



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Robert Pendelić

Reporterski sustav za karakterizaciju utišanih biosintetskih genskih klastera

Kemijski seminar I

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija (smjer Biokemija)

Izrađen prema:

Liu X. i sur. (2022) A visualization reporter system for characterizing antibiotic biosynthetic gene clusters expression with high-sensitivity. *Communications Biology* 5, 901

Zagreb, 2024.

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
1.1. Sekundarni metaboliti	1
1.2. Kvorum signalizacija	3
§ 2. REPORTERSKI SUSTAV.....	4
2.1. Dizajn i opis reporterskog sustava.....	4
2.2. Konstrukcije testnih sojeva i evaluacija.....	5
2.2.1. Karakterizacija genetske regulacije ovm genskog klastera	7
2.2.2. Karakterizacija ang genskog klastera.....	9
2.3. Genetska identifikacija i poboljšanje prinosa oksazolomicina	11
§ 3. ZAKLJUČAK	14
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XV

§ 1. UVOD

1.1. Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti su male biološki aktivne molekule koje, za razliku od primarnih metabolita poput aminokiselina, vitamina i nukleozida, organizmu koji ih proizvodi nisu nužne za rast i razvitak^[1]. Uloga ovih molekula je omogućiti proizvođačkom organizmu kompetitivnu prednost u njegovom prirodnom okruženju^[2]. Primjeri uključuju razne antibiotike, biopolimere, alkaloide, pigmente i mnoge druge vrste spojeva iz raznih organizama (Tablica 1). Bakterijski sekundarni metaboliti konkretno su izvor mnogih antibiotika, kemoterapeutika, imunosupresiva i drugih medicinski značajnih spojeva koji se svakodnevno koriste (Tablica 1).

Tablica 1. Primjeri sekundarnih metabolita iz raznih organizama i njihova svakodnevna uporaba.

Sekundarni metabolit	Komercijalna/medicinska uporaba	Proizvođački organizam
Kofein	Kava	Rod <i>Coffea</i> ^[3]
Nikotin	Cigarete	<i>Nicotiana tabacum</i> ^[4]
Morfin	Analgetik	<i>Papaver somniferum</i> ^[5]
Penicilin	Antibiotik	Rod <i>Penicillium</i> ^[6]
Lovastatin	Statin	<i>Aspergillus terreus</i> ^[7]
Ciklosporin A	Imunosupresiv	<i>Tolypocladium inflatum</i> ^[8]
Tetraciklin	Antibiotik	<i>Streptomyces aureofaciens</i> ^[9]
Doksorubicin	Antitumorski agens	<i>Streptomyces peucetius</i> ^[10]
Amfotericin B	Fungicid	<i>Streptomyces nodosus</i> ^[11]
Rapamicin	Imunosupresiv	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ^[12]
Bt Toksin	Kontrola štetnih kukaca	<i>Bacillus thuringiensis</i> ^[13]
Streptomycin	Kontrola štetnih bakterija	<i>Streptomyces griseus</i> ^[14]
Ksantanska guma	Zgušnjivač i stabilizator hrane	<i>Xanthomonas campestris</i> ^[15]

Sekundarni metaboliti mikroorganizama (bakterija i gljiva) se već dugi niz godina temeljito istražuju. U periodu od 1940. do 1970. godine se fenotipskim probirom otkrilo više od 1000 prirodnih produkata koji su demonstrirali baktericidnu ili fungicidnu aktivnost, a neki su se pokazali kao obećavajući kemoterapeutici u borbi protiv raka^[16]. Tada pretežito korištena metoda obuhvaćala bi produljeni uzgoj raznih mikroorganizama iz tla u tekućem mediju, popraćeno izolacijom njihova

ekstrakta i difuznim testom kojim bi se ispitao potencijal ekstrakta da inhibira rast testnih organizama. Kako je tada otkrivena većina danas poznatih antibiotika, ovaj period se naziva zlatnim razdobljem otkrića antibiotika.

Narednih 30 godina, od 1970. do 2000., metode istraživanja prirodnih produkata su uglavnom ostale iste, ali se zahvaljujući tadašnjem razvoju raznih tumorskih staničnih linija omogućila bolja potraga za prirodnim produktima koji su demonstrirali antitumorsko i imunosupresivno djelovanje. Dodaci tome su bili pristupi koji su se temeljili na ciljanoj meti, primjerice djelovanje prirodnih produkata na specifične enzime, te visoko-propusne probirne metode koje su robotiziranim pristupima omogućili efektivan probir kroz veliki broj prirodnih spojeva. Kakogod, unatoč opisu preko 1300 novih kemijskih entiteta ovim metodama, u konačnici je znatno manji broj novo otkrivenih prirodnih spojeva imao ulogu u medicini pri usporedbi s prethodnim razdobljem otkrića antibiotika^[16].

Kroz oba razdoblja, streptomicete su se među bakterijama isticale kao vodeći proizvođači velikog broja kemijski raznolikih sekundarnih metabolita – upravo zato su one najviše istraživane u kontekstu ovog područja. Otprilike 60% poznatih antibiotika danas potječe iz streptomiceta^[17], a među njima, više od 60 njih se koriste u medicinske svrhe, agrikulturi i/ili industriji^[16].

Streptomicete su aerobne i filamentne Gram-pozitivne bakterije koje pripadaju razredu aktinomiceta, te se uglavnom mogu pronaći u tlu. Ono što ih čini unikatnima su iznenađujuće veliki genomi za bakterije, koji sežu od 6 do 12 Mbp, time kodirajući za 5 300 do 11 000 proteina, sve na linearnom kromosomu^[18]. Za usporedbu, prosječna bakterija ima genom veličine 5 Mbp, koji kodira za otprilike 5 000 proteina, i to na kružnom kromosomu^[19]. Razlika dijelom potječe iz povećanog broja biosintetskih genskih klastera za sekundarne metabolite, koji su u znatno većem broju prisutni u streptomiceta nego u drugih bakterija^[20]. Naime, u proizvodnju sekundarnih metabolita su uključeni mnogobrojni geni, mnogi od kojih su često lokalizirani u genomu u blizini, tako formirajući biosintetske genske klastere^[21]. Ti geni se najčešće zajedno eksprimiraju u striktnim regulatornim uvjetima, koji odgovaraju specifičnim okolišnim situacijama^[22], time otežavajući njihova otkrića u laboratorijskim uvjetima zbog čega se još nazivaju utišanim i kriptičkim biosintetskim klasterima^[23]. Povećani broj sekundarnih metabolita omogućuje ovim bakterijama veliku plastičnost i preživljenje u mnogo različitih prirodnih okruženja, što je dodatno poduprto velikim brojem karakteriziranih genoma (preko 700) iz preko 200 različitih vrsta streptomiceta^[20].

Nastavno na povijesne periode, tek od 2000. godine se s razvojem genomike i sekvenciranjem prvih dvaju streptomiceta uspostavilo da one imaju puno više genskih klastera za sekundarne metabolite nego što je prvotno predviđeno iz ekspresije njihovih sekundarnih metaboloma^[24]. Pretpostavlja se da samo nešto manje od 10% svih genskih klastera za sekundarne metabolite se mogu eksprimirati u dovoljnim količinama da bi se primijetili pod uobičajenim uvjetima dosad korištenih metoda otkrivanja antibiotika, dok za preostale, odnosno većinu njih, potrebni su posebni uvjeti ili genetičke manipulacije

da bi „otkrili“ svoje produkte^[25, 26, 27]. To u kombinaciji s činjenicom da se svake godine sekvencira još genoma i otkrije još bakterijskih vrsta, objašnjava zašto istraživanje prirodnih spojeva ima toliko bogatu povijest, iako još za veći udio njih ne poznajemo strukturu, funkciju niti uvjete metaboliziranja.

Danas, raspolažući s tim informacijama, se uz pomoć raznih metoda i tehnika nastoje okarakterizirati produkti što većeg broja tih genskih klastera u svrhu otkrivanja novih korisnih prirodnih produkata. Kombinacijom napredovanja genetičkog inženjerstva, kombinatorijske biosintetike i bioinformatike te ubrzanje i pojednostavljenje sekvenciranja genoma, nije nemoguće da će skoro nastupiti i drugo zlatno doba otkrivanja antibiotika, kako Katz u svojoj publikaciji iz 2016. spekulira^[16].

1.2. Kvorum signalizacija

Kvorum signalizacija (eng. *Quorum sensing*) je proces komunikacije između stanica koji omogućuje bakterijama da detektiraju i reagiraju na gustoću populacije kroz regulaciju gena, obično u svrhu privikavanja na nedostatke iz okoliša. Uglavnom se radi o parakrinoj signalizaciji, ali također sadrži i karakteristike autokrine signalizacije. Prvi put je opisana na primjeru dvije svjetleće bakterijske vrste^[28], koje bi luminiscirale tek pri značajnom porastu bakterijske populacije. Dugo se smatralo da je stanična komunikacija karakteristika isključivo eukariotskih stanica, i da bakterije koje su subjekt staničnog komuniciranja su samo iznimke. Jedan od takvih primjera su bile streptomicete, koje mogu producirati antibiotike koristeći kvorum signalizaciju^[29]. Međutim, mnogobrojnim istraživanjima se pokazalo da vrlo vjerojatno većina bakterija komunicira pomoću raznih kemijskih signala. Primjerice, određene bakterije pomoću kvorum signalizacije reguliraju razne procese poput stvaranja biofilma, virulencije, motiliteta, bioluminiscencije, fiksacije dušika i sporulacije^[30].

Mehanizam kvorum signalizacije se uglavnom temelji na tome da svaka individualna bakterija u populaciji izlučuje signalnu molekulu, ali pri niskoj gustoći bakterijskih stanica, ona samo difundira bez aktivacije signala. S druge strane, pri visokoj gustoći bakterijskih stanica, lokalna koncentracija signalne molekule je dovoljno velika – iznad razine praga – da bi pokrenula signalizaciju i time ekspresiju gena adekvatnih za prirodno okruženje^[31]. Mehanizmi se blago razlikuju između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, gdje prve koriste autoinducirajuće peptide, dok druge produciraju N-acil homoserin laktone (AHL)^[30]. U literaturi je dostupno mnogo opisanih sustava koji se temelje na samo jednoj komponenti kvorum signalizacije, ali također i sustavi koji se temelje na dvo-komponentnim sustavima^[32].

§ 2. REPORTERSKI SUSTAV

2.1. Dizajn i opis reporterskog sustava

Nadovezujući se na prethodna istraživanja streptomiceta, Liu i sur. su u sklopu rada na kojemu je temeljen ovaj seminar osmislili reporterski sustav koji se bazira na procesu kvorum signalizacije između raznih Gram-pozitivnih streptomiceta i vizualizacijskog soja Gram-negativne *Chromobacterium violaceum* bakterije.

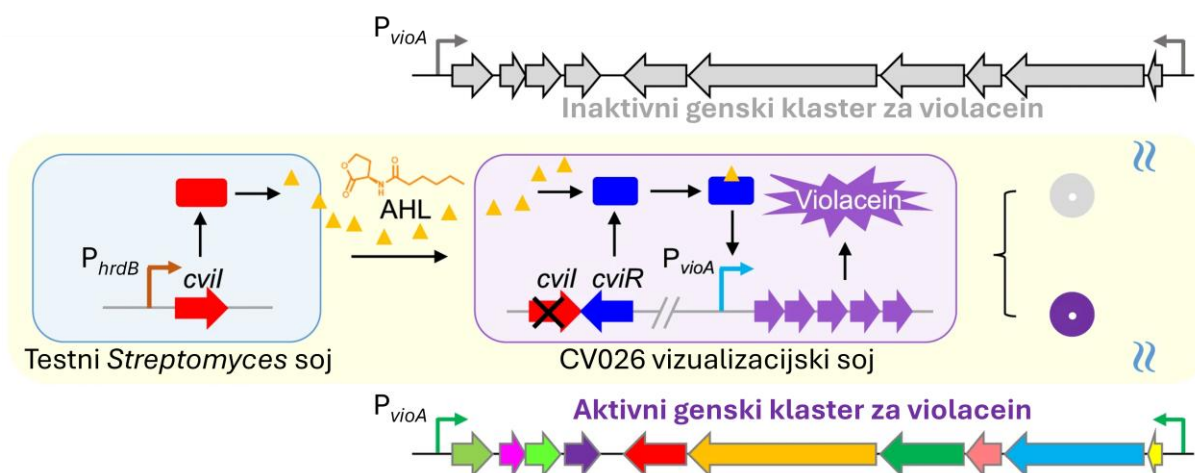
Kvorum signalizacija u Gram-negativnih bakterija se tipično sastoji od AHL signalne molekule i receptora specifičnog za nju. Oni u kompleksu djeluju kao transkripcijski faktor i započinju kaskadnu ekspresiju odgovarajućih genskih klastera sekundarnih metabolita. Konkretna primjer u slučaju *C. violaceum* je N-heksanoil-L-homoserin lakton (C6-HSL) – kratkolančana AHL signalna molekula – koja djeluje kao ligand za receptor CviR. Jednom vezani C6-HSL za CviR služi kao transkripcijski aktivator biosintetskih gena za violacein – sekundarni metabolit i unutarstanični ljubičasti pigment – i time njegovu sintezu.

S obzirom da je opisani sustav oblik autoinducirane signalizacije, za vizualizacijski soj se koristi Gram-negativni *C. violaceum* soj CV026, deficijentan na gene *cviI*, koji kodira za enzim odgovoran za sintezu C6-HSL, i *vioS*, koji kodira za biosintetski represor violaceina. Zbog prve modifikacije, ovaj soj više ne može samostalno stvarati C6-HSL i time je uklonjena autoinducirana signalizacija, a zbog druge modifikacije je ovom soju smanjena potrebna koncentracija C6-HSL iz okoliša kako bi se potaknula produkcija violaceina u ovih bakterija, što ih čini osjetljivijima za aktivaciju^[33, 34, 35].

Ispitivani soj čine razne Gram-pozitivne streptomicete u koje je transformiram plazmid s *cviI* genom pod različitim promotorima. Ekspresija *cviI* rezultira enzimom koji sintetizira C6-HSL iz S-adenozil-L-metionina (SAM) i acil-acil proteinskog nosača (acyl-ACP), sveprisutnih u mikroorganizmima^[36]. Jednom sintetizirani C6-HSL difundira van stanica u okoliš, što prethodno opisani vizualizacijski soj CV026 može detektirati zahvaljujući CviR receptorima i time pokrenuti sintezu violaceina ako je prisutna dovoljna količina C6-HSL za aktivaciju sustava^[33, 34, 35].

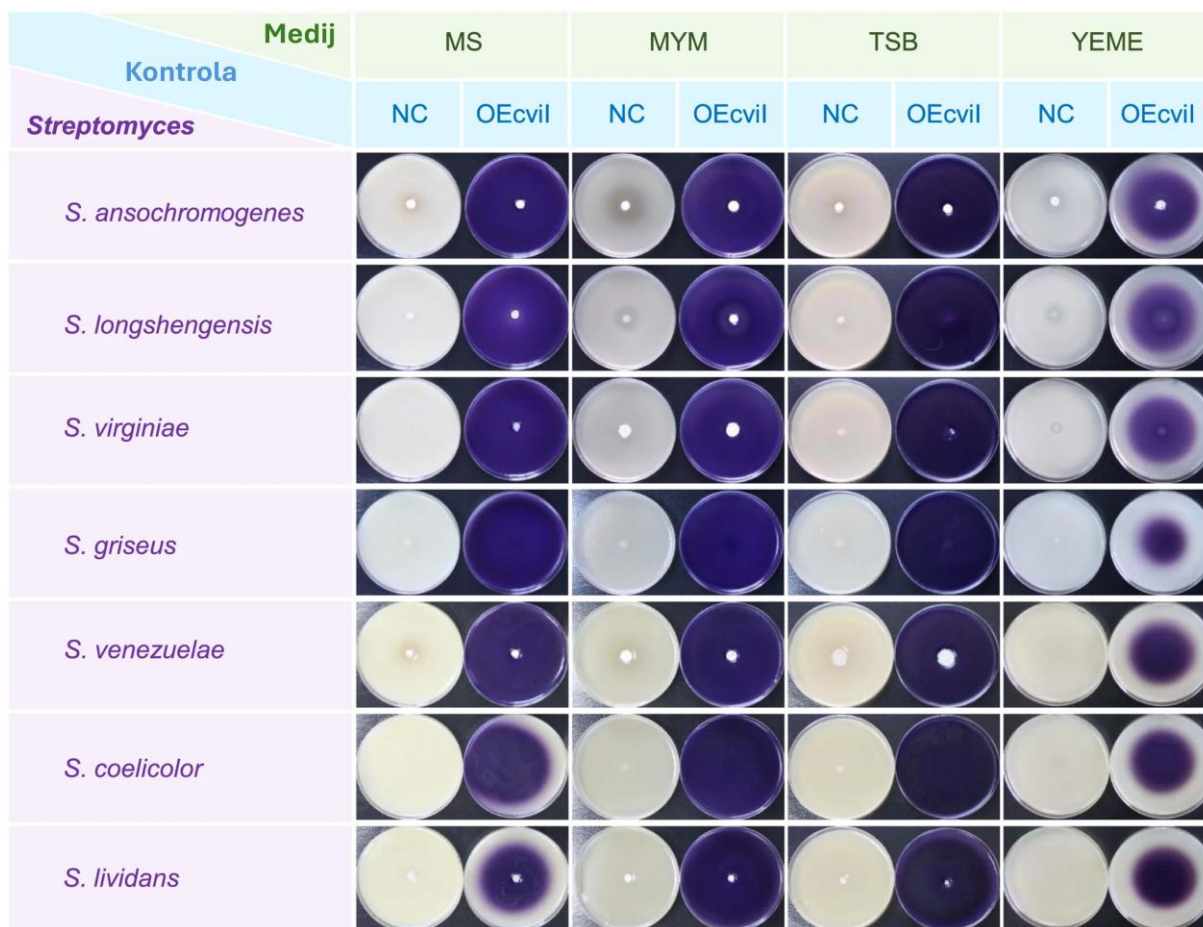
2.2. Konstrukcije testnih sojeva i evaluacija

Kao testni sojevi, u razne streptomicete je ubačen plazmid pSET152 s *cvil* genom pod konstitutivnim promotorom za *hrdB*, esencijalni gen koji u *Streptomyces coelicolor* kodira za sigma podjedinicu HrdB^[37]. Ideja je da će se pod ovim promotorom sintetizirati dovoljno CviI za sintezu C6-HSL. Velika koncentracija difundiranog C6-HSL bi se ulaskom u naknadno nasađeni CV026 soj vezala za njegove CviR receptore čime bi se potaknula transkripcija biosintetskog klastera odgovornog za sintezu violaceina i to bi se očitvalo vizualnim efektom ljubičasto obojenih bakterija (Slika 1).



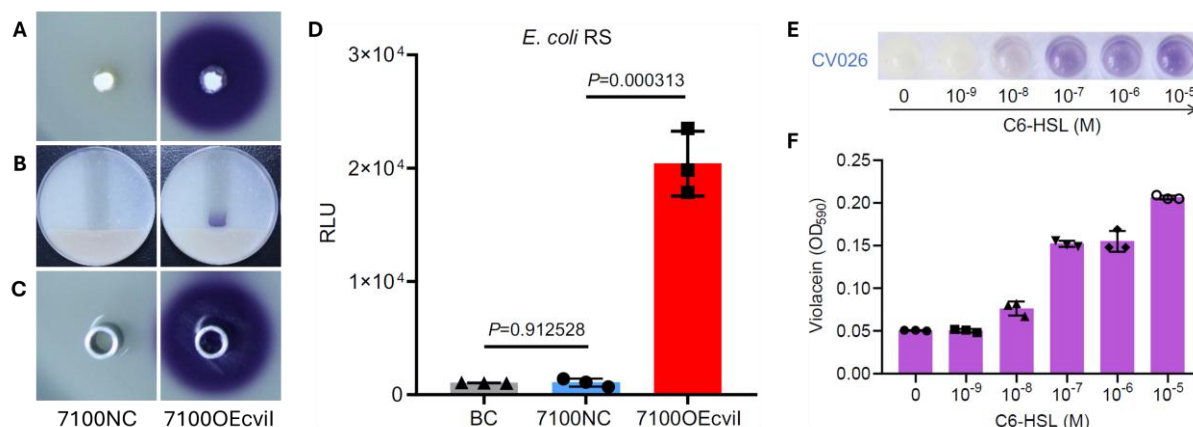
Slika 1. Shema djelovanja testnog VRS-bAHL reporterskog sustava. Reporterski sustav se temelji na kvorum signalizaciji u Gram-negativnoj *C. violaceum*. Radi se o soju CV026, mutantom deficijentnim na *cvil* kako bi se onemogućila autokrina signalizacija i proizvodnja ljubičastog violaceina. U testni soj streptomiceta je ubačen plazmid pSET152 koji sadrži *cvil* gen pod promotorom *hrdB* gena. Konstitutivnom ekspresijom *cvil* nastaje enzim CviI čijom aktivnošću nastaje C6-HSL koji difundira u okoliš. Ulaskom C6-HSL u lokalne CV026 bakterije i njegovim prepoznavanjem pomoću CviR receptora, dolazi do vezanja kompleksa na promotor P_{vioA} i aktivacije biosintetskog genskog klastera za violacein. Aktivnost se očituje ljubičastim obojenjem bakterija.

Kao glavna metoda, korištena je tehnika nasađivanja bakterija u dva sloja. U prvom sloju su na centar krute hranjive podloge nasađene testne streptomicete koje su potom inkubirane 2-3 dana, odnosno dovoljno dugo za sintezu sekundarnih metabolita. U drugom sloju je u omekšanom LB agar mediju nanijet vizualizacijski soj CV026 te su ploče inkubirane još 20 sati. Za negativnu kontrolu, korištene su streptomicete s ubačenim praznim pSET152 plazmidom.



Slika 2. Evaluacija VRS-bAHL reporterskog sustava. Sojevi OEcvil (sadrže ubačeni pSET152 plazmid s *cvil* genom pod P_{hrdB}) i NC (negativna kontrola s ubačenim praznim pSET152 plazmidom) su inokulirani u središte krutih hranjivih podloga. Nakon 3 dana inkubacije, metodom nasađivanja bakterija u dva sloja dodan je CV026 vizualizacijski soj za detekciju C6-HSL pomoću kvorum signalizacije i sinteze violaceina. Za evaluaciju reporterskog sustava korišteno je sedam vrsti streptomiceta (*S. ansochromogenes*, *S. longshengensis*, *S. virginiae*, *S. griseus*, *S. venezuelae*, *S. coelicolor* i *S. lividans*) i četiri tipova medija (MS, MYM, TSB i YEME).

U rezultatima evaluacije vizualizacijski soj je demonstrirao ljubičasto obojenje na svim tipovima korištenih krutih podloga i sa svim korištenim sojevima streptomiceta (Slika 2), a efekt je odsutan na negativnim kontrolama. Isti efekt je demonstriran korištenjem drugih metoda: (1) na omekšanu hranjivu podlogu s nasađenim CV026 bakterijama dodale bi se prethodno uzgojene testne streptomicete, bilo na komadiću agara (Slika 3A; agar-čep metoda), bilo u tekućoj kulturi (Slika 3C; *Oxford Cup* test); (2) kokultivacija testnog i vizualizacijskog soja u istom mediju (Slika 3B); (3) korištenje *E. coli* reporterskog sustava koji se također temelji na prepoznavanju C6-HSL i CviR (Slika 3D) te nizvodnoj sintezi luciferaze i detekciji bioluminiscencije^[38]. Nadalje, demonstrirano je da niska koncentracija C6-HSL od 10 nM aktivira reporterski sustav (Slike 3E) – čineći sustav vrlo osjetljivim – te da je moguća kvantifikacija violaceina koristeći DMSO (Slika 3F).



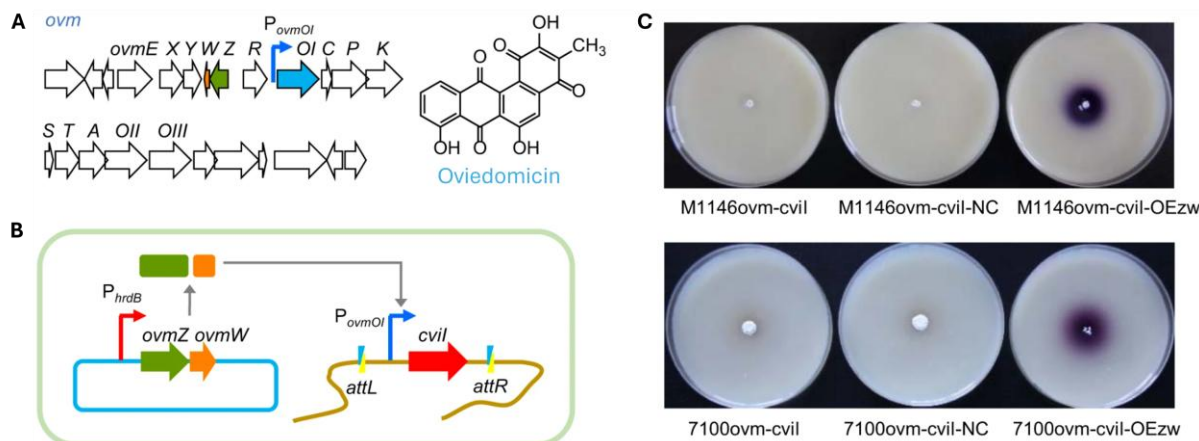
Slika 3. Evaluacija VRS-bAHL reporterskog sustava raznim metodama. (A) Agar-čep metoda; (B) kokultivacija; (C) Oxford Cup test; (D) *E. coli* reporterski sustav EJ532-4 temeljen na prepoznavanju C6-HSL i CviR te bioluminiscenciji. Pritom su korišteni testni sojevi 7100OEcvil (*S. ansochromogenes* 7100 s ubačenim pSET152 koji sadrži *cvil* gen pod P_{hrdB}) i 7100NC (negativna kontrola *S. ansochromogenes* 7100 s ubačenim praznim pSET152 plazmidom), a BC (od eng. *blank control*) je prazna kontrola. (E) Proizvodnja violaceina u CV026 uzgojenom na omekšanom LB mediju u prisutnosti različitih koncentracija C6-HSL. (F) Kvantifikacija proizvodnje violaceina mjerenjem optičke gustoće na 590 nm DMSO ekstrakta violaceina u prisutnosti različitih koncentracija C6-HSL.

2.2.1. Karakterizacija genetske regulacije ovm genskog klastera

Danas, u području istraživanja sekundarnih metabolita je objašnjenje regulatornih mehanizama osnova za pronalazak novih prirodnih spojeva, a ona se zasniva na pouzdanoj i preciznoj procjeni ekspresije gena i genskih klastera odgovornih za sintezu proučavanog prirodnog spoja. Iz tog razloga, Liu i sur. su u ovom radu testirati koliko će dobro VRS-bAHL reporterski sustav okarakterizirati *ovm* genski klaster odgovoran za biosintezu oviedomicina. Naime, koristeći drukčiji reporterski sustav, ista je istraživačka grupa 2017.^[39] dokučila da OvmZ i OvmW čine par regulatornih proteina koji zajedno aktiviraju promotor strukturnog gena *ovmOI* ključnog za *ovm* biosintetski klaster. Stoga, htjeli su vidjeti hoće li koristeći VRS-bAHL reporterski sustav producirati iste rezultate.

Za ovaj test, korišteni su sojevi *S. coelicolor* M1146 i *S. ansochromogenes* 7100, u koje je ubačen plazmid pKC1139 s genima *ovmZ* i *ovmW* pod konstitutivnim promotorom P_{hrdB} . Koristeći plazmid pIJ10500K, u iste sojeve se ubacio gen za CviI, ali pod inducibilnim promotorom P_{ovmOI} . Način rada ovih reporterskih sojeva je sljedeći: OvmZ i OvmW regulatorni proteini su konstitutivno eksprimirani i oni koordinacijom aktiviraju promotor P_{ovmOI} . Aktivacijom P_{ovmOI} , dolazi do nizvodne ekspresije CviI proteina (Slika 4B), koji sintetizira C6-HSL iz SAM i acil-ACP. Signalna molekula C6-HSL difundira u okoliš, što soj CV026 prepoznaje pomoću CviR receptora specifičnih za C6-HSL. Njihovim međudjelovanjem, ako je C6-HSL prisutan u dovoljnoj količini, odnosno koncentraciji, dolazi

do nizvodne ekspresije violaceina i aktivacija vizualizacijskog soja se nazire u obliku ljubičastog obojenja. Kao negativne kontrole, korištene su streptomicete samo s ubačenim pIJ10500K plazmidom koji sadrži *cvil* pod kontrolom P_{ovmOI} , te streptomicete s praznim pIJ10500K plazmidom i pKC1139 plazmidom koji sadrži *ovmZ* i *ovmW* pod P_{hrdB} . Oba reporterska sustava su dala ljubičasta obojenja, a pritom su njihove negativne kontrole ostale nebojane (Slika 4C).

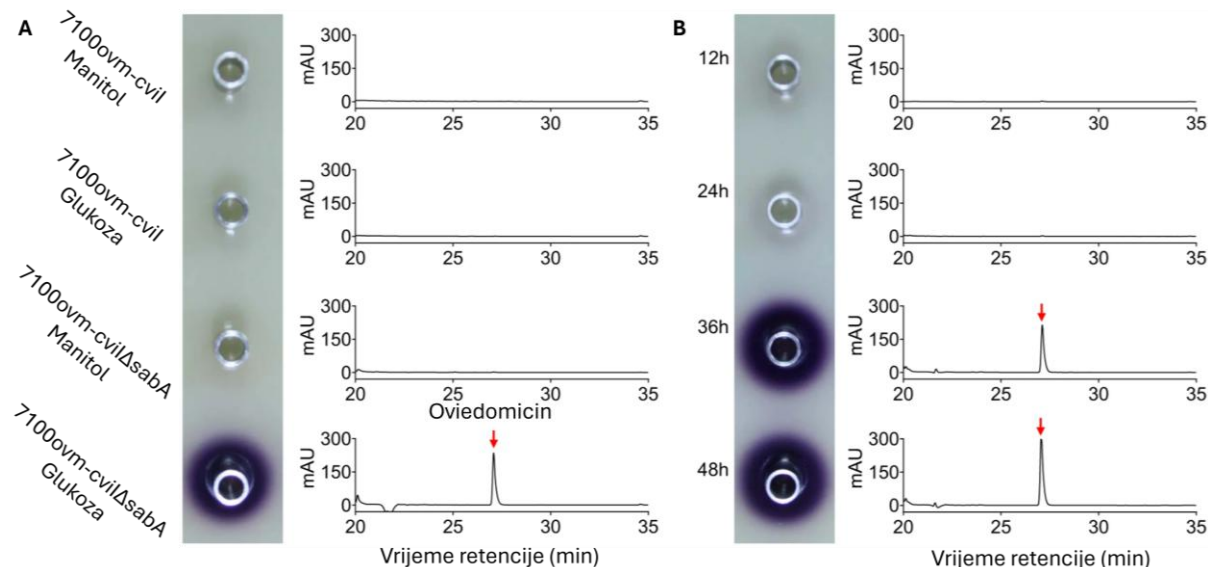


Slika 4. Karakterizacija genetske regulacije *ovm* genskog klastera reporterskim sojem VRS-bAHL.

(A) Organizacija gena biosintetskog genskog klastera za oviedomicin u *S. ansochromogenes* 7100 i molekulska struktura oviedomicina. (B) Shematski prikaz odvijanja regulacije u testnim sojevima streptomiceta. Regulatorni proteini OvmZ i OvmW su konstitutivno eksprimirani i oni zajedno aktiviraju P_{ovmOI} . To omogućuje ekspresiju *cvil* gena, što će dovesti do sinteze C6-HSL (nije prikazano), koji dalje aktivira vizualizacijski soj CV026. (C) Karakterizacija regulatornog učinka OvmZ i OvmW na promotor P_{ovmOI} u reporterskim sustavima *S. coelicolor* M1146 i *S. ansochromogenes* 7100. Soj *S. coelicolor* M1146ovm-cvil sadrži ubačeni pIJ10500K plazmid s genom *cvil* pod kontrolom P_{ovmOI} . Soj M1146ovm-cvil-NC sadrži prazan pIJ10500K plazmid i dodatno ubačeni pKC1139 plazmid s genima *ovmZ* i *ovmW* pod kontrolom P_{hrdB} , te zajedno s prvim sojem čini negativnu kontrolu, a M1146ovm-cvil-OEzw soj sadrži plazmid pIJ10500K s *cvil* pod kontrolom P_{ovmOI} i pKC1139 s *ovmZ* i *ovmW* pod kontrolom P_{hrdB} . Isto su proizvedeni analogni sojevi *S. ansochromogenes* 7100. Korištena je metoda nasađivanja bakterija u dva sloja.

Za potvrdu ovih rezultata, Liu i sur. su na još jedan način došli do ovih rezultate. U radu iz 2022.^[40] ista istraživačka grupa opisuje kako dodatak glukoze streptomicetama deficijentnim na signalne molekule butenolide uvjetuje aktivaciju *ovm* genskog klastera. U ovu svrhu, koristili su soj *S. ansochromogenes* 7100Δ*sabA* s mutiranim genom za SabA (odgovoran za sintezu butenolida) u koji je ubačen plazmid pIJ10500K s genom *cvil* pod promotorom P_{ovmOI} . Manjak butenolida i višak glukoze uzrokuju aktivaciju P_{ovmOI} , što u ovom soju potiče ekspresiju *cvil* i dalje vodi do aktivacije naknadno nasađenog vizualnog soja CV026 kroz C6-HSL. Za testiranje ovog soja, korišten je *Oxford Cup* test zajedno s HPLC analizom pri kojoj je detektiran signal karakterističan za oviedomicin. Kao negativne kontrole, korišteni su soj s istim plazmidom pIJ10500K, ali bez mutiranog gena *sabA* i manitol umjesto

glukoze. Jedino u slučaju soja deficijentnog na butenolide i uz dodatak glukoze u medij je došlo aktivacije vizualnog soja CV026 (Slika 5A) te je demonstrirano vrijeme inicijacije ekspresije *ovm* genskog klastera između 24 h i 36 h (Slika 5B).



Slika 5. Karakterizacija aktivacije *ovm* genskog klastera u soju 7100ovm-cviIΔ*sabA* sustavom VRS-bAHL.

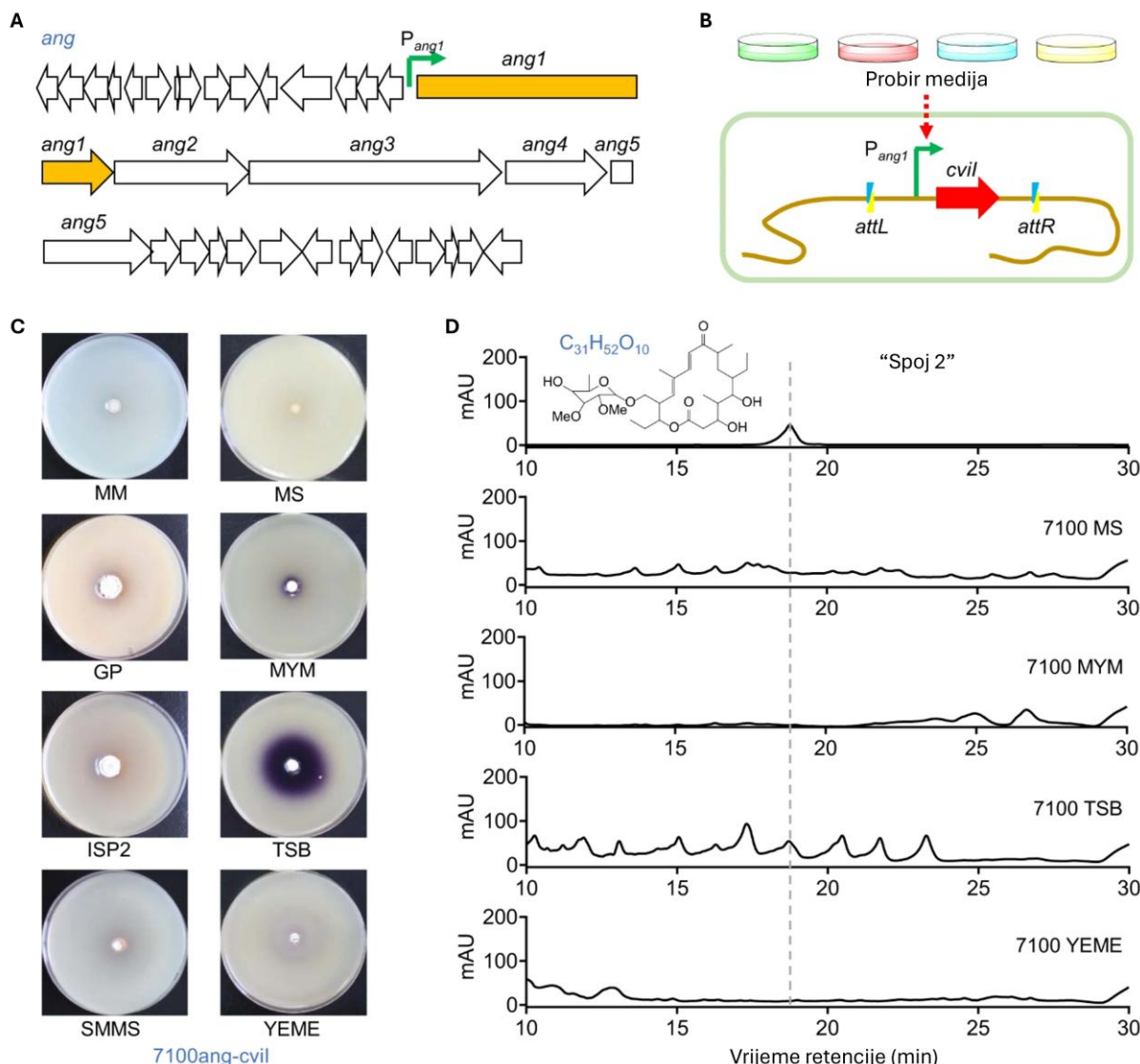
(A) Očitovanje aktivnosti *ovm* genskog klastera u *S. ansochromogenes* 7100Δ*sabA* reporterskim sustavom VRS-bAHL Oxford Cup testom (lijevo) i HPLC analizom (desno) uz dodatak manitola ili glukoze. Soj 7100ovm-cviIΔ*sabA* je deficijentan na butenolide zbog mutiranog gena *sabA* i sadrži plazmid pIJ10500K s genom *cviI* pod kontrolom P_{ovmOI} dok soj 7100ovm-cviI sadrži isti plazmid, ali ima funkcionalan *sabA* gen i služi kao negativna kontrola. (B) Određivanje vremena potrebnog za aktivaciju *ovm* genskog klastera u 7100ovm-cviIΔ*sabA*. (A i B) Crvenim strelicama je označen signal karakterističan za oviedomicin dobiven HPLC analizom na način opisan u [40].

2.2.2. Karakterizacija *ang* genskog klastera

Osim za *ovm* genski klaster, Liu i sur. su iskoristili konstruirani reporterski sustav za karakterizaciju *ang* genskog klastera. Genski klaster je u sklopu ovoga rada dobio naziv po visokom identitetu s biosintetskim genskim klasterom za angolamicin^[41, 42]. Za karakterizaciju ovog genskog klastera, korišten je soj *S. ansochromogenes* 7100 u koji je ubačen plazmid pIJ10500K s *cviI* genom pod kontrolom P_{ang1} , promotorom za ključni strukturni gen *ang1* ovog genskog klastera. Soj je kultiviran na krutim podlogama različitih sastava, nakon čega je u drugom sloju dodan vizualizacijski soj CV026. Demonstrirano je da se reporterski VRS-bAHL sustav aktivira jedino na TSB krutoj ploči (Slika 6C), odnosno da su jedino na njoj odgovarajući uvjeti za aktivaciju *ang* genskog klastera.

U svrhu verifikiranja tih rezultata, ponovljen je eksperiment koristeći divlji tip *S. ansochromogenes* 7100. Divlji tip je uzgajan u tekućim varijantama MS, MYM, TSB i YEME medija,

a produkti iz medija su podvrgnuti HPLC analizi. Jedan od produkata *ang* genskog klastera je takozvani „Spoj 2“^[43], čiji je signal jasno detektiran jedino pri HPLC analizi produkata iz uzgoja u TSB tekućem mediju (Slika 6D), a potom i LC-HR-MS analizom (nije priloženo).

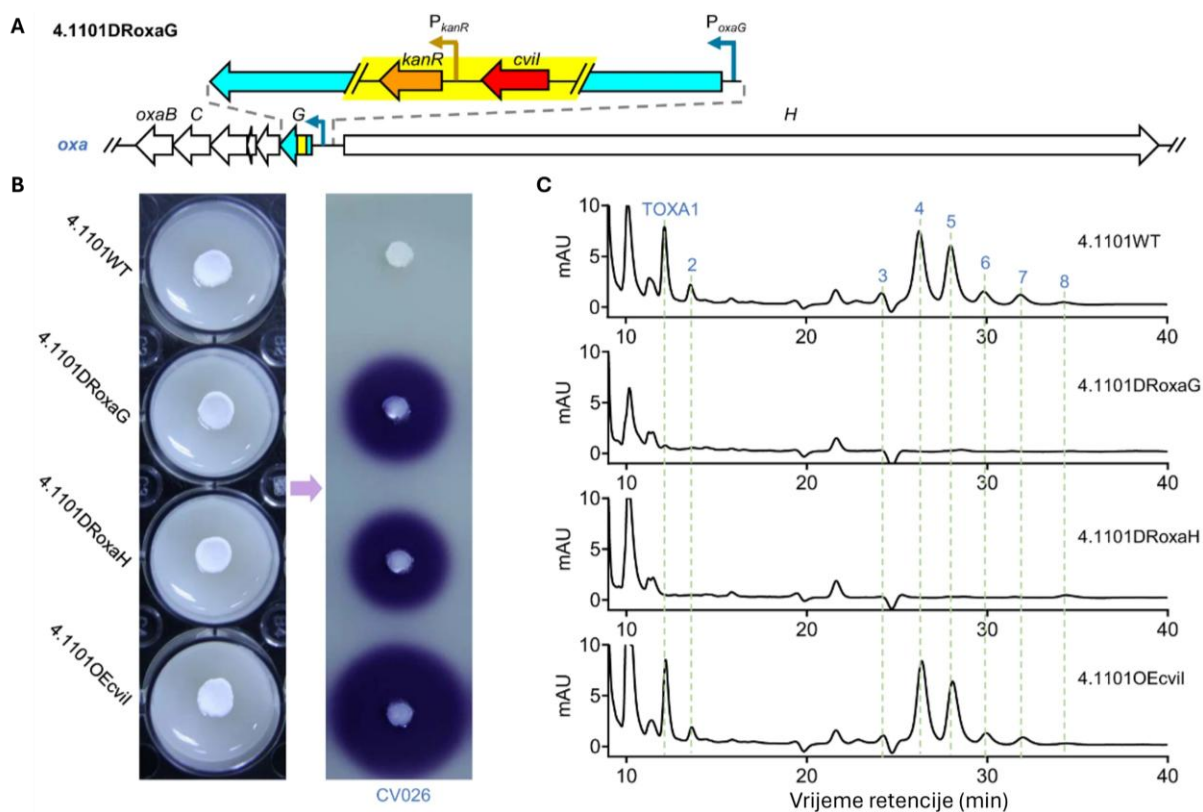


Slika 6. Karakterizacija genetske regulacije *ang* genskog klastera reporterskim sojem VRS-bAHL.

(A) Organizacija gena biosintetskog *ang* genskog klastera u *S. ansochromogenes* 7100. (B) Shematski prikaz probira medija za aktivaciju *ang* genskog klastera reporterskim sojem VRS-bAHL. Krute hranjive podloge s odgovarajućim uvjetima će potaknuti aktivaciju promotora P_{ang1} i time nizvodnu ekspresiju *cvil* gena, što će se posljedično vidjeti ljubičastim obojenjem vizualizacijskog soja CV026 (nije prikazano). (C) Soj 7100ang-cviI (*S. ansochromogenes* 7100 s ubačenim pIJ10500K plazmidom koji sadrži *cvil* gen pod kontrolom P_{ang1}) je inokuliran u središte osam krutih hranjivih podloga (MM, MS, GP, MYM, ISP2, TSB, SMMS, YEME). Nakon inkubacije je u drugom sloju dodan CV026 vizualizacijski soj za detekciju C6-HSL pomoću kvorum signalizacije i sinteze violaceina. (D) HPLC analiza „Spoja 2“ i produkata divljeg tipa *S. ansochromogenes* 7100 iz uzgoja u raznim tekućim medijima (MS, MYM, TSB, YEME). Isprekidana linija predstavlja odgovarajući signal za „Spoj 2“.

2.3. Genetska identifikacija i poboljšanje prinosa oksazolomicina

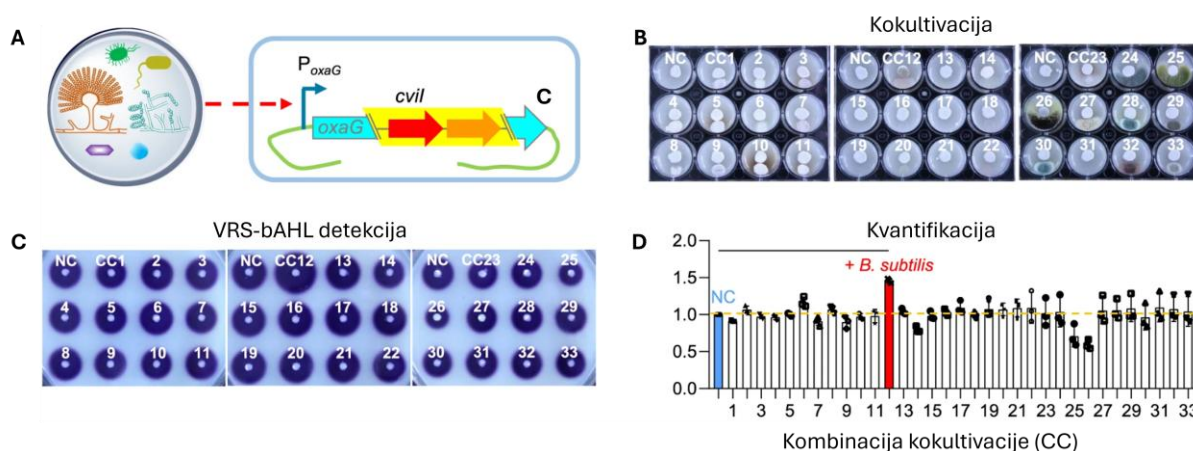
U ovoj studiji je identificiran jedan novi biosintetski genski klaster za oksazolomicin u *S. longshengensis*, koji demonstrira sličnost s već poznatim *ozm* genskim klasterom za oksazolomicin iz *S. albus*^[44]. Kako bi analizirali ovaj *oxa* genski klaster, konstruirana su dva reporterska soja, jedan specifičan za *oxaG*, a drugi za *oxaH* ključne strukturne gene *oxa* genskog klastera. Sojevi su konstruirani na način da se naruši funkcija ključnog gena (*oxaG* ili *oxaH*) ubacivanjem reporterskog gena *cvil* unutar njegove sekvence. Oba soja su imala dvojaku ulogu. Prvo, ugrađeni gen *cvil* bi ostao pod kontrolom promotora za ključni gen – P_{oxaG} u jednom i P_{oxaH} u drugom soju – zbog čega su sojevi korisni za karakterizaciju ekspresije tih gena, a time i *oxa* genskog klastera. Koristeći oba soja, testirani su uvjeti rasta pri kojima su promotori za *oxaG* i *oxaH* aktivni, što bi se u slučaju reporterskih sojeva očitovalo ekspresijom *cvil* i aktivacijom VRS-bAHL sustava (Slika 7B).



Slika 7. Konstrukcija i evaluacija *oxa* dvostrukog reporterskog soja. (A) Organizacija gena biosintetskog *oxa* genskog klastera u *S. longshengensis* 4.1101DRoxaG. Sekvenca gena *oxaG* je narušena ugradnjom *cvil* gena i selektivnim markerom – promotor P_{kanR} i gen za kanamicinsku rezistenciju (*kanR*). (B) Analiza ekspresije *cvil* gena VRS-bAHL sustavom u divljem tipu (4.1101WT), reporterskim sojevima 4.1101DRoxaG (gen *oxaG* narušen ugradnjom *cvil* gena unutar njegove sekvence) i 4.1101DRoxaH (*oxaH* narušen ugradnjom *cvil*), te pozitivnoj kontroli 4.1101OEcvil (sadrži plazmid pIJ10500K s *cvil* pod kontrolom P_{hrdB}). Korištena je metoda agar-čep. (C) HPLC analiza produkata iz uzgoja 4.1101WT, 4.1101DRoxaG, 4.1101DRoxaH i 4.1101OEcvil u tekućem MS mediju. Isprekidane linije predstavljaju odgovarajuće signale za spojeve TOXA1-8.

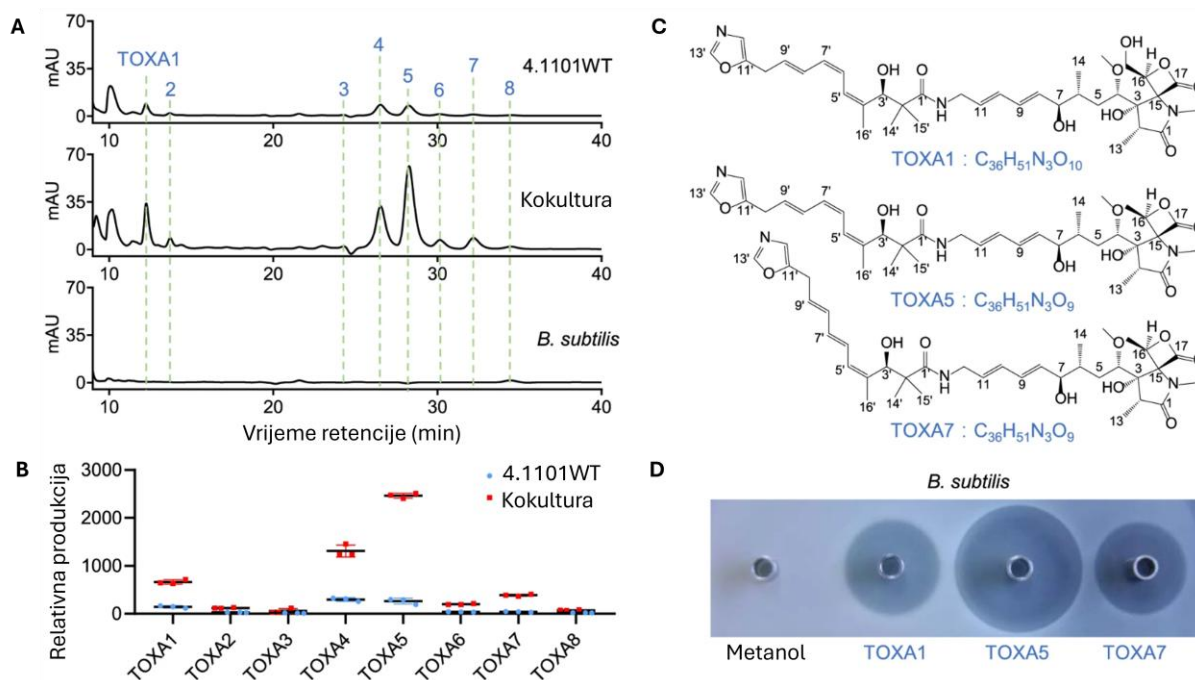
Drugo, oba soja su *oxa* deficijentni mutanti, odnosno, zbog odsutnosti ili gena *oxaG* ili gena *oxaH*, ne dolazi do aktivacije *oxa* genskog klastera niti do nastajanja odgovarajućih sekundarnih metabolita. Stoga, istraživačka grupa je provela HPLC analizu za oba ova soja, te za divlji tip. Dobiveno je da oba soja pri istim prethodno ispitanim uvjetima imaju slične HPLC profile, dok divlji tip ima dodatne signale koji korespondiraju sekundarnim metabolitima, specifičnim za *oxa* genski klaster (Slika 7C). Kao pozitivna kontrola korišten je divlji tip *S. longshengensis* 4.1101 s plazmidom pIJ10500K koji sadrži *cviI* gen pod kontrolom P_{hrdB} . Ovaj soj je dao ljubičasto obojenje te mu je profil HPLC analize odgovarao divljem tipu (Slika 7C).

Iako je HPLC analizom točno određeno da se radi o 8 sekundarnih metabolita (TOXA1-8) koji su produkti ovog genskog klastera, idući je problem bio izolirati ih i karakterizirati. Naime, uobičajena proizvodnja tih spojeva je ekstremno niska, što je zahtijevalo dodatno optimiranje od strane istraživačke grupe. Kako su prethodnim rezultatima pokazali da je moguća kvantifikacija genske ekspresije korištenjem VRS-BAHL sustava, idući je korak bio pronaći uvjete intenzivnije ekspresije *oxa* genskog klastera. Eksperiment koji su proveli u tu svrhu bila je kokultivacija reporterskog soja s raznim mikrobima. Ovim probirom, vizualizacijski soj CV026 je demonstrirao najintenzivniju aktivaciju pri uvjetima kokultivacije soja 4.1101DRoxaG s mikrobom *B. subtilis* (Slika 8D). Isti su rezultati potvrđeni koristeći i drugi soj, odnosno 4.1101DRoxaH (nije priloženo).



Slika 8. Optimizacija ekspresije sekundarnih metabolita *oxa* genskog klastera. (A) Shematski prikaz probira mikroba za pojačanu aktivaciju *oxa* genskog klastera reporterskim sojem 4.1101DRoxaG. (B) Kokultivacija 4.1101DRoxaG soja s različitim specificiranim mikroorganizmima nasađenih jedan pored drugog. Negativna kontrola (NC) je uzgoj samog 4.1101DRoxaG. (C) Detekcija produciranog C6-HSL iz svake kombinacije kokultivacije pomoću CV026 vizualizacijskog soja, koristeći agar-čep metodu. (D) Kvantifikacija produciranog violaceina prema relativnoj površini zone violaceina (vizualizirano u ImageJ^[45]). Sve vrijednosti su normalizirane u odnosu na negativnu kontrolu s pripadajuće ploče, a kokultivacijska kombinacija s *B. subtilis* demonstrira najveće poboljšanje u produkciji C6-HSL.

Kako bi se dodatno provjerilo da su uočeni rezultati posljedica aktivacije *oxa* genskog klastera, ponovno je provedena HPLC analiza, ali ovaj puta divljeg tipa u kokultivaciji s *B. subtilis*. Kao kontrolni HPLC profil, korišten je onaj od divljeg tipa bez kokultivacije, a kao negativna kontrola korišten je HPLC profil samo *B. subtilis*. Ovom HPLC analizom je dobiveno da su intenziteti prethodno spomenutih 8 kromatografskih signala 3,3 do 9,5 puta jači u kokulturi divljeg tipa s *B. subtilis* u odnosu na uzgoj samo divljeg tipa (Slika 9A i 9B). Shodno tome, istraživačka grupa je uspješno izolirala 7,2 mg TOXA1, 20 mg TOXA5 i 3,9 mg TOXA7 za strukturnu karakterizaciju. Metodama LC-HR-MS i NMR se verificirao novo otkriveni oksazolomicin, TOXA1, dok su TOXA5 i TOXA7 spojevi još prethodno karakterizirani (Slika 9C), ali pod nazivima KSM-2690 B i KSM-2690 C^[46]. Za kraj, ispitano je djelovanje TOXA1, 5 i 7 na rast raznih patogenih bakterijskih sojeva, *B. subtilis*, stafilokoka i drugih. Sva tri spoja su demonstrirala antibakterijsko djelovanje tako što su inhibirali rast bakterija (Slika 9D).



Slika 9. Optimizacija ekspresije sekundarnih metabolita *oxa* genskog klastera i njihova izolacija. (A) HPLC analiza produkcije TOXA1-8 spojeva u divljem tipu 4.1101WT, kokulturi divljeg tipa i *B. subtilis* te samog *B. subtilis*. Isprekidane linije predstavljaju odgovarajuće signale za spojeve TOXA1-8. **(B)** Usporedba produkcije TOXA1-8 spojeva u 4.1101WT (plavo) i kokulturi divljeg tipa s *B. subtilis* (crveno). **(C)** Kemijske strukture TOXA1, 5 i 7. **(D)** Analiza antibakterijskog djelovanja TOXA1, 5 i 7 na rast *B. subtilis*. Metanol je korišten kao prazna kontrola s obzirom da su spojevi pripremljeni otapanjem u metanolu.

§ 3. ZAKLJUČAK

Streptomicete su ključne za proizvodnju antibiotika i bioaktivnih spojeva. U današnjici su one odgovorne za više od 50% medicinski značajnih antibiotika i antitumorskih tvari^[17, 47]. Međutim, za daljnje istraživanje i otkrivanje potencijalno korisnih sekundarnih metabolita, potrebno je razumijevanje regulatornih mehanizama utišanih genskih klastera.

Dosadašnjim alatima za istraživanje sekundarnih metabolita i njihovih genskih klastera često bi se nailazilo na brojne izazove. Niska osjetljivost, lažni pozitivni, neželjeni signali u pozadini, potreba za dodatnim kemijskim supstratima te potencijalni negativni utjecaji na sam mikroorganizam otežavali su ovakva istraživanja.

U ovom radu je predstavljen novi reporterski sustav, VRS-bAHL, koji se temelji na sustavu kvorum signalizacije Gram-negativnih bakterija, posebno onih koje koriste AHL. Ovaj sustav omogućuje vizualno praćenje genske aktivacije kroz proizvodnju ljubičastog pigmenta violaceina u *Chromobacterium violaceum* CV026.

Prednosti VRS-bAHL sustava uključuju: 1) izuzetnu osjetljivost – sustav se aktivira pri samo 10 nM koncentraciji AHL, čineći ga izvrsnim za proučavanje slabih promotora; 2) minimalnu pozadinsku interferenciju – time omogućujući lako očitavanje i smanjenje lažnih pozitivna; 3) široku kompatibilnost – *cvrI* reporterski gen je mali (654 bp) i ne zahtijeva dodatne supstrate, već koristi sveprisutne SAM i acil-ACP^[36]; 4) mogućnost kvantifikacije – intenzitet violaceina pozitivno korelira s intenzitetom aktivacije izučavanog promotora, odnosno genskog klastera.

VRS-bAHL predstavlja prvi uspješan primjer hibridnog reporterskog sustava koji kombinira Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije u svrhu vizualizacije genske regulacije. Reporterski sustav VRS-bAHL je robusno, fleksibilno i efikasno rješenje za istraživanje streptomiceta, ali njegova primjena vjerojatno nije ograničena samo na ovaj rod. Budući da mnogi drugi mikroorganizmi također posjeduju utišane biosintetske genske klastere, ovaj bi se sustav mogao prilagoditi i za druge prokariote.

Konačno, razvoj VRS-bAHL-a ne samo da olakšava fundamentalna istraživanja bakterijske genetike već i omogućuje brže otkrivanje novih antibiotika u razdoblju alarmanтно rastuće antibiotske rezistencije^[48]. Daljnje unapređenje ovog sustava, poput uvođenja dodatnih boja ili fluorescentnih signala, moglo bi dodatno proširiti njegovu primjenu u sintetskoj biologiji i industriji.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

- [1] Shadia M. (2017) Microbial Biosynthesis – A Repertory of Vital Natural Products.
- [2] Craney A., Ahmed S. i Nodwell J. (2013) Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot* **66**, 387-400.
- [3] Pech-Kú R. i sur. (2018) Caffeine Extraction, Enzymatic Activity and Gene Expression of Caffeine Synthase from Plant Cell Suspensions. *J. Vis. Exp.* **140**, e58166.
- [4] Shitan N., Hayashida M. i Yazaki K. (2015) Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum*. *Plant Signaling & Behavior* **10**, e1035852.
- [5] Beaudoin G. A. i Facchini P.J. (2014) Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta* **240**, 19-32.
- [6] Ziemons S. i sur. (2017) Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC Biotechnol* **17**, 16.
- [7] De Oliveira M. C. L. i sur. (2020) Lovastatin producing by wild strain of *Aspergillus terreus* isolated from Brazil. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **51**, 164-172.
- [8] Yang X. i sur. (2018) Cyclosporine Biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* Benefits Fungal Adaptation to the Environment. *mBio*, **9**, e01211-18.
- [9] Darken M. A., Berenson H., Shirk R. J. i Sjolander N. O. (1959) Production of Tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in Synthetic Media. *Appl Microbiol.* **8**, 46-51.
- [10] Lomovskaya N. i sur. (1999) Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J Bacteriol.* **181**, 305-318.
- [11] Zhang, B. i sur. (2020) Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: quantitative analysis of metabolism via LC–MS/MS based metabolomics for rational design. *Microb Cell Fact* **19**, 18.
- [12] Kim Y. H. i sur. (2014) Production of Rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* from Glycerol-Based Media Optimized by Systemic Methodology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1319-1326.
- [13] Palma L. i sur. (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. **6**, 3296-3325.
- [14] Rezzonico F., Stockwell V. O. i Duffy B. (2009) Plant agricultural streptomycin formulations do not carry antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**, 3173-3177.

- [15] Demirci A. S. i sur. (2018) Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *LWT* **101**, 40-47.
- [16] Katz L. i Baltz R. H. (2016) Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **43**, 155-176.
- [17] Bérdy J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* **65**, 385-395.
- [18] Otani H., Udvary D. W. i Mouncey N. J. (2022) Comparative and pangenomic analysis of the genus *Streptomyces*. *Sci Rep.* **12**, 18909.
- [19] Land M. i sur. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* **15**, 141-161.
- [20] Nikolaidis M. i sur. (2023) A panoramic view of the genomic landscape of the genus *Streptomyces*. *Microb Genom.* **9**, mgen001028.
- [21] Dinglasan J. L. N. i sur. (2025) Microbial secondary metabolites: advancements to accelerate discovery towards application. *Nat Rev Microbiol.* doi: 10.1038/s41579-024-01141-y.
- [22] Baral B., Akhgari A. i Metsä-Ketelä M. (2018) Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synth Syst Biotechnol.* **3**, 163-178.
- [23] Alam K. i sur. (2022) *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Front. Microbiol.* **13**, 968053.
- [24] Bentley S. i sur. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- [25] Ochi K., Tanaka Y. i Tojo S. (2014) Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **41**, 403-414.
- [26] Yoon V. i Nodwell J. R. (2014) Activating secondary metabolism with stress and chemicals. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **41**, 415-424.
- [27] Baltz R. H. (2016) Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **43**, 343-370.
- [28] Nealson K. H., Platt T. i Hastings J.W. (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol* **104**. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>.
- [29] Folcher M. i sur. (2001) Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem.* **276**, 44297-44306.
- [30] Miller M.B. i Bassler B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **55**, 165-199.

- [31] Kaplan H.B. i Greenberg E. P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol.* **163**, 1210-1214.
- [32] Rutherford S.T. i Bassler B.L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**, a012427.
- [33] McClean K. H. i sur. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**, 3703-3711.
- [34] Devescovi G. i sur. (2017) Negative regulation of violacein biosynthesis in *Chromobacterium violaceum*. *Front. Microbiol.* **8**, 349.
- [35] Chen G. i sur. (2011) A strategy for antagonizing quorum sensing. *Mol. Cell* **42**, 199-209.
- [36] Parsek M. R. i sur. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 4360-4365.
- [37] Du D. i sur. (2013) Improvement of gougerotin and nikkomycin production by engineering their biosynthetic gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 6383-6396.
- [38] Liu X. i sur. (2021) A widespread response of Gram-negative bacterial acyl-homoserine lactone receptors to Gram-positive *Streptomyces* γ -butyrolactone signaling molecules. *Sci. China Life Sci.* **64**, 1575-1589.
- [39] Xu J. i sur. (2017) Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansochromogenes*. *J. Biol. Chem.* **292**, 19708-19720.
- [40] Li J. i sur. (2022) A butenolide signaling system synergized with biosynthetic gene modules led to effective activation and enhancement of silent oviedomycin production in *Streptomyces*. *Metab. Eng.* **72**, 289-296.
- [41] Li Y. i sur. (2021) Activation of cryptic antibiotic biosynthetic gene clusters guided by RNA-seq data from both *Streptomyces ansochromogenes* and $\Delta wblA$. *Antibiotics (Basel)* **10**, 34572679.
- [42] Schell U. i sur. (2008) Engineered biosynthesis of hybrid macrolide polyketides containing D-angolosamine and D-mycaminose moieties. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 3315-3327.
- [43] Lu C., Liao G., Zhang J. i Tan H. (2015) Identification of novel tylosin analogues generated by a *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 173.
- [44] Zhao C. i sur. (2010) Oxazolomycin biosynthesis in *Streptomyces albus* JA3453 featuring an “acyltransferase-less” type I polyketide synthase that incorporates two distinct extender units. *J. Biol. Chem.* **285**, 20097-20108.
- [45] Abràmoff M. D., Magalhães P. J. i Ram S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36-42.

- [46] Otani T. i sur. (2000) Novel triene-beta-lactone antibiotics, oxazolomycin derivative and its isomer, produced by *Streptomyces* sp. KSM-2690. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 1397-1400.
- [47] Bérdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **58**, 1-26.
- [48] Salam M.A. i sur. (2023) Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel)*. **11**, 1946.