto.

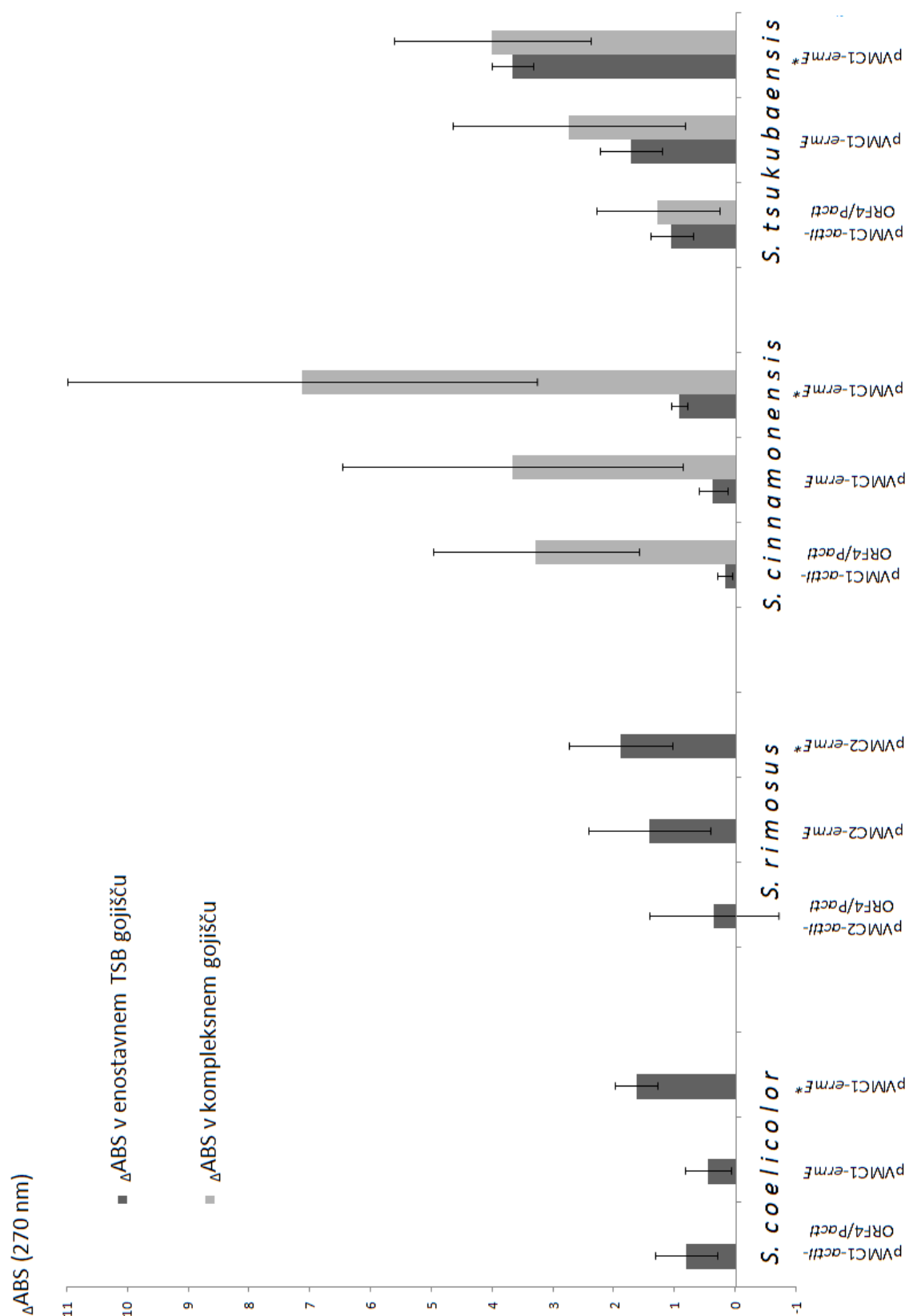
Iz slike 31 je jasno razviden trend naraščanja moči promotorjev. V skoraj vseh sevih se je aktivatorsko promotorski sistem *actII*-ORF4/*PactI* izkazal kot najslabši. Nasprotno se je v vrsti *S. coelicolor* izkazal kot srednji po moči. Razlog za to je verjetno izvor tega aktivatorsko promotorskega sistema v vrsti *S. coelicolor*. Sistem je na vrsto optimiziran. Verjetno so v celicah *S. coelicolor* poleg transkripcijskega faktorja *actII*/ORF4, ki je že vključen v sistem, prisotni še drugi pozitivni regulatorji, ki dodatno spodbudijo transkripcijo.

S kvantitativnimi meritvami se je potrdila domneva, da aktivatorsko promotorski sistem *actII*-ORF4/*PactI* v vrsti *S. rimosus* ne deluje. Iz slike 31 je namreč razvidno, da standardna variacija meritev močno presega absolutno razliko med transformanto s tem promotorjem in divjim tipom. To je že četrta potrditev domneve, da *actII*-ORF4/*PactI* v vrsti *S. rimosus* ne deluje. Prvič se je to izkazalo pri izračunih učinkovitosti transfekcije, drugič pri vizualnem ogledu plošč in tretjič pri izdelavi absorpcijskih spektrov. Poleg tega je bilo s popolnoma

neodvisnimi poizkusi že predhodno ugotovljeno, da *actII*-ORF4/*PactI* v vrsti *S. rimosus* ne deluje (Petković, 1998).

Drugi po moči je v vseh vrstah, razen v prej omenjeni *S. coelicolor*, promotor *ermE*. Naši rezultati kažejo, da je »ojačan« promotor *ermE*, ki je poimenovan *ermE**, od vseh testiranih promotorjev najmočnejši. Vzorci vseh transformant s tem promotorjem imajo daleč najvišjo absorpcijo UV svetlobe pri valovni dolžini 270 nm. Ta ugotovitev ustreza objavam v literaturi, kjer se ta promotor omenja kot eden najmočnejših streptomicetnih promotorjev. Pogosto se tudi uporablja za prekomerno ekspresijo heterolognih proteinov v streptomicetah (Bibb in sod., 1985; Schmitt-John in Engels, 1992; Rowe in sod., 1998).

Zanimiva je tudi primerjava med transformantami, ki so rasle v enostavnem TSB gojišču in tistimi v kompleksnem gojišču. Pri vrsti *S. cinnamonensis* so Δ ABS vrednosti transformant iz kompleksnega medija veliko večje od tistih, ki so rasle v gojišču TSB. Vendar se poleg povprečne vrednosti Δ ABS poveča tudi standardna deviacija meritev. Razlog ni popolnoma jasan. Predvidevamo, da do povečanja variabilnosti meritev pride zaradi daljših kultivacijskih časov, ki skupno trajajo 8 dni pri vrsti *S. tsukubaensis* in 15 dni pri vrsti *S. cinnamonensis*. Pri slednji vrsti se glede na podatke pridobljene z inkubacijo v kompleksnem mediju zdi, da sta promotorja *actII*-ORF4/*PactI* in *ermE* skoraj enako močna. Vendar je glede na precej visoko standardno deviacijo ta trditev precej tvegana. Meritve transformant, ki smo jih inkubirali v gojišču TSB tega ne potrjujejo. Razlika med Δ ABS vrednostmi izmerjenimi po kultivaciji v TSB gojišču in tistimi v kompleksnem gojišču pri vrsti *S. tsukubaensis* ni tako velika kot v primeru vrste *S. cinnamonensis*. Možen vzrok je v sami sestavi gojišča. Gojišče PROD-MON, ki se uporablja v industrijskem merilu vrste *S. cinnamonensis* je rezultat večletnega raziskovalnega dela in je izredno dobro optimizirano za rast te vrste ter za produkcijo sekundarnih metabolitov, kar flaviolin tudi je (Vanek in sod., 1990).



Slika 29: Sprememba absorbance gojišča v katerem so rasli transformirani sevi streptomycet. Podatki so zajeti pri valovni dolžini 270 nm. Temni stolpci prikazujejo podatke kultivacije v gojišču TSB, svetli pa podatke kultivacije v kompleksnem gojišču. Navpične črne oznake na stolpcih predstavljajo vrednost standardne deviacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomskem delu smo optimizirali nov poročevalski sistem za preučevanje izražanja genov v aktinomicetah. Preizkusili smo ga v različnih vrstah streptomicet in ovrednotiti njegovo uporabnost tako v bazičnih raziskavah, kot tudi v aplikativnih industrijskih raziskavah. Pridobljeni rezultati ustrezajo postavljeni delovni hipotezi. Izkazalo se je, da je nov poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* uporaben, v vseh testiranih vrstah streptomicet, vendar ga je potrebno prej optimizirati glede na potrebe vsakega gostiteljskega organizma. Sistem je relativno natančen, hiter in enostaven za uporabo. Uporaba je možna tudi v industrijskih raziskavah z industrijskim sevi, ter v kompleksnih industrijskih gojiščih.

5.1 OBSTOJEČI POROČEVALSKI SISTEMI ZA AKTINOMICETE

Trenutno obstaja kar nekaj poročevalskih sistemov za uporabo v aktinomicetah. Noben med njimi ni univerzalno uporaben in ne dosega enostavnosti in zanesljivosti poročevalskega sistema na osnovi *lacZ* operona. Slednji v aktinomicetah zaradi več neodvisnih razlogov ne deluje. Prva izbira za kvalitativne študije izražanja genov v streptomicetah, predvsem za odkrivanje lokalno specifičnega izražanja genov, je verjetno poročevalski sistem na osnovi izboljšanega zelenega fluorescenčnega proteina (EGFP). Ta sistem omogoča le kvalitativne študije in ne da skoraj nobene informacije o moči izražanja. Če bi radi pridobili kvantitativne podatke o moči izražanja genov, bi se verjetno poslužili poročevalskega sistema na osnovi katehol dioksigenaze (*xylE*), ki je dokaj univerzalno uporaben v aktinomicetah, poleg tega je relativno zanesljiv. Protokol za kvantitativno detekcijo katehol dioksigenaze je delovno intenziven, invaziven, dolgotrajen ter zato drag in manj primeren za obsežne presejalne študije. Kulturi transformant moramo namreč dodajati raztopino katehola, ki se ob oksidaciji s katehol dioksigenazo obarva rumeno. Produkt reakcije je nestabilen, zato je potrebno kulturo ves čas ohranjati na ledu. Zaradi nestabilnosti vzorci ne smejo dolgo stati, posledično je nemogoče obdelovati večje število vzorcev vzporedno. Postopek kvantitativne detekcije katehol dioksigenaze v tekočem mediju zahteva razbitje celic, ki je dolgotrajno ter v primeru razbijanja s sonifikacijo, tudi neprijetno za raziskovalca, ki jo izvaja. Zvok visoke frekvence lahko celo poškoduje slušne organe.

Očitno je, da imata dva najpogostejše uporabljana poročevalska sistema v aktinomicetah kar nekaj slabosti. Zato obstaja velika potreba po novem poročevalskem sistemu, ki bi moral imeti lastnosti omenjene v poglavju 2.2. V tem delu smo skušali razviti nov poročevalski sistem in ga ovrednotiti na podlagi omenjenih lastnosti.

5.2 OVREDNOTENJE POROČEVALSKEGA SISTEMA NA OSNOVI *rppA*

Gen *rppA*, ki smo ga uporabili pri izdelavi našega sistema, kodira encim kalkon sintazo, katere končni produkt je rdeče - rjavo obarvana molekula flaviolin. Gen *rppA* je bil izoliran iz aktinomicete *S. erythraea*. Kot nativen gen v aktinomicetah je torej prilagojen na izražanje v tej skupini organizmov. Problem slabega izražanja genov zaradi napačnega razmerja med GC in AT baznimi pari, ter prisotnost kodonov TTA, ki praktično ustavijo translacijo, sta razloga za neuporabnost večine poznanih poročevalskih sistemov v aktinomicetah. Ker je gen *rppA* aktinomicetnega izvora, lahko sklepamo, da bo univerzalno uporaben v številnih vrstah te skupine. To domnevo smo potrdili s testiranjem v štirih streptomicetnih vrstah (*S. coelicolor*, *S. cinnamomensis*, *S. rimosus* in *S. tsukubaensis*), ki so industrijsko najbolj zanimiva skupina aktinomicet. V vseh štirih vrstah se je izkazal kot učinkovit sistem. Pridobljeni podatki o moči promotorjev so ustrezali tistim iz literature (glej poglavje 2.4).

Metoda detekcije flaviolina je enostavna, hitra in delovno neintenzivna. Detekcija poteka tako, da gojišče v katerem je rasla transformanta enostavno zbistrimo s centrifugiranjem ter izmerimo absorbanco supernatanta. Pred merjenjem je potrebno le razredčiti supernatant do te mere, da na absorpcijskem območju med 240 in 500 nm absorbanca nikjer ne preseže maksimalne meje zanesljive detekcije spektrofotometra (v našem primeru je bila ta meja pri absorbanci 3,5). Sledi še določanje absorpcijskega vrha, kar storimo z analizo razlike v absorpcijskem spektru med negativno kontrolo in vzorci. Določanje potrebnega faktorja redčitve in absorpcijskega vrha minimalno zavlečeta postopek in ju je potrebno izvesti le prvič, ko pričnemo z eksperimenti v novi vrsti aktinomicete.

Uporabnost v različnih gojiščih smo dokazali s testiranjem v treh gojiščih. Prvo gojišče je bilo enostavno TSB gojišče, ki je hitro za pripravo, tudi rast v njem je hitra. S tega stališča je idealno za obsežne presejalne teste. Drugi dve gojišči sta bili kompleksni industrijski gojišči, ki se uporabljata v farmacevtski industriji za proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Z uporabo omenjenih dveh gojišč smo dokazali tudi uporabnost našega sistema v industrijskih aplikacijah. Profil izražanja genov je v različnih gojiščih različen. V industrijskih raziskavah je potrebno čim bolj simulirati pogoje, kakršni bodo v proizvodnih bioreaktorjih. Če se pogoji v laboratoriji preveč razlikujejo od tistih v proizvodnem procesu se lahko zgodi, da bi v laboratoriju s pomočjo poročevalskega sistema ugotovili, da v enostavnem gojišču nek promotor odlično deluje. Omenjeni promotor bi potem uporabili za promocijo izražanja heterolognega gena v postopku biosinteznega inženiringa ter tako z modernim inteligentnim pristopom ustvarili novo izredno učinkovito spojino. Vendar, ko bi želeli proces proizvodnje prenesti v industrijski bioreaktor, kjer bi uporabili cenejše kompleksno gojišče, bi ugotovili, da promotor v njem deluje izredno slabo in bi tako postal ozko grlo pri proizvodnji naše nove spojine. Če se želimo izogniti takim situacijam, moramo imeti na voljo poročevalske sisteme, ki delujejo tudi v industrijskih gojiščih. Ta so običajno problematična, ker vsebujejo izredno veliko različnih spojin, ki motijo detekcijo produkta poročevalskega gena.

V časih, ko vsi skušamo stroškovno optimizirati raziskovalne procese, je zelo pomembno, da metode, ki jih uporabljamo pri eksperimentih, niso drage. To še posebno velja za meritve v

obsežnih presejalnih testih. Obstaja kar nekaj poročevalskih sistemov, pri katerih moramo med postopkom detekcije produkta v vzorce dodajati različne reagente. Tak je sistem na osnovi katehol dioksigenaze (Ingram in sod., 1989), kjer v vzorce dodajamo katehol, v primeru sistema na osnovi luciferaze (Sohaskey in sod., 1992) dodajamo n-dekanal, v primeru sistema na osnovi streptomicetnih β -galaktozidaz (Stein in sod., 1989) dodajamo substrat X-gal, tudi v primeru sistema na osnovi β -laktamaz (Forsman in Jaurin, 1987) moramo v vzorce dodati kromogene β -laktamske substrate. Našteti reagenti sicer niso dragi, vendar v primeru obsežnih študij vseeno predstavljajo znaten strošek. Iz tega stališča je poročevalski sistem na osnovi *rppA* boljši kot ostali najpogostejše uporabljani v aktinomicetah. Substrat kalkon sintaze je namreč malonil-CoA, ki je intermediat primarnega metabolizma in je zato univerzalno prisoten v vseh organizmih. Za detekcijo produkta našega poročevalskega sistema ni potrebe po uporabi dodatnih reagentov, zato je poceni v primerjavi z ostalimi sistemi.

Univerzalen substrat za kalkon sintazo (malonil-CoA) je razlog za dodatno prednost našega sistema pred drugimi. Ker je malonil-CoA v celicah prisoten v izobilju, ne predstavlja ozkega grla za produkcijo flaviolina, ki ga kasneje kvantitativno merimo. Količina flaviolina v gojišču je zato neposredno odvisna od moči promotorja in ne od količine substrata za kalkon sintazo.

Flaviolin je stabilen. Supernatante gojišča je možno hraniti več dni pri sobni temperaturi ter več let v zamrzovalniku pri -20°C . Ta stabilnost omogoča vzporedno obdelavo izredno velikega števila vzorcev, kar poveča uporabnost sistema v obsežnih presejalnih testih. Nasprotje temu je na primer sistem na osnovi katehol dioksigenaze (Ingram in sod., 1989), ki se danes največkrat uporablja pri kvantitativnih študijah ekspresije genov. Produkt katehol oksigenaze je nestabilen. Meritev je treba izvesti v točno določenem času po dodatku substrata. Ker je praktično nemogoče v večje število vzorcev istočasno dodati substrat in kasneje istočasno izmeriti količino produkta, je potrebno vzorce razdeliti v manjše skupine ter jih zaporedno obdelati. To seveda močno podaljša postopek.

Naš sistem se je izkazal kot primeren za kvantitativne študije izražanja genov. Primerjava podatkov pridobljenih z eksperimenti med diplomskim delom s tistimi iz literature in tistimi, ki so bili na katedri pridobljeni v neodvisnih eksperimentih, je pokazala, da rezultati ustrezajo predvidenim. Promotor *ermE** je izboljšana različica promotorja *ermE* in se v literaturi omenja kot eden najmočnejših streptomicetnih promotorjev (Bibb in sod., 1989; Schmitt-John in Engels, 1991; Rowe in sod., 1998). Tudi naši podatki kažejo, da je promotor *ermE** v vseh testiranih vrstah deloval najbolje (slika 29). Za večino vrst se je izkazalo, da je srednji po moči promotor *ermE*, ki je tudi znan kot močan konstitutiven promotor (Bibb in sod., 1989; Schmitt-John in Engels, 1991). Edina vrsta, kjer je aktivatorsko promotorski sistem *actII-ORF4/PactI* deloval bolje kot promotor *ermE*, je vrsta *S. coelicolor*. To je pričakovan rezultat, glede na to da *actII-ORF4/PactI* izvira iz te vrste. Pri izražanju genov iz promotorja *actI* sodelujejo nekateri transkripcijski aktivatorji, eden med njimi je tudi ActII-ORF4, ki je del sistema *actII-ORF4/PactI*. V literaturi je sicer navedeno, da sistem *actII-ORF4/PactI* deluje v nekaterih drugih streptomicetah tudi v *S. lividans* in *S. erythraea*, vendar obsežnejše študije, kjer bi preučili izražanje v drugih vrstah ne obstajajo. V neodvisnih študijah se je v preteklosti

pokazalo, da sistem ne deluje v vrsti *S. rimosus* (Petković, 1998), kar se jasno vidi tudi iz naših rezultatov (slika 25 in slika 29). To je še dodatna potrditev zanesljivosti poročevalskega sistema na osnovi *rppA*.

Priročno je, če lahko že z ogledom agar plošč s prostim očesom ocenimo, ali nukleotidno zaporedje, ki smo ga vstavili v plazmid pred poročevalski, gen vsebuje promotor ali ne. Naš sistem omogoča hitro kvalitativno oceno moči promotorjev z vizualnim ogledom agar plošč. To je razvidno iz slike 21 in slike 22. Na slikah lahko jasno vidimo, da so plošče nacepljene s transformantami, ki vsebujejo močne promotorje temnejše kot tiste, ki vsebujejo šibke promotorje in temnejše kot tiste, ki so nacepljene z negativnimi kontrolami. Če sistem omogoča hitro oceno moči promotorjev, lahko že samo s pregledom plošč izberemo transformante s potencialno močnimi promotorji. Zavržemo pa tiste, ki promotorjev ne vsebujejo in jih ne vključimo v nadaljnje kvantitativne analize.

Pri dobrem poročevalskem sistemu je zelo pomembno, da je signal ozadja čim manjši. Gen *rppA* so odkrili pri skoraj vseh preučevanih streptomicetah (Cortes in sod., 2002). Pričakujemo lahko, da bo večina streptomicet producirala določeno količino flaviolina, kar lahko predstavlja slabost za naš sistem, ki temelji ravno na določanju te molekule. Vendar z uporabo ustrezne negativne kontrole izničimo vpliv naravne prisotnosti *rppA* v testiranih organizmih. V naših eksperimentih smo kot negativno kontrolo uporabili transformante s praznim plazmidom, torej brez promotorja pred genom *rppA*. Testne transformante in negativne kontrole smo nato gojili v prisotnosti antibiotika ter tako zagotovili konstantnost vseh parametrov, razen promotorja pred poročevalskim genom. Edina spremenljivka je bil torej promotor, katerega moč smo hoteli kvantitativno ovrednotiti. Naravno produkcijo flaviolina, ki smo jo izmerili pri negativnih kontrolah, smo potem upoštevali pri ovrednotenju rezultatov, ki smo jih pridobili z merjenjem testiranih transformant. Absorbanco negativne kontrole smo odšteli od absorbance vzorca. Razlika med njima je predstavljala relativno povečanje količine flaviolina. S tem korakom smo izničili signal ozadja ter se izognili lažno pozitivnim rezultatom.

Gen *rppA* je dolg 1104 bazne pare in spada med krajše poročevalske gene. To prinaša dodatne prednosti za naš sistem, saj kratek poročevalski gen olajša eksperimente. Uporaba dolgih genov je nepraktična, saj se s povečevanjem plazmidov zmanjšuje učinkovitost transformacije.

Vloga encima RppA ni točno poznana. Za kompleksne melanine, ki nastanejo s polimerizacijo molekul flaviolina je dokazano, da zaščitijo producentske organizme pred UV sevanjem (Funa in sod., 2005). Končni produkt gena *rppA* ni toksičen za celice in je primeren za uporabo kot poročevalski gen.

5.3 KVALITATIVNA OCENA MOČI PROMOTORJEV

Kot je razvidno iz slike 21 in slike 22, naš sistem omogoča enostavno oceno moči testiranih promotorjev že z vizualnim ogledom agar plošč, na katerih rastejo transformante. To omogoča hitro izločanje negativnih transformant z zaporedji brez promotorjev, še pred zamudno kultivacijo v tekočem mediju in kvantitativnimi meritvami. S tem močno skrajšamo trajanje presejalnega testa ter tudi stroške le tega, saj lahko iz nadaljnjih eksperimentov že takoj na začetku izločimo tiste transformante, ki na ploščah ne producirajo pigmenta.

5.4 IZBIRA USTREZNE VALOVNE DOLŽINE ZA KVANTITATIVNO DETEKCIJO FLAVIOLINA

Izbira ustrezne valovne dolžine za detekcijo flaviolina je pomembna za pravilno kvantitativno ovrednotenje moči testiranih promotorjev. Temu izzivu smo tekom diplomskega dela namenili precej pozornosti. Meritve za selekcijo pozitivnih transformant smo izvajali pri valovni dolžini 370 nm. Zanj smo se odločili na podlagi pregleda objav v literaturi (Kuščer in sod., 2007; Izumikawa in sod., 2003) ter na podlagi analize absorpcijskega spektra kulture transformant. V kasnejših kvantitativnih ocenah moči promotorjev smo uporabili podatke pri valovni dolžini 270 nm, ki se nahaja v UV delu svetlobnega spektra. Dejanski absorpcijski vrh molekule flaviolina je nekje med 262 in 282 nm (Funa in sod., 2002a), polimeri flaviolina pa svetlobo absorbirajo na mnogo širšem območju. Po podatkih iz literature med valovno dolžino 340 nm in 488 nm (Kuščer in sod., 2007; Izumikawa in sod., 2003). Če primerjamo razmerja v moči promotorjev, ki smo jih izračunali iz podatkov pri valovni dolžini 270 nm z razmerji izračunanimi pri 370 nm ugotovimo, da so primerljiva. Pojavi se vprašanje katera valovna dolžina je bolj primerna. Meritve pri valovni dolžini 370 nm so sicer enostavnejše. Pri večini vzorcev je vrednost absorbance tako nizka, da redčenje ni potrebno, kar skrajša postopek priprave vzorcev. Vendar se moramo zavedati, da so spojine z absorpcijskim vrhom pri višjih valovnih dolžinah produkti polimerizacije posameznih flaviolinskih molekul. Hitrost te polimerizacije je glede na objave v literaturi odvisna predvsem od prisotnosti encima RppB (P450 oksidaza), ki katalizira prvo stopnjo polimerizacije, to je dimerizacija dveh molekul flaviolina. Različni nivoji encima RppB v različnih vrstah organizmov torej močno vplivajo na količino flaviolinskih polimerov, ki jih zaznavamo pri valovnih dolžinah svetlobe med 340 nm in 488 nm. To je dodatna spremenljivka, ki bi lahko vplivala na rezultate kvantitativnih meritev in se ji zato raje izognemo. Predvidevamo, da je limitni faktor za hitrost polimerizacije koncentracija encima RppB in ne koncentracija molekul flaviolina. Zato lahko v določenih vrstah pride do izjemno visoke produkcije flaviolina in skoraj nič flaviolinskih polimerov, ker ni prisotnega encima RppB. V tem primeru meritev pri valovni dolžini 270 nm odraža dejanski nivo izražanja *rppA*, meritev pri valovni dolžini 370 nm pa bi verjetno bila podcenjena. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili za določanje relativne količine flaviolina na podlagi absorbance pri valovni dolžini 270 nm.

5.5 DELOVANJE PROMOTORJEV V RAZLIČNIH SEVIH IZBRANIH STREPTOMICET

Poleg razvoja popolnoma novega poročevalskega sistema za aktinomicete smo v tem diplomskem delu izvedli tudi primerjavo treh različnih promotorjev v štirih različnih vrstah streptomicet. To je prvi primer sistematičnega primerjanja promotorjev v tej skupini organizmov. Podobna raziskava še nikoli ni bila objavljena v znanstveni literaturi.

Kot je bilo v besedilu že večkrat omenjeno, so rezultati skladni s hipotezami, ki jih lahko postavimo ob pregledu literature. Promotor *ermE*^{*}, ki je v večini drugih vrst streptomicet izredno močan (Bibb in sod., 1989; Schmitt-John in Engels, 1991), se je kot tak izkazal tudi v testiranih vrstah. Njegov divji tip *ermE* (Bibb in sod., 1989; Schmitt-John in Engels, 1991) se je večinoma izkazal kot srednji po moči, razen v vrsti *S. coelicolor*, kjer je bil srednji po moči aktivatorsko promotorski sistem *actII*-ORF4/*PactI*. To je moč razložiti s tem, da je slednji promotor naravno prisoten v tej vrsti. V drugih vrstah se je *actII*-ORF4/*PactI* izkazal kot najslabši promotor. V vrsti *S. rimosus* sploh ni deloval, kar se sklada z rezultati predhodnih raziskav (Petković, 1998). Naštete ugotovitve so nas prepričale, da je poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* zanesljiv tako za pridobivanje kvalitativnih kot tudi kvantitativnih podatkov.

Danes se za pridobivanje kvantitativnih podatkov najpogosteje uporablja poročevalski sistem na osnovi katehol di-oksigenaze (Ingram in sod., 1989). Ta je sicer najbolj zanesljiv, vendar so meritve katehol di-oksigenazne aktivnosti delovno intenzivne. Posamezni koraki v protokolu si sledijo eden za drugim v točno določenih časovnih razmikih. Pred meritvijo katehol di-oksigenazne aktivnosti moramo celice najprej razbiti. Najenostavnejši postopek je razbijanje z ultrazvokom (sonifikacija). To izvedemo tako, da kulturo za 15 s izpostavimo ultrazvoku in jo nato 30 s inkubiramo na ledu. Ta dva koraka moramo še dvakrat ponoviti. Sonifikacija treh vzorcev (več na enkrat jih ne moremo obdelati) z vsemi pripravljalnimi postopki traja vsaj 3 minute (2 minuti in 15 sekund procedura ter vsaj 45 sekund pripravljalni postopki). Poleg tega je ultrazvok neprijeten za raziskovalca, ki jo izvaja. Po razbijanju celic je potrebno v vse vzorce čim bolj istočasno dodati katehol, inkubirati točno določen čas in ponovno istočasno izmeriti intenziteto barve, ki se razvije. Ker je v večje število vzorcev fizično nemogoče dodati katehol v istem trenutku, je običajno potrebno tudi meritve izvajati večkrat z manjšim številom vzorcev. Enaka meritev pri uporabi našega poročevalskega sistema na osnovi *rppA* poteka tako, da vzorce vzamemo iz stresalnika, jih prenesemo v mikrocentrifugirke, zbistrimo s centrifugiranjem, supernatante prenesemo v mikrotiterske ploščice, po potrebi razredčimo in izmerimo absorbanco. Obdelava 100 vzorcev tako z meritvami vred ne traja več kot pol ure, kar je v primerjavi z več urnim postopkom pri sistemu na osnovi katehol di-oksigenaze izjemno malo. Našteta dejstva so nas prepričala v izjemnost našega sistema. Trdimo, da je poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* trenutno najboljši sistem za pridobivanje kvantitativnih podatkov o izražanju genov v aktinomicetah.

Streptomicete so pomembni industrijski organizmi. Z njimi se danes v industrijskih bioprocseh proizvaja številne farmacevtske učinkovine. V času ostre konkurenčne borbe med

farmacevtskimi podjetji je pomembno imeti v lasti sev, ki iz enake količine surovin in v krajšem času proizvede več zelenega sekundarnega metabolita kot sev, ki ga uporabljajo konkurenti na trgu. Veliko vlogo pri izboljšanju produktivnosti sevov danes igrajo močni heterologni promotorji, s katerimi lahko nadomestimo šibke native promotorje, ki so odgovorni za uravnavo izražanja genov sekundarnega metabolizma. Seveda moramo te heterologne promotorje najprej poiskati v naravi in v vsaki vrsti posebej testirati njihovo delovanje.

Drug primer, v katerem je koristno poznati delovanje promotorjev, je biosintezni inženiring pri razvoju novih učinkovin. S tem pristopom ustvarjamo nove učinkovine, ki jih v naravi ni, oziroma v naravi še niso bile odkrite. Biosintezni inženiring vključuje načrtovano izbijanje naravno prisotnih genov v organizmu ter tudi vnos novih heterolognih genov. Ker se hočemo izogniti ozkim grlom pri proizvodnji, je za vnos heterolognih genov v produkcijski organizem izjemnega pomena, da v kombinaciji z novim genom uporabimo tudi močan promotor, ki bo odgovoren za ekspresijo tega gena. Promotorje moramo torej pred uporabo testirati v vsakem organizmu posebej.

Naj za konec omenimo še to, da se je sistem na osnovi gena *rppA* že izkazal kot uspešen pri preučevanju regulacije izražanja genov v streptomicetah (Kuščer in sod., 2007). Poleg tega bodo ugotovitve o moči promotorjev v eni izmed vrst, ki smo jih pridobili v diplomskem delu, uporabljene v nadaljnjih industrijskih raziskavah s področja biosinteznega inženiringa novih spojin. Raziskave, ki so potekale v okviru diplomskega dela, bodo torej neposredno koristile tudi napredku aplikativne znanosti in razvoju visokotehnoloških panog našega gospodarstva.

5.6 SKLEPI

Na podlagi analize meritev pridobljenih v tem delu lahko sklepamo, da ima poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* vse lastnosti dobrega poročevalskega sistema:

- univerzalna uporabnost v številnih aktinomicetah
- enostavna uporaba
- hitra in delovno neintenzivna detekcija
- uporabnost v različnih gojiščih
- uporabnost v industrijskih aplikacijah
- nizka cena, po možnosti brez potrebe po dodatnih reagentih
- količina produkta čim bolj odvisna od moči izražanja (brez drugih ozkih grl)
- stabilen produkt, kar omogoča vzporedno obdelavo več vzorcev hkrati
- možnost natančne kvantitativne analize
- hitra kvalitativna vizualna ocena izražanja genov na agar ploščah
- odsotnost signala ozadja (ni lažno pozitivnih rezultatov)
- kratek genski zapis za poročevalski gen
- produkt poročevalskega gena ni toksičen za celice

6 POVZETEK

Aktinomicete so pomembna skupina bakterij. V naravi so ubikvitarno razširjene. Najdemo jih predvsem v zemlji in vodi. Nekatere so patogene za ljudi in živali. V začetku druge polovice dvajsetega stoletja so pritegnile pozornost znanstvenikov predvsem zaradi izjemnega nabora sekundarnih metabolitov, ki jih proizvajajo. Streptomicete, ki jih uvrščamo v skupino aktinomicet, so s tega stališča še posebej zanimive, saj proizvajajo kar 80% vseh biološko aktivnih spojin aktinomicetnega izvora. Sekundarni metaboliti aktinomicet imajo protibakterijske, protiglivne in protirakave lastnosti. Poleg tega se uporabljajo tudi kot imunosupresorji po presaditvah organov in za zniževanje koncentracije holesterola v krvi.

Za učinkovito proizvodnjo aktinomicetnih sekundarnih metabolitov in načrtovanje novih spojin je potrebno dobro poznavanje bioloških procesov, ki se odvijajo v proizvodnih organizmih. Za študij le teh potrebujemo molekularno biološka orodja. Takih orodij, ki bi bila uporabna v streptomicetah, je malo. Klasična molekularna biološka orodja, ki dobro delujejo v večini organizmov v aktinomicetah običajno niso uporabna. Predvsem zaradi specifičnega genetskega ustroja te skupine organizmov. V delu smo razvili poročevalski sistem za študij moči ekspresije genov v aktinomicetah. Enostaven, cenen in učinkovit poročevalski sistem, ki bi dobro deloval v tej skupini organizmov bo koristen tako za bazične, kot tudi za aplikativne raziskave.

Kot temelj novega poročevalskega sistema smo uporabili streptomicetni gen *rppA*, ki kodira encim kalkon sintazo. Produkt tega encima je rdeče rjavo obarvan poliketid flaviolin. Relativno koncentracijo flaviolina v raztopini je moč kvantitativno ovrednotiti z enostavnimi spektrofotometričnimi meritvami. Nov sistem smo preizkusili v štirih različnih vrstah streptomicet (*S. coelicolor*, *S. cinnamonensis*, *S. rimosus* in *S. tsukubaensis*). Dva med njimi sta bila industrijska seva (*S. cinnamonensis* in *S. tsukubaensis*), ki se uporabljata za proizvodnjo biološko aktivnih sekundarnih metabolitov v velikem obsegu. Sistem smo preizkusili v kombinaciji s tremi različnimi promotorji (*actII-ORF4/Pact*, *Perme* in *Perme**). S pregledom literature smo ocenili relativno moč teh promotorjev ter te ocene primerjali z našimi meritvami. Uporabnost novega sistema smo ovrednotili tudi glede na druge praktične lastnosti (na primer enostavnost, cenenost ter hitrost meritev, univerzalno uporabnost v različnih organizmih).

Z eksperimenti smo pokazali, da je poročevalski sistem na osnovi gena *rppA* uporaben. Odlikuje se po enostavnosti detekcije, hitrih meritvah, cenenosti. Poleg tega je z njim moč pridobiti natančne kvantitativne podatke o izražanju aktinomicetnih genov ter o moči njihovih promotorjev. Trdimo, da je sistem na osnovi gena *rppA*, predvsem s stališča enostavnosti uporabe, trenutno najboljši poročevalski sistem za študij ekspresije genov v aktinomicetah.

7 VIRI

Abou-Zeid A., Euverink G.J.W., Hessels G.I., Jensen R.A., Dijkhuizen L. 1995. Biosynthesis of L-phenylalanine and L-tyrosine in the *Actinomyces Amycolatopsis methanolica*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1298–1302.

Anderson A.S., Wellington E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 797–814.

Arias P., Fernandez-Moreno M.A., Malpartida F. 1999. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. Journal of Bacteriology, 181: 6958–6968.

Baerson S.R., Rimando A.M. 2007. A plethora of polyketides: Structures, biological activities, and enzymes. V: Polyketides: Biosynthesis, biological activity and genetic engineering. Rimando A.M., Baerson S.R. (eds.). Washington, American Chemical Society: 2-14.

Bassford P., Beckwith J., Berman M., Brickman E., Casadaban M., Guarente L., Saint-Girons I., Sarthy A., Schwartz M., Shuman H., Silhavy T. 1978. Genetic fusions of the *lac* operon: a new approach to the study of biological processes. V: The operon. Miller J.H., Reznikoff W.S. (eds.). New York, Cold Spring Harbor: 245-261.

Bibb M.J., Cohen S.N. 1982. Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. Molecular Genetics and Genomics, 187: 265-277.

Bibb M.J., Janssen G.R., Ward J.M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. Gene, 38: 215-226.

Binnie C., Cossar J.D., Stewart D.I.H. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. Trends in Biotechnology, 15: 315-320.

Blažič M., Lešnik U., Kuščer E., Petković H. 2009. Biosintezni inženiring: novejši postopki pri razvoju protimikrobnih učinkovin. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-57.

Challis G.L., Hopwood D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 14555–14561.

Chang S.Y., Chang S. 1988. Secretion of heterologous proteins in *Streptomyces lividans*. V: The biology of the actinomycetes. Proceedings of the seventh international symposium on biology of actinomycetes, Tokio, May 1998. Okami Y., Beppu T., Ogawara H. (eds.). Tokyo, Japan Scientific Societies Press: 103-107.

Chen L.Y., Leu W.M., Wang K.T., Lee Y.H.W. 1992. Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. Journal of Biological Chemistry, 267: 20100-20107.

Cortes 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: 1213-1224.

Craney A., Hohenauer T., Xu Y., Navani N.K., Li Y., Nodwell J. 2007. A synthetic *luxCDABE* gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria. Nucleic Acids Research, 35, doi: 10.1093/nar/gkm086.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford, Blackwell: 372 str.

Davis N.K., Chater K.F. 1990. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. Molecular Microbiology, 4: 1679-1691.

Echkard T., Smith R. 1986. Use of secreted β -galactosidase to study gene expression and secretion in *Streptomyces*. V: Proceedings of the fifth international symposium on the genetics of industrial microorganisms, Split, 14. – 20. september 2009. Alečević M., Hranueli D., Toman Z. (eds.). Zagreb, Pliva: 17-27.

Fermentas. 2008. GeneRuler™ and O'GeneRuler™ DNA Ladders. Burlington, Fermentas. (2008)

<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm> (junij 2009): 8 str.

Forsman M., Jaurin B. 1987. Chromogenic identification of promoters in *S. lividans* by using an *ampC* β -lactamase promoter-probe vector. Molecular Genetics and Genomics, 210: 23-32.

Funa N., Funabashi M., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2005. Biosynthesis of hexahydroxyperylenequinone melanin via oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. Journal of Bacteriology, 187: 8149–8155.

Funa N., Ohnishi Y., Fujii I., Shibuya M., Ebizuka Y., Horinouchi S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. Nature, 400: 897-899.

Funa N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. 2002a. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 367: 781-789.

Funa N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. 2002b. Properties and substrate specificity of RppA, a chalcone synthase-related polyketide synthase in *Streptomyces griseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 4628-4635.

Georgiew W.S. 1998. Actinomycetes. V: Infectious diseases in immunocompromised hosts. Georgiew W.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 223-395.

Gregory M.A., Gaisser S., Petković H., Moss S. 2004. Production of polyketides and other natural products. United States Patent US7300942: 123 str.

Hanson J.R. 2003. Natural products: the secondary metabolites. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 147 str.

Hopwood D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97: 2465-2497.

Horinouchi S., Beppu T. 1985. Construction and application of a promoter-probe plasmid that allows chromogenic identification in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 162: 406-412.

Ingram C., Brawner M., Youngman P., Westpheling J. 1989. *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: Use for the study of *galPI*, a catabolite-controlled promoter. *Journal of Bacteriology*, 171: 6617-6624.

Izumikawa M., Shipley P.R., Hopke J.N., O'Hare T., Xiang L., Noel J.P., Moore B.S. 2003. Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 510-515.

Kämpfer P., Kroppenstedt R.M., Dorr W. 1991. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturised physiological tests. *Journal of General Microbiology*, 137: 1831-1891.

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, John Innes Foundation: 610 str.

King A.A., Chater K.F. 1986. The expression of the *Escherichia coli lacZ* gene in *Streptomyces*. *Journal of General Microbiology*, 132: 1739-1752.

Kuščer E., Coates N., Challis., 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: 4756-4763.

Kuščer E., Raspor P., Petković H. 2005. Rational design of polyketide natural products. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 403-410.

Labeda D.P. 1992. DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene*, 115: 249-253.

Labeda D.P., Lyons A.J. 1991. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the *Streptomyces cyneus* cluster. *Systematic and Applied Microbiology*, 14: 158-164.

Leskiw B.K., Lawlor E.J., Fernandez-Abalos J.M., Chater K.F. 1991. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic negative *Streptomyces* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 2461-2465.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New Jersey, Prentice-Hall: 1019 str.

McDaniel R., Welch M., Hutchinson C.R. 2005. Genetic approaches to polyketide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105: 543-558.

Menzella H.G., Reeves C.D. 2007. Combinatorial biosynthesis for drug development. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 238-245.

Nobel Foundation. 2008. The Nobel prize in chemistry 2008. Stockholm, The Nobel foundation. (2008)

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/ (18. junij 2009): 1 str.

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

Paget M.S.B., Hintermann G., Smith C.P. 1994. Construction and application of streptomycete promoter probe vectors which employ the *Streptomyces glaucescens* tyrosinase ancoding gene as reporter. *Gene*, 146: 105-110.

Parro V., Hopwood D.A., Malpartida F., Mellado R.P. 1991. Transcription of genes involved in the earliest steps of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*, 19: 2623-2627.

Petković H. 1998. Študij molekularne genetike skupine genov za biosintezo oksitetraciklina iz *Streptomyces rimosus*. Doktorsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 224 str.

Petković H., Cullum J., Hranueli D., Hunter I.S., Perić-Concha N., Pigac J., Thamchaipenet A., Vujaklija D., Long P.F. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 704-728.

Pigac J., Schrempf H. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 352-356.

Promega. 2009. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Madison, Promega. (2009) <http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf> (september 2009): 7 str.

Rowe C.J., Cortes J., Gaisser S., Staunton J., Leadlay P.F. 1998. Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene*, 216: 215-223.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1659 str.

Schmitt-John T., Engels J.W. 1992. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 493-498.

Schröder J. 1997. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in Plant Science*, 2: 373-378.

Sigma Aldrich. 2008. GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit. St Louis, Sigma Aldrich. (2008) <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/na0150bul.Par.0001.File.tmp/na0150bul.pdf> (september 2009): 16 str.

Smokvina T., Boccard F., Guerineau M. 1997. Cloning and expression vectors in an actinomyces strain, proces for transformation of this strain, actinomycetes strain obtained and preparation of proteins. United States Patent Application US5688689: 19 str.

Sohaskey C.D., Im H., Schauer A.T. 1992. Construction and application of plasmid and transposon based promoter-probe vectors for *Streptomyces* spp. that employ a *Vibrio harveyi* luciferase reporter cassette. *Journal of Bacteriology*, 174: 367-376.

Stackebrandt E., Witt D., Kemmerling C., Kroppenstedt R., Liesack W. 1991. Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1468-1477.

Stackebrandt E.D., Liesack W., Witt D. 1992. Ribosomal RNA andr DNA sequence analysis. *Gene*, 115: 255-260.

Stein D.S., Kendall K.J., Cohen S.N. 1989. Identification and analysis of transcriptional regulatory signals for the *kil* and *kor* loci of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Journal of Bacteriology*, 171: 5768-5775.

Sun J., Kelemen G.H., Fernandez-Abalos J.M., Bibb M.J. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 145: 2221-2227.

Ueda K., Kim K.M., Beppu T., Horinouchi S. 1995. Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers redbrown pigment production in *Streptomyces griseus*. *Journal of Antibiotics*, 48: 638-646.

Vanek Z., Krumphanzl V., Mateju J., Nohynek M., Marsalkova J., Marsalek J., Kristan V., Sevcik B. Monensin a producing high-productive strain of microorganism *Streptomyces cinnamonensis*. Češki patentni urad CS272657: 4 str.

Vujaklija D., Ueda K., Hong S.K., Beppu T., Horinouchi S. 1991. Identification of an A-factor dependent promoter in the streptomycin biosynthetic cluster of *Streptomyces griseus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 229: 119-128.

Ward J.M., Janssen G.R., Kieser T., Bibb M.J. 1986. Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Molecular Genetics and Genomics*, 203: 468-478.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*, 176: 386-390.

Weissman K.J., Leadlay P.F. 2005. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Reviews*, 3: 925-936.

Wezel G.P., White J., Hoogvliet G., Bibb M.J. 2000. Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the nndecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2: 551-556.

Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sakin M.J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, 129: 1743-1813.

Witt D., Stackebrandt E. 1990. Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces* and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 9143, 339AL. *Systematic and Applied Microbiology*, 13: 361-371.

Zukowski M.M., Gaffney D.F., Speck D., Kauffman M., Fndeli A., Wisecup A., Lecocq J.P. 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* base on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80: 1101-1105.

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil mojemu mentorju doc. dr. Hrvoju Petkoviću, da mi je omogočil sodelovanje v projektu razvoja novega poročevalskega sistema za aktinomicete. Zahvaljujem se mu tudi, ker me je vodil skozi proces nastajanja diplomske naloge, za vse strokovne nasvete in tudi za tiste nasvete, ki se niso neposredno dotikali diplomskega dela.

Zahvaljujem se delovni mentorici Vasilki Magdevski, ki me je praktično vpeljala v svet streptomicet in mi razkrila veliko skrivnosti, ki so mi prihranile precej časa. Zahvaljujem se ji za spodbudo in za vse ure dela, ki jih je namenila mojemu uvajanju. Zahvaljujem se ji tudi za pomoč pri vseh tistih plazmidih, ki so se vztrajno upirali mojim laboratorijskim metodam.

Zahvaljujem se celotni ekipi podjetja Acies Bio predvsem dr. Štefanu Fujsu in dr. Eneju Kuščerju. Hvala za vse nasvete z naših številnih sestankov. Hvala tudi Dušanu Goranoviču za pomoč pri najbolj "zvutih" streptomicetnih sevih.

Zahvaljujem se mag. Mariji Kobal za slovnični pregled diplomskega dela in doc. dr. Lei Gašperlin, za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Marko, Teja in Mateja prijetno je bilo delati z vami. Polona hvala za moralno pomoč in potovalne nasvete.

Prof. dr. Petru Rasporju hvala za recenzijo diplomske naloge.

Nazadnje vendar najbolj se zahvaljujem svojima staršema Iki in Alešu, ker sta me ves čas mojega šolanja podpirala in spodbujala. Brez vaju mi zagotovo ne bi uspelo. Hvala vama za vse!

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidno zaporedje uporabljenega gena *rppA* iz organizma *S. erythraea*.

>rppA

```
Gtggcagttctatgcacccctgcgggtcgcgggtcccggagcacgtcatcacggtcgaggagaccctcgacctggcc
cgccgcgtccacgcggaccaccgcagctaccgctcgtccttcgggtgatcagcaacaccggcggtgcgcgagcgc
catctgatcaggccgatcaggacaccctcgagcaccgggttttcgaggtcgcaaccgggatctacgaggagcag
gccaagcagcgcgtgccgcggtggtgcgagaggccctcgacagcgccgagctggggcccgaggacatagacctc
atcgtctacgtctcctgcaccggcttcatgatgccctcgtgaccgcgtggctgatcaactcgatgggcttccgc
atgagcaccgcggcagctgccatcgcgagctcgggtgcgcgcggggcgccgagatcaaccgggcgcacgac
ttctgcaccgcctaccccgacgccaacgcgctcatcgtgtcctgcgagttctgctcgtgtgctaccagccgacc
gacgacgacatcggttcgtcgtgtcgaacggactgttcgggcgacgccgtcggcgccgcgggtggtgcgcgggcac
ggcgggaccgggggtccgcctggagcgcaacgcgctcgtcgtatgatccccgagaccgaggactggatctcctacgcc
gtcaaggccaccggcttccacttccagctcgacaagcgggtgcccaagacgatggagccgctggcgccggcgctg
cgcgcgctggccgaggaccaccgctgggacgtcgcggggctggacttctacgtcatccacgcgggcggcccgcg
atcctcgacgacctgaccaagtctcctgggcgtgccgtccgaggcggtccggcacagccgggcgacgctggcccag
tacggcaacatcgccagcgcggtcgtcctcgacgcgctgcggcgcatcatcgaggaggggcggctggagtccggt
gcccgcggcatgatcgccggcttcggccccggcatcaccgcggagatgtccgtcggcacctgggtcccgcacgac
gtcctgctgcacggcgagcactcgaccacgtccgccccgggagggaaccgatga
```