

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nada N. Stanković

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA
BIOAKTIVNIH SEKUNDARNIH
METABOLITA IZ ODABRANIH SOJEVA
RODA *Streptomyces***

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nada N. Stanković

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF BIOACTIVE SECONDARY
METABOLITES FROM SELECTED
Streptomyces STRAINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jasmina Nikodinović-Runić, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE:

Ova teza urađena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama u periodu od 2006. – 2012. godine.

U toku duge izrade ove teze skoro da nema kolega i zaposlenih u IMGGI koji nisu na neki način doprineli da eksperimentalni rad i laboratorijski život idu glatko i budu lakši. Ja im se na tome iskreno zahvaljujem.

Zahvaljujem se dr Đorđu Firi što se (više puta) prihvatio mentorstva nad mojom tezom. Takođe mu se zahvaljujem na kritičkom čitanju i stručnoj oceni teze.

Mojim dragim kolegama iz LMGEM, onima koji su ovde i onima koji su otišli negde dalje, posebno se zahvaljujem. Mojim „najstarijim“ koleginicama Tanji, Sandri, Ivani M. za dugogodišnje druženje i deljenje svega kroz šta smo u ovih 14 godina prošli, Lidiji, koleginci iz MBT lab dana, veselom triju Tanja/Lidija/Sanja, Saši, Vanjici, kao i Miloju i Ivani pionirima PKS problematike u ovoj laboratoriji, svima od srca hvala.

„Šefici“, dr Branki Vasiljević zahvaljujem se na kolegijalnom i ljudskom odnosu koji ima prema članovima svoje laboratorije, na razumevanju, strpljenju kao i otvorenosti za nove predloge i ideje. Zahvaljujem joj se i na uloženom trudu u oceni ove teze.

Jasmini se zahvaljujem jednostavno na svemu. Bez njenog entuzijazma, ideja, energije i truda koji je uložila, ova teza ne bi u ovom obliku ugledala svetlost dana.

Mojim najdražima Vladi, Urošu i Irini posvećujem ovu tezu. Zbog njih je sve vredno truda.

Oktober 2012.



Izolacija i karakterizacija bioaktivnih sekundarnih metabolita iz odabranih sojeva roda *Streptomyces*

REZIME:

Aktinomicete su Gram-pozitivne zemljišne bakterije poznate kao proizvođači bioaktivnih sekundarnih metabolita. U cilju pronalaženja novih bioaktivnih jedinjenja pretraživana je kolekcija aktinomiceta Laboratorije za molekularnu gentiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu gentiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu po više kriterijuma – bioaktivnosti, prisustvu gena za poliketid sintaze (PKS), pigmentaciji i profilu apsorpcije ukupnih ekstrakata kultura u ultraljubičastom i vidljivom (UV/Vis) delu spektra. Na osnovu ovoga izdvojena su tri izolata NP10, JS520 i *Streptomyces durmitorensis*, od ranije poznati proizvođač didehidroroflamikoina (DDHR). Izolati NP10 i JS520 identifikovani su kao pripadnici roda *Streptomyces*. *Streptomyces* sp. NP10 akumulirao je masne kiseline račvastog niza, pre svega izopalmitinsku kiselinu, i ciklične dipeptide sastavljene od prolina u kombinaciji sa valinom, izoleucinom ili alaninom koji su imali stimulatívno dejstvo na trofoblastne ćelije u kulturi u niskim koncentracijama (1 ng/ml i 1 µg/ml) i citotoksično dejstvo u visokim (1 mg/ml) koncentracijama. Pokazano je da *Streptomyces* sp. JS520 ima sposobnost proizvodnje velike količine pigmenta undecilprodigiozina (UP) sa antibakterijskim, antimikotičkim, antioksidativnim i UV protektivnim osobinama koji je imao citotoksično dejstvo na trofoblastne ćelije u kulturi u visokim koncentracijama (1 ng/ml). Citotoksičnost polienskog makrolidnog antibiotika DDHR iz *S. durmitorensis* je potvrđena, a pokazan je i njegov antimikotički efekat. PKS klaster zadužen za sintezu DDHR je subkloniran u kozmidnu biblioteku i delimično sekvenciran. Optimizacijom uslova gajenja količina proizvedenog UP povećana je 2,12 puta, a DDHR 1,1 puta.

KLJUČNE REČI: bioaktivna jedinjenja, sekundarni metaboliti, *Streptomyces*, pigmenti, undecilprodigiozin, izoalkanske masne kiseline, biciklični peptidi, *Streptomyces durmitorensis*, PKS.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Primenjena mikrobiologija

UDK BROJ: [579.873.7 : 579.222] (043.3)

DODATNA POSEBNA KLASIFIKACIONA OZNAKA ZA DATU OBLAST:

Isolation and characterization of bioactive secondary metabolites from selected *Streptomyces* strains

SUMMARY:

Actinomycetes are Gram-positive soil bacteria known as producers of secondary bioactive metabolites. In the search for new bioactive compounds collection of actinomycetes from the Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (Institute of Molecular Genetic and Genetic Engineering, University of Belgrade) was screened according to several criteria - bioactivity, the presence of the genes for polyketide synthase (PKS), pigmentation, and crude culture extracts absorption profile in ultraviolet and visible (UV/Vis) spectra. Based on these we have isolated three strains NP10, JS520, and *Streptomyces durmitotensis*, previously renewed for didehydroroflamicoin (DDHR) production. Isolates NP10 and JS520 were identified to belong to the genus *Streptomyces*. *Streptomyces* sp. NP10 accumulated branched chain fatty acids, predominately isopalmitic, and cyclic dipeptides consisting of proline in combination with valine, isoleucine or alanine, that have a stimulating effect on the trophoblast cell line in culture at low concentrations (1 ng/ml and 1 mg/ml) and cytotoxic effect at high concentrations (1 mg/ml). *Streptomyces* sp. JS520 was determined to be exceptionally good producer of pigment undecylprodigiosine (UP) with antibacterial, antifungal, antioxidant and UV protective activities showing cytotoxic effects on trophoblast cell line in culture at high concentrations (1 ng/ml). Cytotoxicity of polyene macrolide antibiotic DDHR from *S. durmitotensis* was confirmed and its antifungal effects were shown. PKS cluster responsible for DDHR synthesis was subcloned in the cosmid library and partially sequenced. Optimization of culture conditions resulted in 2.12 times increased production of UP, and 1.1 times increased production of DDHR.

KEY WORDS: bioactive compounds, secondary metabolites, *Streptomyces*, pigments, undecylprodigiosine, iso-branched fatty acids, bicyclic peptides, *Streptomyces durmitotensis*, PKS.

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Applied microbiology

UDC NUMBER: [579.873.7 : 579.222] (043.3)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Sekundarni metaboliti kao bioaktivna jedinjenja.....	2
1.1.1. Kolekcije bakterija kao izvor novih bioaktivnih jedinjenja	3
1.1.2. Bakterijska taksonomija i izučavanje sekundarnih metabolita	5
1.1.3. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata	6
1.1.4. Novi eseji za detekciju bioaktivnih sekundarnih metabolita - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FAV20	7
1.2. Rod <i>Streptomyces</i>	10
1.2.1. Životni ciklus streptomiceta.....	11
1.2.2. Organizacija genoma streptomceta.....	12
1.2.3. Streptomicete kao proizvođači sekundarnih metabolita	13
1.2.4. <i>Streptomyces durmitorensis</i> MS405 ^T	14
1.3. Sinteza sekundarnih metabolita.....	17
1.3.1. Sinteza masnih kiselina i poliketida	17
1.3.1.1. Sinteza masnih kiselina ravnog lanca	17
1.3.1.2. Sinteza masnih kiselina račvastog lanca	19
1.3.1.3. Sinteza poliketida.....	20
1.3.1.4. Poliketid sintaze tipa I (PKS I).....	23
1.3.2. Sinteza neribozomalnih peptida (NRPS)	27
1.3.3. Sinteza hibridnih sekundarnih metabolita (NRPS/PKS)	29
1.3.3.1. <i>Red</i> klaster za sintezu undecilprodigiozina	31
1.3.4. Regulacija sekundarnog metabolizma kod streptomiceta.....	34
2. Cilj rada.....	36
2.1. Specifični ciljevi rada	36
3. Materijal i metode.....	38
3.1. Pretraživanje kolekcije aktinomiceta	38
3.1.1. Medijumi za gajenje streptomiceta.....	38
3.1.2. Pravljenje suspenzije spora streptomiceta	39

3.1.3. Identifikacija sojeva koji proizvode bioaktivne metabolite u tečnom medijumu	39
3.1.3.1. Priprema ukupnih ekstrakata kultura	40
3.1.3.2. Merenje apsorpcije ekstrakata u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) delu spektra.....	40
3.1.3.3. Utvrđivanje antibakterijskih i antigljivičnih svojstava	41
3.1.4. Taksonomska identifikacija sojeva.....	41
3.1.4.1. Sekvenciranje gena za 16S rRNA i filogenetska analiza	41
3.1.4.2. Biohemijske analize sojeva	41
3.2. Prečišćavanje i strukturna karakterizacija sekundarnih metabolita.....	45
3.2.1. Preparativna hromatografija.....	45
3.2.1.1. Preparativna tankoslojna hromatografija (PLC).....	45
3.2.1.2. Prečišćavanje na koloni.....	45
3.2.2. Analitičke metode.....	46
3.2.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC).....	46
3.2.2.2. Tečna hromatografija i masena spektrometrija	47
3.2.2.3. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR).....	47
3.3. Bioaktivnost prečišćenih sekundarnih metabolita	48
3.3.1. Difuzioni esej sa diskovima	48
3.3.2. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) bioaktivnih jedinjenja	48
3.3.3. MTT esej.....	49
3.3.5. Ekofiziološka funkcija undecilprodigiozina (UP).....	50
3.3.5.1. Antioksidativna zaštita - vodonik peroksidni esej	50
3.3.5.2. Osetljivost na UV zračenje.....	50
3.3.5.3. Zaštita od delovanja antibiotika.....	51
3.3.5.4. Antioksidativno delovanje undecilprodigozina	51
3.4. Karakterizacija produkcije bioaktivnih jedinjenja	52
3.4.1. Krive rasta sojeva	52
3.4.2. Određivanje produkcije po gramu suve mase micelijuma.....	52

3.4.3. Lokalizacija bioaktivnih jedinjenja	52
3.4.4. Uticaj fizičko-hemijskih faktora na rast i proizvodnju UP kod JS520	53
3.4.5. Optimizacija medijuma za produkciju UP	53
3.4.6. Optimizacija medijuma za produkciju DDHR	54
3.5. Tehnike rekombinantne DNK.....	55
3.5.1. <i>Escherichia coli</i> sojevi, medijumi i plazmidi.....	55
3.5.2. Priprema kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija i elektroporacija	56
3.5.3. Izolovanje plazmidne DNK.....	56
3.5.4. Izolovanje genomske DNK streptomiceta	57
3.5.5. Obrada DNK enzimima	57
3.5.6. Agarozna elektroforeza i prečišćavanje DNK.....	58
3.5.7. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu	59
3.5.8. Reakcija lančane polimerizacije DNK (PCR).....	60
3.5.9. DNK-DNK hibridizacija ("Southern blot")	61
3.5.10. Određivanje primarne strukture DNK (sekvenciranje).....	63
3.6. Kozmidna biblioteka <i>S. durmitorensis</i>	65
3.6.1. Pretraživanje kozmidne biblioteke	65
3.6.2. Pravljenje kozmidnih podbiblioteka	65
3.6.3. Bioinformatička obrada sekvenci	66
3.6.4. Hemijske strukture.....	66
4. Rezultati.....	67
4.1. Odabir sojeva iz kolekcije aktinomiceta	67
4.2. Identifikacija i karakterizacija sojeva NP10 i JS520	69
4.2.1. Biohemijska karakterizacija sojeva	70
4.2.2. Analiza sekvenci 16S rDNK	71
4.2.3. Prisustvo gena za poliketid sintazu.....	72
4.3. Antimikrobna aktivnost ukupnih ekstrakata kultura	73
4.4. Prečišćavanje i karakterizacija bioaktivnih jedinjenja	75
4.4.1. Prečišćavanje i karakterizacija produkata <i>Streptomyces</i> sp. NP10	75

4.4.2. Prečišćavanje i karakterizacija produkata <i>Streptomyces</i> sp. JS520.....	77
4.4.3. Prečišćavanje i karakterizacija produkata <i>S. durmitorensis</i> A10	80
4.5. Biološki testovi sa prečišćenim frakcijama CRE kultura soja NP10, JS520 i <i>S. durmitorensis</i> wt.....	83
4.5.1. Biološka aktivnost prečišćenih frakcija F1 i F3 iz soja NP10	83
4.5.1.1. Antimikrobna svojstva prečišćenih frakcija iz kulture soja NP10.....	83
4.5.1.2. MTT esej sa prečišćenim frakcijama ekstrakta NP10.....	84
4.5.2. Biološka aktivnost prečišćenih frakcija iz JS520	84
4.5.2.1. Antimikrobna svojstva prečišćenih frakcija iz kulture soja JS520	84
4.5.2.3. MTT esej sa prečišćenim frakcijama ekstrakta JS520	85
4.5.3. Biološka aktivnost DDHR	86
4.5.3.1. Antimikrobna svojstva prečišćenog DDHR	86
4.5.2.3. MTT esej sa prečišćenim DDHR.....	87
4.6. Ekofiziološka funkcija undecilprodigiozina i karakterizacija njegove proizvodnje	88
4.6.1. Antioksidativne osobine prečišćenog UP	88
4.6.2. Ekofiziološka uloga UP	89
4.6.3. Uticaj uslova gajenja na produkciju UP	91
4.7. Optimizacija medijuma.....	95
4.7.1. Optimizacija medijuma za produkciju UP.....	95
4.7.2. Optimizacija medijuma za proizvodnju DDHR	98
4.7.2.1. Kriva rasta <i>S. durmitorensis</i> u NE/manitol medijumu	98
4.7.2.2. Optimizacija medijuma	98
4.8. Klaster za DDHR PKS I sintazu	103
4.8.1. Pravljenje podbiblioteka kozmida	103
4.8.2. Sekvenciranje cos83 i cos16 podbiblioteke	103
4.8.3. Pretraživanje kozmidne biblioteke <i>S. durmitorensis</i> i izolacija kozmida sa sekvencom PKS klastera.....	105
4.8.4. 454 sekvenciranje	111
4.8.4.1. Sekvenciranje kozmida cos33	112

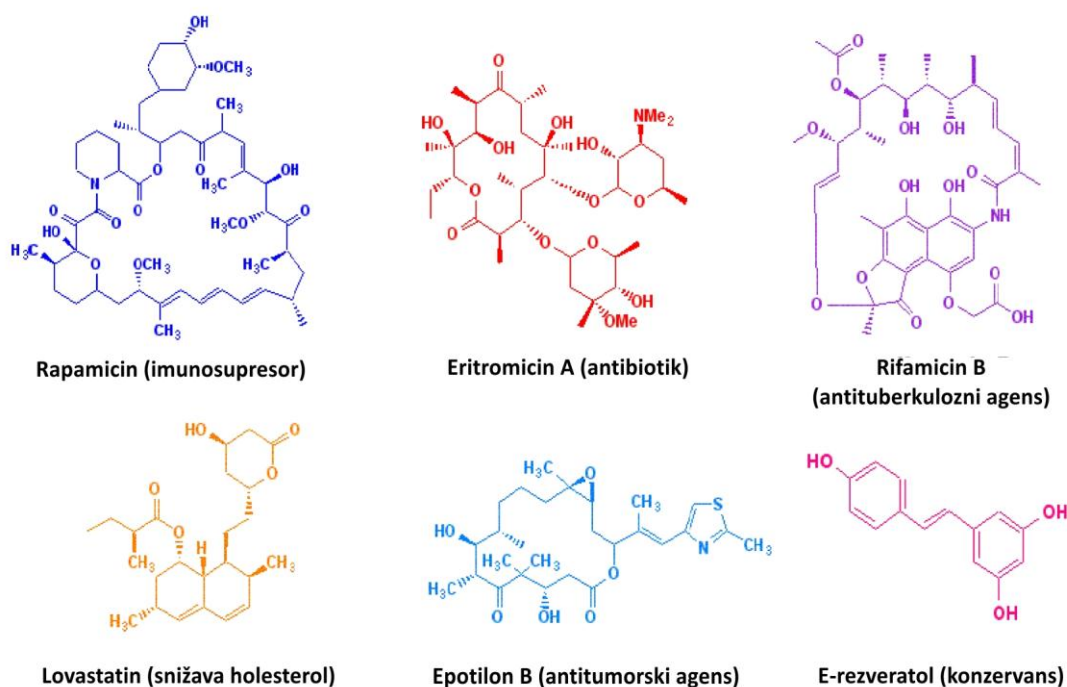
4.8.4.2. Sekvenciranje kozmida cos18	114
4.8.5. Anotacija klastera	116
5. Diskusija	121
5.1. Pretraživanje kolekcije aktinomiceta	122
5.1.1. Kriterijumi odabira izolata iz kolekcije aktinomiceta	122
5.1.2. Kriterijumi za selektovanje odabranih izolata.....	123
5.2. Izolat <i>Streptomyces sp.</i> NP10	126
5.2.1. Karakterizacija izolata NP10.....	126
5.2.2. Bioaktivna jedinjenja soja <i>Streptomyces sp.</i> NP10	127
5.2.2.1. Izopalmitinska kiselina	127
5.2.2.2. Ciklični dipeptidi	129
5.3. Izolat <i>Streptomyces sp.</i> JS520	131
5.3.1. Karakterizacija izolata JS520	131
5.3.2. Sekundarni metaboliti soja <i>Streptomyces sp.</i> JS520 – undecilprodigiozin. 131	
5.4. <i>Streptomyces durmitorensis</i> MS405	138
5.4.1. Bioaktivna jedinjenja <i>Streptomyces durmitorensis</i> - didehidroroflamikoin 139	
5.4.1.1. Klaster za sintezu DDHR	142
5.4.2. <i>Streptomyces durmitorensis</i> A10.....	143
6. Zaključci.....	145
7. Literatura	147
Prilog I: Oligonukleotidi korišćeni u sekvenciranju PKS klastera iz <i>Streptomyces durmitorensis</i> MS405T	166
Prilog II: Izabrani UV/Vis spektri proveranih sojeva iz kolekcije zemljišnih izolata	168
Prilog III: Sporulacija sojeva aktinomiceta iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, IMGGI, na različitim čvrstim podlogama	172
Prilog IV: 16S rDNK sekvence sojeva NP10 i JS520	173

1. Uvod

Razvoj modernog industrijskog društva doneo je čoveku mnoge dobrobiti – stalni rast životnog standarda, ljudske slobode, dostupnost životnih resursa, edukacije i medicinske nege te produžetak životnog veka kao i smanjenje stope smrtnosti pogotovo u infantilnom periodu. Kontinuirani društveni rast kao i povećana očekivanja pojedinca stavljaju stalne i nove izazove pred industriju, poljoprivredu i modernu medicinu. Pritisak da se uvedu nove tehnologije koje će obezbediti dovoljne količine energije i hrane kao i da se proizvedu novi agensi koji će unaprediti ljudsko zdravlje ogroman je, sveprisutan i generisan realnim potrebama svetskog tržišta. Osim toga, sve veća degradacija životne sredine i iscrpljivanje prirodnih resursa doveli su do podizanja ekološke svesti čovečanstva i uveli novi kvalitet u industrijski razvoj – pojavu takozvanih „zelenih“ tehnologija koje vode računa o očuvanju čistoće i celovitosti životne sredine, ponovnoj upotrebi iskorišćenih resursa, korišćenju obnovljivih izvora energije. Jedan od takvih procesa koji poslednjih godina privlači pažnju je biotehnoška produkcija pigmenta za primenu u prehranbenoj i tekstilnoj industriji koji bi zamenili sintetski proizvedene kolorante i ne ekološke procese njihove hemijske proizvodnje (Duran, Teixeira et al. 2002). Novi agensi koje očekujemo na tržištu susreću se sa sve većim izazovima koje moraju da zadovolje sa stanovišta isplativosti, upotrebljivosti i bezbednosti. Stoga novi procesi koje nude farmaceutska i hemijska industrija sve češće se zasnivaju na biološki zasnovanim katalizama (Centi and Perathoner 2009). Najveći generator aktivnih agenasa jesu živi organizmi čiji prirodni proizvodi se nalaze već hiljadama godina u humanoj upotrebi. I pored razvoja hemije, tehnologije i informatike koji daju nemeumljiv doprinos u kreiranju novih, za čoveka važnih bioaktivnih jedinjenja, prirodni proizvodi, usavršavani milionima godina evolucije, izvor su koji je daleko od iscrpljenog (Baltz 2008a).

1.1. Sekundarni metaboliti kao bioaktivna jedinjenja

Prirodna bioaktivna jedinjenja jesu proizvodi biljaka, životinja, gljiva i bakterija. Mogu biti produkti primarnog metabolizma kao što su lipidi (steroidi, prostaglandini, hormoni, neki vitamini), aminokiseline i peptidi (tirozin, proteinski fragmenti, poliamini) nukleozidi, porfirini (Butler 2008), ili produkti sekundarnog metabolizma kao što su alkaloidi, terpenoidi, fenazini, poliketidi, neribozomalni peptidi (Keller, Turner et al. 2005). Tradicionalno, prvi sekundarni metaboliti u humanoj upotrebi bili su sekundarni metaboliti biljaka jer su lako dostupni za izolaciju i korišćenje. Sekundarni metaboliti mikroorganizama (gljiva i bakterija) morali su da čekaju razvoj moderne hemije, farmacije i medicine da bi njihova izolacija i upotreba mogle da počnu.



Slika 1. – Strukture različitih sekundarnih metabolita streptomiceta i njihova primena.

Brojni organizmi iz razdela bakterija, gljiva i biljaka poseduju definisane biohemijske puteve koji nisu u direktnoj vezi sa održavanjem životnog statusa i nisu direktno uključeni u rast, razviće ili reprodukciju. Ovi putevi svrstani su pod zajednički naziv **sekundarni metabolizam**. Sekundarni metaboliti su karakteristika samo

određenog broja vrsta i često su specifični za vrstu. Smatra se da je uloga sekundarnog metabolizma da proizvođačima obezbedi kompetitivnu prednost u prirodnoj sredini te da su na njegov razvoj uticali ekološki faktori kao što su komunikacija u zajednici, kompeticija za izvore hrane, interspecijska odbrana.

Hemijske strukture sekundarnih metabolita pokazuju zadivljujuću raznovrsnost (Slika 1.), mada za polaznu osnovu često imaju metabolite primarnog metabolizma ili "pozajmljene" prekursore iz puteva primarnog metabolizma. To su najčešće relativno mali molekuli, molekulske mase retko veće od 1 500 Da i mogu se podeliti na: 1. alkaloida; 2. terpenoide i steroide; 3. fenilpropanoide; 4. poliketide i masne kiseline; 5. specijalizovane aminokiseline i peptide; 6. specijalizovane ugljene hidrate (Hanson 2003).

Proučavanje sekundarnih metabolita dovelo je do otkrića bioaktivnih molekula koji su našli svoju primenu u medicini i poljoprivredi, te se sekundarni metaboliti mogu podeliti i sa aspekta humane upotrebe i možemo ih klasifikovati kao antibiotike (penicilin, streptomycin, vankomicin), antitumorske agense (taksol, bleomicin), otrove (muskarin, lizergična kiselina), agense za kontrolu bola (morfin), insekticide (avermektin, piretrin I), pesticide (makulozin), antiinflamatorne agense (salicilna kiselina), imunosupresive (ciklosporin A, FK506). Pored nesumnjivog doprinosa medicini ovi metaboliti imaju i veliki doprinos u fundamentalnim biološkim istraživanjima, na primer putevi intraćelijske signalne transdukcije su rasvetljeni proučavanjem delovanja ciklosporina A, FK506 i rapamicina (Nisbet and Moore 1997).

1.1.1. Kolekcije bakterija kao izvor novih bioaktivnih jedinjenja

Kolekcije sredinskih izolata dugo su bile jedini način izolacije novih prirodnih bioaktivnih jedinjenja. Traganje za biološki aktivnim prirodnim proizvodima tradicionalno je podrazumevalo analizu ekstrakata mikroorganizama ili biljaka u odgovarajućem biološkom testu. Potpuno drugačiji pristup, uveden kasnije, zasnivao se na fizičko-hemijskim pretragama u kojima se obično vrši poređenje nepoznate supstance sa supstancama iz banke podataka hemijski generisanih jedinjenja (hemijske biblioteke) (Gordon, Barrett et al. 1994; Ghosh, Nie et al. 2006).

Streptomicete, rod koji prednjači po broju identifikovanih bioaktivnih molekula u odnosu na sve ostale grupe bakterija, rasprostranjen je u površinskim slojevima zemljišta te je formiranje kolekcija izolata relativno lako i jeftino. Ove kolekcije farmaceutska industrija koristi već skoro 70 godina, još od izolovanja streptomicina iz *Streptomyces griseus* u Vaksmanovoj laboratoriji (Waksman) 1943. godine (Comroe 1978). Ipak, sve te kolekcije predstavljaju uzorak samo male kopnene površine, te postoje oblasti koje do sada nisu bile uzorkovane, uključujući i teško dostupne terene (Saintpierre-Bonaccio, Amir et al. 2005) sa ekstremnim klimatskim uslovima (Bruntner, Binder et al. 2005) čije kolekcije predstavljaju veliki potencijalni izvor novih bioaktivnih molekula. Velika nepoznanica do nedavno su bile i akvatične vrste čije se kolekcije danas u velikoj meri pretražuju (Pathom-Aree, Stach et al. 2006; Bredholdt, Galatenko et al. 2007; Hakvag, Fjaervik et al. 2008) i odakle su potekli neki od veoma obećavajućih bioaktivnih molekula (Fiedler, Bruntner et al. 2005).

Iako su danas razvijena i druga rešenja koja nudi metagenomika i funkcionalna genomika, a naročito proteomika na polju otkrivanja novih bioaktivnih jedinjenja i definisanju specifičnih targeta kod patogena (komparativna proteomika: patogen vs. nepatogen), kao i u otkrivanju mehanizma delovanja novih bioaktivnih jedinjenja, pretraživanje kolekcija i dalje je važna polazna osnova u otkrivanju novih agenasa. Mnogi od ovih sistema pretrage koji podrazumevaju upotrebu metoda molekularne biologije, robotike, minijaturizacije, automatizacije i raznovrsnih sistema za detekciju, nisu dovoljno diskriminativni kada se radi o analizi kompleksnih smeša kao što su uzorci po završenoj fermentaciji mikroorganizama. U cilju pronalaženja novih bioaktivnih jedinjenja mnogo truda se ulaže u inicijalna istraživanja koja podrazumevaju optimizaciju medijuma i uslova gajenja kako bi se maksimalno pospešila proizvodnja željenog jedinjenja. Boljim razumevanjem taksonomskih ili filogenetskih odnosa unutar taksona od interesa moguće je dovesti u vezu metabolički potencijal vrsta ili sojeva sa filogenetskim položajem unutar taksona, kao i utvrditi da li se određeni metaboliti proizvode od strane određene klade unutar taksona ili je svojstvo "nasumično" raspoređeno unutar definisane taksonomske grupe (Bull, Ward et al. 2000). Znanja ovog tipa mogu racionalizovati proces uzorkovanja mikroorganizama koji će se analizirati za dato svojstvo.

1.1.2. Bakterijska taksonomija i izučavanje sekundarnih metabolita

Dosadašnje iskustvo u pretraživanju kolekcija izolata ukazuje na nedovoljno poznavanje kolekcije mikroorganizama sa kojom se radi, a sa druge strane ukazuje na važnost poznavanja taksonomskih odlika izolata, naročito kada se ima u vidu da je većina pripadnika različitih kolekcija svrstana samo do nivoa roda na osnovu morfoloških i nekoliko fenotipskih karakteristika.

Taksonomska klasifikacija je proces pri kome različite organizme svrstavamo, na osnovu većeg broja karakteristika, u grupe kojima se zatim određuje položaj u određenoj hijerarhizovanoj shemi (Tucić and Cvetković 2000). Imajući u vidu brojne definicije vrste dva se koncepta izdvajaju svojom univerzalnošću i mogućom primenom u klasifikaciji svih živih organizama: fenetički i evolutivni (Hull 1997). Kod prokariota koncept vrste nije tako jasan kao kod eukariota s obzirom da univerzalni koncept zapravo ne postoji, te je samim tim i definicija vrste problematična (Hull 1997). Generalno, vrsta se kod prokariota posmatra kao grupa sojeva koji pokazuju visok nivo sveukupne sličnosti i značajno se razlikuju od srodnih grupa po mnogim nezavisnim karakteristikama (Colwell, Clayton et al. 1995). Fenetički koncept počiva na sličnosti zasnovanoj na statističkom kovariranju karakteristika koje ne moraju biti univerzalne među pripadnicima datog taksona. Fenetička definicija je nastala iz empirijskih potreba opisivanja vrsta kod prokariota ali se pokazala kao postojana i operativna. Evolutivni koncept vrste zasniva se na linijama utemeljenim u vremenu i smatra se da predstavlja primarni koncept koji može da razmatra sve poznate tipove vrsta (Mayden 1997), ali kao takav nije primenljiv u operativnom smislu kod prokariota.

Trenutno najšire zastupljeni koncept vrste u mikrobiologiji pokušava da objedini pomenuta dva koncepta navodeći da je vrsta skup monofiletskih i genomski koherentnih pojedinačnih organizama među kojima postoji visok nivo sveukupne sličnosti paralelno sa mnogim individualnim karakteristikama i dijagnostički diskriminativnim fenotipskim svojstvima (Rossello-Mora and Amann 2001). Danas postoje različite metode koje se koriste u cilju identifikacije različitih mikroorganizama u njihovim staništima i identifikacije novih izolovanih vrsta, a neke od njih uključuju numeričku analizu fenotipskih karakteristika (Kaempfer, Kroppenstedt et al. 1991), određivanje profila masnih kiselina (Saddler, O'Donnell et al. 1987), analizu sekvenci ribozomalnih proteina

(Ochi 1995), analizu polimorfizama dužina restrikcionih fragmenata (Clarke, Ritchie et al. 1993), DNA-DNA hibridizacije studije (Labeda 1992) i analizu sekvenci za 16S rRNK gena (Stackebrandt, Witt et al. 1991; Mehling, Wehmeier et al. 1995). Treba naglasiti da sve ove metode imaju određena ograničenja i koriste se izborno na osnovu problematike koja se izučava.

1.1.3. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata

Geni za ribozomalne DNK (rDNK) se danas najčešće koriste kao molekularni hronometri pri analiziranju mikrobiološke filogenije i sistematike. Kod većine ispitanih bakterijskih taksona ribozomalni geni za rRNK molekule su raspoređeni u operone po redosledu: 16S-23S-5S rDNK i oni se prepisuju zajedno u vidu policistranske RNK. Obradom policistranske RNK dobijaju se zreli RNK molekuli koji će se naći u ribozomalnim subjedinicama (Perez Luz, Rodriguez-Valera et al. 1998). Organizacijom ribozomalnih gena u poligenске operone osigurava se da se sve tri vrste ribozomalnih RNK molekula produkuju u ekvimolarnim količinama u ćeliji.

Značaj 16S rDNK sekvence u taksonomiji je pokazan na velikom broju slučajeva u kojima je upotreba ovog genetičkog markera u potpunosti redefinisala filogenetske odnose koji su bili utvrđeni na osnovu morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika. Sekvenca 16S rRNK gena je odličan parametar za utvrđivanje odnosa između i unutar rodova usled konzerviranosti svoje sekvence kod vrsta i rodova. Metoda koja se danas najčešće koristi za identifikaciju taksonomskih grupa je amplifikacija 16S ribozomalne DNK (rDNK) reakcijom lančane polimerizacije (PCR) pomoću prajmera koji su dizajnirani na osnovu visoko konzerviranih regiona 16S rRNK gena. Poređenjem dobijenih 16S rDNK sekvenci sa bazom podataka omogućava se rekonstrukcija filogenetske pozicije ispitivanog soja, a samim tim tako dobijeni rezultati se mogu iskoristiti za determinaciju filogenetskih i evolutivnih odnosa između organizama (Mehling et al., 1995). Primarna struktura 16S rRNK molekula se odlikuje prisustvom konzerviranih i varijabilnih regiona. U 16S rRNK streptomiceta razlikuju se tri varijabilna regiona: α - (982-998, po nomenklaturi *S. ambofaciens*), β - (1102-1122) i γ -region (150-200) (Pernodet et al., 1989; Stackebrandt et al., 1991). Najviše nukleotidnih zamena kod aktinomiceta je locirano u γ - i α -regionu, dok β -region

pokazuje manju varijabilnost među različitim aktinomicetama. Varijabilni regioni 16S rRNK molekula mogu poslužiti za određivanje filogenetske pozicije ispitivanog soja (Woese 1987). Određeni regioni u 16S rRNK genu mogu biti specifični za određenu filogenetsku grupu što olakšava dizajniranje proba specifičnih za rod, dok se varijabilni regioni mogu iskoristiti u određivanju pripadnosti ispitivanog soja nižim taksonomskim grupama. Na taj način se pomoću PCR tehnike mogu direktno identifikovati izolati bez prethodnog kultivisanja, što je vrlo važno s obzirom da je poznato da se većina mikroorganizama ne može kultivisati u laboratorijskim uslovima i samim tim 80%-90% mikroorganizama ostaje neidentifikovano (Chun, Huq et al. 1999).

Drugi značajni hronometar je intergenski region između 16S i 23S rRNK gena (ITR). rRNK operon (*rrn*) je često prisutan u većem broju u bakterijskom hromozomu i broj kopija se kreće od 1-14 (Hain 1997). *rrn* operoni najčešće nisu međusobno identični (intercistronska heterogenost). Najčešći uzrok intercistronske heterogenosti je upravo varijabilnost regiona između 16S, 23S i 5S rRNK gena. 16S-23S rRNK ITR region pokazuje bržu evoluciju čime obezbeđuje informacije o odnosima između sojeva. Uloga ITR regiona u sazrevanju policistronske RNK još uvek nije u potpunosti razjašnjena. ITR regioni se razlikuju po dužini i sekvenci kako između različitih grupa prokariota tako i unutar jednog genoma što ih čini veoma dobrim genetičkim markerima u bakterijskoj klasifikaciji (Jensen 1993). Dužina 16S-23S rDNK ITR regiona kod streptomiceta je ~ 300 bp (303 bp kod *S. coelicolor*, 277 bp kod *S. ambofaciens*, 278 bp kod *S. lividans*), dok je dužina 23S-5S rDNK ITR regiona nešto manja (82 bp kod *S. ambofaciens*) (Baylis 1988; Pernodet 1989). U najvećem broju slučajeva, ITR varijabilnost proizilazi iz nukleotidnih supstitucija ili usled prisustva odnosno odsustva nukleotidnih blokova.

1.1.4. Novi eseji za detekciju bioaktivnih sekundarnih metabolita - *Saccharomyces cerevisiae* FAV20

Pored novih tehničkih rešenja usmerenih ka povećanju efikasnosti pretraživanja kolekcija, uvođenje poboljšanih bioloških testova sa organizmima "dizajniranim" da detektuju prisustvo određene molekularne strukture značajno ubrzava dolazak do ciljane grupe novih jedinjenja. Soj pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FAV20

konstruisan je kao model organizam za testiranje aktinomiceta proizvođača sekundarnih metabolita sa načinom delovanja sličnim imunosupresoru FK506 (Skoko, Vujovic et al. 2005). Pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednoćelijski eukariotski organizam. Njegov genom je sekvenciran, a genetika dobro proučena što je uz veliku kolekciju mutanata i razvijenih oruđa za funkcionalnu analizu gena i njihovih produkata doprinelo ubrzanom proučavanju delovanja i uloge kvašćevih proteina (Winzeler, Shoemaker et al. 1999). Poliketidni imunosupersanti FK506 i FK520 su značajni terapijski agensi za prevenciju odbacivanja grafta nakon transplantacije organa i kostne srži i za tretiranje autoimunih oboljenja (Parsons, Sigal et al. 1993). Iako su sintetisani analozi FK506 i FK520, koji su dali vredne podatke o vezi strukture i aktivnosti (Hamilton and Steiner 1998), kompleksnost ovih molekula isključuje sintezu mnogih potencijalno željenih analoga. Stoga je kloniranje novih PKS domena koji pokazuju homologe funkcije ili relaksiranu supstratnu specifičnost jedan od puteva prema kombinatorijalnoj biosintezi koji bi mogao da prevaziđe probleme vezane za supstratnu specifičnost nakon zamene domena i omogućiti dobijanje korisnih analoga (Reeves, Murli et al. 2001; Del Vecchio, Petkovic et al. 2003; Nguyen, Ritz et al. 2006).

Makrolidni antibiotik FK506 suprimira produkciju interleukina-2 od strane T-limfocita onemogućavajući transdukciju signala neophodnih za njihovu aktivaciju delovanjem na kalcijum osetljivu fosfatazu kalcineurin (Dumont 2000). FK506 se vezuje za familiju imunofilina - proteine nazvane FK506 vezujući proteini (*eng.* FK Binding Protein, FKBP). Kompleks FK506-FKBP12 vezuje se za kalcineurin sprečavajući njegovu fosfataznu aktivnost. Kao posledica, ne dolazi do translokacije u jedro nuklearnog faktora aktiviranih T-limfocita (NFAT) koji aktivira transkripciju interleukina-2 i srodnih citokina.

Kod pekarskog kvasca, mnogi sojevi nisu senzitivni na delovanje imunosupresora kao što su FK506 i FK520 zato što za njihov vegetativni rast nije neophodno delovanje enzima kalcineurina. Međutim, identifikovani su i mutanti senzitivni na ove imunosupresore kod kojih je kalcineurin esencijalan za preživljavanje. Ovi mutanti mogu poslužiti za testiranje različitih sojeva streptomiceta u cilju utvrđivanja da li proizvode imunosupresore koji se vezuju za kalcineurin. Jedan od gena neophodnih za vegetativni rast kvasca je i *VMA22* gen koji zajedno sa genima *VMA12* i *VMA21* kodira proteine endoplazmatičnog retikuluma neophodne za izgradnju

vakuolarnog ATP-aznog kompleksa (Kane, Yamashiro et al. 1989). Vakuola kvasca je organela koja reguliše kiselost u ćeliji. U membrani vakuole, tonoplastu, se nalaze brojne proton-translocirajuće ATP-aze koje su uključene i u procese skladištenja različitih metabolita u ćeliji, degradaciju makromolekula, a primarna uloga im je održavanje stabilne jonske ravnoteže. Kod kvasca vakuolarna ATP-aza se sastoji od više subjedinica kodiranih različitim *VMA* genima (Kane, Yamashiro et al. 1989). *vma22* mutanti ne formiraju zrelu vakuolarnu ATP-azu što dovodi do kalcijum senzitivnog i kalcijum zavisnog fenotipa koga karakteriše višestruko povećanje koncentracije kalcijuma u citoplazmi, te ove ćelije zavise od funkcije kalcineurina i nisu vijabilne u prisustvu agenasa koji deluju na kalcineurin (Hemenway, Dolinski et al. 1995). Imajući u vidu funkciju *VMA22* gena soj FAV20 *S. cerevisiae* konstruisan je metodom jednostepene genske disrupcije i pokazana je njegova senzitivnost na FK506, te je korišćen tokom ove studije kao model sistem u inicijalnim pretragama kolekcije aktinomiceta.

1.2. Rod *Streptomyces*

U bakterijskom, a može se slobodno reći i celokupnom živom svetu sasvim posebno mesto zauzimaju bakterije klase *Actinobacteria*, razdela *Actinobacteria* (ranije *Actinomycetes*), Gram-pozitivne bakterije koje nastanjuju najvećim delom zemljišta i vode, manjim brojem biljke i životinje, uz nekoliko primera patogena kao što su pripadnici roda *Mycobacterium*. Aktinomicete su proizvođači velikog broja aktivnih jedinjenja veoma različitih hemijskih struktura, a po ovoj sposobnosti posebno se izdvajaju rod *Streptomyces* iz familije *Streptomycetaceae* i, ne tako davno otkriveni, rod *Salinispora* iz familije *Micromonosporaceae* (Mincer, Jensen et al. 2002). Ipak, rod *Streptomyces* i dalje je bez premca po broju bioaktivnih jedinjenja koja su otkrivena, okarakterisana i uvedena u uporebu. Eksploatacija bakterija ovog roda počela je 40-ih godina XX veka (Wallace, Rhymer et al. 1945; Carter, Gottlieb et al. 1948) i traje i danas. Polovina antibiotika prirodnog porekla u trenutnoj kliničkoj upotrebi sintetisana je od strane ovog roda, a prema nekim procenama još oko 100 000 novih antibiotika moglo bi da bude otkriveno (Watve, Tickoo et al. 2001). Osim antibiotika koji su prvi otkriveni i uvedeni u kliničku praksu produkti roda *Streptomyces* deluju i kao antimikotici, antitumorski agensi, imunosupresivi, antihelminthici, insekticidi, pesticidi (Slika 1.) (Firn and Jones 2000). Ovakvo bogatstvo i raznolikost aktivnih molekula posledica je osobenog metabolizma ovih bakterija i predstavlja naizgled neiscpan izvor kako „gotovih proizvoda“ tako i polaznih struktura za hemijsku sintezu novih aktivnih jedinjenja.

Streptomicete su saprofitne bakterije zemljišta i voda koje se karakterišu kompleksnom morfološkom diferencijacijom. Rod *Streptomyces* sadrži trenutno najveći broj opisanih vrsta (576 vrsta do 2010. (Labeda 2011), po drugim izvorima preko 900 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>)) koji se uvećava svake godine. Pripadnici ovog roda mogu nastanjivati različite ekološke niše od umerenih (temperaturni optimum od 25-35°C, optimum pH opsega između 6,5-8,0 (Holt, Krieg et al. 1994)) do ekstremnih kao što su sedimenti dubokih voda (Pathom-Aree, Stach et al. 2006; Tian, Xu et al. 2012), alkalna zemljišta (Antony-Babu and Goodfellow 2008), oblasti niskih (Li, Zhang et al. 2002) ili visokih (James, Edwards et al. 1991) temperatura. Streptomicete su aerobne i hemoorganotrofne bakterije sa ćelijskom organizacijom

tipičnom za prokariote – fibrilarni nuklearni region u kome ne postoji morfološki diferencirano jedro, granularna citoplazma sa ribozomima tipa 70S, odsustvo citoplazmatičnih organela odeljenih membranom i ćelijska membrana sastvaljna od lipidnog dvosloja. Ćelijski zid streptomiceta slične je građe kao i kod drugih Gram-pozitivnih bakterija i često varira, obično se povećavajući sa starošću kulture (Locci and Sharples 1984). Ćelijski zid nije “acid-fast”, sastoji se od peptidoglikana asociranih sa jednim ili više polimera kao što su tejhojna kiselina i neutralni polisaharidi i sadrži L-diaminopimeličnu kiselinu (L-DAP), izo-, anteizo- masne kiseline, heksa- ili oktahidrogen menakinone sa devet izoprenskih jedinica kao i polarne lipide koji sadrže difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol i fosfatidilinozitol manozidazu. Streptomicete imaju sposobnost redukcije nitrata do nitrita, katalaza pozitivne su, razgrađuju adenin, eskulin, želatin, kazein, hipoksantin, skrob i L-tirozin. Za rast mogu koristiti različita jedinjenja kao izvore ugljenika.

1.2.1. Životni ciklus streptomiceta

Streptomicete imaju složeni životni ciklus tokom koga razvijaju razgranati supstratni micelijum na kojem se razvija vazdušni micelijum. Vazdušni micelijum sastoji se od mreže hifa koje prekrivaju površinu kolonije i daju joj tipičan paučinast ili brašnast izgled. U prisustvu signala koji nisu još uvek u potpunosti okarakterisani, a posledica su smanjenja količine nutrijenata u spoljašnjoj sredini, vegetativni supstratni micelijum počinje da formira hife. Na formiranje ove taksonomski važne karakteristike utiču različiti faktori između ostalih i sastav hranjivog medijuma, temperatura, prisustvo specifičnih supstanci koje mogu imati stimulatorni efekat. Formiranje vazdušnog micelijuma je neuobičajeno za prokariote i može se smatrati da predstavlja adaptaciju na uslove života u zemljištu naročito ako je poznato da tipični akvatični predstavnici streptomiceta ne formiraju vazdušni micelijum (Locci and Sharples 1984). Razvoj vazdušnog micelijuma završava se sporulacijom (Slika 2.) što ujedno predstavlja i završetak životnog ciklusa. Spore, čijim klijanjem se formira supstratni micelijum, nastaju fragmentacijom hifa vazdušnog micelijuma i kod većine predstavnika roda *Streptomyces* su nepokretne, glatkih površina (Holt, Krieg et al. 1994). Paralelno sa razvojem vazdušnog micelijuma, supstratni micelijum počinje da produkuje različite

sekundarne metabolite. Ova dva procesa su vremenski usklađena i međusobno zavisna, jer mutanti koji ne sporulišu ne sintetišu ni sekundarne metabolite (Bibb 2005).

1.2.2. Organizacija genoma streptomceta

Streptomicete spadaju među bakterije sa najvećim genomima. Poseduju linearni hromozom dužine oko 8 do 10 Mb kao i visoki GC sastav od 70 - 75 mol% (Wenner, Roth et al. 2002). Trenutno se u raznim fazama sekvenciranja nalazi oko 30 genoma streptomiceta, ali genom *Streptomyces coelicolor* A3(2), prvi sekvencirani genom streptomiceta dao je uvid u model organizacije genoma kod ovih bakterija koji su kasnije sekvencirani genomi potvrdili (Ikeda, Ishikawa et al. 2003). *S. coelicolor* A3(2) poseduje jedan linearan hromozom i dva plazmida, jedan linearan, drugi cirkularan. Hromozom ima 8,67 Mb (8 667 507 bp) sa oridžinom replikacije smeštenim u sredini, dok se na krajevima nalaze invertovani ponovci (Bao and Cohen 2001). Na 5' kraju nalaze se kovalentno vezani proteini. Smatra se da je hromozom podeljen u 3 regiona – konzervirani središnji region (*eng.* core) i dva bočna, varijabilna subtelomerna regiona (*eng.* arms). Središnji region zauzima manje od 50% hromozoma i u njemu su mešteni geni esencijalni za opstanak koji regulišu procese kao što je deoba ćelije, DNK replikacija, transkripcija, translacija i sinteza amino kislina (Bentley, Chater et al. 2002). Bioinformatičkim poređenjem 5 genoma pripadnika roda *Streptomyces* veličina središnjeg regiona svedena je na 33-45% (Zhou, Gu et al. 2012). Terminalni regioni su kod *S. colicolor* različite dužine (oko 1,5 Mb i oko 2,3 Mb) i sadrže gene koji nisu esencijalne za preživljavanje ćelije kao što su geni sekundarnog metabolizma, hidrolitičkih enzima, oknzervona (konzerviranih operona), proteina gasnih vezikula (Bentley, Chater et al. 2002). Za genom streptomiceta karakteristično je postojanje velikog broja dupliranih gena. Od 4% do 11% celog genoma sastoji se od umnožaka specifičnih za soj (*eng.* lineage-specific expansions, LSEs), što sugeriše da česte duplikacije i lateralni transfer kako pojedninačnih gena tako i hromozomskih blokova igraju ulogu u oblikovanju diverziteta genoma unutar roda (Zhou, Gu et al. 2012).

1.2.3. Streptomicete kao proizvođači sekundarnih metabolita

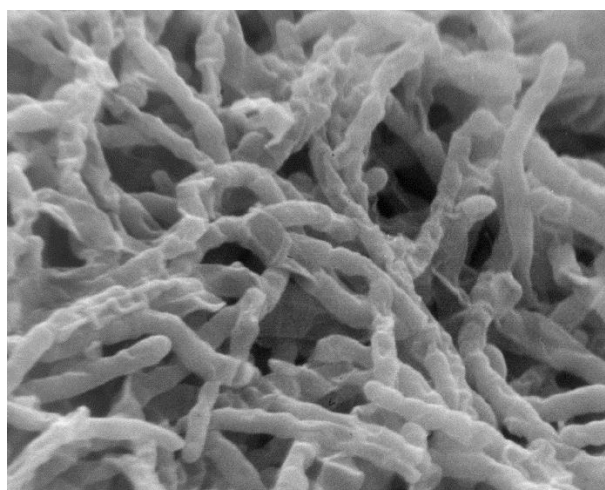
Biološka funkcija većine sekundarnih metabolita streptomiceta nije poznata, ali se prepostavlja da imaju adaptivnu ekološku funkciju (Bibb 2005). Najnovije teorije sugerišu da je uloga sekundarnih metabolita primarno u komunikaciji sa dugim mikroorganizmima ili višim organizmima sa kojima bakterija stupa u komensalne, simbiotske ili kompetitivne odnose (Dufour and Rao 2011). Komparativne studije pokazale su da preko 5% genoma streptomiceta zauzimaju geni za sintezu sekundarnih metabolita (Nett, Ikeda et al. 2009). Oni su organizvani u klasterne koji se nalaze na bočnim delovima hromozoma. Veličina klastera varira od nekoliko pa sve do 150 kb koliko iznosi do sada najveći poznati klaster za sintezu stambomicina iz *Streptomyces ambofaciens* koji sam zauzima 2% genoma (Laureti, Song et al. 2011). Analiza genskih klastera sekundarnog metabolizma daje uvid u mehanizme njihove evolucije (Jenke-Kodama, Börner et al. 2006; Fischbach, Walsh et al. 2008; Ridley, Lee et al. 2008). Raznolikost sekundarnih metabolita posledica je procesa horizontalnog transfera gena, tačkastih mutacija, duplikacije, parcijalne delecije ili zamene gena, homologih rekombinacija i transpozicija. Osim toga, funkcionalni genski podklasteri kao, na primer, putevi biosinteze šećera, mogu da se kombinuju i uklapaju i povezuju sa drugim podklasterima kao što su klasteri za poliketid sintaze (PKS) ili sintaze za neribozomalnu sintezu peptida (*eng.* Nonribosomal Peptide Synthetase, NRPS) preko gena za glukoziltransferazu ili drugih gena (Baltz 2008b). Modularne PKS i NRPS su posebno pogodne za ove evolutivne procese (Jenke-Kodama, Börner et al. 2006; Ridley, Lee et al. 2008).

Tek nakon sekvenciranja prvih celokupnih genoma otkriveno je da genomi streptomiceta sadrže preko 20 klastera sekundarnog metabolizma koji kodiraju za sintezu poliketida putem PKS (Staunton and Weissman 2001), peptida putem NRPS (Marahiel and Essen 2009), bakteriocina (Moore 2008), terpenoida, derivata šikimata, aminoglikozida i drugih prirodnih proizvoda (Nett, Ikeda et al. 2009). Ovi klasteri se u većini slučajeva ne eksprimiraju u uslovima kultivacije u laboratoriji i njihova eksploatacija predstavlja veliki potencijal i izazov u otkrivanju novih, za čoveka značajnih sekundarnih metabolita (Corre and Challis 2009). Jedan od pristupa eksploatacije zasniva se na skeniranju genoma u potrazi za kriptičnim klasterima za

sekundarne metabolite i korišćenje karakterističnih motiva PKS i NRPS da bi se predvidele strukture potencijalnih metabolita i, nakon fermentacije, traženje metabolita sa odgovarajućim fizikohemijskim svojstvima (Zazopoulos, Huang et al. 2003). Drugi pristup bio bi „genomizotopni pristup“ - da se, na osnovu predikcije strukture sekundarnog metabolita iz genomskih podataka, kultura „nahrani“ prekursorom obeleženim nekim stabilnim izotopom čija će se ugradnja posle pratiti putem dvodimenzionalne nuklearne magnetne rezonance (Gross, Stockwell et al. 2007). Takođe su razvijeni pristupi koji se zasnivaju na analizi transkriptoma kao i kloniranju kriptičnih biosintetskih puteva u kozmide ili veštačke bakterijske hromosome i ekspresiji u heterolognim domaćinima (Baltz 2008a).

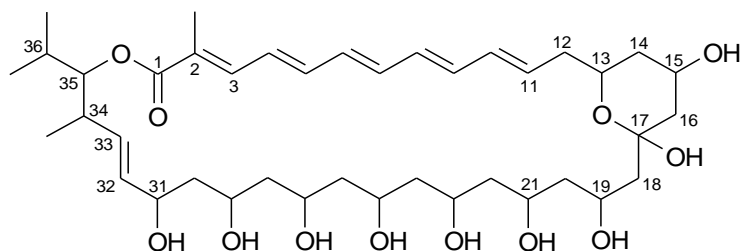
1.2.4. *Streptomyces durmitorensis* MS405^T

Soj MS405 izolovan je iz uzorka zemljišta preklom iz Nacionalnog parka Durmitor u Crnoj Gori (tada SCG) i morfološki, biohemijski i filogenetski detaljno okarakterisan (Savic, Bratic et al. 2007). G+C sastav soja je 72 mol%, a filogenetska stabla generisana na osnovu 16S rRNK sekvence smestila su ovaj soj u *Streptomyces albidoflavus* superklaster sa najvišim stepenom sličnosti sa sojevima *Streptomyces aureus* DSM 41785^T (99,59%) i *Streptomyces kanamyceticus* DSM 40500^T (99,32%). Brojne fiziološke i biohemijske karakteristike razlikuju ovaj soj od najbližih srodnih sojeva te je utvrđeno da soj MS405 (Slika 2.) predstavlja novu vrstu roda *Streptomyces* nazvanu *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. sa tipskim sojem MS405^T (=DSM 41863^T =CIP 108995^T) (Savic, Bratic et al. 2007).



Slika 2. – Elektronska mikrografija vazdušnog micelijuma *Streptomyces durmitorensis* MS405^T sa sporama glatke površine. Preuzeto iz arhive Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, IMGGI.

S. durmitorensis MS405^T proizvodi sekundarni metabolit koji inhibira rast FK506 senzitivnog soja *S. cerevisiae* FAV20 (Odeljak 1.1.4.). U saradnji sa grupom iz Instituta za mikrobiologiju češke akademije nauka ovaj metabolit je prečišćen i okarakterisan i određeno je njegovo citotoksično delovanje na različite ćelije u kulturi (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). Bioaktivni princip koji proizvodi *S. durmitorensis* jeste familija polienskih makrolida srodna antibiotiku roflamikoinu (Schlegel, Thrum et al. 1981) koju čine najzastupljeniji član 32,33-didehidroroflamikoin (**DDHR**) formule $C_{40}H_{64}O_{12}$ i još četiri srodna jedinjenja sa zastupljenošću oko 17% u odnosu na DDHR. DDHR je po svojoj strukturi 36-člani makrolaktonski prsten sa hromoforom od 5 konjugovanih dvostrukih veza koje ga svrstavaju u grupu pentaena i čine hidrofobni kraj molekula. Sa suprotne strane nalazi se poliolni lanac sa 7 hidroksilnih grupa koji zajedno sa C_{17} hemiketalnim regionom predstavlja polarni deo molekula (Slika 3.). Kod različitih ćelijskih linija humanih i mišijih karcinoma DDHR indukuje ćelijsku smrt, prevashodno apoptozom, koja je dozno i vremenski zavisna, sa najvećom stopom smrtnosti ćelija u toku prvih 12 h inkubacije. U eseju sa He-La ćelijskom linijom vidi se da dolazi do velikih promena u fiziologiji ćelija koje su dozno zavisne, a uključuju gubitak F-aktina, fragmentaciju mikrotubula, odlepljivanje ćelija, povećanu permeabilnost za boje i, na kraju, smrt (Stodulkova, Kuzma et al. 2011).



Slika 3. – Struktura 32,33-didehidroroflamikoina. Preuzeto od Stodulkove i saradnika (Stodulkova, Kuzma et al. 2011).

U cilju identifikacije enzima odgovornih za sintezu DDHR iz genomske DNK *S. durmitorensis* prajmerima MAK1/MAK3 umnožen je fragment od 316 bp deponovan u bazi podataka GenBank pod pristupnim brojem AY954364 koji pripada KS domenu PKS I (Savic and Vasiljevic 2006). Ovaj fragment poslužio je za konstrukciju inaktivacione kasete sa marker genom za rezistenciju na tiosstrepton (Tsr) na plazmidu pIM15PKS kojim je izvršena transformacija *S. durmitorensis* i izolovan Tsr rezistentni klon

S. durmitorensis A10 bez sposobnosti produkcije DDHR (Bratić 2006). Odsustvo zone inhibicije kod soja FAV20 u esaju sa ekstraktom kulture klona A10 smatrano je dovoljnom indikacijom da mutant A10 ne proizvodi funkcionalni DDHR, te da je mutagenozom ciljane PKS I zadužena za njegovu sintezu. Stoga se pristupilo određivanju primarne strukture njenog genskog klastera. U tu svrhu prvo je konstruisana kozmidna biblioteka genoma *S. durmitorensis* u SuperCos 1 vektoru (Stratagene, La Jolla, CA, SAD) i ova biblioteka pretražena je DNK-DNK hibridizacijom pomoću obeležene probe koju je činio upravo fragment KS od 316 bp dobijen MAK1/MAK3 prajmerima (Savić M, Bratić I, neobjavljeni rezultati). Izolovana su 4 kozmidna klona cos16, cos83, cos85 i cos135 koji su poslužila kao polazište za sekvenciranje klastera za sintezu DDHR tokom ove studije.

1.3. Sinteza sekundarnih metabolita

Sinteza sekundarnih metabolita streptomiceta koristi posebne metaboličke puteve koji nisu esencijalni za život ćelije i aktiviraju se u uslovima morfološke diferencijacije i sporulacije. Prekursori sekundarnog metabolizma jesu često isti kao u putevima primarnog metabolizma ili predstavljaju derivate primarnih metabolita. Enzimi sekundarnog metabolizma su organizovani u multienzimske sisteme, a njihovi geni su grupisani u klastere.

1.3.1. Sinteza masnih kiselina i poliketida

Putevi sinteze poliketida i masnih kiselina u živim organizmima su homolog i koriste isti hemijski mehanizam Klajzenove (Claisen) kondenzacije (Slika 4.) i model izgradnje dugog ugljovodoničnog lanca od istih jednostavnih gradivnih prekursorskih blokova kao što su acetilni i malonilni ostaci.



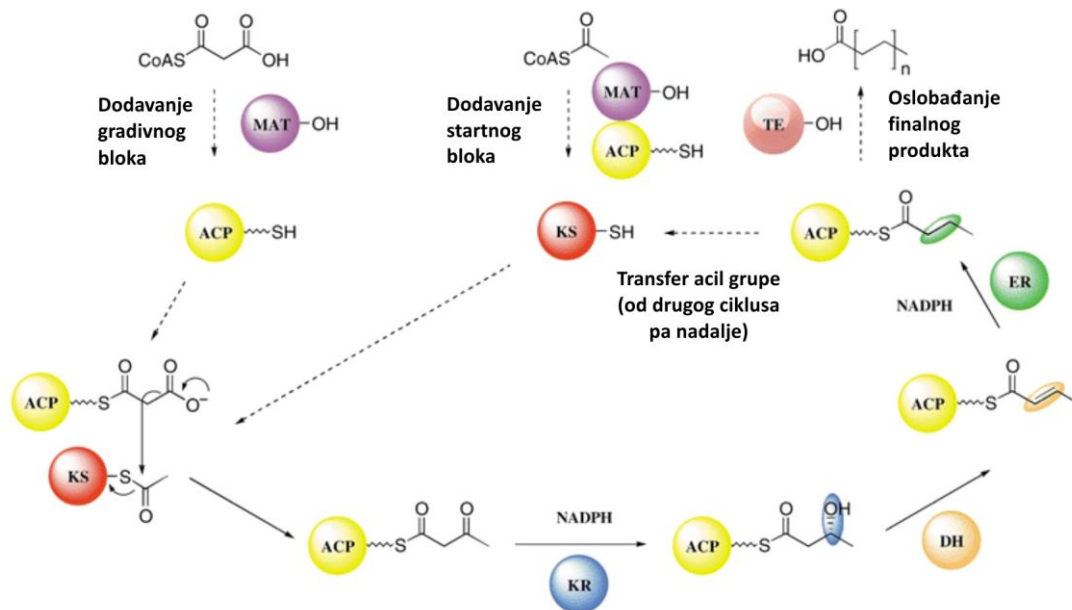
Slika 4. – Klajzenova kondenzacija. Dva estarska molekula formiranjem nove C-C veze daju β -keto ester (β -diketon) i alkohol.

Enzimi koji učestvuju u izgradnji lanca u ova dva biosintetska puta takođe su homolog tako da je uvid u procese sinteze masnih kiselina u velikoj meri doprineo rasvetljavanju procesa sinteze poliketida i bio vodilja na putu daljih istraživanja (Staunton and Weissman 2001).

1.3.1.1. Sinteza masnih kiselina ravnog lanca

Sinteza masnih kiselina je esencijalan proces za svaku živu ćeliju. Masne kiseline sintetišu enzimi sintaze masnih kiselina (*eng.* Fatty Acid Synthase, FAS) od acetilnih i malonilnih gradivnih blokova. Ovi gradivni blokovi nalaze se vezani za koenzim A (CoA) te prvo malonil-CoA:ACP transacilaza (malonil-acetil transferaza (MAT)) (Szafranska, Hitchman et al. 2002) prebacuje malonilnu grupu na tiolni ostatak odgovarajućeg enzimskog domena. Sinteza započinje kondenzacijom startnog molekula

- acil gradivnog bloka i to obično acetilnog, sa malonilnom gradivnom jedinicom (Slika 5.). U procesu dekarboksilacije formira se nova C-C veza. Nastali β -keto ester se zatim redukuje, dehidriše i ponovo redukuje da bi dao lanac sa zasićenim C-C vezama duži za 2 C atoma. Koraci sukcesivnih ekstenzija sastoje se od daljih dodavanja malonilnih gradivnih blokova koji se ponavljaju u orijentaciji glava-rep dok lanac ne dostigne odgovarajuću dužinu (Slika 5.). Acil gradivni blokovi učestvuju u reakciji tako što su u obliku tioestara vezani za enzime sinteze masnih kiselina. Startni acilni molekul je vezan tioestarskom vezom za cisteinski ostatak keto sintaze (KS) koja katalizuje korak kondenzacije. Malonatna gradivna jedinica koja produžava lanac vezana je tioestarskom vezom za protein nosač acilne grupe (*eng.* acyl carrier protein, ACP). Ova tiolna veza se ne ostvaruje preko amino kiselinskog ostatka samog proteina, već preko 20 Å duge fosfopanteteinske grupe posttranslaciono dodate na ovaj enzim uz pomoć fosfopanteteniltransferaze (*eng.* phosphopantetenyl-transferase, PPTase) (Elovson and Vagelos 1968). Pre hemijske modifikacije ACP proteina, ACP protein se nalazi u neaktivnoj *apo* formi. Nakon modifikacije PPTazom, *apo* forma prelazi u *holo* formu koja postaje hemijski kompetentna za vezivanje acil grupa (Lambalot and Walsh 1997). Fosfopanteteinska grupa funkcioniše kao dugački fleksibilni krak koji rastući lanac prenosi do enzima odgovornih za nadogradnju lanca. Nakon kondenzacije rezultujući β -keto ester je vezan za ACP. U sledećim koracima keto ester se redukuje posredstvom keto reduktaze (KR), dehidriše posredstvom dehidrataze (DH) i konačno ponovo redukuje posredstvom enoil reduktaze (ER). Ovaj sled reakcija završava prvu rundu elongacije lanca. Ciklus se zatim ponavlja prebacivanjem zasićenog lanca sa ACP na KS gde ga "čeka" novi malonatni gradivni blok za elongaciju. Sukcesivno ponavljanje ciklusa elongacija dovodi do porasta lanca do određene dužine, obično od 14, 16 ili 18 C atoma. Tada se lanac prebacuje na tioesterazu (TE) koja oslobađa lanac sa enzima u obliku kiseline ili acil estra (Slika 5.) (Staunton and Weissman 2001).



Slika 5. – Ciklus sinteze masnih kiselina. MAT - malonil-acetil transferaza; ACP - protein nosač acil grupe; KS - ketosintaza; KR - ketoreduktaza; DH - dehidrataza; ER - enoil reduktaza. Adaptirano prema Stautonu i Vajsmanovoj (Staunton and Weissman 2001).

Sve FAS imaju isti set komponenti - KS, ACP, KR, DH, ER i TE, međutim u zavisnosti od toga kako su ove komponente organizovane postoje dva tipa FAS, I i II. Kod FAS I (nalaze se kod životinja i kvasaca) one su organizovane u obliku multifunkcionalnih enzimskih kompleksa, dok su FAS II solubilni sistemi sastavljeni od individualnih enzimskih jedinica i sreću se kod viših biljaka i bakterija (Kaneda 1991).

1.3.1.2. Sintaza masnih kiselina račvastog lanca

Masne kiseline ravnog niza su karakteristične za membrane svih živih organizama, dok se kiseline račvastog niza sreću uglavnom kod bakterija (Brennan 1988). Obično su to zasićene masne kiseline sa metil grupom na predposlednjem (izokiseline) ili pred predposlednjem (anteizokiseline) C atomu. Masne kiseline račvastog niza utiču na povećanje fluidnosti membrane što se odražava na sposobnost bakterije da raste. Za *Bacillus subtilis* određen je minimalni udeo kiselina račvastog niza od 28% potreban za rast ćelije (Kaneda 1988). Sastav i zastupljenost račvastih masnih kiselina je karakterističan za vrstu i varira znatno unutar roda. Tako *Streptomyces venezuelae* ima 88% račvastih masnih kiselina, dok *S. afghaniensis* ima 39% (Kaneda 1991). Sastav i zastupljenost račvastih masnih kiselina takođe variraju i od uslova

okoline – temperature, pH, nivoa kiseonika, izvora ugljenika, faze rasta, dostupnosti prekursora i predstavljaju jedan od odgovora bakterija na sredinski stres.

Za razliku od FAS koje sintetišu masne kiseline ravnog niza, za sintezu kiselina račvastog niza zadužene su sintaze kiselina račvastog niza (*eng.* Branched-Chain Fatty Acid Synthase, BFAS). FAS i BFAS enzimski sistemi razlikuju se po supstratnoj specifičnosti acil-CoA:ACP transacilaze pri vezivanju startnog prekursora. U sintezi izo- račvastih masnih kiselina dugog lanca kao startni molekul služe acil-CoA račvastog kratkog lanca sa 3-6 C atoma kao što su izobutiril-CoA (derivat valina) i izovaleril-CoA (derivat leucina). Kada je startni prekursor vezan za ACP elongacija se događa dodavanjem C₂ malonilnih gradivnih blokova na isti način u oba sistema (Kaneda 1991).

1.3.1.3. Sinteza poliketida

Poliketidna jedinjenja su značajna grupa prirodnih proizvoda bakterija (pre svega aktinomiceta) i gljiva, velike strukturne raznolikosti i od izuzetnog medicinskog značaja jer su među njima pronađena jedinjenja sa antibakterijskim, antifungalnim, antitumorskim, antiparazitskim i imunosupresivnim delovanjem. Kompleksni poliketidi su veoma raznovrsni u svom delovanju. Uloga poliketidnih jedinjenja u životnom ciklusu njihovih proizvođača mogla bi da ima veze sa odbijanjem kompetirajućih mikroorganizama u uslovima ograničenosti hranljivih materija (Pfeifer and Khosla 2001) jer čini se da je svaki poliketidni antibiotik evoluirao da veže ciljni molekul kod kompetitivnih organizama. Tako na primer eritromicin A vezuje se za bakterijske ribosome (Bulkley, Innis et al. 2010), epotilon A za α/β -tubulin (Nettles, Li et al. 2004), svinholid A za aktin (Klenchin, King et al. 2005), rifapentin (derivat rifamicina) za RNK polimerazu (Artsimovitch, Vassylyeva et al. 2005), rapamicin za FKBP12/mTOR (Choi, Chen et al. 1996), simvastatin (derivat lovastatina) za HMG-CoA reduktazu (Istvan and Deisenhofer 2001), hipothemicin za ERK2 (Rastelli, Rosenfeld et al. 2008), geldanamicin za Hsp90 (Stebbins, Russo et al. 1997). Kompleksni poliketidi mogu učestvovati i u izgradnji ćelijskog zida bakterija ili služiti kao signalni molekuli (Keatinge-Clay 2012).

Poliketid sintaze su multienzimski sistemi koji se karakterišu velikom molekularnom masom (100 - 10 000 kDa) i neophodnošću posttranslacione

modifikacije. Poliketid sintaze su strukturno vrlo slične sintazama masnih kiselina (FAS). Do danas je identifikovano 3 tipa poliketid sintaza kod različitih mikroorganizama i gljiva. Prvu kategoriju čine takozvane modularne poliketid sintaze (PKS I). PKS I su velike megasintaze u kojima se svako aktivno mesto tokom biosinteze poliketidnog jedinjenja koristi samo jednom. Ove sintaze su odgovorne za biosintezu makrolidnih, polietarskih i polienskih jedinjenja (Staunton and Weissman 2001). Drugu kategoriju čine poliketid sintaze tipa II koje proizvode aromatična poliketidna jedinjenja, najčešće policiklična (Shen 2000). Ovi multienzimski sistemi sadrže individualna aktivna mesta koja se nalaze na posebnim polipeptidima i koja se koriste više puta u toku biosinteze poliketidnog jedinjenja. Treću kategoriju čine poliketid sintaze koje nemaju ACP domene i deluju direktno na acil-CoA supstrat (Shen 2003). Javljaju se kod gljiva i vrlo su slične FAS I tipu sintaza masnih kiselina kod kičmenjaka. Istraživanja su pokazala da su ove PKS evolutivno vrlo bliske sa ostalim tipovima PKS (Jez, Ferrer et al. 2000).

Veliki strukturni diverzitet poliketidnih jedinjenja zavisi od tipa startnog molekula i gradivnih blokova koji se koriste u njihovoj sintezi, dužine poliketidnog lanca, stepena redukcije β -keto grupa, kao i od enzimskih reakcija koje učestvuju u postsintetskoj obradi poliketidnih jedinjenja. Geni koji su uključeni u biosintezu poliketidnih jedinjenja su organizovani u genske klastere. Često se uz biosintetske gene nalaze i geni koji su odgovorni za sintezu proteinskih pumpi koji učestvuju u izbacivanju poliketidnih jedinjenja iz ćelije, kao i geni koji obezbeđuju rezistenciju na proizvedeno poliketidno jedinjenje (Walsh 2000). PKS kao starter molekul mogu koristiti različite acil-grupe: acetil, malonil, malonamil, propionil, butiril, cikloheksil, benzoil i 3-hidroksi-5-amino benzoil grupu. Za razliku od FAS, PKS u elongacionim ciklusima najčešće koriste kao gradivne blokove malonil-CoA ili metilmalonil-CoA, a retko kada i etilmalonil-CoA i metoksimalonil-CoA. U toku elongacionih ciklusa dolazi do dekarboksilacije malonil i metilmalonil-CoA, tako da malonil-CoA nakon kondezacije povećava elongacioni lanac za dva, a metilmalonil-CoA za tri atoma ugljenika (Keating and Walsh 1999).

Kao i FAS, PKS se sastoje iz više domena ili iz nekoliko podjedinica koji učestvuju u reakcijama inicijacije, elongacije ili terminacije poliketidnog lanca. PKS tipa I se sastoje od nekoliko modula koji se nalaze zajedno u *in cis* orijentaciji i čine deo

velike multidomenske subjedinice. Svaki modul u PKS I sadrži bar tri domena: β -keto-acil sintazni domen (KS), acil-transferazni domen (AT) i protein nosač acil lanca (ACP) (tzv. "minimalni PKS" ili α -modul (Jenke-Kodama, Börner et al. 2006)). Između AT i ACP se mogu naći i domeni dehidrataze (DH), enoilreduktaze (ER), ketoreduktaze (KR) i tioesteraze (TE) (Cheng, Tang et al. 2003). Supstratna specifičnost AT domena, redosled, broj modula, kao i prisustvo određenih katalitičkih domena unutar modula predstavljaju "kôd" strukture poliketidnog jedinjenja (Schirmer, Gadkari et al. 2005). Kod PKS tipa II, katalitički domeni i domeni proteina nosača su u *in trans* orijentaciji, tj. razdvojeni kao posebne subjedinice koje privremeno funkcionišu zajedno u svakom katalitičkom ciklusu tokom biosinteze poliketidnog jedinjenja.

Reakcija sinteze poliketidnih jedinjenja se sastoji iz tri faze. U prvoj fazi (koja se sastoji iz tri podfaze: inicijacije, elongacije i terminacije) se sintetiše poliketidni lanac od monomernih jedinica HS-CoA pomoću poliketid sintaze. U drugoj fazi se sintetisani poliketidni lanac ciklizuje. Neke reakcije ciklizacije poliketidnog lanca su katalizovane genima u okviru PKS, a neke genima koji se nalaze nizvodno od PKS. U trećoj fazi ciklični intermedijer se modifikuje uz pomoć modifikujućih enzima (Tsoi and Khosla 1995).

U inicijacionoj reakciji sinteze poliketidnog jedinjenja dolazi do vezivanja starter molekula (malonil ili metilmalonil-CoA) za sulfhidrilnu grupu *holo* ACP domena. Acil grupa starter molekula se vezuje za sulfhidrilnu grupu fosfopanteteinskog kraka kovalentno vezanog za ACP koji služi kao nosač za rastući lanac poliketidnog jedinjenja. ACP domen je nekatalitički domen koji ima funkciju proteina nosača rastućeg acil (poliketidnog) lanca. Ovaj domen je okružen setom drugih katalitičkih domena organizovanih u *in cis* (PKS tip I) ili *in trans* (PKS tip II) orijentaciji. PKS I sadrže *holo* ACP domene linearno raspoređene tako da će se u toku elongacije poliketidnog lanca, rastući lanac translocirati ka donjim modulima pri čemu će *holo* ACP u svakom sledećem modulu prihvatati novonastali derivat iz prethodnog ciklusa. PKS II sadrži samo jednu ACP subjedinicu tako da će rastući lanac tokom sukcesivnih dodavanja građivnih blokova ostati kovalentno vezan za isti ACP protein (Shen 2003).

Elongacija poliketidnog lanca otpočinje formiranjem acil-ACP, tj. prebacivanjem acil ostatka sa acil-CoA ili acil-KS na ACP u reakciji koju katalizuje AT

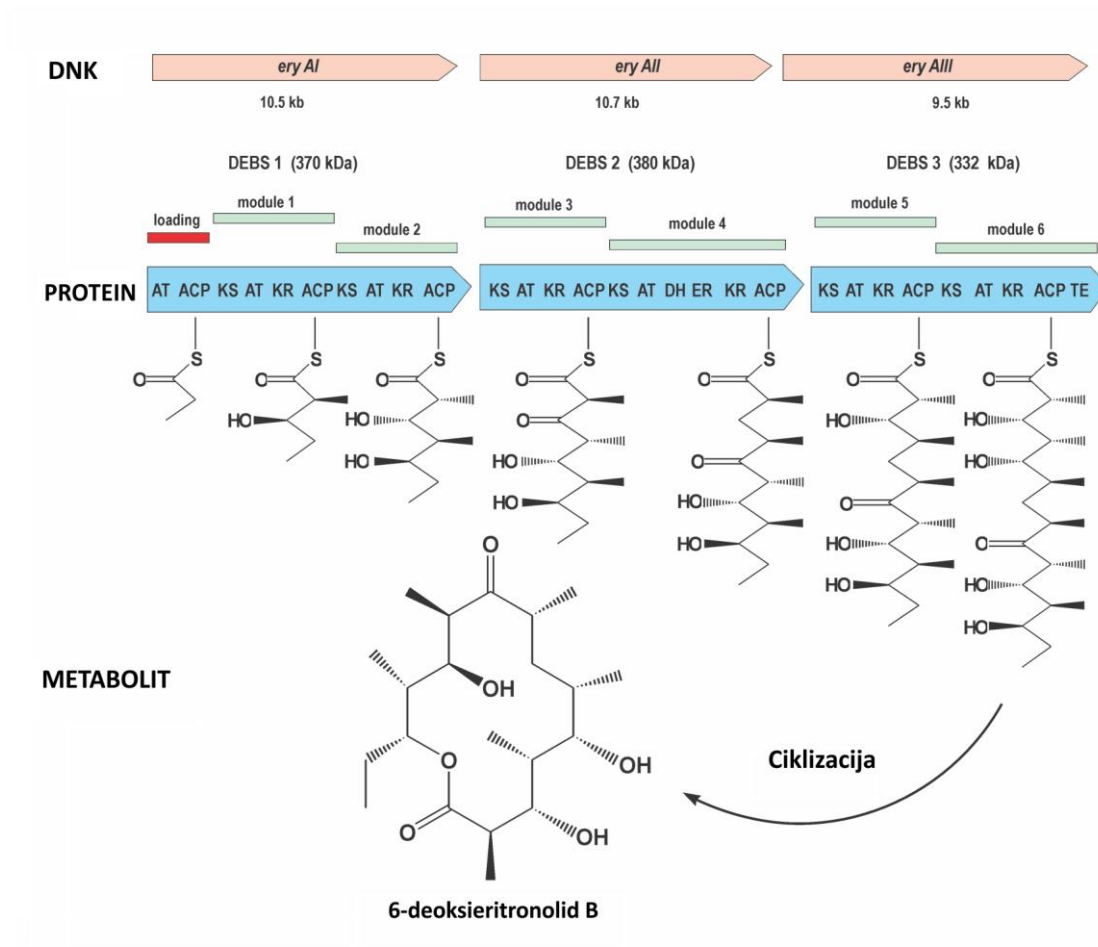
domen (PKS I) ili subjedinica (PKS II). Svaki elongacioni ciklus prati reakcija dekarboksilacije ACP-vezanog supstrata bez koje bi elongacija acil-poliketidnog lanca bila nemoguća. Nakon određenog broja elongacionih ciklusa, nastali acil-poliketidni lanac će se odvojiti od ACP-a, za koji je vezan kovalentnom vezom, pomoću katalitičkog domena – TE (PKS I) ili posebne subjedinice - ciklaza (PKS II).

1.3.1.4. Poliketid sintaze tipa I (PKS I)

Poliketid sintaze tipa I su veliki multienzimski kompleksi koji se dele na modularne PKS I koje sintetišu svoj produkt prebacujući rastući poliketidni lanac duž molekula i koristeći svaki modul u toku sinteze po jednom i iterativne PKS I kod kojih se isti domeni koriste više puta u ciklusima. Za modularne PKS I je karakteristično da se njihova genetska struktura preslikava na proteinskom nivou, a organizacija aktivnih domena proteina se preslikava na strukturu poliketidnog lanca sintetisanog sa enzimskog kompleksa. Ovo ima za posledicu da se na osnovu sekvence klastera za modularne PKS I može zaključiti o strukturi finalnog proizvoda - bioaktivnog molekula (Nguyen, Ishida et al. 2008). Verovatno sve poliketid sintaze tipa I vode poreklo od istog predačkog kompleksa koji je sadržao pun set domena – ketosintazni (KS), aciltransferazni (AT), dehidratazni (DH), metiltransferazni (MT), ketoreduktazni (KR), enoilreduktazni (ER), protein nosač acil grupe (ACP) i tioesterazu (TE) (Keatinge-Clay 2012). Uprkos velikoj evolutivnoj divergenciji većina PKS I je i dalje zadržala, uz mogućnost gubljenja pojedinih ali retko umetanja novih, isti poredak domena - KS + AT + DH + MT + KR + ER + ACP što svedoči o velikoj biosintetskoj moći ovakve enzimske arhitekture i selektivnom pritisku da se ona održi (Keatinge-Clay 2012).

Selektivna prednost koju PKS I donose svojim nosiocima, kao što je npr. sinteza antibiotika, podržava evoluciju u okviru ovog strukturnog modela koja će rezultirati u novim molekulima. AT je evoluirala da selektuje gradivne blokove koji mogu da dodaju više od 2 C aroma na rastuću okosnicu. KR je evoluirala da može da epimerizuje

α -substituenti i kontrolišu stereochemiju hidroksilne grupe i susjednih α -substituenata.



Slika 6. – Genska i proteinska organizacija modularne 6-deoksieritronolid B sintaze (DEBS). Svaki modul katalizuje kondenzaciju jednog acilnog gradivnog bloka na rastući poliketidni lanac. KS - ketosintaza; AT - acil transferaza; ACP – protein nosač acil grupe; KR - ketoreduktaza; DH - dehidraza; ER - enoil reduktaza; TE - tioesteraza. Preuzeto od Nikodnović J. (Nikodinovic 2004).

DH je evoluirala da ima sposobnost pomeranja dvogubih veza, vrši dehidraciju koja rezultuje u *cis*-dvogubim vezama i služi kao templet za ciklizaciju poliketida. ER su evoluirale da mogu da odeduju stereochemiju α -substituenata. TE su evoluirale da mogu da ciklizuju jedne substrate i hidrolizuju druge. Jedna klasa TE razvila je mogućnost da katalizuje formiranje C-C veza, druga pak da katalizuje reakcije dekarboksilativne eliminacije. Modifikujući enzimi (*eng.* tailoring enzymes) glikozilaze, metiltransferaze i oksidativni enzimi koji se uz PKS gene nalaze unutar klastera takođe dramatično evoluirali mogućnosti izmene oblika i hemije poliketida povećavajući tako dodatno njihovu strukturnu raznovrsnost.

Prototip organizacije PKS I je deoksieritronolid B sintaza (DEBS) kod *Saccharopolyspora erythraea* nakon čijeg sekvenciranja je otkriveno da tri polipeptida prosečne veličine 200 kDa čine osnovnu strukturu odgovornu za prevođenje početnog propionil-CoA i šest metilmalonil-CoA u 6-deoksieritronolid (DEB) (Cortes, Haydock et al. 1990; Donadio and Katz 1992; Pieper, Khosla et al. 1996) (Slika 6.). Tri subjedinice (DEBS1, DEBS2 i DEBS3) i 28 domena zajedno čine DEB sintazu (DEBS) koja je odgovorna za sintezu 6-deoksieritronolida (DEB). U sintezi DEB-a kao starter molekul se koristi propionil-CoA, dok se šest molekula metilmalonil-CoA koriste kao gradivni molekuli. Svaka subjedinica se sastoji od 2 modula za elongaciju poliketidnog lanca. DEBS1 subjedinica pored dva modula za elongaciju, sadrži na N-terminusu modul za vezivanje propionil-CoA starter molekula (*eng.* loading module) koji se sastoji od AT i HS-ACP domena. Jedino DEBS3 subjedinica sadrži TE domen na njegovom C-terminusu (Slika 6). Svi moduli sadrže tri osnovna domena KS, AT i ACP koji su odgovorni za elongaciju poliketidnog lanca. Uz ove domene moduli mogu sadržati i druge domene koji su odgovorni za redukciju β -keto grupe. Pored tri osnovna domena moduli 1, 2 i 5 sadrže i KR domen, modul 4 sadrži DH, ER, KR, a modul 6 KR i TE domene. Moduli 1 i 2 imaju pored KS, AT, ACP samo KR domen, bez ER i DH, tako da će triketidni acil lanac koji se nalazi na ACP domenu drugog modula (ACP₂) imati 2 OH grupe na C₃ i C₅ atomu. Nastali poliketidni lanac potom prelazi sa DEBS1 na DEBS2 subjedinicu, pri čemu ga obrađuju domeni modula 3 i 4. S obzirom da modul 3 ima samo KS-AT-ACP domene, β -keto grupa se zadržava, ali nova β -keto grupa uvedena u modulu 4 će se redukovati do OH grupe usled prisustva KR domena. U DEBS3 subjedinici moduli 5 i 6 imaju samo KR domen tako da se β -keto-grupe redukuju do β -OH grupe. Poslednji domen u DEB sintazi je TE domen koji ima funkciju ciklaze koja katalizuje intramolekularnu reakciju između C₁-S atoma acil-ACP₇ intermedijera i C₁₃-OH grupe formirajući 14C- makrolaktonsko jedinjenje, 6-DEB, pri čemu se oslobađa HS-ACP koji može ponovo započeti novu reakciju sinteze drugog 6-DEB molekula (Pieper, Khosla et al. 1996).

S obzirom da su moduli PKS I obično raspoređeni u više proteina intra- i interpolipeptidni linkeri su neophodni pri transferu acil- lanca unutar i između polipeptidnih lanaca. Intrapolipeptidni linkeri su dužine oko 20 amino kiselina koji odvajaju ACP domen jednog modula i KS domen drugog (Gokhale, Tsuji et al. 1999;

Tsuji, Cane et al. 2001; Broadhurst, Nietlispach et al. 2003). Interpolipeptidni linkeri su dužine oko 80-130 aminokiselina i nalaze se na C terminusu jednog modula koji intereaguje sa 30-50 dugom aminokiselinskom sekvencom koja se nalazi na N terminusu nizvodnog modula (Broadhurst, Nietlispach et al. 2003). Zahvaljujući inter- i intrapolipeptidnim linkerima moguće su modul-modul interakcije između modula različitih poliketid sintazi čime se olakšava produkcija novih "neprirodnih" prirodnih poliketidnih jedinjenja (Menzella, Reid et al. 2005).

Poliketidna jedinjenja se nakon sinteze pomoću poliketid sintaza postsintetski obrađuju reakcijama acilacije, oksigenacije, glikozilacije i metilacije. Geni koji su odgovorni za postsintetsku modifikaciju poliketidnih jedinjenja se najčešće nalaze u poliketidnom biosintetskom klasteru. Nakon sinteze, 6-DEB poliketidno jedinjenje se enzimski obrađuje pomoću pet enzimskih reakcija u cilju dobijanja bioaktivnog eritromicina A. U prvoj enzimskoj reakciji se vrši hidroksilacija C₆ atoma 6-DEB pomoću EryF hidroksilaze. Potom slede reakcije glikozilacije pomoću dve glikoziltransferaze. TDP-mikarozo glikoziltransferaza (EryBIV) vezuje L-mikarozu za C₃-OH grupu makrolaktonskog prstena pri čemu se dobija 3- α -mikarozileritronolid B. Druga glikoziltransferaza, TDP-dezozamin glikoziltransferaza (EryCII) vezuje D-dezozamin za C₅-OH grupu 3- α -mikarozileritronolida B pri čemu nastaje eritromicin D. 3-OH grupa mikarozil-šećerne grupe eritromicina D se potom metiluje pomoću EryG proteina pri čemu nastaje eritromicin B (Katz 1997). EryK hidroksilaza vrši hidroksilaciju C₁₂ atoma eritromicina B pri čemu se dobija eritromicin A (Peiru, Menzella et al. 2005).

Mnoga poliketidna jedinjenja sadrže neuobičajene šećerne komponente (kao kod eritromicina, oleandomicina, megalomicina, nistatina, avermektina i kod nekih antikancerogena – doksorubicin) koje su od esencijalnog značaja za njihovu funkciju (Peiru, Menzella et al. 2005). Svi ovi poliketidi sadrže deoksišećere vezane glikozidnom vezom za aglikonski prsten. Ove šećerne komponente prepoznaju ćelijske targete (npr. 23S rRNK velike ribozomalne subjedinice u slučaju eritromicina A) i od esencijalnog su značaja za funkciju poliketidnog jedinjenja. Geni koji kodiraju biosintezu šećernih komponenti su najčešće klasterovani sa ostalim biosintetskim genima poliketidnog klastera (Thorson 2001). Šećeri koji služe kao supstrati glikoziltransferaza u

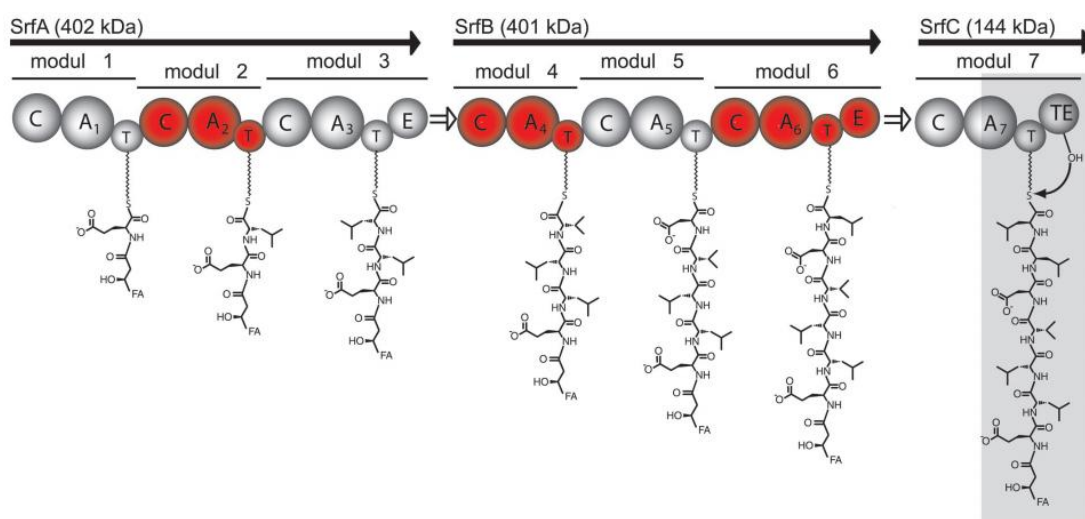
postsintetskoj obradi poliketidnog jedinjenja su nukleozid difosfat šećeri (NDP) i to najčešće TDP ili UDP (Liu 1994).

1.3.2. Sinteza neribozomalnih peptida (NRPS)

Još od otkrića penicilina kao delotvornog antibakterijskog agensa i rešavanja njegove strukture (Hodgkin 1949) otkriveno je dosta bioaktivnih molekula koji u osnovi imaju peptidnu strukturu. Kao i penicilin, to su mali peptidi koji se sastoje od 3 do 22 aminokiselinska ostatka sa često neubičajenim strukturnim elementima uključujući heterociklične prstenove, D-amino kiseline, glikozilovane i N-metilovane amino kiselinske ostatke što je posledica njihovog neribozomalnog porekla biosinteze. Zahvaljujući izraženoj farmakološkoj aktivnosti ovih jedinjenja postojao je veliki interes da se izuči njihov mehanizam sinteze. Lipman i saradnici su još 70-ih godina XX veka uočili da se ciklični peptidi gramicidin S i tirocidin iz *Bacillus* sp. proizvode na RNK nezavisan način posredstvom velikih enzimskih kompleksa sličnih FAS (Lipmann, Gevers et al. 1971). Ispostavilo se da se i drugi peptidni prirodni proizvodi sintetisu na ovaj način, putem velikih enzima nazvanih neribozomalne peptid sintetaze (NRPS) (Walsh 2003). Zajednička osobina mnogih neribozomalnih peptida jeste njihova isključiva struktura koja omogućava preciznu funkcionalnost koja je važna za adekvatnu interakciju sa njihovim specifičnim molekularnim targetom u ćeliji. U prirodi se ova rigidnost molekularnih struktura postiže na nekoliko načina: molekul može imati kiseonične mostove (*eng.* cross-linking) kao kod vankomicina, biti heterocikličan kao kod penicilina ili, najčešće, ciklizovan kao kod fengicina (Sieber and Marahiel 2003). Izgleda da je ciklizacija predominantni način da se postigne strukturalna isključivost neribozomalno sintetisanih peptida. S obzirom da je ciklizaciju peptida sa hemijske tačke gledišta teško postići bez zaštićivanja svih bočnih grupa postoji veliko interesovanje u izučavanju enzimskih mehanizama ovog procesa u cilju razvijanja novih puteva sinteze. Mašinerija za neribozomalnu sintezu peptida koristi velike multienzimske komplekse koji kao na pokretnoj traci katalizuju korake peptidne kondenzacije. Substrati ovih multienzimskih kompleksa nisu ograničeni na standardnih 20 amino kiselina, već se zna da na stotine gradivnih blokova mogu biti ugrađeni i zatim modifikovani postsintetički. Uobičajeno za ove sisteme je ugrađivanje aminokiselina koje se ne koriste za sintezu proteina kao što su D-izomeri, karboksi kiseline i N-

metilovani ostaci, kao i ugradnja heterocikličnih prstenova i masnih kiselina. Glikozilacija i oksidativno premošćavanje su uobičajene dodatne postsintetičke modifikacije od strane enzima pridruženih NRPS mašineriji.

Principi enzimske sinteze peptida i mehanicističke osobine NRPS mogu se videti na primeru surfaktin sintetaze iz *Bacillus subtilis* (Mootz, Schwarzer et al. 2002; Schwarzer, Finking et al. 2003). To je veliki multienzimski kompleks koji se sastoji iz 3 subjedinice - SrfA, B i C, koji imaju 7 modula koji sadrže 24 katalitička domena (Slika 7.). Svaki modul je odgovoran za ugradnju jednog određenog substrata na rastućem heptapeptidnom lancu (Peypoux, Bonmatin et al. 1999). N-terminalni, inicijalni modul specifično prepoznaje i aktivira N-terminalnu amino kiselinu peptidnog produkta. Svaka hemijska reakcija potrebna da se ugradi i modifikuje sledeći supstrat je vođena katalitički nezavisnim setom domena u okviru modula.



Slika 7. – Sinteza surfaktina od strane NRPS. Surfaktin sintetaza sastoji se od 24 individualna domena odgovorna za katalizu 24 hemijske reakcije. Ovi domeni katalizuju aktivaciju (A domen), kovalentno vezivanje (T domen), elongaciju (C domen), epimerizaciju (E domen) i oslobađanje produkta (TE domen) ili ciklizacijom ili hidrolizom. Domeni su organizovani u module gde svaki modul dodaje jedan gradivni blok na rastući polipeptidni lanac. Preuzeto od Zibera i Marajela (Sieber and Marahiel 2003).

Prvi korak u sintezi je prepoznavanje i aktivacija određenog supstrata od strane adenilacionog domena (A domen) (Conti, Stachelhaus et al. 1997). U sledećem koraku, aminoaciladenilatni intermedijer se prebacuje na slobodnu tiolnu grupu

fosfopanteteinskog kofaktora koji je kovalentno vezan posredstvom fosfopantetein transferaze za serinski ostatak tiolacionog domena (T domen ili peptidil noseći protein, *eng.* peptidyl carrier protein, PCP). Aminoaciladenilatni intermedijer može biti prenet sa T domena na ostale domene na kojima se dešavaju ostale reakcije. Formiranje peptidne veze između dva susedna supstrata katalizuje kondenzacioni domen (C domen) koji je lociran između A i T domena susednih modula (Keating, Marshall et al. 2002). C domen katalizuje nukleofilni napad amino kiseline vezane za „nizvodni“ T domen (Belshaw, Walsh et al. 1999). Pri inicijaciji sinteze surfaktina peptidna veza se formira između modula 1 i 2 nukleofilnim napadom α -amino grupe Leu na tioestarski aktiviranu karboksi grupu glutaminske kiseline formirajući dipeptid koji se onda translocira na modul 2. Pored A, T, i C domena koji su esencijalni domeni elongacionog modula postoje i drugi, opcioni domeni. Uobičajeni strukturni motiv neribozomalnih peptida je ugradnja D-amino kiselina koje katalizuje epimerizacioni domen (E domen). E domen katalizuje racemizaciju aminokiseline vezane za T domen stvarajući ravnotežu između L i D konformera, a C domen bira samo D-amino kiseline u rastući peptidni lanac (Linne and Marahiel 2000). Kod surfaktin sintetaze dva E domena (u modulu 3 i 6) su odgovorni za racemizaciju L-leucina. Kombinacija L- i D-amino kiselina daje peptidu jedinstvenu konformaciju koja je važna za specifično delovanje na njegove ciljne ćelijske strukture. Da bi enzim mogao da učestvuje u sledećem ciklusu sinteze zreli peptid se odseca od strane tioesteraznog (TE) domena koji je pripojen C-terminalnom modulu. Peptid se ovaj hidrolizom kao linearna kiselina (vankomicin) (Hubbard and Walsh 2003) ili nakon ciklizacije. Kod surfaktina dolazi do intramolekulske ciklizacije i nastaje ciklični depsipeptid (Tseng, Bruner et al. 2002). Postoje i druge strategije ciklizacije koje daju različite ciklične ili ciklično razgranate molekule što rezultuje u njihovoj različitoj biološkoj aktivnosti.

1.3.3. Sinteza hibridnih sekundarnih metabolita (NRPS/PKS)

NRPS i PKS su dve velike familije enzima koje sintetizuju prirodne proizvode u koje spadaju mnoge klinički važne supstance – antibiotici vankomicin i eritromicin, imunosupresori ciklosporin A i rapamicin, antitumorski agensi epotilon i bleomicin.

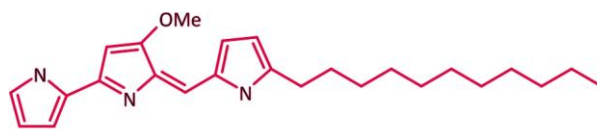
karboksilni prekursor koji bira A domen NRPS ili AT domen PKS. Lanac zatim raste dodavanjem 5 amino kiselina (Ser, Asn, Asn, His i Ala). U sledećem koraku malonat reaguje sa pentapeptidnim intermedijerom i formira β -ketotioestarski intermedijer koji se zatim metiluje. Nakon jednog ciklusa poliketidne elongacije nastavlja se peptidna elongacija ugrađivanjem Thr, β -Ala i 2 molekula Cys čime je kompletiran BLM aglikon. Kompletan aglikon se oslobađa sa BLM sintetaze preko nukleofilne supstitucije za razliku od većine do sada poznatih NRPS i PKS koje oslobađaju kompletan lančani produkt delovanjem TE.

1.3.3.1. Red klaster za sintezu undecilprodigiozina

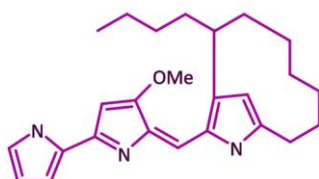
Mikroorganizmi proizvode veliki dijapazon stabilnih pigmenata različitih struktura - karotenoide, flavonoide, hinone, rubramine i prodigiozine (Dufosse 2009). Prodigiozini su velika familija crveno obojenih oligopirrolnih antibiotika sa velikim potencijalom primene u medicini kao antimikrobijalni, antimalarični, imunosupresivni i citotoksični agensi (Perez-Tomas, Montaner et al. 2003; Williamson, Fineran et al. 2007; Pandey, Chander et al. 2009). Prodigiozine proizvodi više vrsta ne srodnih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija kao što su *Serratia marcescens* (Williams, Green et al. 1956; Feng, Webb et al. 1982; Kim, Kim et al. 1999), *Streptomyces griseoviridis* (Kawasaki, Sakurai et al. 2008), *Vibrio* sp. (Staric, Danevcic et al. 2010), *Zooshikella rubidus* (Lee, Kim et al. 2011). U prodigiozine osim linearnog prodigiozina i undecilprodigiozina spadaju i ciklizovani derivati - butilmetacikloheptilprodigiozin, butilcikloheptilprodigiozin, metaciklono-nilprodigiozin i nonilprodigiozin (Furstner 2003).

Undecilprodigiozin (Slika 9.) ((5'Z)-4'-Methoksi-5'-[(5-undecil-1H-pirol-2-il)metilen]-1H,5'H-2,2'-bipirrol), poznat i kao prodigiozin C-25, je tamno crveni pigment sa pirolnom strukturom koji je ranije opisan kao sekundarni metabolit kod više vrsta mikroorganizama (Furstner 2003). Do sada, proizvodnja undecilprodigiozina opisana je kod malo bakterijskih vrsta, uključujući Gram-negativne *Serratia marcescens* SS-1 (Wei, Yu et al. 2005) i Gram-pozitivne *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Rudd and Hopwood 1980; Tsao, Rudd et al. 1985) i *Saccharopolyspora* sp. (Liu, Cui et al. 2005). Slično prodigiozinu, undecilprodigiozin takođe poseduje imunosupresivno i proapoptotičko dejstvo, iako je mnogo manje proučavan (Perez-Tomas, Montaner et al. 2003). U novije vreme dobio je na važnosti zbog selektivnog apoptotičkog efekta na

ćelije karcinoma dojke, što ga je učinilo mogućim novim antikancer lekom za tretman raka dojke (Ho, Ma et al. 2007; Perez-Tomas and Vinas 2010).



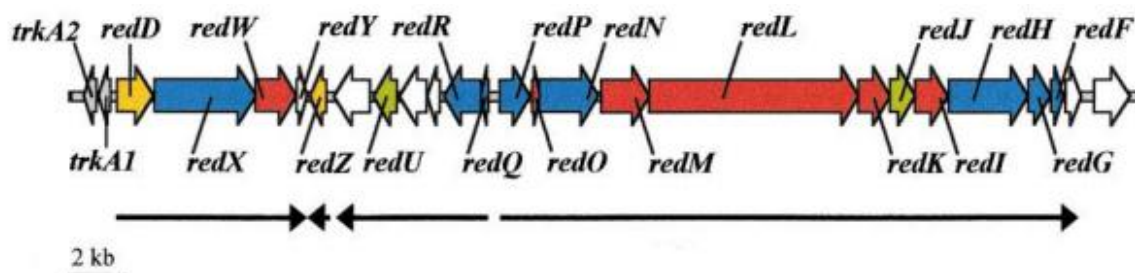
Undecilprodigiozin



Butilmetacikloheptaprodigiozin

Slika 9. – Struktura undecilprodigiozina i butilmetacikloheptilprodigiozina

Pirolpirometenski kostur undecilprodigiozina sintetiše PKS/NRPS hibridni enzimski sistem od jedne jedinice prolina, jedne glicina, jedne serina i nekoliko jedinica acetata, preko konvergentnog puta koji uključuje kondenzaciju dva konstitutivna intermedijera – 2-undecilpirola i 4-metoksi-2,2'-bipirrol-5-karboksaldehida, na kasnom stupnju sinteze (Cerdano, Bibb et al. 2001; Williamson, Fineran et al. 2006). Raniji eksperimenti mapiranja mutacija izazvanih UV zračenjem na hromozomu *S. coelicolor* A3(2) klonova koji ne proizvode UP ukazivalo je da se geni za njegovu proizvodnju nalaze u klasteru. Ovaj klaster nazvan je *red* (Rudd and Hopwood 1980) i u toku projekta sekvenciranja genoma *S. coelicolor* A3(2) (Bentley, Chater et al. 2002) postala je dostupna njegova celokupna sekvenca. Geni u klasteru za sintezu undecilprodigiozina (UP) i njegovog ciklizovanog derivata butilmetacikloheptilprodigiozina (BMCHP) koji se sintetiše u razmeri 1:2 u odnosu na UP su anotirani poređenjem sekvenci i većini je određena funkcija (Slika 10.) (Cerdano 2001). Neki od ovih gena pokazuju homologiju sa genima za modularne PKS I, zatim sa NRPS, FAS i α -oksoamin sintazom - ključnim enzimom u biosintezi porfirina i biotina (Ploux, Soularue et al. 1992). Na osnovu ovih anotacija dedukcijom je dobijen kompletan put sinteze UP i BMCHP u *S. coelicolor* A3(2) koji je potvrđen eksperimentima genskih delecija (Cerdano 2001).



Slika 10. – Organizacija UP biosintetičkog klastera kod *S. coelicolor* A3(2). Plavo - geni uključeni u sintezu 2-undecilpirola; Crveno - geni uključeni u sintezu 4-metoksi-2,2P-bipiro1-5-karboksialdehida; Zeleno - konstitutivno eksprimirani geni; Žuto - regulatorni geni; Belo - geni nepoznate funkcije. Crnim strelicama prikazana su 4 transkripta koja se prepisuju sa klastera. Preuzeto od Serdenjo i saradnika (Cerdeno 2001).

Red klaster sastoji se od 23 gena organizovana u 4 transkripcione jedinice (van Wezel, White et al. 2000). Dva od 23 gena u klasteru (Slika 10., žuto) pokazano je da kodiraju specifične regulatore puta sinteze (Narva and Feitelson 1990; Guthrie, Flaxman et al. 1998). Od preostalih 21 gena, 8 pripada biosintetskom putu 2-undecilpirola (Slika 10., plavo), 6 gena *red* klastera pripada biosintetskom putu 4-metoksi-2,2P-bipiro1-5-karboksialdehida (Slika 10., crveno), 2 gena se eksprimiraju konstitutivno (*eng.* housekeeping genes), a preostalih 5 ima nepoznatu funkciju. Dva konstituenta UP se sintetišu odvojeno. 2-undecilpirol se sastoji od undecilskog bočnog lanca i heterocikličnog prstena koji nastaju od sedam acetatnih gradivnih blokova kondenzovanih glava-rep i jednog molekula glicina (Wasserman, Skles et al. 1973). Geni koji kodiraju sintezu ovog intermedijera imaju homologiju sa FAS, PKS I i α -oksoamin sintazom. Monosupstituisani pirolni prsten UP poreklom je od prolina (Gerber, McInnes et al. 1978) i deo je 4-metoksi-2,2P-bipiro1-5-karboksialdehida. Prolin modifikuju enzimi homologni NRPS, a zatim se intermedijer prebacuje na kompleks homolog PKS I koji dodaje malonilni gradivni blok. Drugi pirolni prsten 4-metoksi-2,2P-bipiro1-5-karboksialdehida nastaje od malonila i serina posredstvom enzima homologih NRPS i PKS I. Terminacija lanca odvija se mehanizmom koji nije tipičan ni za PKS ni za NRPS – posredstvom piridoksal fosfat zavisne transferaze. Dodatnom postsintetskom metilacijom i oksidacijom nastaje zreli 4-metoksi-2,2P-bipiro1-5-karboksialdehid. Poslednji korak u sintezi UP je povezivanje njegova dva konstituenta.

Još uvek nije poznato koji je katalitički put zadužen za ovaj korak. Do formiranja BMCHP derivata (Slika 9.) dolazi oksidativnom ciklizacijom UP verovatno posredstvom jednog od enzima iz klastera sa dioksigenaznom aktivnošću (Cerdeno 2001).

1.3.4. Regulacija sekundarnog metabolizma kod streptomiceta

Proizvodnja sekundarnih metabolita kod streptomiceta najčešće je vremenski koordinisana sa promenama morfologije kolonije i sa formiranjem vazdušnog micelijuma i sporulacijom (Chakraborty and Bibb, 1997; Bibb et al., 2000). Oba procesa započinju tokom kasne faze rasta što se poklapa sa usporavanjem eksponencijalnog rasta organizama. Mutanti koji ne sporulišu najčešće ne proizvode antibiotike i obrnuto, mada su identifikovani i mutanti za samo jedan od ovih procesa (Davies and Thompson, 1987). Ova zapažanja ukazuju da su rani stupnjevi diferencijacije koordinativno regulisani dok su sami procesi sporulacije i biosinteze antibiotika nezavisno regulisani. Sredinski uslovi su oni koji pokreću oba ova procesa. U uslovima smanjivanja količine nutrijenata dolazi do porasta ćelijske koncentracije guanozin tetrafosfata (ppGpp) koji predstavlja čvorište u regulaciji mnogih procesa kod bakterija pa i sinteze antibiotika (Chakraborty and Bibb 1997). U uslovima nedostatka fosfata pokreće se druga signalna kaskada koja reguliše sintezu sekundarnih metabolita preko dvokomponentnogogregulatorni sistema PhoR-PhoP, senzor kinazne mašinerije za globalnu regulaciju (Sola-Landa, Moura et al. 2003). Od ekstracelularnih signala koji utiču na aktivaciju gena sekundarnog metabolizma kod streptomiceta najbolje su proučeni su γ -butirolaktoni (Yamada 1999). Najbolje okarakterisani A faktor (2-isocaprilolil-3R-hidroksimethyl-g-butirolactone) iz *Streptomyces griseus* je potreban i za sekundarni metabolizam i za morfološku diferencijaciju (Horinouchi and Beppu 1992; Yamazaki, Tomono et al. 2004). A faktor pokreće signalnu kaskadu koja ro vodi do aktivacije kako plejotropnih tako i specifičnih regulatora gena (Bibb 2005).

Sa većim brojem gena nego niži eukarioti i sa neobično visokim brojem regulatora, otkrivanje regulatorne mreže kod *S. coelicolor* A3(2), i streptomiceta generalno, jeste veliki izazov. Regulacija je dinamičan proces kod koga se preklapajuće signalne kaskade integrišu u kompleksne mreže, povezujući različite aspekte rasta,

morfolologije i produkcije sekundarnih metabolita. Uz to, u slučaju bakterija, geni se mogu ko-transkribovati kao policistronske RNK i na ovom, cistronskom nivou dešava se regulacija pre nego na nivou pojedinačnih gena. Pojedinačne delecije i disruptivne mutacije široko su korišćene u proučavanju streptomiceta u pokušaju otkrivanja mehanizama koji regulišu produkciju sekundarnih metabolita i njihovu vezu sa morfološkim promenama. Proučavanje ovih mutanata dovelo je tokom godina do velikog napretka u razumevanju ovih procesa uključujući karakterizaciju regulatora genskih klastera specifičnih za sintezu antibiotika. Ovi pristupi otkrili su takođe da dolazi do unakrsne regulacije između različitih puteva (Huang, Shi et al. 2005) i da je zaista potrebno istražiti regulaciju na nivou celog genoma. Za sistematsko određivanje regulatornih interakcija mogu se koristiti profili transkriptoma dobijeni u različitim setovima uslova kao što je to dobijeno kod *Escherichiae coli* (Faith, Hayete et al. 2007). U proučavanju regulatornih mreža kod *S. coelicolor* A3(2) kao osobine na osnovu kojih su poboljšane ranije predikcije operonskih mapa (Charaniya, Mehra et al. 2007) korišćene su funkcionalna sličnost susednih gena (geni koji su deo operona često učestvuju u istoj biološkoj funkciji ili putu), konzerviranost redosleda gena (geni istog operona imaju često konzervisan redosled u različitim genomima), intergenska udaljenost (geni istog operona imaju manje intergenske distance u odnosu na gene koji ne pripadaju operonu) i sličnost ekspresije gena (geni koji pripadaju operonu su ko-transkribovani i imaju slične ekspresione profile). Mikrorejni podaci za gensku ekspresiju na nivou cistrona korišćeni su da predvide regulacionu mrežu zasnovanu na 692 regulatorna cistrona odnosno cistrona koji sadrže bar jedan putativni regulatorni gen koji može interagovati sa drugim cistronima stvarajući regulacionu mrežu (Castro-Melchor, Charaniya et al. 2010). Iz svega jasno proističe da mnogostruki regulatorni mehanizmi kontrolišu ekspresiju bioaktivnih metabolita kod roda *Streptomyces*. Ovo uključuje globalne regulatorne mehanizme koji unakrsno interaguju dovodeći do modulacija primarnih i sekundarnih metaboličkih puteva kao i specifične regulatore koji kontrolišu određene gene preko kaskadnih mehanizama. Bolje poznavanje ovih regulatornih mreža otvara nove mogućnosti u proizvodnji željenih bioaktivnih molekula, ne samo aktivacijom specifičnih puteva sinteze, već i „utišavanjem“ klastera za sintezu drugih, neželjenih sekundarnih metabolita.

2. Cilj rada

Bioaktivni sekundarni metaboliti streptomiceta imaju primenu kao antibiotici, antihelmintici, herbicidi, pesticidi, imunosupresori, citostatici. Stalna potreba za novim bioaktivnim jedinjenjima i novim hemijskim strukturama koje mogu da posluže kao osnova u sintezi poboljšanih terapeutika čini kolekcije streptomiceta nezaobilaznom polaznom tačkom u njihovom otkrivanju. Osim novih jedinjenja postoji i velika poteba za novim biokatalitičkim procesima koji će zameniti ekološki neprihvatljive hemijske procese, a putevi sekundarnog metabolizma streptomiceta mogu predstavljati izdašan izvor novih katalizatora adaptiranih na upotrebu raznovrsnih i “nekonvencionalnih” supstrata.

Cilj ovog rada bio je izolacija i karakterizacija sekundarnih metabolita iz sojeva streptomiceta odabranih iz postojeće kolekcije aktinomiceta Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pretraživanjem prema unapred utvrđenim kriterijumima.

U ovu studiju uključen je i didehidroroflamikoin (DDHR) iz *Streptomyces durmitorensis* (DSM 41863^T), poliketidni makrolakton sa citotoksičnim delovanjem za koji je utvrđeno da ga sintetiše multienzimski kompleks modularne poliketid sintaze tipa I (PKS) (Savic, Bratic et al. 2007; Stodulkova, Kuzma et al. 2011) sa namerom da se ovaj PKS genski klaster sekvencira i anotira.

2.1. Specifični ciljevi rada

- ◆ selektovanje odabranih izolata iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama na osnovu profila bioaktivnosti njihovih ukupnih ekstrakata;
- ◆ biohemijska i taksonomska karakterizacija izolata iz uže selekcije;
- ◆ prečišćavanje i određivanje hemijske strukture glavnih sekundarnih metabolita iz ukupnih ekstrakata kultura izabranih sojeva;

- ◆ utvrđivanje dejstva prečišćenih sekundarnih metabolita iz odabranih sojeva na različite mikroorganizme i humane ćelije u kulturi;
- ◆ istraživanje biotehnološkog potencijala sojeva – proizvođača kroz seriju eksperimenata optimizacije medijuma i uslova kultivacije;
- ◆ ispitivanje potencijalne ekofiziološke uloge nekih od proizvoda odabranih sojeva;
- ◆ izolovanje kozmidnih klonova genomske biblioteke *S. durmitorensis* sa delovima genskog klastera koji kodira za PKS odgovornu za sintezu DDHR;
- ◆ sekvenciranje, bioinformatička obrada i anotacija dobijenih delova klastera.

3. Materijal i metode

3.1. Pretraživanje kolekcije aktinomiceta

3.1.1. Medijumi za gajenje streptomiceta

Sastav tečnih medijuma za gajenje streptomiceta je naveden kao procentni udeo komponenti u medijumu. Svi procenti su dati kao masa po zapremini (w/v) osim ako nije drugačije naglašeno. Sve komponente za podloge kao i gotove podloge nabavljane su od Becton, Dickinson and Company (BD, Franklin Lakes, NJ, SAD) osim ako nije drugačije naglašeno. Za sve čvrste podloge korišćen je Agar Broj 1 (1,5%) (*eng.* Agar No 1 Bacteriological High Clarity, Lab M, Bury, UK). Sve soli i šećeri korišćeni u pripremanju podloga, osim ukoliko nije drugačije naglašeno, su nabavljani od kompanije Sigma-Aldrich (St Louis, MO, SAD).

TSB: 3% gotove podloge u prahu TSB (*eng.* Tryptone Soy Broth powder).

NE (Kieser, Bibb et al. 2000): 1% glukoze, 2% kvašćevog ekstrakta, 0,1% mesnog ekstrakta (*eng.* BBL Beef Extract powder), 0,2% kazamino kiselina, pH 7,0.

MSY (Stankovic, Radulovic et al. 2012): 3% D-maltoze, 0,8% gotove podloge u prahu TSB, 0,4% kvašćevog ekstrakta, 0,3% NaNO₃, 0,05% CaCO₃ i 0,1% (v/v) rastvor soli koji sadrži u 1M HCl (g/l): 1,5 MnCl₂×4H₂O; 1,05 ZnSO₄; 0,3 H₃BO₃; 0,25 Na₂MoO₄×2H₂O i 0,15 CuCl₂×2H₂O.

JS: 2% glukoze, 2% rastvorljivog skroba (Merck, Darmstadt, Nemačka), 1,5% manitola, 3% sojinog brašna (Florida Bel, Srbija), 1% CaCO₃, pH 7,2.

MSF (Kieser, Bibb et al. 2000): 2% sojinog brašna (Florida Bel, Srbija) i 2% manitola, česmensku vodu, pH 7,2.

GYM (Nikodinovic 2004): 0,4% glukoze, 0,4% kvašćevog ekstrakta, 1% ekstrakta slada, pH 7,2.

YMM (Shepherd, Kharel et al. 2010): 0,4% kvašćevog ekstrakta, 1% ekstrakta slada, 1% manitola.

TO (Nikodinovic 2004): 2% koncentrata paradajza (Petti, Nocera Superiore, Italija), 2% neglaziranih ovsenih pahuljica (Florida Bel, Srbija).

Sterilizacija medijuma je vršena autoklaviranjem 20 min/121°C. Kulture su gajene u tikvicama po Erlenmajeru u koje su stavljene namotaji spiralne žice od nerđajućeg čelika u cilju bolje aeracije. Odnos zapremina kultura prema veličini suda bio je 1:5. Kulture su gajene na 30°C, na rotirajućoj orbitalnoj platformi sa 180 obrt/min, u mraku.

Za gajenje *S. durmitorensis* A10 u različite podloge je dodavan rastvor 30 mg/ml tiostreptona u dimetil sulfoksidu (DMSO) do finalne koncentracije tiostreptona u medijumu od 30 µg/ml.

3.1.2. Pravljenje suspenzije spora streptomiceta

U cilju dugotrajnog čuvanja sojeva streptomiceta pravljenje su suspenzije spora (Kieser, Bibb et al. 2000). Sojevi su zasejavani na odgovarajuće čvrste podloge za koje je predhodno utvrđeno da omogućuju dobru sporulaciju određenog soja (Prilog II). Na sporulišću kulturu na podlozi je nakapavano 2 ml sterilne, dejonizovane vode. Sprederom je pažljivo zgreban površinski sloj spora, a zatim je voda sa sporama sakupljana pipetom i filtrirana kroz tampon od sterilne vate. Spore su zatim centrifugirane (5 min, 13 000 obrt/min, 4°C, cetrifuga Eppendorf 5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i resuspendovane u 20% (v/v) glicerolu. Putem sukcesivnih razblaženja spora i zasejavanja na čvrste TSB podloge određivana je koncentracija spora (CFU/ml). Suspenzija je alikvotirana po 0,5 ml i trenutno zamrzavana na suvom ledu. Do daljeg korišćenja suspenzije spora su čuvane na -80°C.

3.1.3. Identifikacija sojeva koji proizvode bioaktivne metabolite u tečnom medijumu

Produkcije sekundarnih metabolita kod odabranih sojeva detektovana je gajenjem sojeva u dva različita tečna medijuma – MSY i JS (odjeljak 3.1.1.). Za *S. durmitorensis* korišćen je i treći medijum, TSB sa dodatkom 10% manitola. Kao inokulum koriscena je starter kultura (2,5%, (v/v)). Za zasejavanje starter kulture koriscena je suspenzija spora (10-20 µl, što je odgovaralo $1,4 - 2,8 \times 10^8$ CFU) i 20 ml TSB medijuma. Starter

kultura je gajena 48 h na 30°C, 150 obrt/min. Kulture u 50 ml MSY i JS medijuma inkubirane su 15 dana na 30°C, 150 obrt/min. Tokom gajenja alikvot od 3 ml je odvajan svaka 3 dana i praćena je apsorpcija u ultraljubićastom i vidljivom delu spektra (odeljak 3.1.3.2.) etilacetatnih ekstrakata (odeljak 3.1.3.1.). Nakon 15. dana inkubacije ostatak kulture (30 ml) je ekstrahovan (odeljak 3.1.3.1.) i bioaktivnost ekstrakta određivana je na test organizmima u difuzionom eseju sa diskovima.

3.1.3.1. Priprema ukupnih ekstrakata kultura

Ekstrakcija na maloj skali vršena je na sledeći način: alikvot od 3 ml je sterilno uziman iz tečne kulture streptomiceta u polipropilensku epruvetu sa zapušačem i dodavano mu je 3 ml etil acetata. Ekstrakcija je vršena u trajanju od 5 min uz snažno mućkanje da bi se intenzivirao kontakt vodene i etil acetatne faze. Razdvajanje faza vršeno je zatim u kliničkoj centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u trajanju od 5 min na 5 000 obrt/min, na sobnoj temperaturi (RT; *eng.* room temperature). Gornja, etil acetatna faza premeštana je zatim u kvarcnu kivetu i merena je apsorpcija u ultraljubićastom i vidljivom spektru (poglavljje 3.1.3.2.).

Ekstrakcija na velikoj skali rađena je takođe etil acetatom na sledeći način: u celokupnu kulturu dodavan je NaCl do 5% (w/v) i kultura je zatim mešana da se so rastvori. Kultura je zatim premeštana u levak za odvajanje i dodavana je etilacetat u količini dvostrukoj u odnosu na zapreminu kulture. Smeša je zatim snažno mućkana više puta po 2 min, a onda ostavljena 1 h na sobnoj temperaturi da se faze razdvoje. U etil acetatni ekstrakt je zatim dodavano do 10% anhidrovanog MgSO₄ i ekstrakt je filtriran kroz 1MM filter-papir (Munktell Filter, Falun, Švedska). Filtrat je uparavan pod vakuumom (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Flawil, Švajcarska), a masa suvog ekstrakta je određivana na analitičkoj vagi (Sartorius, Göttingen, Nemačka). Ovakav ekstrakt (CRE; *eng.* crude extract) je do daljeg korišćenja čuvan na -20°C.

3.1.3.2. Merenje apsorpcije ekstrakata u ultraljubićastom (UV) i vidljivom (Vis) delu spektra

Merenje apsorpcionih spektara ekstrakata kultura streptomiceta vršeno je u ultraljubićastom i vidljivom (UV/Vis) delu spektra u opsegu od 200-700 nm (Ultrospec 3300 pro, Biochrom, Cambridge, VB). Kao referenca je korišćen etil acetat ili odgovarajući rastvarač.

3.1.3.3. Utvrđivanje antibakterijskih i antigljivičnih svojstava

Za preliminarno utvrđivanje antimikrobnog delovanja ukupnih ekstrakata kultura korišćen je difuzioni esej sa diskovima kao što je opisano u poglavlju 3.3.1. Suvi ekstrakti iz 50 ml kulture rastvarani su u 500 µl metanola. Na diskove je nakapavano po 10 i 30 µl ekstrakta. Kao kontrola korišćene su odgovarajuće zapremine metanola. Test organizmi na ovom stupnju testiranja bili su *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 (Skoko, Vujovic et al. 2005), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857).

3.1.4. Taksonomska identifikacija sojeva

3.1.4.1. Sekvenciranje gena za 16S rRNA i filogenetska analiza

Geni za 16S rDNK ispitivanih sojeva umnoženi su pomoću specifičnih prajmera (Tabela 1) korišćenjem genomske DNK kao matrice, a zatim istim prajmerima sekvencirani u oba smera po tri puta. Dobijene sekvence su analizirane i preklapljene pomoću Lasergene SeqMan Pro softvera (DNASTAR, Madison, WI, SAD) i identifikovane uz pomoć BLASTN algoritma (Altschul, Madden et al. 1997). Dobijene sekvence 16S rDNK gena izolata korišćene su za pronalaženje sličnih sekvenci u okviru Ribosomal Database Project-II Release 9.4 (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>; (Cole, Wang et al. 2009)). Sekvence 16S rDNK fragmenata sojeva deponovane su u GenBank bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.1.4.2. Biohemijske analize sojeva

Za fenotipsku karakterizaciju bakterijskih sojeva korišćen je set standardnih biohemijskih testova opisanih u knjigama „Priručnik za laboratorijsku dijagnostiku-standardizacija dijagnostičkih metoda za bakterijske, virusne i parazitske bolesti životinja čije je suzbijanje propisano zakonom” (Radojčević, M. i Šebetić, Č. 1984) i „Methods for general and molecular microbiology” (Tindall, Sikorski et al. 2007).

Lipaza test. Prisustvo lipaze je testirano na osnovu sposobnosti bakterija da vrše hidrolizu Tween-a 80 (polioksietilen sorbitan monooleata) na oleinsku kiselinu i sorbitol. Bakterije su zasejavane na specifičnu podlogu koja se sastojala od 1% peptona, 0,5% NaCl, 0,01% CaCl₂, 2% agara i 0,05% Tween 80. Sterilizacija je vršena 30

min/110°C. Zasejane podloge su inkubirane 24 h na 30°C i ukoliko je reakcija pozitivna oko kolonija su detektovane zone prosvetljenja.

Redukcija nitrata. Ovim biohemijskim testom dokazivana je sposobnost mikroorganizama da redukuju nitrate u nitrite. Podloga za ovaj test sastojala se od 0,02% KNO₃ i 0,5% peptona, pH 7,4. Podloga je razlivana u epruvete po 5 ml i sterilisana u autoklavu 20 min/121°C. Ovako pripremljeni medijumi su zasejavani i kulture su inkubirane 4 dana na 30°C. U epruvete je zatim dodavano po 0,1 ml rastvora A i 0,1 ml rastvora B (rastvor A: 0,8% sulfanilna kiselina (w/v) u glacijalnoj (100%) sirćetnoj kiselini; rastvor B: 0,5% alfa naftilamina (w/v) u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Pojava crvene boje je znak pozitivne reakcije.

Proizvodnja vodonik sulfida. Ispitivani sojevi zasejavani su na 6,5% TSI gotovu podlogu (*eng.* Triple Sugar Iron agar, Torlak, Srbija). Ukoliko ispitivani mikroorganizam oslobađa H₂S podloga se boji u crno;

Korišćenja citrata. Pripremljen je Simonsov citratni agar (SCA) (gotova podloga Torlak, Srbija). Na SCA podloge zasejavani su ispitivani mikroorganizmi i inkubirani 48 h na 30°C. Promena boje iz zelene u plavo značila je da ispitivani soj može da koristi citrate kao izvor energije (Knežević-Vukčević 1999).

Hidroliza želatina. Proteolitička sposobnost ispitivanih sojeva testirana je na podlozi koja sadrži želatin. Pripreman je duboki želatin koji sadrži 0,3% mesnog ekstrakta, 1% peptona i 15% želatina (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Nemačka), pH 7,2. Podloga je razlivana u epruvete (po 5 ml) i sterilisana u autoklavu 20 min/121°C. Sojevi su zasejavani ubadanjem eze do dna epruvete. Nakon inkubacije od 4 dana na 30°C, epruvete su stavljane u frižider. U slučaju negativne reakcije podloga se steže nakon 10 min, dok su u slučaju pozitivne reakcije podloge ostajale tečne.

Produkcija katalaze. Ezom je zahvatana velika količina ćelija sa čvrste TSB podloge koje su potom nanošene na sterilnu Petri šolju. Na ćelije su sipane 1 - 2 kapi 3% (v/v) vodonik peroksida (Zorka Pharma, Srbija). Ukoliko ispitivani soj poseduje katalazu dolazi do burne reakcije uz oslobađanje mehurića kiseonika.

Hidroliza uree. Pripreman je Christensen urea agar (gotova podloga, Torlak, Beograd) koja je razlivana po 5 ml u epruvete i sterilisana 20 min/121°C. Ohlađene i stegnute

podloge imaju žutu boju. Podloge su zasejavane po kosini i inkubirane 24-72 h na 30°C. Pojava crvene boje indikator je da soj razlaže ureu.

Produkcija indola. Pripremana je tečna podloga koja se sastojala od 2% peptona i 0,5% NaCl, razlivana u epruvete po 5 ml i sterilisana u autoklavu 20 min/121°C. Podloge su zatim inokulirane ispitivanim sojevima i inkubirane 24 h na 30°C. Nakon inkubacije u podlogu je dodavant 1 ml ksilola (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, SAD), a zatim 0,5 ml reagensa po Ehrlichu (0,8% (w/v) *p*-dimetil-aminobenzaldehid i 16% (v/v) HCl u 96% (v/v) etanolu). Pojava crvenog prstena bila je indikator da mikroorganizam proizvodi indol.

Hemoliza. Krvni agar je pravljen od NB podloge (0,2% mesnog ekstrakta, 0,2% ekstrakta kvasca, 0,5% bakto peptona i 0,4% NaCl). Nakon sterilizacije autoklaviranjem i hlađenja podloge na oko 50-60°C, sterilno je dodavano 6% (v/v) sterilne defibrinisane ovčije krvi (Torlak, Srbija). Sveže pripremljen krvni agar je crvene boje. Ukoliko bakterije stvaraju hemolizine oko bakterijskih kolonija će se pojaviti prosvetljene zone hemolize u kojima je došlo do lize eritrocita. Na osnovu izgleda zone hemolize razlikuju se α i β . β -hemoliza se odlikuje kompletnom lizom eritrocita i dekolorizacijom hemoglobina zbog čega je zona hemolize potpuno svetla, dok α -hemoliza podrazumeva delimičnu lizu eritrocita i redukciju hemoglobina u methemoglobin zbog čega je zona zelenkaste boje (Knežević-Vukčević 1999).

Ispitivanje prisustva DN-aze. Pripremana je gotova podloga 4,2% DN-aza agar (*eng.* Dnase Agar). Ispitivani sojevi su zasejavani tako što je ezom povučena samo jedna prava linija preko sredine podloge koja je potom inkubirana 24-48 h na 30°C. Očitavanje je vršeno prelivanjem 0,01% (w/v) toluidin plavim u 0,2 M Tris-HCl (pH 7,8) preko podloge (Soto-Hernandez, Nunley et al. 1988). Pojava svetlo roze boje nakon nekoliko sekundi bila je indikator da ispitivani soj proizvodi DN-azu.

Ispitivanje koriscenja različitih izvora ugljenika. Mogućnost korišćenja različitih šećera i drugih supstrata kao jedinog izvora energije vršeno je u minimalnom medijumu MSM koji se sastojao od 0,9% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,15% KH_2PO_4 , 0,02% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002% CaCl_2 , 0,1% (v/v) rastvora minimalnih soli (Schlegel, Kaltwasser et al. 1961) i 0,15% bakteriološkog agara. Nakon sterilizacije u podlogu je dodato finalno 1% (w/v) određenog šećera. Ispitivano je korišćenje sledećih izvora

ugljenika: D(-)-fruktoze, D(+)-glukoze, D(+)-manitola, D(-)-saharoze, D(+)-ksiloze, D(-)-maltoze i glicerola. Kultura su gajene na 30°C (180 obrt/min, šejker sa horizontalnom platformom), a rast je praćen tokom 7 dana.

Rast na različitim koncentracijama NaCl. Ispitivani sojevi su zasejavani u 10 ml TSB medijuma sa različitim koncentracijama NaCl (3%, 6% i 9%) i inkubirani na 30°C (180 obrt/min, šejker sa horizontalnom platformom). Rast mikroorganizama praćen je 7 dana.

3.2. Prečišćavanje i strukturna karakterizacija sekundarnih metabolita

3.2.1. Preparativna hromatografija

Nakon ekstrakcije (poglavlje 3.1.3.1.), ukupni ekstrakti kultura sojeva su analizirani tankoslojnom (TLC) i prečišćavani preparativnom hromatografijom. Svi rastvarači stepena čistoće za tečnu hromatografiju (*eng.* HPLC grade) nabavljani su od kompanije Merck (Merck, Darmstadt, Nemačka).

3.2.1.1. Preparativna tankoslojna hromatografija (PLC)

Preparativna tankoslojna hromatografija je korišćena kao metoda izbora za prečišćavanje malih količina ekstrakta kultura u eksperimentima optimizacije medijuma za proizvodnju DDHR (odjeljak 4.8.2.). Za PLC korišćene su staklene ploče dimenzija 20×20 cm sa silika gelom (slica gel 60) debljine 2 mm (Merck, Darmstadt, Nemačka) na koje je staklenom kapilarom nanošen sav uzorak. Hromatogram je zatim razvijan u kombinaciji organskih rastvarača, istih onih koji su korišćeni i za TLC (poglavlje 3.2.2.1.). Nakon sušenja na vazduhu ploča je posmatrana pod UV svetlom talasne dužine 254 nm (Mineralight Lamp UVSL-58, Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, CA, SAD) i na osnovu R_f vrednosti (odjeljak 3.2.2.1.) određivano je mesto na kome se nalazi DDHR. Sloj silike sa odgovarajućim jedinjenjem uklanjan je sa ploče i ekstrahovan metanolom. Metanolni ekstrakti su zatim upareni do suva i mereni da bi se ocenio prinos DDHR.

3.2.1.2. Prečišćavanje na koloni

Prečišćavanje ukupnih ekstrakata (CRE) kultura vršeno je razdvajanjem na koloni sa silika gelom 60 (velična zrna 230-400 mesh). Frakcije eluirane sa kolone proveravane su na prisustvo sekundarnih metabolita tankoslojnom hromatografijom i UV-Vis spektroskopijom. Za razdvajanje produkata iz soja *S. durmitorensis* wt i *S. durmitorensis* A10 korišćen je sledeći sistem eluata: etil acetat (150 ml), etil acetat i metanol u odnosu 8:2 (150 ml) i na kraju etil acetat i metanol u odnosu 1:1 (60 ml). Za razdvajanje produkata iz CRE soja NP10 korišćeni su eluenti: *n*-heksan i etil acetat u odnosu 1:1 (100 ml), *n*-heksan i etil acetat u odnosu 1:3 (100 ml), etil acetat (50 ml) i na

kraju etil acetat i metanol u odnosu 5:1 (175 ml). Za razdvajanje produkata iz CRE soja JS520 korišćeni su po 100 ml sledećih smeša eluenata: *n*-heksan i etil acetat u odnosu 7:3, *n*-heksan i etil acetat u odnosu 1:1, etil acetat i metanol u odnosu 7:3 i na kraju etil acetat i metanol u odnosu 1:1.

3.2.2. Analitičke metode

3.2.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)

TLC spada u grupu hromatografskih postupaka koji se izvode na ravnim površinama. Do razdvajanja supstanci dolazi usled uspostavljanja dinamičke ravnoteže između komponenata iz smeše sa mobilnom i stacionarnom fazom (Turina 1984). U tankoslojnoj hromatografiji se položaj mrlje, tj. detektovane supstance na hromatogramu definiše retencionim faktorom (R_f) koji predstavlja odnos pređenog puta uzorka (mrlja) i pređenog puta rastvarača:

$$R_f = \ell/L,$$

gde je ℓ put koji pređe supstanca od startne linije, a L put koji pređe rastvarač od startne linije.

Za TLC su korišćene aluminijumske ploče sa 0,25 mm silika gela (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Nemačka) koje sadrže fluorescentni indikator. Na startnu liniju je staklenom kapilarom nanošeno 1-5 μ l uzorka ispitivanog ekstrakta. Hromatogram je stavljan uspravno u zatvorenu komoru za razvijanje hromatograma, tako da je startna linija bila 0,5 cm iznad površine razvijaa. Kao razvijaa su korišćene različite smeše organskih rastvarača: za ekstrakte iz *S. durmitorensis* i NP10 korišćena je smeša etil acetata i metanola (8:2, odn. 7:3), a za JS520 smeša etil acetata i *n*-heksana (7:3). Razvijanje hromatograma je trajalo dok frontu rastvarača nije ostalo 1 cm do vrha ploče. Potom je hromatogram vađen iz komore i sušen na vazduhu. Mrlje su zatim vizualizovane pod UV svetlom talasne dužine 254 nm (Mineralight Lamp UVSL-58, Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, CA, SAD) i dodatno, potapanjem u vodeni rastvor permanganata (5% K₂MnO₄ i 0,25% NaOH) i pečenjem 2 min na 120°C. Hromatogrami su zatim odmah skenirani.

3.2.2.2. Tečna hromatografija i masena spektrometrija

Prečišćene frakcije aktivnih supstanci dalje su razdvajane tečnom hromatografijom i analizirane masenom spektroskopijom (LC-MS). Analiza je rađena na instrumentu za tečnu hromatografiju (HPLC Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) sa C18 kolonom Zorbax Eclipse Plus (150×4,6 mm, unutrašnjeg prečnika od 1,8 μm) i diodnim detektorom (*eng.* diode-array detector) povezanim sa 6210 time-of-flight LC-MS sistemom (Agilent Technologies). Radna temperatura kolone bila je 40°C sa konstantnom stopom protoka od 1,4 ml/min. Mobilna faza bio je gradijent sastavljen od 0,2% vodenog rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B) prema seldećem programu: 0-1,5. min, 5% B; 1,5.-26. min 5-95% B; 26.-35. min 95% B; 35.-36. min 95-5% B; 36.-41. min 5% B. Maseni spektri visoke rezolucije dobijeni elektrosprej jonizacijom (ESI) beleženi su u opsegu odnosa masa/naelektrisanje (m/z) od 100–3200 u pozitivnom jonskom modu, sa potencijalom jonskog izvora od 4000 V i potencijalom fragmentatora od 140 V.

3.2.2.3. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)

NMR spektri uzoraka beleženi su pomoću Varian Gemini 2000 (Varian, Inc., Paolo Alto, CA, SAD), ^1H -NMR na 200 MHz, ^{13}C -NMR na 50 MHz u deuterizovanom hloroformu. Hemijski pomeraji izražavani su u ppm (*eng.* parts-per-million) koristeći tetrametilsilan kao standard.

3.3. Bioaktivnost prečišćenih sekundarnih metabolita

3.3.1. Difuzioni esej sa diskovima

Za testiranje biološke aktivnosti korišćeni su ukupni ekstrakti (odjeljak 3.1.3.1.) i prečišćene frakcije ekstrakata. Suvi CRE ili frakcije rastvarani su u smeši metanola i DMSO (9:1). 200 µl prekonoćne kulture test organizama nanošeno je na odgovarajuću čvrstu podlogu – LB agar (poglavlje 3.5.1.) za bakterije, Sabouraud agar (4% glukoza, 1% pepton, 1,5% agar, pH 5,6) za *C. albicans*, YPD (2% glukoza, 2% pepton, 1% kvašćev ekstrakt, 1,5% agar (Sherman 1986)) za *S. cerevisiae*. Na podloge sa test organizmima polagani su sterilni papirni diskovi (Hi-Media Laboratories, Mumbai, Indija) na koje je nakapavan predhodno pripremljen rastvor aktivne supstance, ukupno 1 mg aktivne supstance po disku. Kao kontrola na disk je nakapavana odgovarajuća zapremina smeše rastvarača. Kao test organizmi korišćeni su sojevi: *Micrococcus luteus* (ATCC 379), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Saccharomyces cerevisiae* FAS20 (Ludwig 1991) i FAV20.

3.3.2. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) bioaktivnih jedinjenja

MIK je određivan dilucionom metodom koja je referentna metoda u testiranju osetljivosti mikroorganizama na antimikrobijalne agense (EUCAST 2003). Dilucion test rađen je u mikrotitarskim pločama sa 96 mesta. Korišćeni tečni medijumi bili su LB, Sabouraud i YPD (poglavlje 3.3.1.) za bakterije, kandidate i pekarski kvasac, respektivno. Aktivne supstance bile su rastvorene u DMSO, a testirane koncentracije bile su (µg/ml): 0,001, 0,1, 0,5, 1, 10, 50, 100, 250, 500 i 1000. Kontrole su sadržale samo medijum, medijum i odgovarajuću količinu rastvarača, medijum i dilucije aktivne supstance. Finalni volumen reakcija je bio 200 µl po bunarčiću. Apsorbancija na 600 nm očitavana je na čitaču (plate reader Labsystem Multiscan RC, MTX LabSystems Inc., Vienna, WY, SAD) u nultom vremenu i na svakih sat vremena u toku sledećih 5 sati, zatim nakon 20 sati i nakon 24 sata. Vrednosti su normalizovane oduzimanjem

vrednosti apsorbancije medijuma i bioaktivne frakcije ekstrakta od vrednosti za kulturu. MIK je definisan kao najniža koncentracija bioaktivne supstance na kojoj test organizam u kulturi ne pokazuje rast.

3.3.3. MTT esej

MTT esej (Hanisch FG 1993) je kolorimetrijski esej za merenje aktivnosti enzima koji redukuju MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) žutu boju do ljubičastog formazana. Osnovna aplikacija ovog eseja je određivanje vijablnosti i proliferativnosti ćelija, te se može koristiti za određivanje citotoksičnosti jedinjenja od potencijalnog medicinskog značaja. Test je rađen na HTR-8/SVneo trofoblastnoj ćelijskoj liniji (Graham CH 1993) (dobijeno ljubaznošću Dr Charles H. Graham-a (Queen's University, Kingston, ON, Kanada). Ćelije su gajene preko noći u mikrotitar pločama sa 96 mesta u po 100 µl OBRT/MINI-1640 medijuma (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, SAD) sa dodatkom 5% (v/v) fetalnog seruma govečeta (FCS) i rastvora antibiotika/antimikotika na 37°C do gustine ćelija od 2×10^4 po bunarčiću u atmosferi vlažnog vazduha sa 5% CO₂. Ćelije su zatim pažljivo ispirane sterinim PBS rastvorom (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, SAD) i inkubirane sa prečišćenim frakcijama ekstrakata sojeva NP10 i JS520, kao i sa DDHR u koncentracijama od 1 ng/ml, 1 µg/ml i 1 mg/ml u medijumu do konačne zapremine od 200 µl. Posle 24 h ćelije su pažljivo ispirane sterilnim PBS dva puta i u svaki bunarčić dodavano je po 100 µl MTT u koncentraciji 2,4 nmol/l rastvorenog u 5% FCS/PBS (v/v). Posle inkubacije od 2 h na 37°C medijum je zamenjen 1-propanolom (100 µl po bunarčiću) i mikrotitar ploče su snažno mučkane da bi se osigurala solubilizacija ljubičastog formazana. Apsorbanca je merena na 570 nm. Svi uzorci su rađeni u heksaplikatu, a ceo eksperiment je ponovljen 2 puta.

3.3.4. Ekofiziološka funkcija undecilprodigiozina (UP)

3.3.4.1. Antioksidativna zaštita - vodonik peroksidni esej

Protektivni efekat UP na ćelije pod oskidativnim stresom meren je vodonik peroksidnim esejom. Suspenzija ćelija dobijena je narastanjem ćelija soja JS520 u TSB medijumu u kome nema produkcije pigmenta i u MSY medijumu u kome ćelije proizvode pigment u trajanju od 4 dana. Ćelije su zatim prikupljane centrifugiranjem 5 min, 5000 obrt/min, RT (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i resuspendovane u sterilnom fosfatnom puferu (50 mM, pH 7,2). Gustina suspenzije ćelija podešena je takoda odgovara 0,1 g/ml vlažne ćelijske mase. Po 200 µl ovako pripremljene ćelijske suspenzije utrljavano je na čvrste TSB podloge, a zatim su na površnu podloge položeni sterilni papirni diskovi (Hi-Media Laboratories, Mumbai, Indija). Na diskove je zatim nakapavano po 20 µl vodonik peroksida različitih koncentracija (20 mM, 100 mM i 200 mM). Podloge su inkubirane 48 h na 30°C, a zatim su merene zone inhibicije rasta ćelija.

3.3.4.2. Osetljivost na UV zračenje

Esej osetljivosti bakterijskih ćelija na UV zračenje rađen je prema Simonsonu (Simonson, Kokjohn et al. 1990) uz male izmene. Suspenzije ćelija soja JS520 narastanih u TSB i MSY medijumu pripremljene su kao što je opisano u poglavlju 3.3.5.1. U esej je uključen i sledeći uzorak: u 9,8 ml suspenzije ćelija iz TSB kulture (uslovi kada nema produkcije undecilprodigiozina) dodato je 200 µl rastvora prečišćenog pigmenta (100 mg/ml u etanolu) i ćelije su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi uz umereno mešanje (100 obrt/min). Po 10 ml svake od tri suspenzije ćelija premešteno je u sterilne staklene Petri šolje i osvetljeno UV lampom (254 nm, Mineralight Lamp UVSL-58, Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, CA, SAD) u trajanju od 5, 10 i 15 min. Napravljena su serijska razblaženja supenzija tretiranih i ne tretiranih ćelija za svaku vremensku tačku i zasejana na čvrste TSB podloge. Nakon inkubacije od 48 h na 30°C brojane su kolonije i za svaku vremensku tačku preračunavan je procenat preživljavanja u prisustvu UP.

3.3.4.3. Zaštita od delovanja antibiotika

Za ovaj esej podloge sa bakterijama su pripremljena na isti način kao za vodonik peroksidni esej i proveravana je osetljivost ćelija soja JS520 koje proizvode UP u odnosu na ćelije koje ga ne proizvode. Na papirne diskove nanošeno je 0,1, 0,5 i 1 mg tetraciklina, kanamicina i hloramfenikola i 0,01, 0,05 i 0,1 mg 8–hidroksihinolina. Tetracklin i kanamicin su rastvarani u sterilnoj dejonizovanoj vodi, hloramfenikol u 70% (v/v) etanolu, a 8–hidroksihinolin u vodi zakišeljenoj do pH 5 pomoću 1 M HCl. U eksperiment su uključene i odgovarajuće kontrole koje su sadržale samo rastvarače.

3.3.4.4. Antioksidativno delovanje undecilprodigozina

Antioksidativna aktivnost prečišćenog pigmenta proveravana je izmenjenom gvožđe tiocijanatnom metodom (Haraguchi, Hashimoto et al. 1992; Takao, Kitatani et al. 1994). Po 400 µl etanolnog rastvora prečišćenog pigmenta i α–tokoferola (100 mg/ml) dodavano je u reakcione vaje od tamnog stakla sa poklopcima, zapremine 4 ml, dimenzija 15×45 mm koje su sadržale 400µl etanolnog rastvora linolne kiseline (25 mg/ml), 800 µl natrijum fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,2) i 400 µl destilovane vode. Kontrolne reakcije su bile reakcija koja je sdržala samo rastvarač i reakcija bez linolne kiseline. Vaje su inkubirane na 45°C sa mešanjem (200 obrt/min) 7 dana. Svaka 24 h u toku inkubacije uzimani su alikvoti od 30 µl i dodavani u staklenu kivetu za spektrofotometar koja je sadržala smešu od 3 ml 75% (v/v) etanola, 100 µl 30% vodenog rastvora NH₄SCN i 100µl 2,45×10⁻⁴% FeCl₂ u 1M HCl. Da bi se komponente pomešale kiveta je okretana tri puta. Reakcija je inkubirana dva min, a zatim je merena apsorbanca na 500 nm (Ultrospec 3300 pro, Biochrom, Cambridge, VB).

3.4. Karakterizacija produkcije bioaktivnih jedinjenja

3.4.1. Krive rasta sojeva

Krive rasta sojeva NP10 i JS520 određivane su u MSY medijumu. Kriva rasta soja *S. durmitorensis* određivana je u NE/manitol (NEM) medijumu. Svi sojevi su prvo gajeni 48 h u po 20 ml TSB medijuma. Ove kulture korišćene su kao starter kulture iz kojih su 2% inokulumom zasejavani triplikati kultura od 100 ml. Ove kulture gajene su 7 dana na 30°C i svakoga dana, počev od dana zasejavanja (nulto vreme) uziman je alikvot od 3 ml. Alikvoti su centrifugirani 5 min, 5 000 obrt/min, RT, (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), supernatanti odbacivani, a talozi sušeni 24 h na 65°C i zatim mereni na analitičkoj vagi (Sartorius, Göttingen, Nemačka). Rast je izražavan kao priraštaj suve mase ćelija u vremenu.

3.4.2. Određivanje produkcije po gramu suve mase micelijuma

Suva masa micelijuma određivana je na sledeći način: alikvoti od 3 ml kulture centrifugirani su 5 min, 5 000 obrt/min, RT, (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u predhodno odmerenim epruvetama. Supernatant je zatim odbacivan, a ćelijski talog je u otvorenoj epruveti sušen 24 h na 65°C. Suvi talozi su zatim mereni na analitičkoj vagi. Količina proizvedene aktivne supstance prvo je izražavana u miligramima po litru kulture, a zatim preračunavana i finalno izražavana u miligramima po miligramu suve mase ćelija.

3.4.3. Lokalizacija bioaktivnih jedinjenja

Da bi se utvrdilo da li se bioaktivna jedinjenja predominantno sekretuju u medijum ili ostaju vezana za ćelijske komponente posebno su mereni apsorpcioni spektri za medijum i ćelije: 3 ml sedmodnevne kulture je prvo obarano u kliničkoj centrifugi pod standardnim uslovima (5 min, 5 000 obrt/min, RT). Zatim je vršena ekstrakcija posebno iz supernatanta (medijuma), posebno iz taloga (ćelija), sa po 3 ml etil-acetata i mereni UV-Vis apsorpcioni spektri ekstraktata na način kako je to opisano u odeljku 3.1.3.1. i 3.1.3.2.

3.4.4. Uticaj fizičko-hemijskih faktora na rast i proizvodnju UP kod JS520

Da bi se analizirao uticaj različitih fizičko-hemijskih faktora kao što su temperatura, pH i aeracija, na rast i produkciju UP, kulture soja JS520 su gajene u MSY medijumu u različitim uslovima. Jedan set kultura je gajen na temperaturama od 18°C, 25°C, 30°C, 37°C i 43°C u uslovima intenzivne aeracije (200 obrt/min). U drugom setu pH medijuma podešavan je od pH 4 do pH 9 pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl. Treći set kultura gajen je u uslovima aeracije pri 50, 100, 150 i 200 obrt/min. U kulturama je praćen priraštaj biomase i proizvodnja UP kao što je ranije opisano.

3.4.5. Optimizacija medijuma za produkciju UP

Rast kulture i produkcija undecilprodigiozina testirani su u šest različitih kompleksnih medijuma i u tri različita definisana medijuma. Korišćeni kompleksni medijumi bili su: MSY, TSB, GYM, NB, YE (0,5% kvašćev ekstrakt) i PSB ((2% mleveni kikiriki (Florida bel, Srbija); (Giri, Anandkumar et al. 2004)). Kao definisani medijumi korišćeni su standardni medijumi optimizovani za streptomicete: mM, R2YE i HMM, s tim što je glukoza u njima zamenjena 1% (w/v) maltozom. pH medijuma podešavan je na 6,9-7,2 pre sterilizacije 15 min/121°C. Glukoza je sterilisana filtriranjem i dodavana nakon sterilizacije. Sastav minimalnih medijuma bio je sledeći:

mM (Kieser, Bibb et al. 2000): 2,7% skroba, 0,3% mesnog ekstrakta, 0,5% triptona, 0,1% glukoze, 0,5% kvašćevog ekstrakta, 0,6% CaCO₃, 0,4% KCl, sterilizacija 20 min/121°C.

R2YE (Hopwood, Bibb et al. 1985): 3,3% saharoze, 0,3% glukoze, 0,003% kazamino kiselina, 0,008% K₂SO₄, 0,328% MgCl₂×6H₂O uz dodatak 0,06% rastvora soli koji se dodaje nakon autoklaviranja.

Rastvor soli ima sledeći sastav (g/l): 0,04 ZnCl₂, 0,2 FeCl₃×6H₂O, 0,01 CuCl₂×6H₂O, 0,01 MnCl₂×6H₂O, 0,01 Na₂B₄O₇×7H₂O, 0,01 (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O i sadrži sledeće rastvore: 60 ml/l 0,5% KH₂PO₄, 90 ml/l 20% L-Prolina, 30 ml/l 1M NaOH, 114 ml/l 14,7% CaCl₂, 131 ml/l 23% TES pufera (5% 1M Tris pH 8,0, 2% 0,25M EDTA, 0,3% NaCl, pH 7,2), 150 ml/l 20% kvašćevog ekstrakta.

HMM (Hobbs, Frazer et al. 1989): 0,5% NaCl, 0,5% Na₂SO₄, 0,45% NaNO₃, 0,2% K₂HPO₃, 0,2% glukoze, 0,12% TRIS bazu, 0,1% MgSO₄×7H₂O, 0,01% ZnSO₄, pH 7,2 i 0,1% rastvor soli sa sledećim solima (g/l): 8,775 FeCl₃, 2,04 ZnCl₂, 1,015 MnCl₂×4H₂O, 0,425g CuCl₂×2H₂O, 0,415 NaJ, 0,210 H₂BO₃, 0,298 CaCl₂×6H₂O, 0,242 NaMoO₄×2H₂O.

MSY medijum je optimizovan dodavanjem metil oleata (0,2% i 0,4%, v/v), L-tirozina (0,3%), L-prolina (0,3%), L-glicina (0,3%), L-serina (0,3%), kombinacije L-prolina/L-glicina/L-serina (0,1% svakog), zamenom D-maltoze glukozom (3%), fruktozom (3%), 6% (v/v) glicerolom, natrijum dodekanoatom (3%), uljem koštica grožđa (Olitalia, Forli, Italija) (1,5%, v/v) i oduzimanjem različitih komponenti MSY medijuma kao što su TSB, maltoza, soli, kao i oduzimanjem kombinacija ovih komponenti (Tabela 11.).

3.4.6. Optimizacija medijuma za produkciju DDHR

Rast kulture soja *S. durmitorensis* i produkcija DDHR testirani su u sedam različitih medijuma: NEM (NE koji sadrži 2% manitola), JS, JSO (Nikodinovic 2004) (2% glukoza, 6% dekstrin, 3% sojino brašno (Florida Bel, Srbija), 1% CaCO₃, pH 7,2), MSF, GYM, YED (Gil, Naharro et al. 1985) (5% glukoza, 1% bako pepton, 1% CaCO₃, 0,001% MnCl₂, 0,001% FeSO₄, pH 7,2) i skrob/nitratni medijum (Glazebrook, Vining et al. 1993) (1% rastvorljivi skrob (Merck, Darmstadt, Nemačka), 0,25% KNO₃ i 0,1% K₂HPO₄, pH 7,0). NEM je optimizovan oduzimanjem pojedinačnih komponenti medijuma, zatim kombinovanim oduzimanjem komponenti medijuma, zamenom izvora ugljenika i azota, dodavanjem metil oleata (0,2%, v/v), ulja koštica grožđa (0,2%, v/v) (Tabela 13.). Kiselost medijuma podešavana je na pH 7,0 pre, a 50% rastvor glukoze dodavan je nakon sterilizacije.

3.5. Tehnike rekombinantne DNK

3.5.1. *Escherichia coli* sojevi, medijumi i plazmidi

Za konstrukciju kozmidne biblioteke korišćen je soj *E. coli* XL1-Blue MR ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$), Stratagene, La Jolla, CA, SAD.

Za konstrukciju kozmidnih podbiblioteka kao i za sve eksperimente kloniranja korišćen je soj *E. coli* DH5 α (F^+ , Δlac , U169($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gyrA96*, *endA1*, *thi-1*, *relA1*, (Hanahan 1983)).

Za transformaciju, izolovanje DNK i čuvanje, ovi sojevi su gajeni na čvrstom ili u tečnom bogatom Luria Bertani (LB) medijumu ((Sambrook 1989), 1% bakto-triptona, 1% NaCl, 0,5% kvašćevog ekstrakta; pH 7,5; za čvrste podloge uz dodatak 1,5% agara; sterilizacija 20 min/121°C). U zavisnosti od eksperimenta u medijum su dodvani antibiotici tetraciklin (10 $\mu\text{g/ml}$) i ampicilin (100 $\mu\text{g/ml}$). Za pravljenje elektrokompetentnih ćelja korišćen je LB medijum sa 0,5% NaCl, a za oživljavanje nakon elektroporacije SOC medijum ((Hanahan 1983), 2% bakto triptona, 0,5% kvašćevog ekstrakta, 10mM NaCl, pH 7,5, sterilizacija 15 min/121°C, sa dodatkom 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ i 20 mM glukoze nakon sterilizacije).

Svi sojevi *E. coli* su gajeni na 37°C uz intenzivnu aeraciju (180 obrt/min).

Za detekciju aktivnosti β -galaktozidaze („plavo-bela“ selekcija) u čvrste podloge je dodavan 5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktozid (X-gal, Fermentas, Vilnius, Litvanija) (20 mg/ml u DMSO) tako da je finalna koncentracija u medijumu iznosila 40 $\mu\text{g/ml}$ i 1M izopropil- β -D-tio-galaktozid (IPTG, Fermentas, Vilnius, Litvanija) do finalne koncentracije u medijumu od 0,5 mM.

Za kloniranje PCR fragmenata korišćen je plazmid pUC18 (Yanisch-Perron, Vieira et al. 1985).

3.5.2. Priprema kompetentnih *E. coli* ćelija i elektroporacija

Kompetentne *E. coli* ćelije pripremane su za jednokratnu upotrebu svaki put sveže. Ovaj protokol je obezbeđivao dobijanje kompetentnih ćelija visoke efikasnosti (standardno reda veličine 10^8 transformanata po μg DNK). Ćelije su zasejavane iz prekonoćne kulture (1% v/v inokulum) i gajene do kasne eksponencijalne faze rasta kada je optička gustina kulture merena na 600 nm (GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, VB) iznosila 0,9. Ovakva kultura inkubirana je 30 min na 4°C da bi se zaustavio rast ćelija. Zatim su ćelije sakupljane centrifugiranjem 15 min, 4000 obrt/min, 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Ćelije su zatim dva puta ispirane resuspendovanjem u jednakoj zapremini hladne sterilne vode i ponovo sakupljane pod istim uslovima. Posle poslednjeg centrifugiranja i odbacivanja supernatanta, ćelije su nežno resuspendovane u zaostaloj vodi. Alikvoti od 50 μl ovako dobijene ćelijske suspenzije odmah su korišćeni za transformaciju. Zapremina DNK dodavana u ćelijsku suspenziju bila je manja od 5 μl . Suspenzija ćelija sa DNK inkubirana je 5 min na ledu, a zatim je unošena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju razmaka 0,1 cm (BioRad, Hercules, California, SAD). Elektroporacija je vršena pri parametrima: 1,25 kV, 25 mF, 200 Ω (Gene Pulser, BioRad, Hercules, California, SAD). Po primenjenom strujnom impulsu u kivetu je odmah dodavan 1 ml SOC medijuma. Suspenzija ćelija je oživljavana inkubiranjem 1,5 h na 37°C uz umerenu aeraciju i zatim zasejavana na odgovarajuće podloge.

3.5.3. Izolovanje plazmidne DNK

Plazmidi su standardno izolovani mini-prep tehnikom upotrebom komercijalnog kita (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN, Hilden, Nemačka) koji se zasniva na alkalnoj lizi bakterija (Birnboim 1983) i prečišćavanju plazmida na komercijalnoj koloni koja specifično vezuje DNK. Za dobijanje veće količine plazmidne DNK protokol je modifikovan dodavanjem koraka inkubacije 30 min na 4°C nakon centrifugiranja lizata.

3.5.4. Izolovanje genomske DNK streptomiceta

Ukupna genomska DNK streptomiceta izolovana je prema metodi Nikodinović i saradnika (Nikodinovic, Barrow et al. 2003). Čelije su gajene u TSB medijumu (30 ml) preko noći na 30°C uz aeraciju od 200 obrt/min. Nakon inkubacije ćelije su sakupljane centrifugiranjem (5 min, 4 000 obrt/min, RT, Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i resuspendovane u rastvoru za lizu koji je sadržao 0,3 M saharozu, 25 mM EDTA i 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) sa dodatkom 2 U RNaze A (Promega, Fitchburg, WI, SAD). Suspenziji je dodavan lizozim (Promega, Fitchburg, WI, SAD) u koncentraciji od 1 mg/ml i suspenzija je inkubirana 30 min na 37°C. Potom je suspenziji dodavana 1/10 zapremine 10% SDS-a i 0,5 mg/ml proteinaze K (Promega, Fitchburg, WI, SAD) i inkubirana je 1,5 h na 55°C uz povremeno mešanje inverzijom. Zatim je dodavana 1/3 zapremine 5 M NaCl i 1 zapremina hloroforma nakon čega je uzorak inkubiran 30 min na 25°C na rotirajućem točku. Nakon centrifugiranja (20 min, 5 000 obrt/min, RT) gornja, vodena faza je prebacivana pipetom u čistu epruvetu i dodavana je jednaka zapremina izopropanola. Epruveta je jednom pažljivo invertovana, a zatim je DNK namotavana na zatopljenu staklenu kapilaru, prebacivana u čistu mikro epruvetu i prana 70% (v/v) etanolom. Nakon pranja i sušenja taloga DNK je rastvarana u 10% (v/v) TE puferu (1mM Tris pH 8,0; 0,1mM EDTA).

Kvalitet i kvantitet izolovane DNK utvrđivani su spektroskopski očitavanjem $A_{260/280}$ (Ultraspec 3300 pro, Biochrom, Cambridge, VB).

3.5.5. Obrada DNK enzimima

DNK je obrađivana restrikcionim endonukleazama prema uputstvu proizvođača enzima (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Inaktivacija restrikcionih enzima vršena je gde je to bilo moguće inkubacijom 20 min na 65°C, odnosno 15 min na 85°C. Ligiranje molekula DNK vršeno je T4 DNK ligazom (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Za ligiranje fragmenata sa tupim krajevima u reakcionu smešu je dodavan 40% polietilenglikol (PEG 6000), do finalne koncentracije od 12%, a reakcija je izvođena na sobnoj temperaturi u trajanju od najmanje 3 h. Koncentracija molekula vektora za ligacionu reakciju određivana je po formuli:

$$MW = (51,1/j/i \times 1/C)^2$$

gde je (MW) molekulska masa vektora u kb, (C) optimalna koncentracija vektora, a (j/i) odnos slobodnih krajeva vektora i inserta (Sambrook 1989) i iznosi između 1 i 3. Molarna koncentracija inserta u reakciji održavana je tri puta većom od koncentracije vektora da bi se favorizovala inter-molekulska ligacija.

3.5.6. Agarozna elektroforeza i prečišćavanje DNK

Restrikcioni produkti i PCR produkti analizirani su horizontalnom elektroforezom u nedenaturišućim uslovima na agaroznim gelovima koncentracije od 0,6 do 1,5% (Sambrook 1989). Kao elektroforetski pufer korišćen je TBE (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8,3). Etidijumbromid je dodavan u gel u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Pufer za uzorak sastavljen je od indikatorskih boja (0,04% bromfenol plavog, 0,04% ksilencijanola) i 6,7% saharoze. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 0,5 do 5 V po dužnom centimetru gela.

Veličina DNK fragmenata je određivana poređenjem njihove elektroforetske mobilnosti sa standardima molekulskih masa. Korišćeni markeri molekulskih veličina bili su:

- 1 kb standard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvanija) veličine traka (bp): 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000, 5 000, 6 000, 8 000, 10 000
- λ /HindIII standard (Fermentas, Vilnius, Litvanija) veličine traka (bp): 125, 564, 2 027, 2 322, 4 361, 6 557, 9 416, 23 130.

Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorskih boja, a detekcija uzoraka na gelu postizana je njihovim osvetljavanjem pod UV svetlom (266 nm, BioDoc Analyze, Biometra, Goettingen, Nemačka).

Preparativna elektroforeza vršena je na isti način kao i analitička. Po završenom razdvajanju, odabrane elektroforetske trake su isecane skalpelom, a izolovanje DNK iz agaroznog gela vršeno je ekstrakcijom komercijalnim rastvorima na koloni prema uputstvu proizvođača (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN, Hilden, Nemačka).

3.5.7. Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu

Oligonukleotidi korišćeni u ovom radu dati su u Tabeli 1 i u Prilogu I.

Tabela 1. - Oligonukleotidi (prajmeri) korišćeni u ovom radu

Naziv	sekvenca	Referenca/izvor
Prajmeri za umožavanje fragmenata iz pUC18 vektora		
M13f-20	GTAAAACGACGGCCAG	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
Prajmeri za utvrđivanje 16S rDNK bakterijske sekvence		
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
1492r	CGGCTACCTTGTTACGACTT	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
Prajmeri za utvrđivanje prisustva gena za poliketid sintazu		
ksf	GAICCSMTSGCSRTCATCGSCATG	(Chuck, Dunn et al. 2006)
ksar	AGSGCSACSAGSSWSSWSSWGCA	(Chuck, Dunn et al. 2006)
MAK1	GACACSGCSTGYTCBTCGTCG	(Savic and Vasiljevic 2006)
MAK3	CCGTTSGACGCRCCGTCCTGGTTSAC	(Savic and Vasiljevic 2006)
Prajmeri za sintezu probe za DNK-DNK hibridizaciju		
c83end2-L	CTTCTCGTGGTCGGGTGT	ovaj rad
c83end2-R	CAGCCCTGTACGAGTTCCAG	ovaj rad
c135T3L	CGAGTACAGGTCCGTGAGGT	ovaj rad
c135T3R	GAGAACAGCACGAACGCG	ovaj rad
Prajmeri za sekvenciranje kozmidne biblioteke		
T3	ATTAACCCTCACTAAAGG	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
T7	AATACGACTCACTATAGG	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
TET-1 FP-1	GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT	Epicentre, Madison, WI, SAD
TET-1 RP-1	TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA	Epicentre, Madison, WI, SAD

Za dizajniranje novih prajmera za PCR i sekvenciranje korišćen je program Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Osobine prajmera su analizirane *in silico*

(<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Sekvence prajmera za analizu kozmidne biblioteke su provereni na postojanje alternativnih mesta vezivanja unutar PKS sekvence BLAST pretragom unutar baze podataka formirane od sekvenci kozmida cos83 i cos16 (The Personal Sequence Database (Givan, Sullivan et al. 2007)). Dizajnirani oligonukleotidi sintetisani su od strane Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD.

3.5.8. Reakcija lančane polimerizacije DNK (PCR)

Za sva umnožavanja korišćeni su PCR aparati GeneAmp PCR System 2700 i 2720 Thermal Cycler, proizvođača Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD). Reakciona smeša (50 µl) sadržala je: 100 ng matrice DNK, 0,2 mM svakog dNTP, 1x Pfu Poly puffer sa MgSO₄, 5% DMSO, 1,5 U *Pfu* polimeraze (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 100 pmol svakog prajmera, osim u slučaju PKS PCR-a gde je reakciona smeša (50 µl) sadržala ~ 1000 ng matrice DNK, 1 mM svakog dNTP, 1x OptiBuffer puffer, 1 mM MgCl₂, 5% DMSO, 4 U BIO-X-ACT long range polimeraze (Bioline, London, VB) i 100 pmol svakog prajmera. Reakcioni uslovi dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. – PCR programi za umnožavanje 16S rDNK, dokazivanje prisustva PKS i sintezu probe za pretraživanje kozmidne biblioteke.

16S PCR, uslovi	
5min, 95°C	1 ciklus
30 s, 72°C	dodavanje polimeraze u reakciju
30 s, 95°C	
40 s, 52°C	33 ciklusa
2 min, 72°C	
10 min, 72°C	1 ciklus
PKS PCR, uslovi	
5min, 94°C	1 ciklus
50 s, 94°C	
50 s, 53°C	33 ciklusa
1 min 30 s, 68°C	
7 min, 68°C	1 ciklus
Sinteza probe, uslovi	
5min, 98°C	1 ciklus
30 s, 72°C	dodavanje polimeraze u reakciju
1 min, 95°C	
1 min 30 s, 50 °C	26 ciklusa
3 min, 72°C	
10 min, 72°C	1 ciklus

3.5.9. DNK-DNK hibridizacija ("Southern blot")

DNK-DNK hibridizacija vršena je probama obeleženim radoaktivnim izotopom fosfora [$\alpha^{32}\text{P}$] ugrađenim u deoksicitozin (dCTP). Sinteza obeležene probe vršena je na odgovarajućoj DNK matrici korišćenjem Multiprime DNA kita za obeležavanje (Multiprime DNA Labeling System, Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska). Ovako pripremljena proba korišćena je za hibridizaciju sa DNK vezanom za najlonsku membranu (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska). DNK vezana za membranu dobijana je na dva načina – direktno iz bakterijskih ćelija (Colony Southern) i nakon elektroforetskog razdvajanja kozmidne DNK obrađene restrikcijom enzimima. Colony Southern je tehnika u kojoj je najlonska membrana prislanjana direktno na Petrijevu šolju na koje se nalaze kolonije bakterija. Membrana je zatim

prana u denaturišućem puferu (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) čime dolazi do lize bakterija i oslobađanja DNK. Nakon toga membrane je prana u neutrališućem puferu (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,4) i na kraju u 10% rastvoru SDS. Membrana je zatim fiksirana pečenjem 2 h na 80°C u vakuum pećnici (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) čime se DNK kovalentno vezala za membranu.

U slučaju hibridizacije sa DNK koja potiče iz gela po završenom elektroforetskom razdvajanju fragmenata kozmidne DNK dobijenih digestijom sa restrikcionim enzimima DNK je depurinisana inkubacijom gela u 0,25 M HCl 15 min. Gel je zatim prebačen u denaturišući pufer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) u kome je inkubiran 20 min, RT. Neutralizacija je rađena dva puta u neutrališućem puferu (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,4), 20 min, RT. Kapilarni transfer na membranu Hybond-N⁺ je rađen preko noći u 20×SSC puferu (3M NaCl, 0,3M Na-citrat, pH 7,0). Po završenom transferu DNK je fiksirana za membranu pečenjem 2 h na 80°C.

Hibridizacija se sastojala iz 2 faze: prehibridizacije i hibridizacije. Prehibridizacija je rađena u hibridizacionom puferu (20×SSC, 5×Denhardov rastvor (0,1% fokol, 0,1% polivinilpirolidin, 1% BSA), 0,1% SDS) na 65°C u trajanju od 1 h. U pufer je potom dodavana denaturisana radioaktivno obeležena proba (u reakciji sa [α^{32} P]) i hibridizacija je vršena na 65°C preko noći uz konstantno mešanje.

Nakon hibridizacije membrana je prana sa tri različita pufera rastućih jonskih jačina: 2×SSC, 0,1% SDS; 1×SSC, 0,1% SDS; 0,1×SSC, 0,1% SDS. Membrana je prana u svakom od pufera tokom 10 min uz neprestano mešanje i to u prvom puferu na sobnoj temperaturi a u druga dva na 65°C.

Hibridizacioni signali su detektovani na čitaču (Cyclone Storage Phosphor System, PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) pomoću OptiQuant softvera (Packard Instrument Company, Meriden, CT, SAD) nakon 1 h ekspozicije ploča osetljivih na zračenje (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) sa membranom ili na autoradiogramu dobijenom nakon eksponiranja rendgenskog filma (Kodak, Rochester, NY, SAD) prislonjenog uz membranu na -70°C tokom 48 h.

3.5.10. Određivanje primarne strukture DNK (sekvenciranje)

Za pirosekvenciranje (Ronaghi, Uhlen et al. 1998) pomoću 454 platforme (454 pyrosequencing, 454 Life Sciences, Branford, CT, SAD) korišćene su usluge GATC Biotech (Konstanz, Nemačka) koja se bazira na korišćenju GS FLX Titanium serije kitova (Roche Applied Science, Penzberg, Nemačka). Za sekvenciranje po Sanger-u (Sanger F 1977) korišćene su usluge BRM Genomics (Padova, Italija) bazirane na BigDye Terminator kitu za sekvenciranje (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). U IMGGI sekvenciranje je rađeno pomoću BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kita (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) korišćenjem PCR aparata (GeneAmp PCR System 2700 ili 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Reakciona smeša sadržala je odgovarajuću količinu DNK matrice u odnosu na veličinu i poreklo (plazmid/kozmid, genomska DNK ili PCR produkt), 3,2 pmol prajmera, 3 µl Ready Reaction Mix-a, 5% DMSO u slučaju GC bogatih matrica i dejonizovanu vodu do finalne zapremine od 8 µl. Sekvenciranje se odvijalo u uslovima datim u Tabeli 3.

Tabela 3. – Reakcioni uslovi za sintezu fragmenata za sekvenciranje

Sekvenciranje, uslovi	
1min, 96°C	1 ciklus
10 sek, 96°C	
10 sek, 50/55°C	25 ciklusa
4 min 60°C	

Temperatura vezivanja prajmera varirana je između 50°C za standardne i 55°C za GC bogate matrice.

Reakcione smeše su prečišćavane od nevezanih obeleženih nukleotida etanol/natrijum acetatnom precipitacijom. 40 µl rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, pH 5,2; 25 ml 96% etanola (v/v); 5,8 ml destilovane vode) dodavano je u reakcionu smešu. DNK je obarana 10 min, 13 000 obrt/min, RT (mikrofuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Talog je zatim pran dva puta sa po 200 µl 70% (v/v) etanola. Talози su zatim sušeni 3 min pod vakuumom (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i resuspendovani u 25 µl formamida (Hi-Di Formamide, Applied Bio-systems, Foster

City, CA, SAD). Ovako pripremljeni uzorci nanošeni su na čitač (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Sekvence dobijene na čitacu su obrađivane programom SeqAnalizer u okviru softverskog paketa samog čitača.

3.6. Kozmidna biblioteka *S. durmitorensis*

3.6.1. Pretraživanje kozmidne biblioteke

Broj klonova kozmidne biblioteke (N) koji je bilo potrebno pretražiti da bi se pronašla jedinstvena (željena) DNK sekvenca određivan je prema jednačini:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f),$$

gde je P verovatnoća, a f predstavljaveličinu fragmenta genoma koji sadži svaki klon (Clarke and Carbon 1976). Zasejavana su serijska razblaženja kozmidne biblioteke *S. durmitorensis*, a zatim je vršena hibridizacija kolonija (poglavlje 3.5.9.). Proba za hibridizaciju dobijena je tako što je PCR produkt dobijen sa kozmidne matrice (poglavlje 3.5.8.) ligiran u vektor pUC18 koji je predhodno linearizovan sečenjem enzimom *SmaI* i sekvenciran prajmerima iz vektora. Zatim je dobijeni konstrukt korišćen kao matrica za amplifikaciju fragmenta probe istim parom prajmera. Dobijen PCR produkt je prečišćavan i korišćen u hibridizacijama. Iz kolonija sa kojima je dobijen signal u hibridizaciji izolovane su kozmidne DNK koje su zatim digerirane enzimom *BamHI* i takodje proveravane kao što je opisano u poglavlju 3.5.9. Iz klonova koji su dali pozitivan signal izolovani su kozmidi čiji su krajevi zatim sekvencirani (poglavlje 3.5.10.) prajmerima T3 i T7 (Tabela 1).

3.6.2. Pravljenje kozmidnih podbiblioteka

Za pravljenje kozmidnih podbiblioteka korišćen je EZ-Tn5™ <TET1> Insertion Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, SAD) prema uputstvu proizvođača. Ovaj kit je zasnovan na nasumičnoj ugradnji modifikovnog transpozona Tn5 koji nosi gen za rezistenciju na tetraciklin posredstvom enzima integraze u ciljnu DNK (kozmid). Na taj način nastaje biblioteka klonova datog kozmida sa po jednim ugrađenim Tn5. Tn5 na svojim krajevima ima mesta za vezivanje prajmera TET-1 FP-1 i TET-1 RP-1 (Tabela 1) pomoću kojih se može „pročitati“ sekvenca kozmidne DNK u okolini ugrađenog transpozona. Reakciona smeša sastojala se od 0,2 µg DNK, ekvimolarne količine transpozona Tn5, 1 µl 10×reakcionog pufera i 1 µl transpozaze (1 U/µl) i sterilne vode do finalne zapremine od 10 µl. Nakon 2 h inkubacije na 37°C reakcija je prekidana

dodavanjem 1 μ l 1% SDS i inkubacijom 10 min na 70°C. 1 μ l ovako dobijene reakcione smeše korišćen je za elektrotransformaciju kompetentnih *E. coli* kao što je opisano u poglavlju 3.5.2. Transformanti su zasejavani na LB selektivne podloge sa dodatkom tetraciklina koje su inkubirane 48 h na 37°C da bi se pojavile kolonije.

3.6.3. Bioinformatička obrada sekvenci

Obrada sekvenci vršena je u programu ChromasPro (Technelysium Pty, Helensvale, Australija) koji korespondira sa programskim paketom za poravnavanje (alignement) sekvenci ClustalW (Thompson, Gibson et al. 2002). Sekvence su sklapanje (assembly) uz pomoć programskog paketa Lasergene SeqMan (DNASTAR, Madison, WI, SAD). Dobijene sekvence su poređene sa deponovanim sekvencama u bazama podataka korišćenjem BLAST programa (Altschul, Madden et al. 1997). Pretraga otvorenih okvira čitanja za prisustvo konzerviranih domena vršena je unutar CDD baze podataka (Marchler-Bauer, Anderson et al. 2009). Anotacija PKS klastera rađena je uz pomoć programskog paketa Clust Scan (Starcevic A 2008), u okviru baze podataka MAPSI (Management and Analysis for Polyketide Synthase type I <http://gate.smallsoft.co.kr:8080/pks/mapsitools/index.pl>), kao i uz pomoć SBSPKS softvera (Anand, Prasad et al. 2010).

3.6.4. Hemijske strukture

Hemijske strukture kreirane su u programu ISIS/Draw 2.5 (MDL Information Systems, San Ramon, CA, SAD).

4. Rezultati

4.1. Odabir sojeva iz kolekcije aktinomiceta

Deo sojeva iz kolekcije aktinomiceta Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama (IMGGI, Beograd, Srbija) testiran je na proizvodnju sekundarnih metabolita. Kriterijum za izbor sojeva u primarnom pretraživanju bio je trojak: sojevi za koje je u toku izolacije i karakterizacije utvrđeno da deluju na *S. cerevisiae* FAV20 (Savić 2004), sojevi za koje je pokazano da poseduju klaster gena za sintezu PKS I (Savic and Vasiljevic 2006) i izrazito pigmentisani sojevi (Tabela 4.). Produkcija sekundarnih metabolita praćena je u dva medijuma – JS i MSY, preko UV/Vis spektara etilacetatnih ekstrakata alikvota kultura na svaka 3 dana. Produkcija u *S. durmitorensis* praćena je i u trećem medijumu, TSB/manitolu, koji je ranije korišćen za produkciju sekundarnih metabolita u ovom soju (Bratić 2006; Stodulkova, Kuzma et al. 2011). Odabrani UV/Vis spektri kultura različitih sojeva dati su u Prilogu II. Nakon 15 dana urađena je ukupna ekstrakcija kultura i određena preliminarna biološka aktivnost ukupnih ekstrakata (CRE), osim za sojeve JS497 i JS520, gde je ekstrakcija urađena nakon 7 dana, jer nakon 15 dana UV/Vis profil nije više bio detektabilan. Od osamnaest ispitivanih sojeva kod dvanaest (JS497, JS520, MSD12, MSD15, NP2, NP4, NP10, NP11, NP13, NP60, *S. durmitorensis* wt i *S. durmitorensis* A10) je detektovan UV/Vis spektar čiji je profil bio indikativan za prisustvo sekundarnih metabolita koji sadrže hromofore i sa CRE ovih sojeva urađeni su biološki testovi na mikroorganizmima (Tabela 4.). Od izdvojenih dvanaest sojeva MSD12, MSD15, *S. durmitorensis* wt i *S. durmitorensis* A10 su produkovali sekundarne metabolite u JS medijumu, dok su ostalih osam sojeva produkovali u MSY medijumu (Tabela 4.). Kod *S. durmitorensis* gajenog na TSB/manitolu nije detektovan UV/Vis spektar čiji bi profil bio indikativan za prisustvo sekundarnih metabolita koji sadrže hromofore.

CRE kultura su testirani na sojevima *S. cerevisiae* (FAV20), *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC 25923) i *B. subtilis* 168 (ATCC 23857). Pojava zone inhibicije rasta nekog od sojeva smatrana je pozitivnom reakcijom. Odsustvo zone

inhibicije rasta smatrano je negativnom reakcijom, tj. odsustvom delovanja datog CRE na određeni soj (Tabela 4.).

Tabela 4. – Produkcija sekundarnih metabolita u tečnoj kulturi i biološka aktivnost ukupnih ekstrakata odabranih sojeva aktinomiceta.

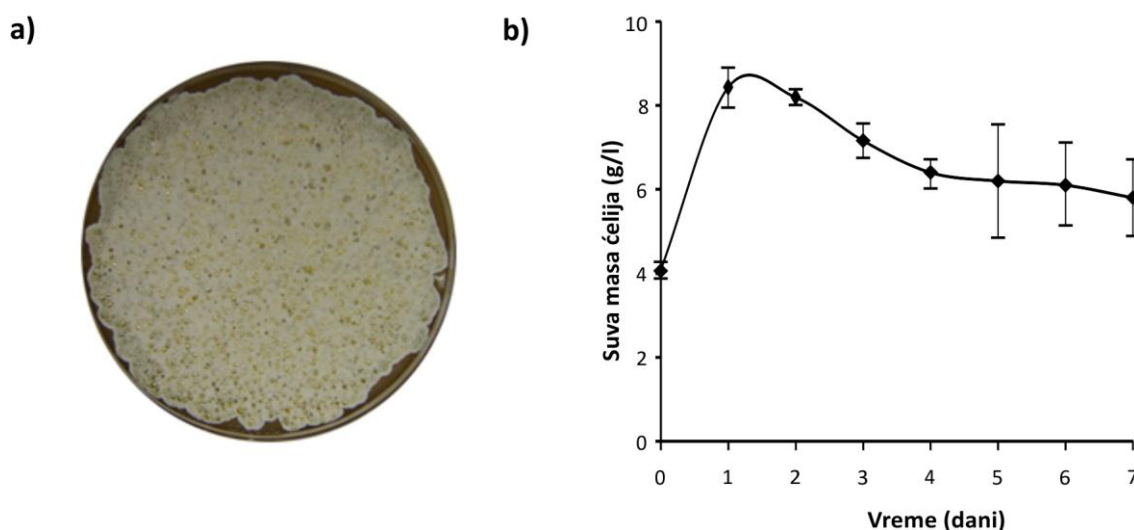
soj	medijum ^a	<i>S. cerevisiae</i> FAV20	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
JS497	MSY	- ^b	-	s.r. ^c	-
JS520	MSY	+ ^d	-	+	-
MS7	/ ^e				
MS10	/				
MSD12	JS	-	-	-	+
MSD13	/				
MSD15	JS	-	-	+	+
MSG12	/				
MSG13	/				
NP2	MSY	-	-	-	-
NP4	MSY	-	+	+	+
NP10	MSY	+	-	-	+
NP11	MSY	+	-	-	-
NP12	/				
NP13	MSY	+	-	+	-
NP60	MSY	+	-	-	-
<i>S. durmitorensis</i> wt	JS	+	-	-	-
<i>S. durmitorensis</i> A10	JS	-	+	+	+

^a medijum u kome je detektovana produkcija; ^b odsustvo zone inhibicije rasta; ^c odsustvo zone, smanjen rast; ^d prisustvo zone inhibicije rasta; ^e nema produkcije u ispitivanim medijumima – biološka aktivnost nije testirana

Na osnovu biološke aktivnosti, dinamike proizvodnje i UV/Vis profila za dalje ispitivanje izabrani su sekundarni metaboliti *S. durmitorensis* i sojeva NP10 i JS520.

4.2. Identifikacija i karakterizacija sojeva NP10 i JS520

Soj NP10 (Slika 11a) uzorkovan je na lokalitetu sela Čumić u okolini Kragujevca, Srbija (Papić 2000). Soj NP10 na svim testiranim čvrstim medijumima razvija svetlo žut micelijum. Ni na jednom od testiranih medijuma nije detektovana proizvodnja egzopigmenta. Soj dobro sporuliše već nakon 48 h na većini testiranih medijuma (Prilog III), pri čemu su spore bele boje (Slika 11a). Takođe, ima sposobnost produkcije spora u tečnom medijumu. Kriva rasta na MSY medijumu pokazala je da ovaj soj brzo dostiže stacionarnu fazu (nakon 48 h rasta) i da se u ovom medijumu ne odlikuje produkcijom velike biomase (8,31 g/l u ranoj stacionarnoj fazi) (Slika 11b). U toku eksponencijalne faze rasta, u toku prvih 24 h, stopa rasta kulture iznosila je 0,18 g/l na sat.



Slika 11. – Izolat NP10. **a)** Izolat NP10 na MSF podlozi nakon 3 dana rasta. **b)** Kriva rasta soja NP10 u MSY medijumu.

Soj JS520 (Savić 2001) uzorkovan je na lokalitetu jame Rakin ponor, planina Miroč, Srbija. Odlikuje se sivkasto belim sporama i sposobnošću produkcije tamno ljubičastog pigmenta već nakon 48 h na čvrstom MSF medijumu (Slika 12a). Egzopigment je detektovan i u tečnom MSY medijumu (Slika 12b) već nakon 4 dana kultivacije. Kriva rasta soja data je u poglavlju 4.6.3., Slika 29.

a)



b)



Slika 12. – Izolat JS520. **a)** Izolat JS520 na MSF podlozi nakon 3 dana rasta. **b)** Tečna kultura soja JS520 u MSY medijumu nakon 7 dana kultivacije.

4.2.1. Biohemijska karakterizacija sojeva

Soj NP10 ima sposobnost hidolize želatina i uree i pokazuje prisustvo katalaze (Tabela 5.). Ovaj soj takođe pokazuje DNK-znu aktivnost i sposobnost hemolize, osobine koje karakterišu patogene i oportune patogene (Knežević-Vukčević J. 1999). Soj NP10 može da raste i na 9% NaCl, a kao izvor ugljenika može da koristi manitol, maltozu, glukozu, glicerol, ksilozu i fruktozu (Tabela 5.).

Soj JS520 pokazuje sposobnost hidrolize uree, redukcije nitrata u nitrite i prisustvo katalaze. Raste na 6%, ali ne i na 9% NaCl. Od izvora ugljenika rastao je na svim ponuđenim izvorima osim rafinoze i ksiloze (Tabela 5.).

Tabela 5. – biohemijske karakteristike izolata NP10 i JS520.

Karakteristika	Rezultati za soj	
	NP10	JS520
Biohemijski testovi		
Hidroliza želatina	+ ^a	- ^b
Proizvodnja H ₂ S	-	-
Lipaza test	-	-
Hidroliza uree	+	+
Prisustvo katalaze	+	+
Korišćenje citrata	-	-
Produkcija indola	-	-
Detekcija hemolizina	+	-
Prisustvo DNaze	+	-
Redukcija nitrata u nitrite	-	+
Rast na različitim koncentracijama NaCl		
3%	+	+
6%	+	+
9%	+	-
Rast na različitim izvorima ugljenika		
manitol	+	+
saharoza	-	+
maltoza	+	+
glukoza	+	+
glicerol	+	+
ksiloza	+	-
fruktoza	+	+
arabinoza	n.r. ^c	+
rafinoza	n.r.	-

^a detektovana pozitivna reakcija/rast; ^b negativna reakcija/nema rasta; ^c nije ispitivano.

4.2.2. Analiza sekvenci 16S rDNK

Parcijalna sekvenca 16S rDNK soja NP10 od 1224 nukleotida deponovana je u bazi podataka GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod pristupnim brojem JQ288108. Na osnovu pretraživanja baza podataka ribozomalnih DNK (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), rDNK sekvenca soj

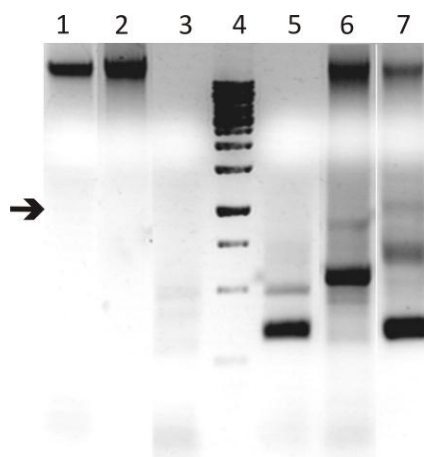
NP10 nedvosmisleno smešta u rod *Streptomyces*, a najveće poklapanje (sa koeficijentom verovatnoće od 0,997) dobijeno je sa *Streptomyces badius* ((T) GenBank AY999783; NRRL B-2567; CSSP536 i GenBank AB184114; NBRC 12745;) i sa *S. rubiginosohelvolus* (T); (GeneBank AB184240; NBRC 12912). Ovo je u skladu sa rezultatima pretraživanja BLAST algoritmom nukleotidne kolekcije NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gde celokupna deponovana sekvenca ima 99% homologije i najveću identičnost sa ova dva soja.

Parcijalna sekvenca 16S rDNK soja JS520 od 1319 nukleotida deponovana je u bazi podataka GeneBank pod pristupnim brojem JQ288109. I ovaj izolat na osnovu 16S rDNK sekvence pripada rodu *Streptomyces*. Na osnovu pretraživanja RDP baze podataka rDNK sekvenca JS520 pokazuje najveće poklapanje (sa koeficijentom verovatnoće od 0,996) sa sojevima *S. violaceolatus* (GenBank NR027223; DSM 40438) i *S. humiferus* (GeneBank NR025250; DSM43030), što je u skladu sa rezultatima pretraživanja nukleotidne kolekcije NCBI gde deponovana sekvenca ima 99% identičnosti sa 16S rDNK ova dva soja.

Parcijalne sekvence 16S rDNK sojeva NP10 i JS520 koje su deponovane u bazi podataka GenBank sa po prvih deset rezultata poravnanja ovih sekvenci sa bazom podataka za sekvence 16S rDNK bakterija i arhea NCBI prikazane su u Prilogu IV.

4.2.3. Prisustvo gena za poliketid sintazu

Genomi sojeva NP10 i JS520 testirani su na prisustvo gena za poliketid sintazu (PKS) u dve reakcije sa degenerisanim prajmerima ksf, ksar i MAK1, MAK3 (Tabela 1). Kao pozitivna kontrola za prisustvo PKS gena korišćena je genomska DNK *S. durmitorensis* koja je dala sa ksf i ksar prajmerom produkt od ~ 500 bp i sa MAK1 i MAK3 prajmerima očekivani produkt od 316 bp (Savic and Vasiljevic 2006) (Slika 13.). U reakciji sa genomskom DNK izolata NP10 nije umnožen fragment ni sa jednim testiranim parom prajmera, dok je u reakciji genomske DNK soja JS520 sa prajmerima MAK1 i MAK3 dobijen proizvod umnozavanja od ~ 300 bp (Slika 13.).



Slika 13. – Prisustvo PKS I gena u genomima sojeva *Streptomyces* sp. NP10 (kolone 1 i 2), *Streptomyces* sp. JS520 (kolone 3 i 5) i *Streptomyces durmitorensis* (kolone 6 i 7). Reakcije sa prajmerima ksf i ksar date su u kolonama 1, 3 i 6. Reakcije sa prajmerima MAK1 i MAK3 date su u kolonama 2, 5 i 7. U koloni 4 nalazi se 1 kb standard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvanija), visina trake od 1 kb obeležena je strelicom.

4.3. Antimikrobna aktivnost ukupnih ekstrakata kultura

Nakon preliminarnih biotestova ukupni ekstrakti kultura (CRE) *Streptomyces* sp. NP10, *Streptomyces* sp. JS520, *S. durmitorensis* wt i *S. durmitorensis* A10 testirani su na širem spektru mikroorganizama – FAS20 i FAV20 sojevima *S. cerevisiae*, dva soja *Candida albicans*, četiri soja Gram-pozitivnih i dva soja Gram-negativnih bakterija (Tabela 6.).

Ekstrakti svih testiranih kultura pokazivali su široko antimikrobno dejstvo. CRE soja NP10 pokazuje inhibitorno delovanje na *S. cerevisiae* i Gram-pozitivne bakterije, ali ne i na sojeve roda *Candida* i Gram-negativne bakterije. Izolat JS520 svojim produktima selektivno deluje na FAS20, ali ne i na FAV20, pokazuje izraženo dejstvo na sojeve *Candida*, kao i na Gram-pozitivne bakterije sa izuzetkom *Enterococcus faecalis* (Tabela 6.). Dok je za *S. durmitorensis* wt i A10 bilo od ranije poznato različito dejstvo na soj FAV20 (Bratić 2006), pokazalo se da postoji razlika i u antibakterijskom delovanju na sojeve *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*. Dok *S. durmitorensis* wt smanjuje rast *M. luteus* i *P. aeruginosa*, a inhibira rast *K. pneumoniae*, dotle mutant A10 potpuno inhibira rast *M. luteus* i *P. aeruginosa*, a uopšte ne deluje na *K. pneumoniae* (Tabela 6.).

Tabela 6. – Biološka aktivnost ukupnih ekstrakata kultura.

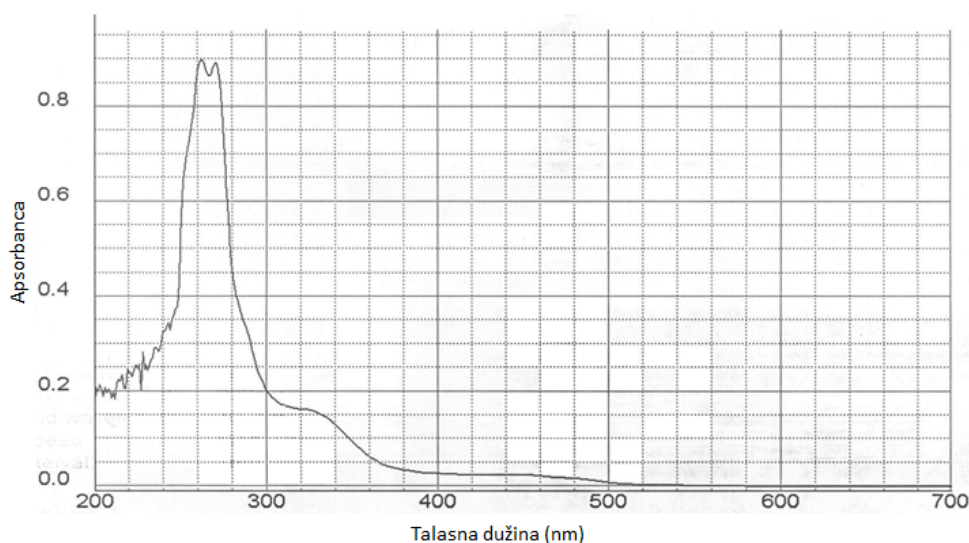
	NP 10	JS520	<i>S. durmitorensis</i> wt	<i>S. durmitorensis</i> A10
<i>S. cerevisiae</i> FAS20	+ ^a	- ^b	-	-
<i>S. cerevisiae</i> FAV20	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 10259	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+
<i>M. luteus</i>	+	+	s.r. ^c	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	s.r.	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	-

^a prisustvo zone inhibicije rasta; ^b odsustvo zone inhibicije rasta; ^c smanjen rast.

4.4. Prečišćavanje i karakterizacija bioaktivnih jedinjenja

4.4.1. Prečišćavanje i karakterizacija produkata *Streptomyces* sp. NP10

Apsorpcioni profil ukupnog etilacetatnog ekstrakta kulture NP10 je imao karakterističan izgled – “zečje uši” odnosno dva bliska pika na 263 i 272 nm i slabije izražen pik na 325 nm (Slika 14.).

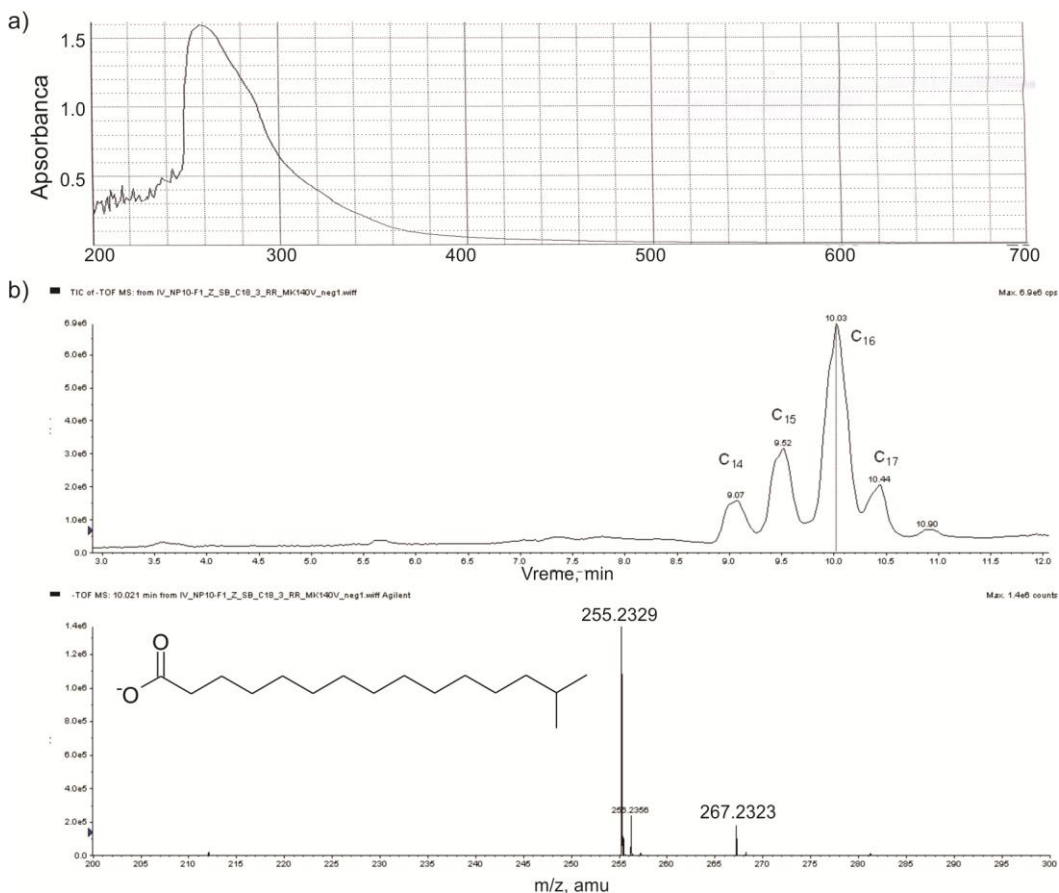


Slika 14. – UV-vis profil etilacetatnog ekstrakta kulture NP10 nakon 10 dana gajenja u MSY medijumu.

Nakon prečišćavanja na koloni, frakcije sa eluatima mogle su se grupisati u 3 frakcije (F1, F2 i F3) od kojih je po masi dominantna bila F1. Ova frakcija iznosila je 30% (w/w) CRE, dok su F2 i F3 činile 0,4% i 12%, respektivno. F1 i F3 frakcije su zatim analizirane pomoću LC-MS (poglavlje 3.2.2.2.). Frakcija F2 nije dalje analizirana zbog neadekvatne količine materijala.

U toku hromatografske analize F1 frakcije uočeno je da se ova frakcija smeša 4 produkta koji se eluiraju u 9,07. minutu, 9,52. minutu, 10,03. minutu i 10,44. minutu, respektivno (slika 15b). Glavni pseudomolekularni jonski pik uočen je na m/z 255,2329 $[M+H]^+$ što je u skladu sa molekularnom formulom **izopalmitinske** (14-metilpentadekanske) **kiseline** $C_{16}H_{32}O_2$ (preračunata m/z 256,4241 $[M+H]^+$). Manji pik eluiran u 10,44. minutu je pseudomolekularni jon na m/z 267,2323 $[M+H]^+$ ukazujući da se radi o produktu molekulske formule $C_{17}H_{34}O_2$ (preračunata m/z 270,4507

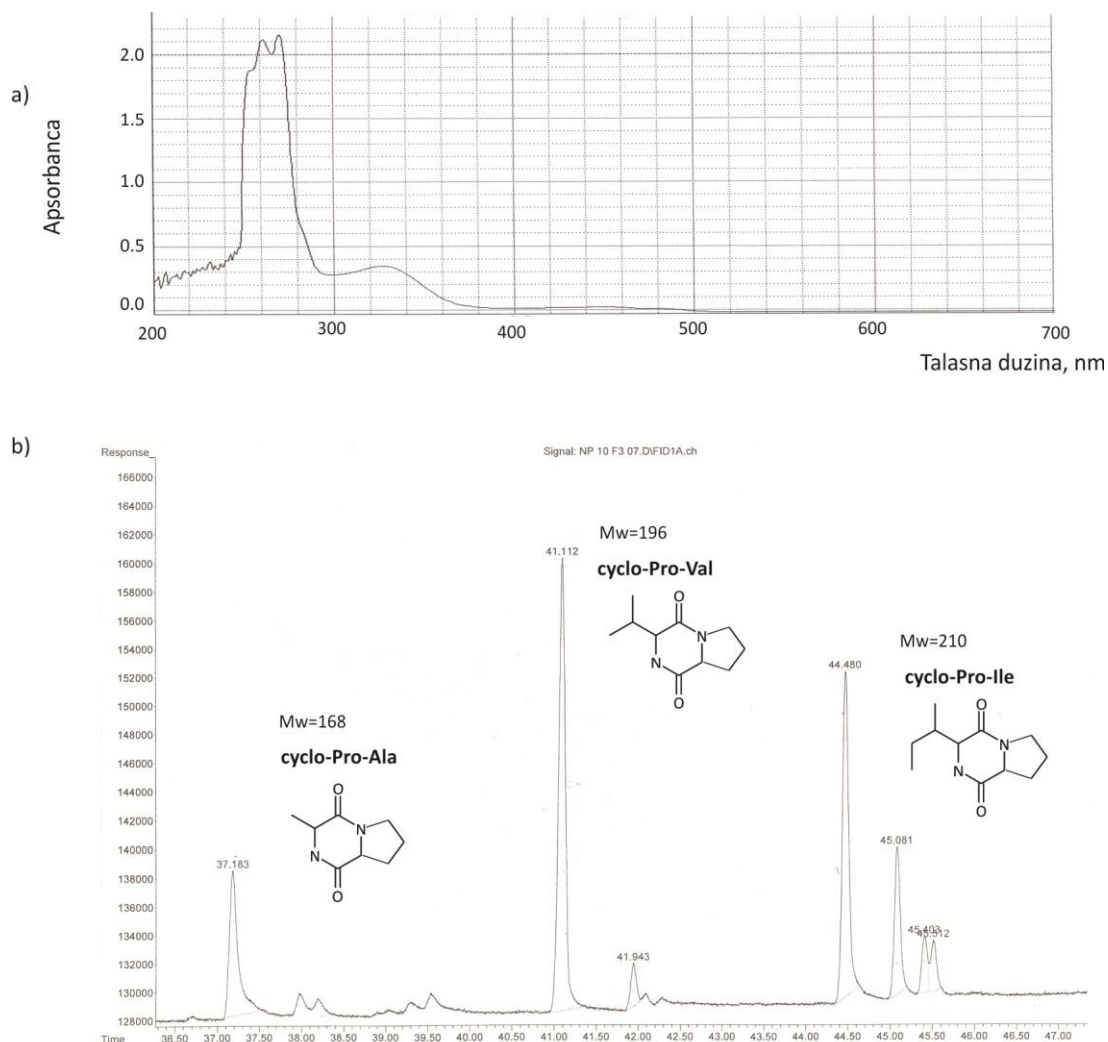
$[M+H]^+$) (Slika 15b). Pikovi eluirani u 9,95. minutu i 9,07. minutu odgovarali bi izokiselinama sa 15 i 14 C atoma, respektivno (Slika 15b).



Slika 15. - Karakterizacija F1 frakcije soja NP10.

Hromatografska analiza frakcije F3 pokazala je da ona predstavlja smešu cikličnih dipeptida (diketopiperazina) koji se sastoje prevashodno od prolina (Pro), valina (Val), izoleucina (Ile) i alanina (Ala) (Slika 16). Ovi produkti se eluiraju u 41,11. minutu, 44,48 minutu i 37,18. minutu respektivno, prema veličini pika (slika 16b). Glavni pseudomolekularni jonski pik uočen na m/z 197,1289 $[M+H]^+$ odgovara molekularnoj formuli **ciklo-Pro-Val** $C_{10}H_{16}N_2O_2$ (preračunata m/z 196,2500 $[M+H]^+$). Drugi pik odgovara pseudomolekularnom jonu na m/z 211,1445 $[M+H]^+$ ukazujući da se radi o produktu molekulske formule $C_{11}H_{18}N_2O_2$ (preračunata m/z 210,2770 $[M+H]^+$) što odgovara **ciklo-Pro-Ile** (Slika 16b). Pik eluiran u 37,18. minutu odgovara pseudomolekularnom jonu na m/z 168,1 $[M+H]^+$ ukazujući da se radi o jedinjenju

molekulske formule $C_8H_{12}N_2O_2$ (preračunata m/z 168,1961 $[M+H]^+$) odnosno **ciklo-Pro-Ala** (Slika 16b).

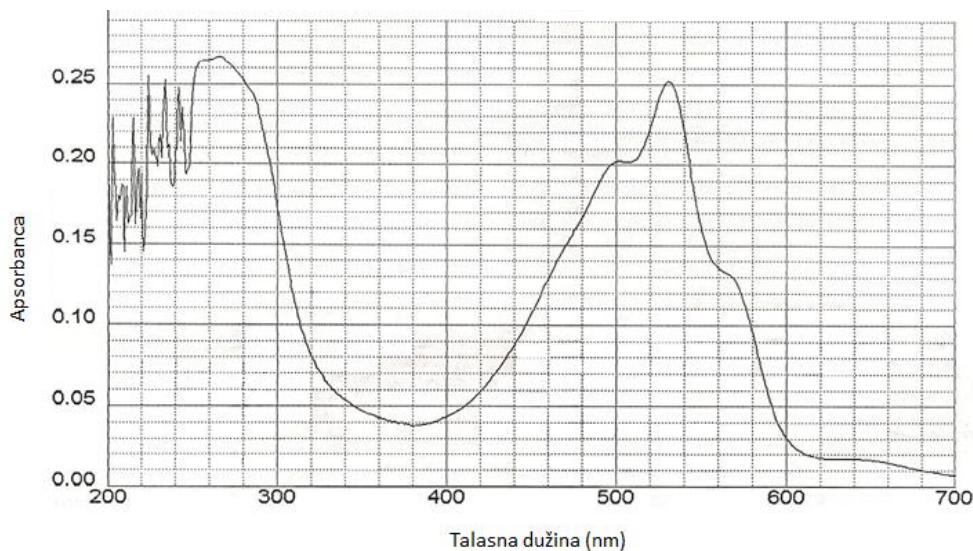


Slika 16 - Karakterizacija F3 frakcije soja NP10.

Na osnovu rezultata prečišćavanja zaključeno je da je smeša izokiselina sa najvećim udelom izopalmitinske kiseline predominantni produkt *Streptomyces* sp. NP10.

4.4.2. Prečišćavanje i karakterizacija produkata *Streptomyces* sp. JS520

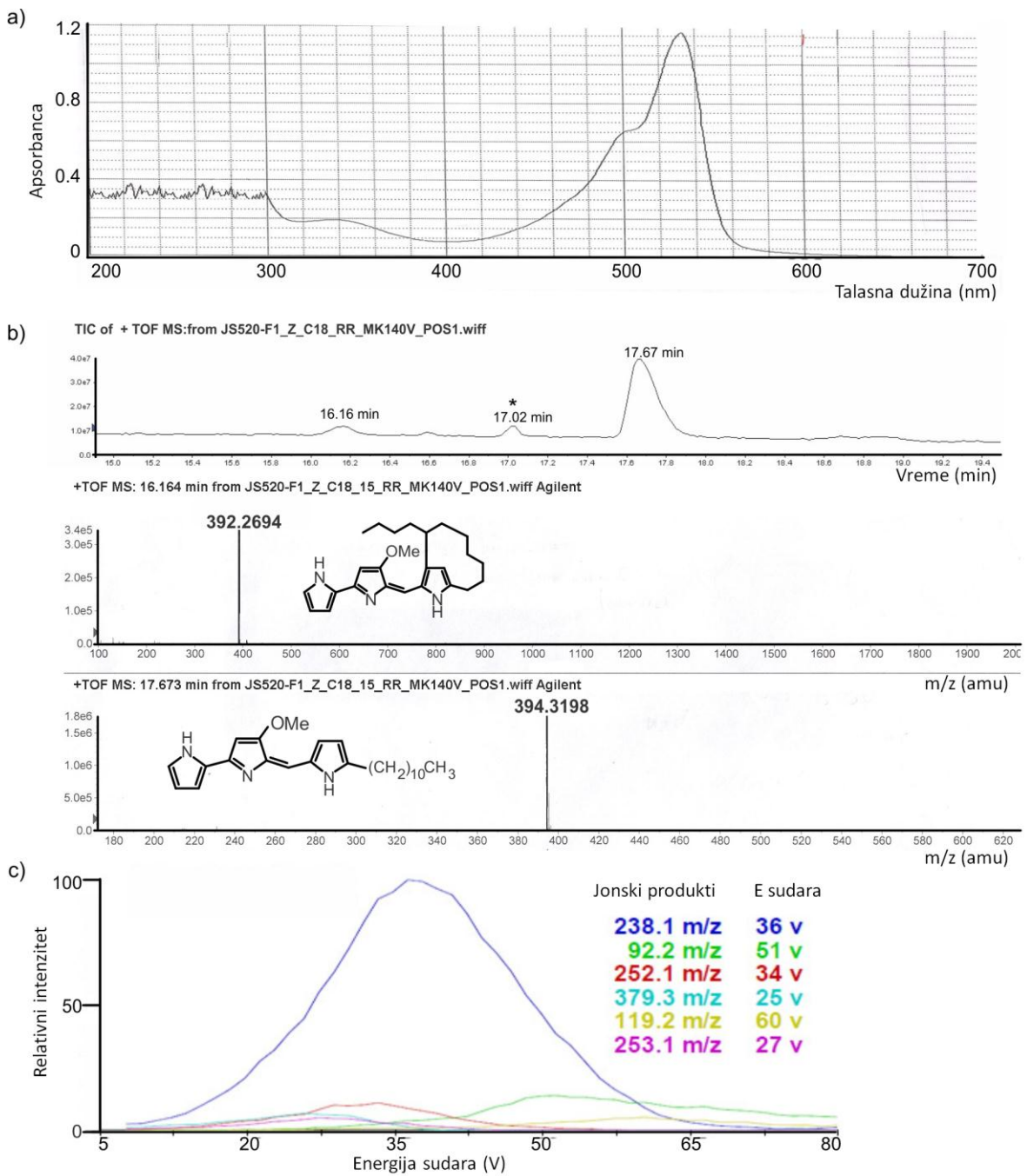
UV-Vis apsorpcioni spektar CRE *Streptomyces* sp. JS520 ima široki apsorpcioni maksimum u opsegu od 320-380 nm i izraženu apsorpciju u opsegu od 420-560 nm sa maksimumom na 533 nm i sekundarnim pikom na 500 nm (Slika 17.).



Slika 17. – UV-vis profil ukupnog etilacetatnog ekstrakta kulture JS520 nakon 7 dana gajenja u MSY medijumu.

Nakon prečišćavanja na koloni samo profil sa apsorpcionim maksimumom na 533 nm je ostao u eluatu (slika 18a). Efikasnost procesa ekstrakcije i purifikacije je bila visoka na šta ukazuje količina prečišćenog produkta – od 120 mg CR iz 4 g micelijuma (vlažna masa) dobijeno je čak 78,5 mg čistog produkta. Prečišćeni pigment je zatim analiziran pomoću LC-MS. U toku HPLC analize glavni produkt eluiran je u 17,67. minutu, a sporedni produkt eluiran je u 16,16. minutu (slika 18b). Glavni pseudomolekularni jonski pik uočen je na m/z 394,3198 $[M+H]^+$ što je u skladu sa molekularnom formulom **undecilprodigiozina** ((5'Z)-4'-metoksi-5'-[(5-undecil-1H-pirol-2-il)metilen]-1H,5'H-2,2'-bipirola) $C_{25}H_{35}N_3O$ (preračunata m/z 394,2859 $[M+H]^+$). Manji pik eluiran u 16,16. minutu je pseudomolekularni jon na m/z 392,2694 $[M+H]^+$ ukazujući da se radi o oksidativno cilizovanom produktu molekulske formule $C_{25}H_{33}N_3O$ (Slika 18b). Pojava mešovitih produkata kod proizvođača pigmenta iz grupe prodigiozina poznata je od ranije (Tsao, Rudd et al. 1985; Mo, Kim et al. 2005) i ovi rezultati su u skladu sa već opisanim literaturnim podacima. Relativna količina undecilprodigiozina iznosi 93% u poređenju sa ciklizovanim derivatom (7%). Najintenzivniji jonski produkt 238,1 m/z je rezultat odsecanja alifatičnog bočnog lanca. Sečenje bočnog lanca na β poziciji daje jone m/z 252,1 i m/z 253,1 dok jon 379,3 m/z nastaje usled toga što metoksi grupa prodigiozina (-OMe) gubi jednu metil grupu (Slika

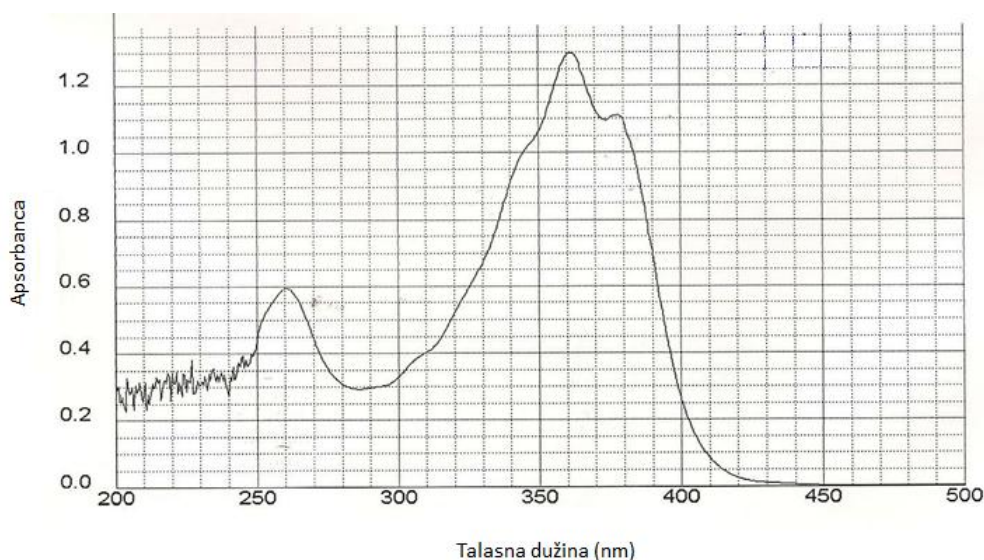
18c). Na osnovu rezultata prečiščavanja zaključeno je da je undecilprodigiozin (UP) predominantni sekundarni metabolit *Streptomyces* sp. JS520.



Slika 18. – Karakterizacija produkata soja JS520.

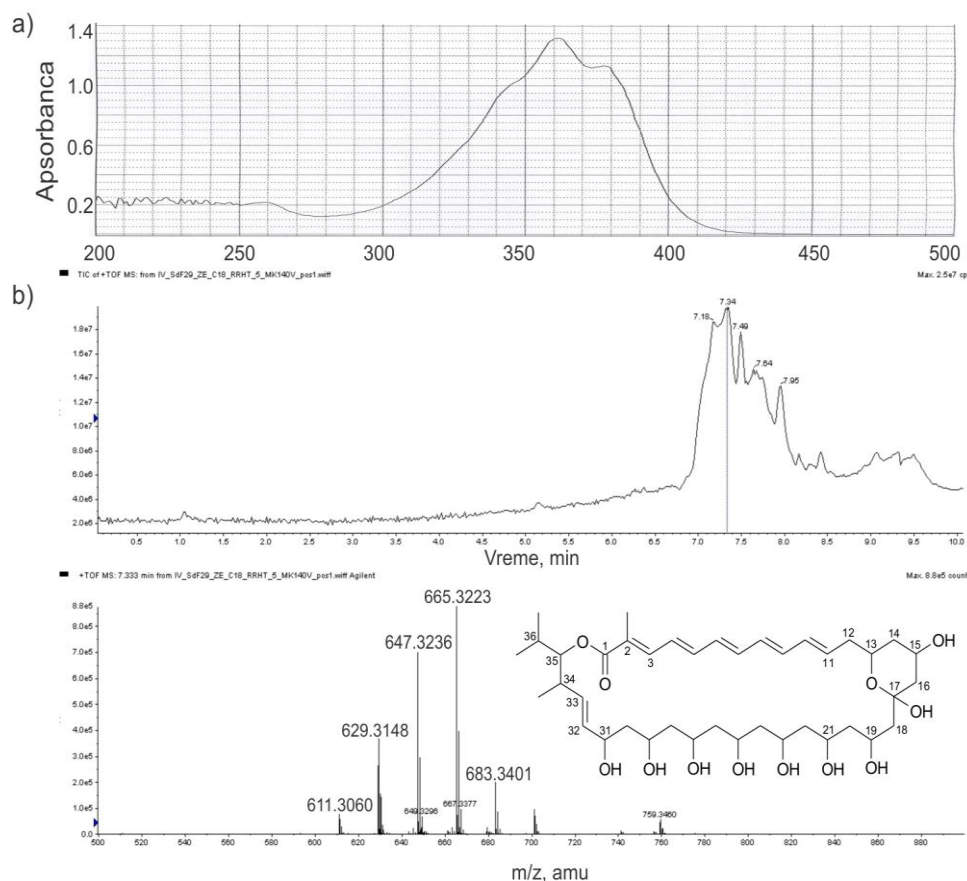
4.4.3. Prečišćavanje i karakterizacija produkata *S. durmitorensis* A10

Apsorpcioni spektar etilacetatnog ekstrakta kulture *S. durmitorensis* wt ima širok apsorpcioni pik u opsegu 243-275 nm sa maksimumom apsorpcije na 260 nm i još jednim apsorpcionim maksimumom na 363 nm sa sekundarnim pikom na 375 nm (Slika 19.).



Slika 19. – UV/Vis apsorpcioni spektar etilacetatnog ekstrakta *S. durmitorensis* wt nakon 5 dana kultivacije u JS medijumu

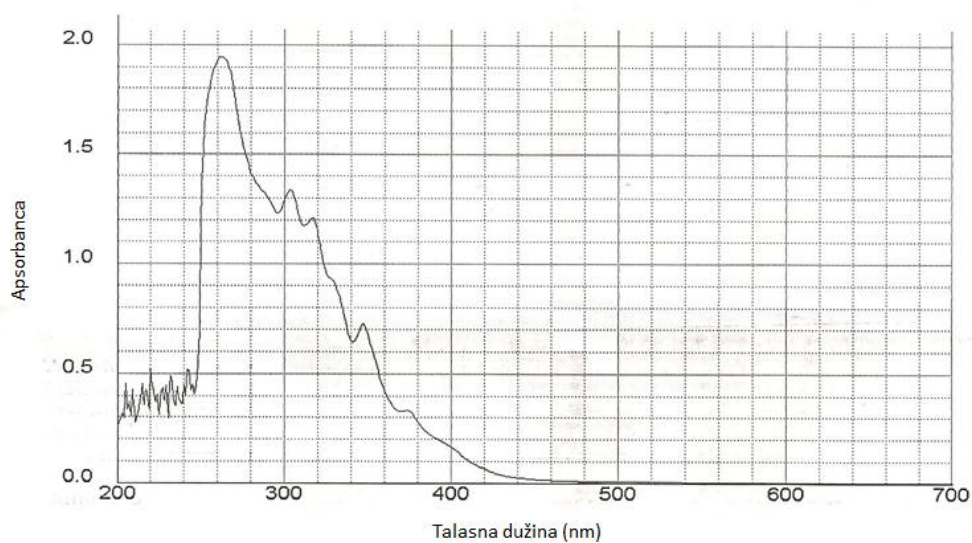
Nakon prečišćavanja na koloni CRE iz *S. durmitorensis* wt analiziran je LC-MS tehnikom. U toku HPLC analize glavni produkt iz CRE *S. durmitorensis* – DDHR, eluiran je u 7,34. minutu, a ostali članovi njegove polienske makrolidne familije u 7,18., 7,49., 7,64. i 7,95. minutu (slika 20b). Za glavni produkt elucije je NMR tehnikom potvrđeno da se radi o DDHR (Slika 20b.). Iz 120 mg CR dobijeno je 70 mg DDHR. Ova prečišćena frakcija se poklapa sa ranije opisanom (Stodulkova, Kuzma et al. 2011) i poslužila je u daljim eksperimentima kao TLC standard.



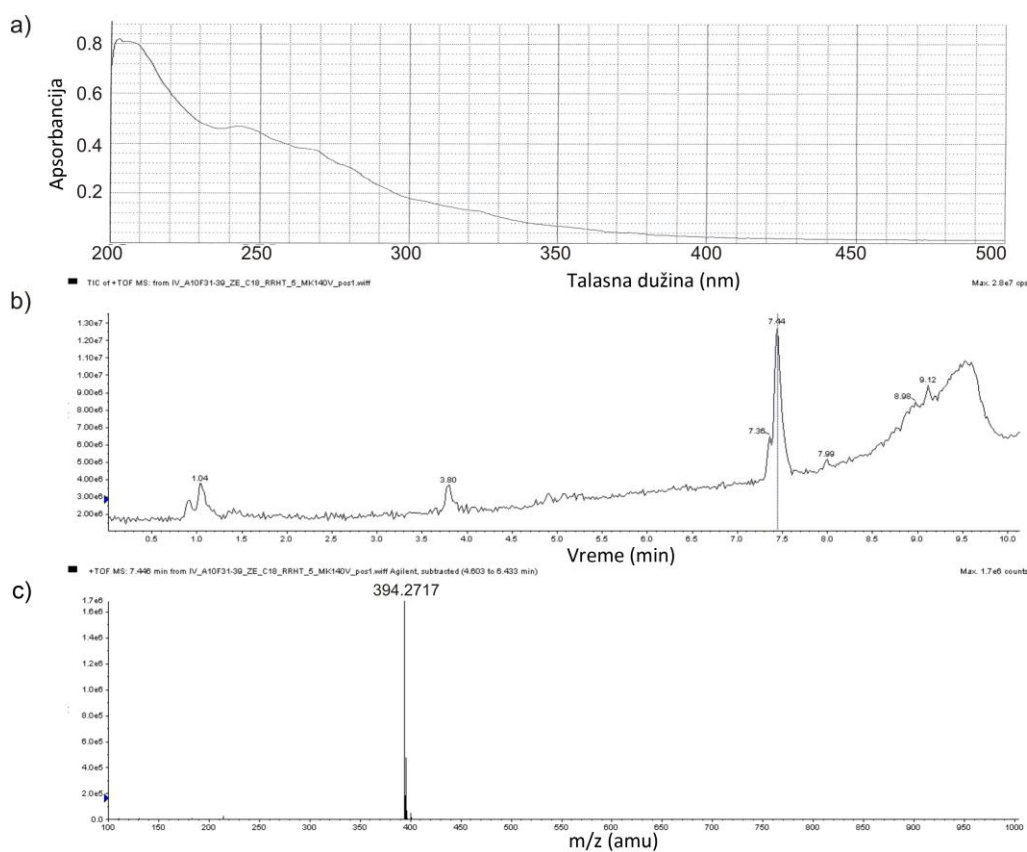
Slika 20. – Prečišćavanje DDHR iz ukupnog etilacetatnog ekstrakta kulture *S. durmitorensis*.

UV-vis profil apsorpcije etilacetatnog ekstrakta mutiranog soja *S. durmitorensis* A10 značajno se razlikovao od wt. Osim izraženog apsorpcionog pika na 260 nm pojavljuje se niz pikova (305, 319, 348 nm) koji nisu karakteristični za wt i slabo izražen sekundarni pik na 375 nm (Slika 21.).

CRE kulture *S. durmitorensis* A10 takođe je prečišćen na koloni i kod dobijenih frakcija F1 i F2 NMR tehnikom je određena struktura njihovih komponenti (Slika 22.). U toku HPLC analize glavni produkt eluiran je u 7,44. minutu. (slika 22b). Glavni pseudomolekularni jonski pik uočen je na m/z 394,2717 $[M+H]^+$ (Slika 22c). Ova analiza pokazala je da je sposobnost produkcije DDHR u soju A10 u potpunosti ukinuta.



Slika 21. - UV-vis profil etilacetatnog ekstrakta kulture *S. durmitorensis* A10 nakon 5 dana gajenja u JS medijumu.



Slika 22. – Karakterizacija produkata *S. durmitorensis* A10.

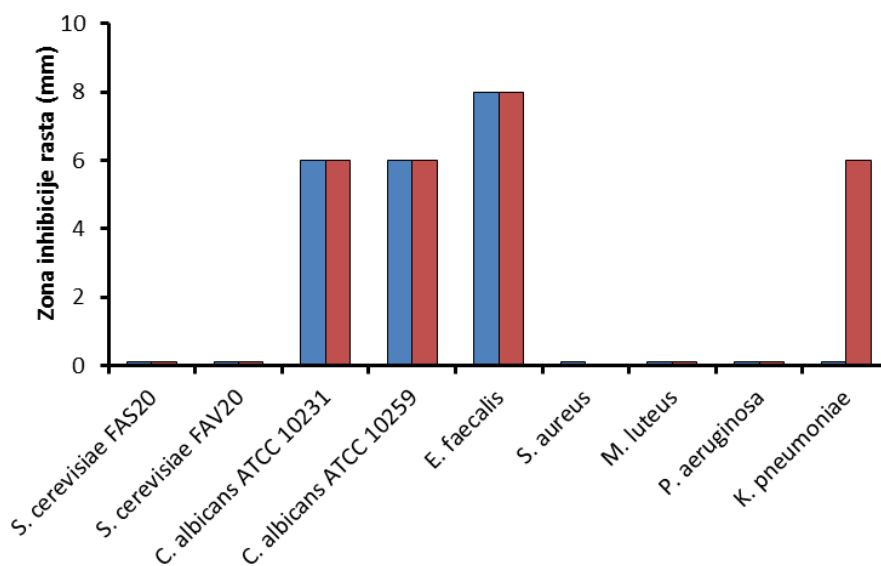
4.5. Biološki testovi sa prečišćenim frakcijama CRE kultura sojeva NP10, JS520 i *S. durmitorensis* wt

4.5.1. Biološka aktivnost prečišćenih frakcija F1 i F3 iz soja NP10

Nakon prečišćavanja, samo je frakcije F1 (smeša izoalkanskih kiselina) i F3 (smeša cikličnih dipeptida) bilo u dovoljnoj količini (odjeljak 4.4.1.) da bi se mogli biti urađeni biološki testovi. Ponovljeni su testovi delovanja ovih frakcija na osetljive mikroorganizme, određene su MIK i testirano dejstvo na humane ćelije u kulturi.

4.5.1.1. Antimikrobna svojstva prečišćenih frakcija iz kulture soja NP10

Frakcija F1 (metanolni ekstrakt koncentracije 1 mg po disku) delovala je na FAS20 i *M. luteus* uspostavljajući zone smanjenog rasta od 9 mm i 14 mm, respektivno (Slika 23.). Kod sojeva *Candida* uočene su veoma male zone inhibicije rasta uz sam disk (6 mm), dok je kod *E. faecalis* postojala zona inhibicije rasta od 8 mm. F1 nije pokazala nikakvo dejstvo na FAS20, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*. F3 (metanolni ekstrakt koncentracije 1 mg po disku) nije pokazala nikakvo dejstvo na *Saccharomyces* sojeve, za sojeve *Candida* uočene su veoma male zone inhibicije uz sam disk, kao i kod *K. pneumoniae*, doke je zona inhibicije rasta *E. faecalis* iznosila 8 mm (Slika 23.).



Slika 23. – Biološki testovi sa frakcijama F1 i F3 iz soja NP10; (■ frakcija F1, ■ – frakcija F3).

Minimalna inhibitorna koncentracija frakcije F1 određivana je za oba soja *C. albicans*, *B. subtilis* i *E. faecalis*. MIK za oba soja *C. albicans* iznosila je 500 µg/ml, dok je za *B. subtilis* i *E. faecalis* bila >1 mg/ml.

4.5.1.2. MTT esej sa prečišćenim frakcijama ekstrakta NP10

Pri određivanju vijablnosti i proliferativnosti ćelija HTR-8/SVneo trofoblastne ćelijske linije u prisustvu frakcija F1 i F3 ekstrakta kulture soja NP10 uočeno je da su koncentracije od 1 mg/ml obeju frakcija imale negativan efekat na rast ćelija. Najveći citotoksični efekat imala je F1 gde je samo 30% ćelija preživljavalo nakon 24 h, dok je u slučaju F3 taj procenat iznosio oko 50% (Tabela 7.). Niže koncentracije (1 ng/ml i 1 µg/ml) deluju stimulatивно na preživljavanje ćelija, pri čemu su najviši stepen proliferacije pokazale ćelije u prisustvu 1 ng/ml F3, čak 162% u odnosu na kontrolu (Tabela 7.). F3 je izazivala intenzivniji stimulatorni efekat u odnosu na F1 (1,3 puta za obe koncentracije).

Tabela 7. - Preživljavanje HTR-8/Svneo ćelija u prisustvu različitih koncentracija frakcija F1 i F3 ekstrakta kulture NP10.

	1 ng/ml	1 µg/ml	1 mg/ml
K (%)	99,7 ± 7,6	100,3 ± 16,2	99,8 ± 12,3
F1 (%)	124,3 ± 8,1	119,7 ± 6,9	31,3 ± 10,7
F3 (%)	162,0 ± 18,6	146,3 ± 18,0	48,0 ± 6,4

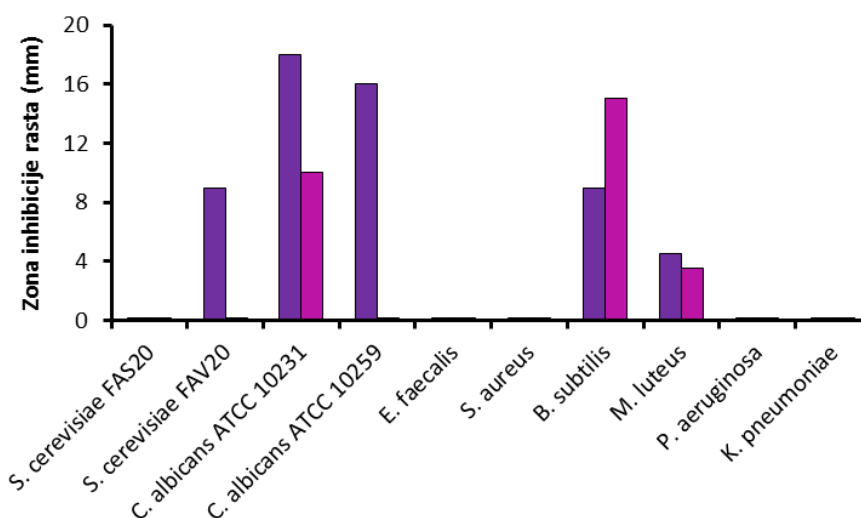
4.5.2. Biološka aktivnost prečišćenih frakcija iz JS520

Nakon prečišćavanja CRE kultura soja JS520 dobijene frakcije F1 i F2 su korišćene za dalje biološke testove. Ponovljeni su testovi delovanja ovih frakcija na sve već ranije pomenute test mikroorganizme, određene su MIK za osetljive mikroorganizme i testirano dejstvo na ćelije u kulturi.

4.5.2.1. Antimikrobna svojstva prečišćenih frakcija iz kulture soja JS520

Antimikrobna svojstva F1 testirana su na mikroorganizmima čiji je rast inhibiran delovanjem CRE (Tabela 6.). Frakcija F1 je pokazivala jaku inhibiciju rasta gljiva soja

C. albicans, kao i soja *B. subtilis* i *S. cerevisiae* FAV20. Ova frakcija uticala je na smanjivanje rasta sojeva *P. aeruginosa* i *M. luteus*, a nije delovala na *S. cerevisiae* FAS20, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* i *S. aureus* (Slika 24). F2 nema efekta *S. cerevisiae*, kao ni na *C. albicans* ATCC10259 kao ni na *E. faecalis*, *S. aureus* i *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* kod koga postoji konfluentan rast, ali u velikoj zoni nema sinteze fluorescentno zelenog pigmenta karakterističnog za ovaj soj. F2 pokazuje inhibitorno dejstvo na rast *C. albicans* ATCC10231, *B. subtilis* i *M. luteus* (Slika 24.).



Slika 24 - Biološki testovi sa frakcijama F1 i F2 iz soja JS520; (■ – frakcija F1, ■ – frakcija F2).

Minimalne inhibitorne koncentracije F1 i F2 određivane su za *B. subtilis*, *C. albicans* ATCC10231 i *C. albicans* ATCC10259, a MIK F1 određivana je za *S. cerevisiae* FAV20. MIK za obe frakcije, definisana kao najniža koncentracija pri kojoj test organizam ne pokazuje rast, bila je za *B. subtilis* 50 µg/ml, dok je za sojeve *C. albicans* ATCC 10231 i *C. albicans* ATCC 10259 iznosila 100 µg/ml i 200 µg/ml, respektivno. *S. cerevisiae* FAV20 pokazivao je potpunu inhibiciju rasta već na koncentraciji od 1 µg/ml. U svim esejima kao rastvarač i kontrola korišćena je smeša DMSO i metanola.

4.5.2.3. MTT esej sa prečišćenim frakcijama ekstrakta JS520

Frakcije F1 i F2 u nižim koncentracijama (1 ng/ml i 1 µg/ml) delovale su povoljno na vijablности i proliferativnosti HTR-8/SVneo trofoblastnih ćelija u kuturi. F1

je u ovim koncentracijama dovela do povećanja preživljavanja za 30% u odnosu na kontrolu, dok je F2 dovela do povećanja od 50%. Pri ovim koncentracijama stimulatívni efekat F2 je bilo 1,13 puta veći od efekta F1. Koncentracije od 1 mg/ml i F1 i F2 imale su prilično ujednačen citotoksični efekat na ove ćelije – procenat preživljavanja ćelija je u oba slučaja bio oko 50% u odnosu na kontrolu (Tabela 8.).

Tabela 8. - Preživljavanje HTR-8/Svneo ćelija u prisustvu različitih koncentracija frakcija F1 i F2 ekstrakta kulture JS520.

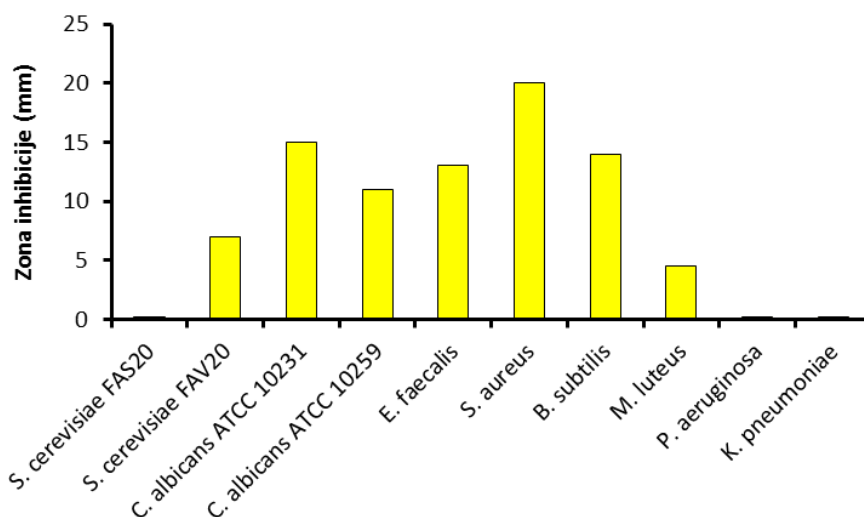
	1 ng/ml	1 µg/ml	1 mg/ml
K (%)	99,7 ± 7,6	100,3 ± 16,2	99,8 ± 12,3
F1 (%)	134,8 ± 14,7	132,5 ± 11,6	53,0 ± 6,4
F2 (%)	151,0 ± 9,3	151,2 ± 8,4	52,3 ± 3,6

4.5.3. Biološka aktivnost DDHR

Nakon prečišćavanja ekstrakta *S. durmitorensis* frakcija koja sadrži DDHR korišćena je za dodatne biološke testove. Iako je pokazan citotoksični efekat na više tipova sisarskih ćelija u kulturi (Stodulkova, Kuzma et al. 2011) kao i delovanje na FAV20 (Skoko, Vujovic et al. 2005) bilo je potrebno detaljnije okarakterisati i antibakterijsko i antimikotičko delovanje DDHR i odrediti MIK.

4.5.3.1. Antimikrobna svojstva prečišćenog DDHR

Ako se izuzme FAS20, DDHR pokazuje aktivnost na svim testiranim mikroorganizmima sa negativnim efektom na njihov rast. Kod *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* izazivao je samo smanjen rast (Slika 25.).



Slika 25. - Biološki testovi sa prečišćenim DDHR.

Minimalne inhibitorne koncentracije DDHR određivane su za FAV20, oba soja *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. aureus* i *B. subtilis*. MIK za oba soja *C. albicans* iznosile su 50 µg/ml, dok su MIK za FAV20 i sve testirane bakterijske sojeve iznosile >1 mg/ml.

4.5.2.3. MTT esej sa prečišćenim DDHR

Podaci iz literature govore o citotoksičnom efektu DDHR pri srednjim koncentracijama (između 8 i 80 µg/ml) na različite tipove humanih i mišijih ćelija (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). U MTT esejju sa HTR-8/SVneo trofoblastnim ćelijama proširen je dijapazon koncentracija na izrazito niske (1 ng/ml) i izrazito visoke koncentracije (1 mg/ml) i pokazano je da niske i srednje koncentracije nisu imale efekta na preživljavanje ćelija u kulturi, dok je najvišu koncentraciju od 1 mg/ml preživljavalo oko 50% ćelija nakon 24 h (Tabela 9.).

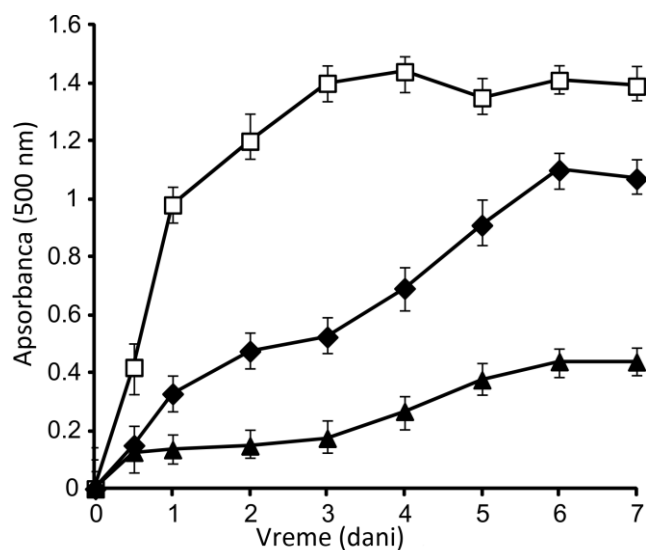
Tabela 9. - Preživljavanje HTR-8/Svneo ćelija u prisustvu različitih koncentracija DDHR.

	1 ng/ml	1 µg/ml	1 mg/ml
K (%)	92,4 ± 7,3	105,03 ± 7,7	102,6 ± 9,0
DDHR (%)	102,1 ± 8,8	116,1 ± 9,6	53,4 ± 11,0

4.6. Ekofiziološka funkcija undecilprodigiozina i karakterizacija njegove proizvodnje

4.6.1. Antioksidativne osobine prečišćenog UP

Antioksidativna aktivnost prečišćenog pigmenta određivana je gvožđe tiocijanatnom metodom koja meri količinu preoksida koji se oslobađa pri autooksidaciji linoleinske kiseline u toku inkubacije na 45°C i poređenjem sa uobičajenim prirodnim oksidantom α -tokoferolom (Slika 26.). Niske vrednosti apsorbancije na 500 nm ukazuju na visok nivo antioksidativne aktivnosti (Fukuda, Osawa et al. 1985). U negativnoj kontroli koja je sadržala samo linoleinsku kiselinu autooksidacija uzorka mogla se uočiti već nakon 12 h inkubacije (Slika 26.), dok su pozitivna kontrola koja je sadržala α -tokoferol i uzorak koji je sadržao prečišćeni UP imali sličan nivo produkcije peroksida u toku ovog vremenskog perioda. Autooksidacija u negativnoj kontroli dostizala je maksimum nakon 3 dana inkubacije, dok je u pozitivnoj kontroli i uzorku sa UP nivo peroksida bio 8 puta i 2,7 puta niži ukazujući na antioksidativna svojstva. Nakon trećeg dana inkubacije nivo peroksida prisutan u pozitivnoj kontroli porastao je 1,4 puta dok je u uzorku sa UP ovaj porast iznosio 3,4 puta. Nakon šestog dana inkubacije autooksidacija linoleinske kiseline nije postigla isti nivo kao u negativnoj kontroli, ukazujući da UP nije tako potentan antioksidans kao α -tokoferol (nivo peroksida bio je 3 puta niži u poređenju sa negativnom kontrolom na kraju inkubacije) u smislu inhibicije autooksidacije linoleinske kiseline, ali može delovati preko različitog mehanizma. Odloženi efekat autooksidacije može biti stoga što UP reaguje sa peroksidom smanjujući njegov nivo u uzorku na taj način.



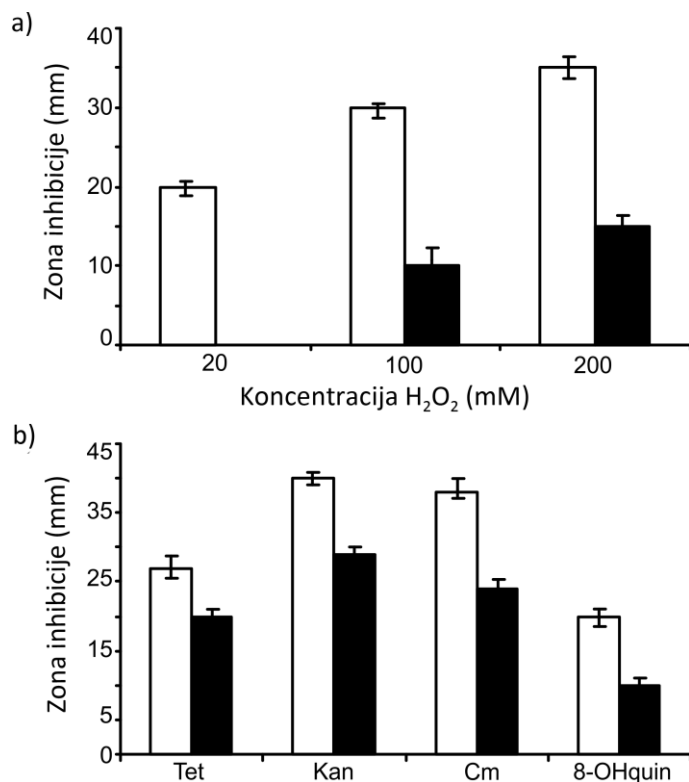
Slika 26. – Antioksidativna aktivnost prečišćenog UP iz *Streptomyces* sp. JS520 kulture (◆) ferri tiocijanatnom metodom u poređenju sa α -tokoferolom (▲). Svaka supstanca doavana je do finalne koncentracije od 20 mg/ml (0,05 mM), dok je kontrola sadržala samo rastvarač (□).

4.6.2. Ekofiziološka uloga UP

Ekofiziološka uloga UP mogla je biti proučavana zahvaljujući činjenici da se UP ne proizvodi u uslovima gajenja u TSB medijumu, te su mogle biti poređene pigmentisane i ne pigmentisane kulture soja JS520.

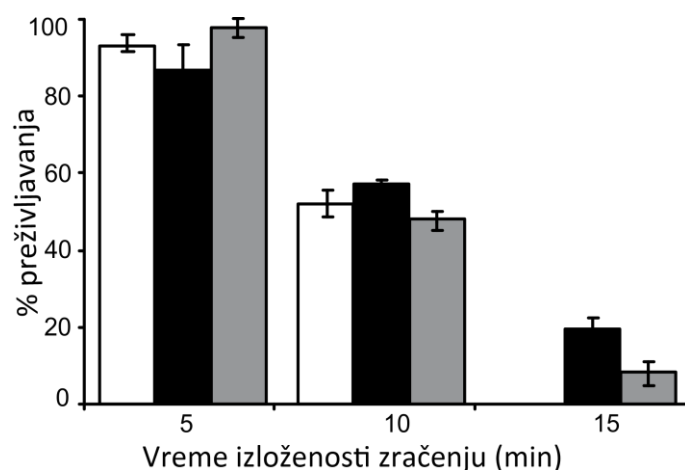
Zaštita od H_2O_2 i antimikrobinih agenasa. Pri izlaganju različitim koncentracijama H_2O_2 (20 - 200 mM) ćelije koje produkuju UP pokazivale su manju zonu inhibicije rasta na svakoj od koncentracija u poređenju sa ne pigmentisanim ćelijama (Slika 27.). Na koncentraciji 20 mM H_2O_2 ćelije koje produkuju pigment nisu dale uopšte zonu inhibicije dok je ona bila 3 i 2,3 puta manja pri koncentracijama H_2O_2 od 100 mM i 200 mM, respektivno, u poređenju sa ne pigmentisanim ćelijama. Takođe, pri izlaganju različitim koncentracijama tetraciklina, kanamicina i hloramfenikola (0,1, 0,5 i 1 mg) i 8-hidroksihinolina (0,01, 0,05 i 0,1 mg), zone inhibicije rasta bile su veće kod ćelija koje ne proizvode UP u poređenju sa pigmentisanim ćelijama (Slika 27.) i to za teraciklin, kanamicin i hloramfenikol 1,3 puta za koncentraciju od 0,1 mg, 1,4 puta za 0,5 mg i 1,5 puta za 1mg, a za 8-hidroksihinolin 2 puta za koncentraciju od 0,05 mg i 1,25 puta a 0,1 mg. Pri najnižoj koncentraciji od 0,01 mg 8-hidroksihinolina ćelije koje

proizvode UP bile su potpuno zaštićene, tj. nije bilo zone inhibicije rasta, dok je kod ćelija koje ne proizvode UP ona iznosila 11 mm.



Slika 27. - Osetljivost ćelija *Streptomyces* sp. JS520 gajenih u uslovima produkcije pigmenta (■) i u uslovima bez produkcije pigmenta (□) na: a) vodonik peroksid i b) antibiotike. Tet – tetraciklin; Kan – kanamicin; Cm – hloramfenikol (0,5 mg po disku) i 8-OHquin – 8-hidroksihinolin (0,05 mg po disku).

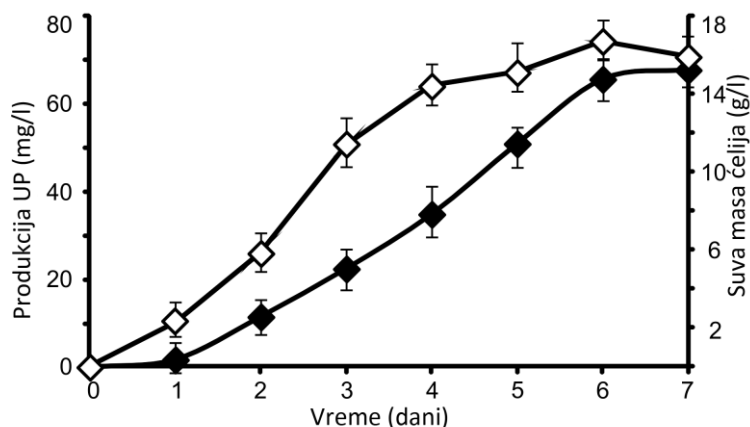
Zaštita od ultraljubičastog zračenja. Nedavno je pokazano da prodigiozin iz *Vibrio* sp. ima UV-protektivne osobine (Boric, Danevcic et al. 2011). Zbog toga je urađen eksperiment ekspozicije ćelija soja JS520 koje proizvode i ne proizvode UP ultraljubičastom zračenju i mereno je preživljavanje ćelija. U eksperiment su uključene i ćelije gajene u uslovima u kojima nema produkcije UP, a kojima je *in vitro* dodat prečišćeni pigment i koje su nakon inkubacije od 30 min u prisustvu UP, izložene zračenju. Oba uzorka u kojima je bio prisutan UP (endogeno proizveden ili dodat *in vitro*) pokazala su povećanu stopu preživljavanja u odnosu na ćelije bez UP koja je bila u korelaciji sa vremenom ekspozicije (5 min i 10 min) (Slika 28.). Ćelije bez UP nisu, pak, preživljavale vreme ekspozicije od 15 min, dok je za ćelije koje produkuju UP i ćelije kojima je dodat UP procenat preživljavanja iznosio 22 % i 8 %, respektivno.



Slika 28. – Preživljavanje ćelija *Streptomyces* sp. JS520 nakon izloženosti ultraljubičastom zračenju od 254 nm u trajanju od 5, 10 i 15 min (□) - ćelije gajene u uslovima bez produkcije UP; (■) - ćelije gajene u uslovima produkcije UP; (▒) - ćelije gajene u uslovima bez produkcije UP kojima je dodat UP *in vitro* pre izlaganja zračenju.

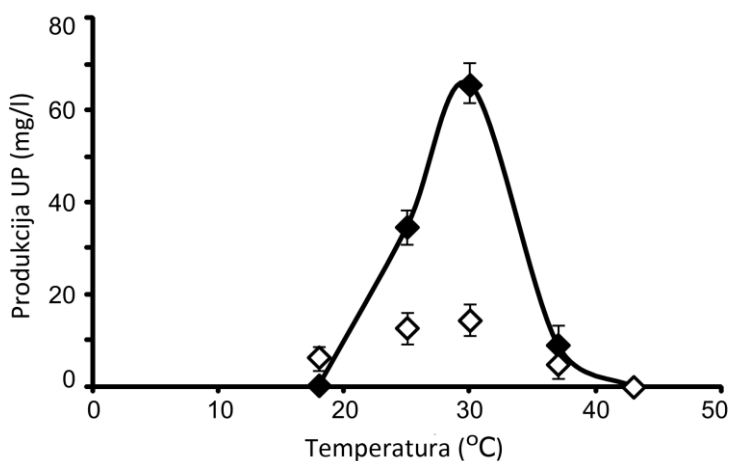
4.6.3. Uticaj uslova gajenja na produkciju UP

Produkcija biomase *Streptomyces* sp. JS520 praćena je u toku 7 dana na 30°C u MSY medijumu (Slika 29.). Nakon 24 h kultura je dostigla biomasu od 2,3 g/l, pri čemu je izmerena mala količina proizvedenog pigmenta (1,7 mg/l). U ovoj fazi rasta pigment je u potpunosti vezan za micelijum što je utvrđeno na osnovu UV/Vis spektara etilacetatnih ekstrakata ćelija i medijuma. Tokom eksponencijalne faze rasta (od 2. do 4. dana) stopa rasta kulture iznosila je 0,18 g/l na sat, a stopa proizvodnje undecilprodigiozina bila je 0,49 mg/l na sat. Kako je kultura ulazila u stacionarnu fazu (od 4. do 6. dana) stopa produkcije biomase opala je na 0,05 g/l na sat dok je stopa produkcije UP porasla 1,3 puta i iznosila je 0,64 mg/l na sat. U ovoj fazi pigment je bio i dalje uglavnom vezan za micelijum, ali se male količine mogu detektovati i u medijumu (34 µg/l) zbog čega cela kultura postaje intenzivno ljubičasta (Slika 29.). U toku stacionarne faze (poslednjih 24 h inkubacije) uočava se mali pad u akumulaciji biomase, dok se UP i dalje proizvodi stopom od 0,08 mg/l na sat. Nakon sedmodnevne inkubacije ukupni prinos biomase iznosio je od 15,9 g/l, a prinos UP 67,7 mg/l (Slika 29.).



Slika 29. – Produkcija UP (◆) u mg/l i akumulacija biomase (◇) izražena kao g/l suve mase ćelija kod *Streptomyces* sp. JS520 kulture u gajene u MSY medjumu 7 dana na 30°C i 200 obrt/min.

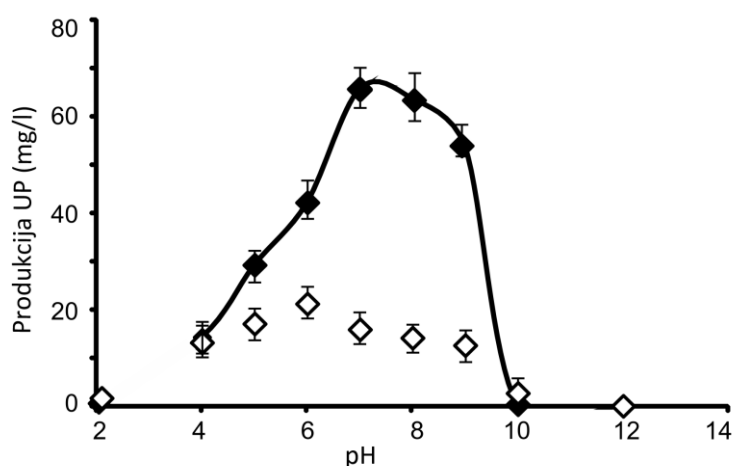
Kako produkcija sekundarnih metabolita streptomiceta izuietno zavisi od uslova kultivacije (Bibb 2005), praćen je uticaj nekoliko sredinskih faktora - temperature, pH medijuma i stope aeracije na proizvodnju UP u toku 6 dana kultivacije u MSY medijumu. *Streptomyces* sp. JS520 nije rastao na temperaturi nižoj od 10°C te nije bilo ni produkcije UP pod tim uslovima, što važi i za temperaturu višu od 42°C. Najviši prinosi biomase i UP dobijeni su tokom kultivacije na 30°C (3,92 mg UP po gramu suve mase ćelija) (Slika 30.).



Slika 30. - Produkcija UP (◆) u mg/l i akumulacija biomase (◇) izražena kao g/l suve mase ćelija kod *Streptomyces* sp. JS520 kulture u gajene u MSY medjumu 6 dana na 200 obrt/min na različitim temperaturama.

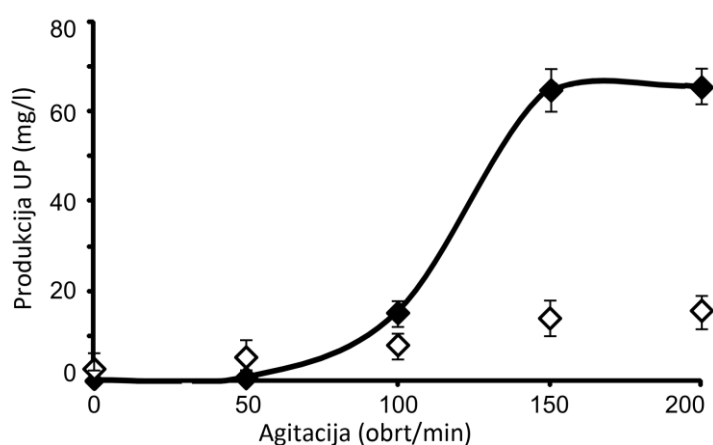
Gajenje na temperaturama od 25°C i 18°C smanjuje prinos biomase 1,3 i 2,6 puta respektivno, u poređenju sa optimumom dostignutim u gajenju na 30°C dok produkcija UP opada 1,4 i čak 78,4 puta. Gajenje na 37°C dovodi do pada prinosa biomase od 3,4 puta dok produkcija UP opada 2,1 puta u odnosu na optimum (Slika 31.). Iz predhodnog se može zaključiti da stres izazvan hladnoćom ima veći efekat na produkciju UP kod ovog soja.

Prateći uticaj pH medijuma došlo se do zaključka da on ima značajnog uticaja i na prinos biomase i na prinos UP kod soja JS520 (Slika 31.) Najviši prinos biomase od 21,6 g/l dobijen je pri pH medijuma od 6,0 dok je najveća količina UP sintetisana pri pH 7,0 medijuma (65,58 mg/l). Ipak, najveća stopa produkcije UP od 4,5 mg po gramu suve mase ćelija dobijena je u blago baznim uslovima kada je pH medijuma iznosio 8. U odnosu na ovaj maksimum, najveći pad produkcije UP po gramu suve mase ćelija (4,2 puta) uočen je u umereno kiselom medijumu (pH 4), u uslovima koji praktično da nemaju uticaja na akumulaciju biomase (Slika 31.). Najveći pad u prinosu biomase od 5 puta u odnosu na optimum na pH 8 uočen je, pak, u umereno baznom medijumu (pH 10), a pratio ga je pad od 37,5 puta u produkciji UP. Ovaj soj nije rastao u uslovima pH medijuma manjim od 4 i većim od 10, te se ove vrednosti mogu smatrati i graničnim pH vrednostima u produkciji UP.



Slika 31. - Produkcija UP (◆) u mg/l i akumulacija biomase (◇) izražena kao g/l suve mase ćelija kod *Streptomyces* sp. JS520 kulture u gajene u MSY medijumu različitih pH u toku 6 dana na na 30°C i 200 obrt/min.

Brzina rotacije na orbitalnoj platformi koja utiče na aeraciju kulture takođe je imala uticaja na priraštaj biomase i produkciju UP kod izolata JS520 (slika 32.). Rast kulture nije zabeležen u uslovima bez agitacije, dok je pri uslovima agitacije od 50 obrt/min uočen spor rast kulture od 0,4 g/l pri kome nema produkcije UP. Kada se porede uslovi agitacije od 150 obrt/min i 200 obrt/min uočava se da iako u potonjim dolazi do veće akumulacije biomase (1,2 puta) nema značajne razlike u produkciji UP. Optimalna stopa produkcije UP od 4,6 mg po gramu suve mase ćelija beleži se prema tome u uslovima agitacije od 150 obrt/min (Slika 32.).



Slika 32. - Produkcija UP (◆) u mg/l i akumulacija biomase (◇) izražena kao g/l suve mase ćelija kod *Streptomyces* sp. JS520 kulture u gajene u MSY medjumu na na 30°C u toku 6 dana na 0, 50, 100, 150 i 200 obrt/min.

4.7. Optimizacija medijuma

4.7.1. Optimizacija medijuma za produkciju UP

Izolat JS520 poseduje osobinu da produkuje izuzetno veliku količinu pigmenta u medijumu. U cilju maksimizacije prinosa biomase i pigmenta isprobana je produkcija u šest kompleksnih i tri definisana medijuma (Tabela 10.). Najviši ukupni prinos UP ostvaren je u MSY medijumu, dok u toku kultivacije u TSB medijumu, kao ni u MSM minimalnom medijumu sa manitolom ili fruktozom kao izvorima ugljenika nije bilo sinteze ljubičastog pigmenta. Najviša stopa produkcije od 14,9 mg/g suve mase ćelija dobijena je u definisanom HMM medijumu, ali je pri tome prinos biomase bio 27,8 puta manji u odnosu na MSY medijum, što je rezultiralo ukupno 7,3 puta manjim prinosom UP (Tabela 10.).

Tabela 10. - Akumulacija biomase i UP kod *Streptomyces* sp. JS520 gajenog u različitim kompleksnim i definisanim medijumima.

Medijum ^a	SM ^b (g/l)	UP (mg/l)
MSY	16,7±0,3	65,58±0,07
PSB	29,1±0,6	42,24±0,03
GYM	19,5±0,4	11,76±0,04
NB	1,1±0,1	2,89±0,01
YE	1,6±0,1	0,68±0,01
TSB	17,9±0,5	n.d. ^c
HMM	0,6±0,1	8,91±0,02
mM	0,3±0,1	2,28±0,01
R2YE	2,4±0,1	n.d.

^a sastav medijuma dat je u poglavlju 3.4.5.; ^b suva masa ćelija; ^c nije detektovano.

Najviši prinos biomase ostvarne je gajenjem u PSB medijumu, dok je najniža biomasa dobijena upotrebom definisanog MM medijuma sa maltozom kao izvorom ugljenika. Produkcija UP izuzetno je varirala u različitim medijumima – od 0 do 3,92 mg/g, baš kao i prinos biomase koji se kretao od 1,1 g/l za NB medijum do 29,1 g/l za PSB medijum. Interesantno je da ove varijacije nisu uvek u korelaciji – dok je prinos biomase u GYM medijumu bio 1,2 puta viši, produkcija UP je bila 6,5 puta niža u

odnosu na MSY medijum. Uopšteno, moglo bi se reći da za definisane medijume važi da daju manju biomasu i slabiju produkciju UP. Zanimljivo je da u R2YE medijumu koji se koristi za produkciju UP kod *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Hobbs, Frazer et al. 1989) JS520 pokazuje dobar rast, ali bez produkcije pigmenta.

S obzirom na velike varijacije u produkciji biomase i pigmenta kod soja JS520 u zavisnosti od sastava medijuma pristupilo se optimizaciji MSY medijuma, najboljeg osnovnog medijuma iz grupe bogatih i minimalnih medijuma u kojima je predhodno praćen rast i proizvodnja undecilprodigiozina (Tabela 11.). Najveći ukupni prinos UP dobijen je kada je MSY medijumu dodat 0,2% (v/v) metil oleat. Iako se stopa produkcije UP nije značajno promenila, biomasa je povećana dvostruko, a produkcija UP 2,1 puta. Dalje dodavanje metil oleata do 0,4% (v/v) dovelo je do daljeg povećanja biomase od 1,25 puta, dok je prinos UP smanjen 1,6 puta, a stopa produkcije po gramu suve mase dvostruko (Tabela 11.).

Suplementacija MSY medijuma raznim L-amino kiselinama imala je različit efekat na proizvodnju biomase i UP. Dodavanje L-prolina, L-serina i L-glicina za koje se smatra da služe kao prekursori u sintezi undecilprodigiozina (Cerdeno, Bibb et al. 2001), rezultiralo je blagim povećanjem biomase od 1,2 i 1,3 puta u slučaju L-prolina i L-serina, respektivno, dok je dodavanje L-glicina izazvalo smanjenje od 2,1 puta (Tabela 11.), što ne iznenađuje s obzirom da L-glicin deluje i kao inhibitor sinteze ćelijskog zida kod Gram-pozitivnih bakterija (Miyata, Raven et al. 2008). Osim toga, L-glicin je negativno uticao na proizvodnju UP obarajući je 11,7 puta što je sveukupno rezultiralo 5,6 puta smanjenom stopom produkcije UP u odnosu na MSY. Dodavanje L-prolina izazvao je smanjenje produkcije UP 3,6 puta, a L-serina 1,2 puta. Najveći porast u produkciji biomase i UP od 1,5 puta za oba, dobijen je kada je osnovnom medijumu dodata smeša svih triju amino kiselina, 0,1% (w/v) svake, što ukazuje na moguću važnost balansiranog prisustva ovih amino kiselina. Kao kontrola MSY medijumu dodavan je L-tirozin koji ne igra ulogu u sintezi UP, što je dovelo do blagog smanjenja produkcije biomase od 1,1 puta i UP od 1,4 puta.

Tabela 11. - Optimizacija MSY medijuma u cilju povećanja UP produkcije.

Medijum i izmene	SM ^a (g/l)	UP (mg/l)	Produktiv- nost ^b (mg/g)
MSY	16,7±0,3	65,58±0,07	3,92
Suplementi medijuma			
Metil oleat (0,2%)	34,1±0,4	138,94±0,08	4,07
Metil oleat (0,4%)	42,5±0,7	87,35±0,05	2,06
L-prolin (0,3%)	19,3±0,2	20,71±0,04	1,07
L-glicin (0,3%)	7,9±0,3	5,56±0,04	0,7
L-serin (0,3%)	21,8±0,6	69,51±0,07	3,19
L-prolin/L-glicin/L-serin (0,1% svakog)	24,4±0,4	97,98±0,05	4,02
L-tirozin (0,3%)	14,8±0,5	44,74±0,03	3,02
Zamena maltoze			
glukoza	2,9±0,1	n.d.	-
fruktoza	2,4±0,1	34,65±0,06	14,45
glicerol	0,2±0,03	n.d.	-
dodekanska kiselina	21,6±0,4	2,34±0,03	0,11
ulje koštica grožđa	45,4±0,6	0,19±0,01	0,004
Substrakcija komponenti medijuma			
TSB	10,4±0,3	6,14±0,03	0,59
50% maltoza	51,6±0,5	49,34±0,09	0,95
NaNO ₃ i CaCO ₃	5,2±0,1	34,75±0,04	6,68
50% maltoza, NaNO ₃ , CaCO ₃	2,3±0,1	21,63±0,04	9,40
50% maltoza, TSB, NaNO ₃ , CaCO ₃	1,5±0,1	9,95±0,01	6,63

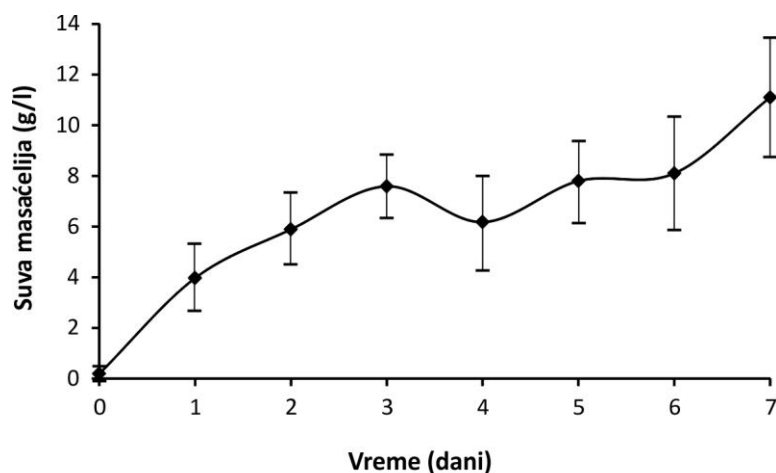
^a suva masa ćelija; ^b produktivnost, izražena kao mg proizvedenog UP po g suve mase ćelija.

Substrakcije različitih komponenti MSY medijuma kao i zamena izvora ugljenika su redom doveli do smanjenja ukupnog prinosa UP. Ipak, treba izdvojiti varijaciju MSY medijuma u kome je maltoza zamenjena fruktozom što je rezultiralo najvišom stopom produkcije od 14,45 mg/g, sa 6,9 puta smanjenom produkcijom biomase što je ukupno dovelo do smanjenja prinosa UP 1,9 puta. Zanimljivo je da kada se maltoza u originalnom MSY medijumu smanji za 50% dobija se trostruko povećanje biomase od 51,6 g/l i smanjenje produkcije UP od 1,3 puta. Slična stopa rasta dobijena je i kada je maltoza zamenjena uljem koštica grožđa, ali je pri tom dobijena najniža stopa proizvodnje UP od 0,004 mg/g (Tabela 11.). Dve promene koje su u potpunosti ukinule proizvodnju UP su korišćenje glukoze i glicerola kao glavnih izvora ugljenika.

4.7.2. Optimizacija medijuma za proizvodnju DDHR

4.7.2.1. Kriva rasta *S. durmitorensis* u NE/manitol medijumu

Streptomyces durmitorensis gajen je 7 dana u NEM medijumu u cilju utvrđivanja dinamike rasta kulture. Kultura je pokazala eksponencijalni disperzivni rast u toku prvih 72 h (Slika 33.). U toku ove faze stopa rasta kulture bila je 0,103 g/l na sat, a postignuta ukupna suva masa iznosila je 7,59 g/l. Nakon ove faze kultura nastavlja rast smanjenom stopom od ~ 0,04 g/l na sat, ali u toku 7 dana nije dostigla stacionarnu fazu (Slika 33.). Postignuta suva masa kulture nakon 7 dana iznosila je 11,56 g/l. U ovoj fazi rasta došlo je do masovnog nakupljanja ćelija na zidovima flaska što je imalo za posledicu povećavanje greške pri uzimanju alikvota.



Slika 33. – Kriva rasta *Streptomyces durmitorensis* u NEM medijumu

4.7.2.2. Optimizacija medijuma

Pokazano je da je produkcija DDHR od strane *S. durmitorensis* u TSB/manitol medijumu nestabilna i zahteva produženu inkubaciju (do 28 dana) (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). U cilju optimizacije produkcije i prinosa biomase i DDHR isprobana je kultivacija u sedam fundamentalno različitih medijuma (Tabela 12.). Najviši prinos biomase ostvaren je u JSO medijumu, a ovaj prinos je bio od 42,1 do 1,1 put viši od ostalih testiranih medijuma (Tabela 12.). Prinos biomase ostvaren u JS medijumu bio je istog reda veličine, dok su prinosi biomase u MSF, NE/manitol (NEM), YED i GYM medijumu bili za red veličine niži. Prinos biomase u skrob/nitrat medijumu bio je za 2 reda veličine niži u odnosu na JSO medijum u kome je *S. durmitorensis* postigao

najvišu biomasu. Prisustvo karakteristične polienske hromofore je detektovano u apsorpcionim spektrima ekstrakata kultura gajenih u JS, MSF i NEM medijumu, dok polienska hromofora nije detektovana u ekstraktima kultura gajenih u JSO, GYM, YED i skrob/nitratnom medijumu (Tabela 12.). Podjednaki prinosi suve mase CRE ostvareni su u JS, MSF i NEM medijumu, dok je najviša stopa suve mase CRE od 117,9 mg/g suve mase ćelija ostvarena u skrob/nitratnom medijumu, ali je prinos suve mase CRE u ovom medijumu bio 4,2 puta niži od proseka za NEM, JS i MSF medijum, a prinos biomase najniži od svih ispitivanih medijuma (Tabela 12.).

Tabela 12. – Prinos DDHR iz kultura *S. durmitorensis* gajenog u različitim medijumima 7 dana.

Medijum ^a	SM ^b (g/l)	DDHR (mg/l)
JSO	22,30	n.d. ^c
JS	20,30	108,57
MSF	9,27	114,29
NEM	5,17	122,86
YED	3,73	n.d.
GYM	2,37	n.d.
skrob/nitrat	0,53	n.d.

^a sastav medijuma dat je u poglavlju 3.4.6.; ^b suva masa ćelija; ^c nije detektovano.

Proizvodnja DDHR u NEM medijumu pokazala je najvišu stopu produkcije DDHR izraženu u mg/g suve mase ćelija, 1,07 i 1,13 puta veću u odnosu na MSF i JS medijum, respektivno. NEM medijum pokazao je najstabilniju produkciju DDHR, sa najvišim ukupnim prinosom u mg/l i najvišom stopom produkcije. Stoga se pristupilo njegovoj optimizaciji iako je, za potrebe prečišćavanja, predhodno korišćeni JS medijum dao zadovoljavajuće rezultate (poglavlje 4.4.3.). DDHR proizveden od strane *S. durmitorensis* u NEM i modifikovanim medijumima prečišćavan je PLC-om. Najveći ukupni prinos DDHR dobijen je kada je NEM medijumu dodato 0,2% (v/v) ulje koštica grožđa. U ovom slučaju prinos DDHR je povećan za 12,42%, ali je produktivnost opala 1,59 puta. Generalno, dodavanje suplemenata metil oleata i ulja koštica grožđa kao i zamena izvora ugljenika metil oleatom dalo je povećanje biomase 2,63, 1,90 i 1,65 puta, respektivno, ali ukupna proizvodnja nije odstupila za više od 13% od originalnog medijuma. (Tabela 13.).

Tabela 13.– Optimizacija NEM medijuma u cilju povećanja produkcije DDHR.

Medijum i izmene	SM ^a (g/l)	DDHR (mg/l)	Produktiv- nost ^b (mg/g)
NE/manitol	5,46±0,78	211,43±44,45	39,76±15,22
<u>Substrakcija komponenti medijuma</u>			
manitol (NE)	2,87±0,55	n.d. ^c	-
glukoza	2,76±0,08	121,42±46,46	43,30±4,29
YE	3,10±0,51	n.d.	-
ME	4,05±0,82	105,71±56,57	25,20±8,86
CAA	3,38±0,40	101,42±22,22	30,57±10,21
ME, CAA	2,18±0,71	85,71±0,05	13,04±5,81
ME, CAA, YE	4,47±0,56	80,00±23,35	17,90±9,50
ME, CAA, YE, dodat NaNO ₃	4,92±1,80	164,28±38,39	61,08±0,95
<u>Zamena izvora ugljenika</u>			
glukoza	2,73±1,07	22,86±9,56	5,76±0,55
manitol	6,32±2,70	215,72±135,36	52,37±33,36
glicerol	5,35±1,48	60,00±44,45	10,46±5,41
arginin	4,48±0,12	n.d.	-
amonijum sukcinat	5,21±0,12	n.d.	-
metil oleat	7,42±0,92	211,42±20,20	28,88±6,30
<u>Suplementi medijuma</u>			
metil oleat (0,2%)	11,88±2,81	200,00±12,16	17,19±3,04
ulje koštica grožđa (0,2%)	8,56±0,47	235,70±42,43	27,43±3,44

^a suva masa ćelija; ^b produktivnost, izražena kao mg proizvedenog DDHR po g suve mase ćelija; ^c nije detektovano.

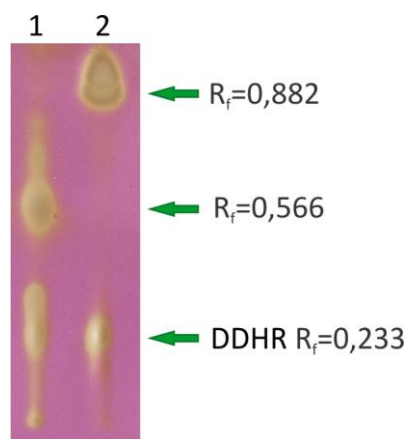
Svako oduzimanje neke od komponenti medijuma dovelo je do smanjivanja biomase i generalno se može reći da je *S. durmitorensis* pokazao veću osetljivost na smanjenje ukupne količine izvora ugljenika (pad biomase 1,98 i 1,90 puta za glukožu i manitol respektivno), nego na oduzimanje izvora azota (pad biomase varira od 2,51 puta pri oduzimanju mesnog ekstrakta i kazamino kiselina do 1,22 pri oduzimanju svih izvora azota (Tabela 13.). S druge strane, biomasa *S. durmitorensis* zavisila je ne samo od količine dostupnih izvora ugljenika, već i od njihove prirode. Tako uvođenje glukoze kao jedinog izvora ugljenika smanjuje produkciju biomase tačno 2,0 puta i to je najveći pad produkcije biomase uočen za neku od pojedinačnih komponenti medijuma. Ako se posmatra ukupni najveći pad u produkciji biomase, on je uočen za medijum sa

dvostrukom substrakcijom mesnog ekstrakta i kazamino kiselina i iznosi 2,5 puta. Najpovoljniji efekat na povećanje prinosa biomase imaju manitol i metil oleat, pojedinačno, kao glavni izvori ugljenika (1,2 i 1,4 puta, respektivno) ili u kombinaciji (2,2 puta), kao i kombinacija manitola i ulja koštica grožđa (1,6 puta).

Proizvodnja DDHR nije uočena u 4 od ispitivanih modifikacija NEM medijuma: medijumu bez kvašćevog ekstrakta, zatim u medijumima gde su arginin i amonijum sukcinat bili jedini izvor ugljenika i u medijumu bez manitola (NE medijum). Proizvodnja DDHR drastično je niža u medijumima sa smanjenim sadržajem N (2,2 u medijumu bez mesnog ekstrakta i kazamino kiselina, odnosno 3 puta u medijumu bez kvašćevog ekstrakta, mesnog ekstrakta i kazamino kiselina). Priroda izvora N nije bila od presudnog značaja – medijum gde su svi izvori azota zamenjeni sa NaNO_3 omogućio je je najveću produktivnost od 61,08 mg/g suve mase ćelija uz blago smanjenu biomasu (1,11 puta). Proizvodnja DDHR je takođe drastično smanjena u medijumima gde su glavni izvor ugljenika bili glukoza i glicerol (6,9 i 3,8 puta, respektivno).

Prisustvo manitola imalo je ključnu ulogu u produkciji DDHR u ovom medijumu. Oduzimanje manitola iz NEM medijuma imalo je za posledicu da je nakon 7 dana gajenja izostajala vidljiva produkcija DDHR. Medijum sa manitolom kao glavnim izvorom ugljenika pokazuje povećanu produktivnost DDHR kao i povećanu produkciju biomase. Medijumi sa manitolom i suplementima (metil oleat i ulje koštica grožđa) takođe pokazuju najviše dobijene prinose DDHR i najvišu produkciju biomase. S druge strane svi medijumi bez manitola, osim medijma sa metil oleatom kao jedinim izvorom ugljenika pokazuju ili nisku ili nedetektabilnu produkciju DDHR (Tabela 13.).

U toku eksperimenata optimizacije primećeno je da je produkcija tamno zelenog pigmenta iz *S. durmitorensis* (Savić 2004) takođe varirala zavisno od medijuma i uslova kultivacije. Ovaj pigment se u najvećoj meri proizvodio u medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika, kada je biomasa bila jednaka onoj u osnovnom NEM medijumu, ali je produktivnost DDHR bila 3,8 puta niža. U toku ekstrakcije etil acetatom ovaj pigment je ostajao vezan za vodenu fazu i nije doprinosa TLC profilu hromatograma CRE iz ovih kultura (Slika 34.), ali se u isto vreme pojavljivao produkt čija R_f vrednost je iznosila 0,566. U ovom sistemu rastvarača (etil acetat/metanol 8:2) . R_f vrednost za DDHR iznosila je 0,233.



Slika 34. – Razdvajanje CRE kultura *S. durmitorensis* u etil acetatu/metanolu (8:2). 1 - NE bez glukoze sa glicerolom; 2 - NEM sa 0,2% ulja koštica grožđa.

U slučaju suplementacije NEM medijuma 0,2% uljem koštica grožđa došlo je do povećanja prinosa CRE 14,29 puta iako je količina proizvedenog DDHR bila u granicama one koju je soj proizvodio u NEM medijumu. Sa hromatograma (Slika 34.) se vidi da se u ovom slučaju drastično povećala produkcija nekog drugog metabolita sa R_f vrednošću 0,882.

4.8. Klaster za DDHR PKS I sintazu

U ranijem radu pokazano je da je poliketid sintaza tipa I (PKS I) odgovorna za sintezu DDHR (Bratić 2006). Geni za ovu PKS izolovani su iz kozmidne biblioteke *S. durmitorensis* pomoću probe koja je sadržala sekvencu iz β -ketoacil sintaznog domena (KS domena) dobijene prajmerima MAK1/MAK3 (Savic and Vasiljevic 2006). Na ovaj način izolovani su iz biblioteke kozmida cos135, cos85, cos83 i cos16. Krajevi ovih kozmida sekvencirani su prajmerima T3 i T7 (Tabela 1) iz SuperCos 1 kozmidnog vektora (Stratagene, La Jolla, CA, SAD).

4.8.1. Pravljenje podbiblioteka kozmida

Transpozonske podbiblioteka kozmida cos83 i cos16 napravljene su kao što je opisano u poglavlju 3.6.2. Efikasnost transpozicije iznosila je 2,2%, a efikasnost transformacije *E. coli* kozmidnom DNK između 10^5 i 10^6 kolonija po mg DNK. Na ovaj način dobijeno je dovoljno klonova da se obezbedi pokrivenost cele PKS sekvence ugrađene u kozmid, prema jednačini datoj u poglavlju 3.6.1. Kozmidna DNK izlovana iz klonova podbiblioteka restrikcijom je proverena sečenjem enzimom *Bam*HI da bi se izbeglo sekvenciranje DNK iz kolonija nastalih od istog klona u procesu oživljavanja nakon elektrotransformacije (poglavlje 3.5.2.).

4.8.2. Sekvenciranje cos83 i cos16 podbiblioteka

Za potrebe sekvenciranja izolovano je 500 - 1 000 ng kozmidne DNK klonova iz podbiblioteka. Za sekvenciranje prve grupe od 93 klona iz podbiblioteka cos83 korišćen je prajmer TET-1 RP (Tabela 1). Verovatnoća pokrivenosti PKS sekvence cos83 ovim brojem klonova iznosila je približno 0,77. Uspešnost sekvenciranja procenjena pomoću algoritma Phred (Ewing, Hillier et al. 1998) je data u Tabeli 14.

Tabela 14.– Procena kvaliteta sekvenci cos83 na osnovu Phred algoritma.

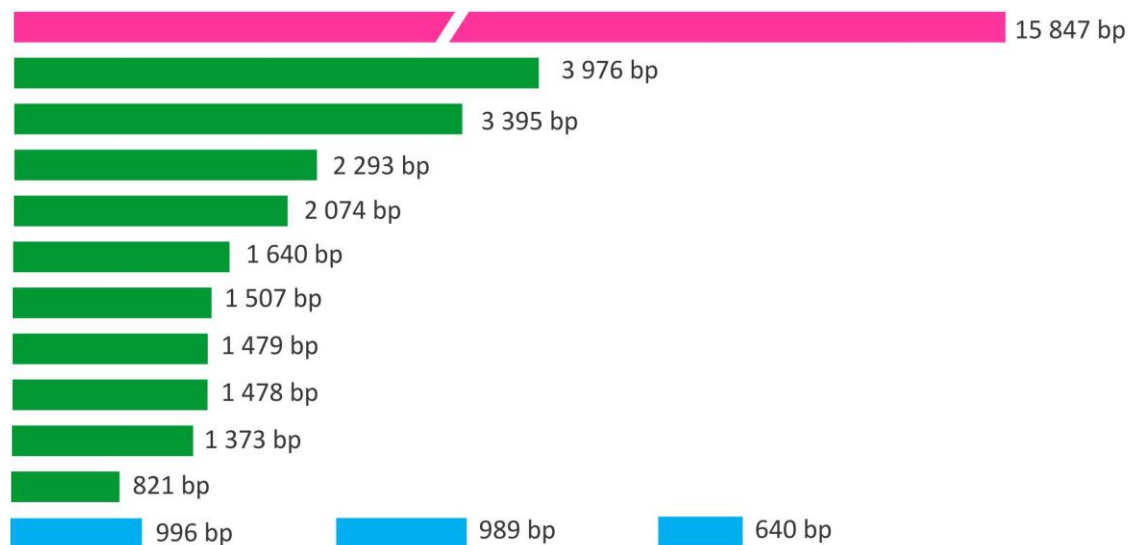
Broj pročitanih bp	0	<100	100-200	200-300	300-400	>400
Broj sekvenci	13	6	3	1	0	70

Nakon sklapanja dobijenih sekvenci u kontige (*eng.* contig, contiguous sequence), 15 klonova podbiblioteke cos83 i 80 klonova podbiblioteke cos16 sekvencirani su prajmerom TET-1 F. Uspešnost sekvenciranja procenjena pomoću algoritma Phred je data u Tabeli 15.

Tabela 15.– Procena kvaliteta sekvenci cos83 i cos16 na osnovu Phred algoritma.

Broj pročitanih bp	0	<100	100-200	200-300	300-400	>400
Broj sekvenci	1	4	1	2	3	84

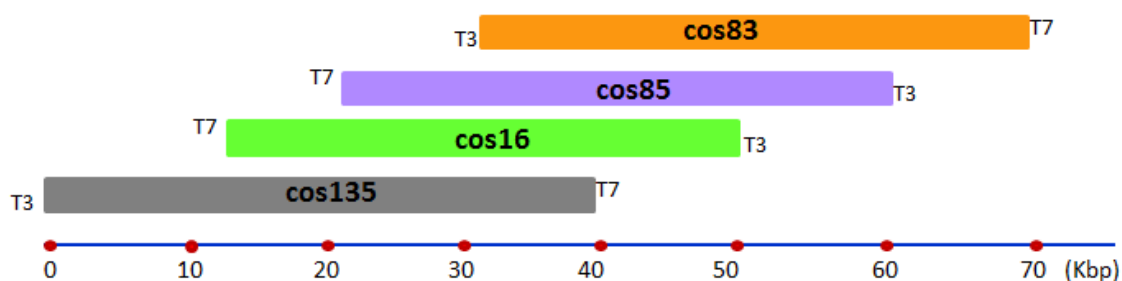
Sekvenca cos83 koja je dobijena nakon sklapanja pojedinačnih sekvenci sastojala se iz 11 kontigova i 3 ne preklopljene sekvence (Slika 35.). Najduži kontig cos83 sekvence iznosio je 15 847 bp, a ukupna količina pročitanih nukleotida iznosila je 38 508.



Slika 35. – Kontigovi sekvence cos83. ■– najduži kontig; ■– ostali kontigovi predstavljeni u srazmeri; ■– ne preklopljene sekvence predstavljene u srazmeri.

Delovi sekvence cos83 koji su nedostajali dobijeni su sekvenciranjem specifičnim prajmerima dizajniranim na osnovu poznatih sekvenci cos83. Na ovaj način je sa 21 prajmerom (Prilog I) dobijeno preostalih 2 744 bp i kompletirana je PKS sekvenca u cos83 koja je iznosila 41 252 bp.

PKS sekvenca kozmida cos16 preklapila se u dužini od 22 395 bp sa 5' krajem PKS sekvence cos83 (Slika 36.). Preostali deo sekvence cos16 (17 376 bp) je sklopljen uz pomoć 8 specifično dizajniranih prajmera (Prilog I). Ukupna dužina cos16 iznosila je 39 771 bp, a ukupna dužina PKS sekvence koju sadrže kozmidi cos83 i cos16 iznosila je 58 628 bp i sadržala je 3 otvorena okvira čitanja (ORF, *eng.* open reading frame) dužine 16 097 bp, 24 810 bp i 17 669 bp smeštena na istom, (+) lancu DNK. Na osnovu ove sekvence moguće je bilo utvrditi mesta preklapanja sa PKS sekvencama kozmida cos85 i cos135. Kozmid cos85 se u celosti preklapio sa sekvencom kozmida cos83 i cos16, dok se cos135 preklapio u manjoj meri sa 5' krajem kozmida cos83 i cos16 (9 675 bp i 27 284 bp, respektivno) (Slika 36.).

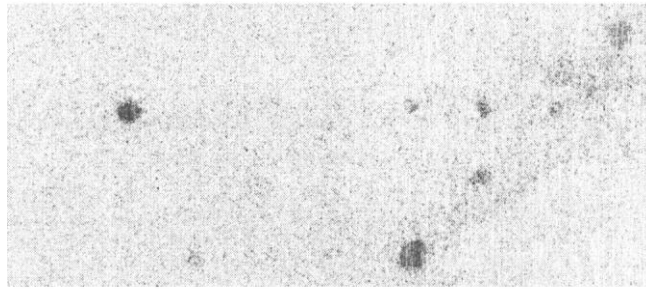


Slika 36. – Međusobni položaj i orijentacija PKS sekvenci kozmidnih klonova izolovanih iz genomske biblioteke *S. durmitorensis*.

4.8.3. Pretraživanje kozmidne biblioteke *S. durmitorensis* i izolacija kozmida sa sekvencom PKS klastera


Sekvenca kraja cos135 dobijena T3 prajmerom poravnana pomoću BLASTn algoritma sa nukleotidnom kolekcijom NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sadržala je PKS sekvencu. Ovaj region cos135 je odabran za konstrukciju c135 probe za hibridizaciju od 468 bp umnožavanjem prajmerima c135T3L i c135T3R (Tabela 1). Kozmidna biblioteka *S. durmitorensis* pretražena je pomoću DNK-DNK hibridizacije sa c135 probom i izolovana su 33 klona. Od ovih klonova je formirana uređena biblioteka koja je ponovo hibridizovana sa c135 probom (Slika 37.).

a)

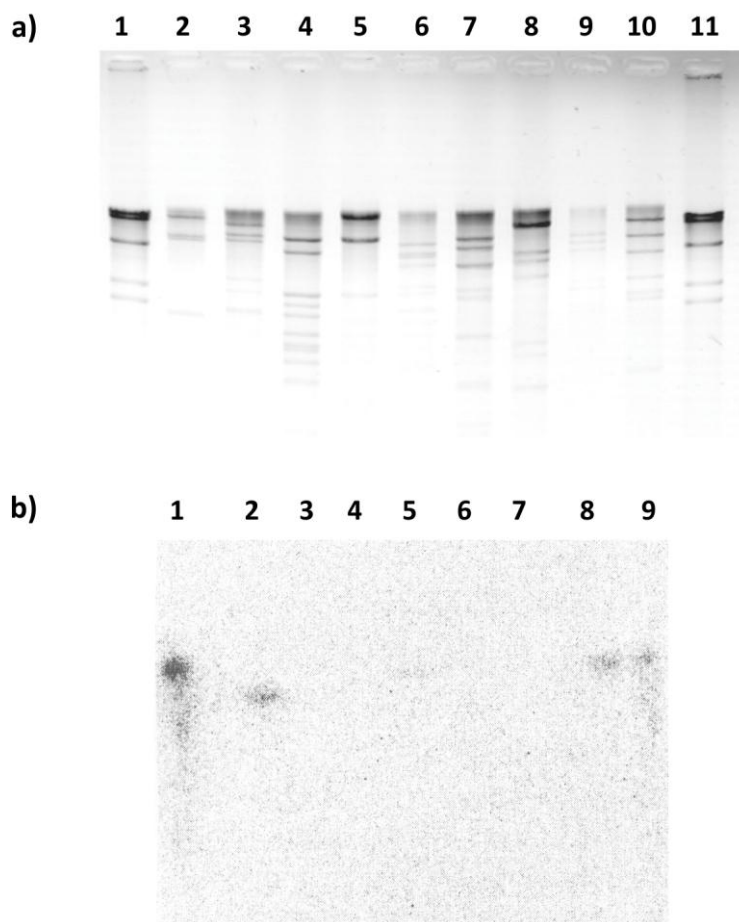


b)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33			

Slika 37. – Rezultati DNK-DNK hibridizacije uređene biblioteke kozmidnih klonova sa c135 probom. **a)** – membrana; **b)** – shematski prikaz položaja klonova na membrani.  – klonovi koji su dali signal u hibridizaciji.

Prilikom hibridizacije signal je dobijen sa 9 klonova (Slika 37b.) označenih kao klonovi 9, 11, 15, 16, 17, 22, 25, 30 i 33. Iz klonova koji su dali signal u hibridizaciji izolovana je kozmidna DNK, sečena restrikcijom enzimom *Bam*HI i hibridizovana sa c135 probom. Nakon hibridizacije 5 klonova je dalo pozitivan signal sa probom c135 (Slika 38.).



Slika 38. – Hibridizacija kozmidnih DNK sečenih enzimom *Bam*HI sa c135 probom. **a)** Kozmidne DNK sečene enzimom *Bam*HI razdvojene agaroznom elektroforezom. 1 i 11 - λ *Hind*III standard; 2 - klon 9; 3 - klon 11; 4 - klon 15; 5 - klon 16; 6 - klon 17; 7 - klon 22; 8 - klon 25; 9 - klon 30; 10 - klon 33. **b)** Hibridizacija sa probom c135. 1 - klon 9; 2 - klon 11; 3 - klon 15; 4 - klon 16; 5 - klon 17; 6 - klon 22; 7 - klon 25; 8 - klon 30; 9 - klon 33.

Hibridizacijom sa c135 probom iz kozmidne biblioteke *S. durmitorensis* izolovani su klonovi 9, 11, 16, 25 i 33 sa PKS sekvencom uzvodno od sekvence iz cos135. Krajevi genomskih inserata u ovim kozmidima sekvencirani su prajmerima T3 i T7 i njihov identitet određen je poređenjem pomoću BLASTn algoritma sa nukleotidnom kolekcijom NCBI ili pretraživanjem algoritmima BLASTp i DELTA-BLAST baze podataka kozerviranih domena proteina CDD (Marchler-Bauer, Anderson et al. 2009) (Tabela 16.). Pri sekvenciranju kozmidne DNK klona 25 T3 prajmerom ni posle višestrukog ponavljanja nije dobijena sekvenca zadovoljavajućeg kvaliteta da bi mogla biti anotirana.

Tabela 16.– Rezultati pretraživanja homologije krajeva kozmidnih klonova iz biblioteke *S. durmitorensis* izolovanih c135 probom.

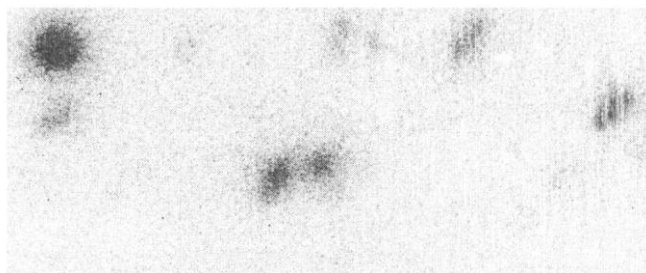
Klon	Prajmer	Homologija
	T3	PKS I (preklapanje sa cos16)
9	T7	ketoacil/3-oksoacil ACP sintaza
	T3	metilaza
11	T7	glutamat sintaza
	T3	NAD dehidrogenaza
16	T7	PKS I (preklapanje sa cos83)
	T3	n.p. ^a
25	T7	ACCA superfamilija
	T3	PKS I sekvenca (preklapanje sa cos16)
33	T7	ksantin dehidrogenaza

^a nema podataka

Sekvenca sa 5' kraja PKS sekvence kozmida cos83 iskorišćena je za konstrukciju probe za hibridizaciju umnožavanjem prajmerima c83end2-L i c83end2-R (Tabela 1). Ovim prajmerima dobijena je proba od 393 bp nazvana c83 proba.

Kozmidna biblioteka *S. durmitorensis* pretražena je pomoću DNK-DNK hibridizacije sa c83 probom. Izolovana su 32 klona od kojih je formirana uređena biblioteka koja je ponovo hibridizovana sa c83 probom (Slika 39a.).

a)

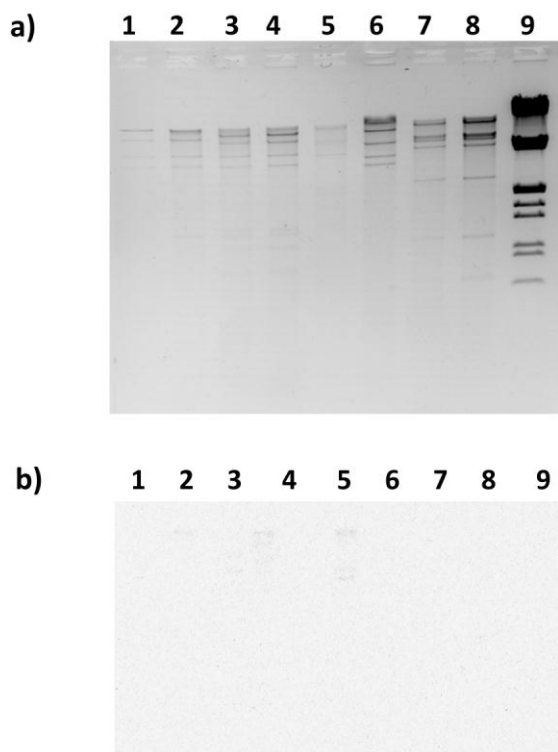


b)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32				

Slika 39. – Rezultati DNK-DNK hibridizacije uređene biblioteke kozmidnih klonova sa c83 probom. **a)** Membrana. **b)** Shematski prikaz položaja klonova na membrani. – klonovi koji su dali signal u hibridizaciji. Na polju broj 1 nalazi se cos83 kao kontrola.

Nakon hibridizacije 9 klonova (klonovi 3, 5, 7, 10, 18, 22, 23, 26 i 27) dali su signal koji upućuje na vezivanje obležene probe (Slika 39b.). DNK iz ovih 9 klonova je izolovana, sečena restrikcijom enzimom *Bam*HI i hibridizovana sa c83 probom (Slika 40.).



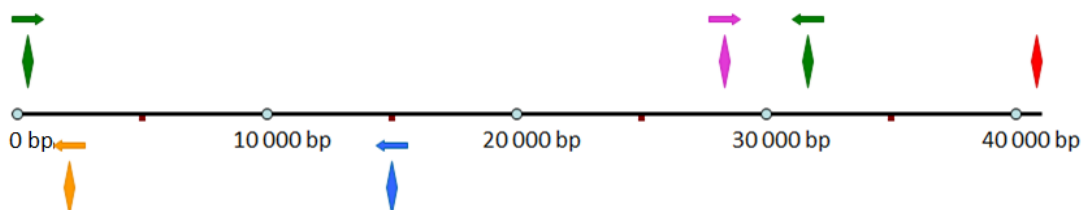
Slika 40. – Hibridizacija kozmidnih DNK sečenih enzimom *Bam*HI sa c83 probom. **a)** Kozmidne DNK sečene enzimom *Bam*HI razdvojene agaroznom elektroforezom. **b)** Hibridizacija sa probom c83. 1 - klon 3; 2 - klon 5; 3 - klon 7; 4 - klon 10; 5 - klon 18; 6 - klon 22; 7 - klon 23; 8 - klon 26; 9 - klon 27.

Nakon hibridizacije signal je dobijen kod 4 klona. Na ovaj način iz kozmidne biblioteke *S. durmitorensis* izolovani su klonovi 3, 5, 10 i 18 sa PKS sekvencom nizvodono od sekvence kozmida cos83. Krajevi genomskih inserta u ovim kozmidima sekvencirani su prajmerima T3 i T7, pomoću BLASTn algoritma pretražena je nukleotidna kolekcija NCBI i određene sekvence sa najvećom homologijom. Jedino se za kozmid cos18 moglo pretpostaviti da u jednom delu pripada PKS sekvenci klastera za DDHR, a da mu je ostatak sekvence izvan tog klastera (Tabela 17.).

Tabela 17.– Rezultati pretraživanja homologije krajeva kozmidnih klonova iz biblioteke *S. durmitorensis* izolovanih c83 probom.

Klon	Prajmer	Homologija
3	T3	tiolaza
	T7	acil koenzim A dehidrogenaza
5	T3	PKS (preklapanje sa cos83)
	T7	PKS (preklapanje sa cos83)
10	T3	PKS (preklapanje sa cos83)
	T7	PKS
18	T3	PKS (preklapanje sa cos83)
	T7	TetR transkripcioni regulator

Položaj i orijentacija sekvenci dobijenih T3 i T7 prajmerima u odnosu na sekvencu kozmida cos83 prikazana je na slici 41. Sekvenca klona 9 počinje 894 bp uzvodno od sekvence cos83, a sekvenca klona 33 počinje 13 202 bp uzvodno od sekvence cos83.



Slika 41. – Položaj i orijentacija sekvenci krajeva kozmida izolovanih iz biblioteke *S. durmitorensis* probama c135 (klon 10 i klon 16) i c83 (klon 5 i klon 18) u odnosu na sekvencu cos83. (♣) – položaj c83 probe; (♠) – položaj T7 sekvence klona 16; (♣) – položaj T3 sekvence klona 10; (♣) – položaj T3 i T7 sekvenci klona 5; (♠) – položaj T7 sekvence klona 18.

4.8.4. 454 sekvenciranje

Na osnovu mere preklapanja sa cos83 i cos16 kozmidima kao i sekvence terminalnih delova fragmenata genoma *S. durmitorensis* prisutnih u kozmidnim klonovima, odabrani su kandidati za sekvenciranje preostalih delova PKS klastera. Za cos33 pretpostavljeno je da sadrži preostalu sekvencu PKS klastera uzvodno od

sekvence u cos16, dok je za cos18 predpostavljeno da sadrži delove klastera nizvodno od PKS sekvence u cos83. Preklapanje cos33 sa 5' krajem PKS sekvence cos16 iznosilo je 4 174 bp dok se cos18 preklapio sa 12 591 bp sa 3' kraja cos83. Kozmidi cos33 i cos18 sekvencirani su zajedno tehnikom pirosekvenciranja pomoću 454 platforme, a obim sekvenciranja iznosio je 10 Mbp.

4.8.4.1. Sekvenciranje kozmida cos33

U toku sekvenciranja kozmida cos33 pročitano je ukupno 14 845 sekvenci, a ukupan broj pročitanih baza iznosio je 2,77 Mbp (2 774 985 bp). Procenat poravnanih sekvenci iznosio je 96,30%, a broj poravnanih baza iznosio je 98,14% (Tabela 18.). Nakon preklapanja sekvenci dobijen je 21 kontig koji je sadržao ukupno 23 955 bp (Tabela 18.).

Tabela 18.– Statistika sekvenciranja i sklapanja sekvenci dobijenih sekvenciranjem cos33.

Statistika sekvenciranja	
Broj poravnanih sekvenci	14 295 (96,30%)
Broj poravnanih baza	2 723 473 (98,14%)
Broj preklapljenih sekvenci	14 167
Broj delimično pročitanih sekvenci	128
Broj ne preklapljenih sekvenci	231
Broj previše kratkih čitanja sekvenci	308
Statistika sklapanja sekvenci	
Ukupan broj kontigova	21
Broj baza u kontigovima	23 955
Broj velikih kontigova (>500 bp)	13
Broj bp u velikim kontigovima	20 861
Prosečna veličina velikih kontigova (bp)	1 604
Najduži kontig (bp)	4 215

Pretraživanje baza podataka NCBI pokazalo je da je približno 80% (83,67%) čitanja sekvenci pripada kontigovima čija je sekvenca homologa sa sekvencom vektora SuperCos 1. Ove sekvence čine takođe i 2 najduža kontiga, kontig 5 i 21 (Tabela 19.). Manje od 20% čitanja sekvenci pripada kontigovima isključivo sa sekvencama iz S.

durmitorensis. Dužina dobijenih kontigova kao i rezultati pretraživanja homologije sekvenci dati su u tabeli 19.

Tabela 19.– Rezultati pretraživanja homologije sekvenci kontigova dobijenih sekvenciranjem cos33 kozmidnog klona iz biblioteke *S. durmitorensis*.

Kontig	Dužina (bp)	Broj sekvenci	Homologija
broj 5	4 215	6 012	SuperCos 1 vektor i ksantin dehidrogenaza
broj 21	2 826	5 417	SuperCos 1 vektor i cos16
broj 16	2 129	440	citohrom P450
broj 2	2 045	684	dihidrofolat reduktaza
broj 4	1 927	552	TetR transkripcijski regulator
broj 19	1 603	217	cos16
broj 7	1 431	125	ksantin dehidrogenaza
broj 6	1 033	47	PKS I (AT domen)
broj 1	995	187	cos16
broj 8	811	23	3 oksoacil-ACP sintaza
broj 3	720	38	cos16
broj 12	609	22	PKS I (AT domen)
broj 9	518	44	fosfodiesteraza, nukleotid pirofosfataza
broj 20	471	18	PKS I (KS domen)
broj 15	440	8	PKS I (KS domen)
broj 10	414	19	ksantin dehidrogenaza
broj 17	390	19	cos16
broj 11	385	11	PKS I (DH i ER domeni)
broj 13	347	16	PKS I (ACP domen)
broj 18	328	1 278	SuperCos 1 vektor
broj 14	319	9	ksantin dehidrogenaza

Dva najduža kontiga sadržala su sekvencu vektora SuperCos1 kao i terminalne delove sekvence genomskog inserta *S. durmitorensis*. Od 18 kontigova sa sekvencama isključivo iz *S. durmitorensis*, 11 je sadržalo sekvencu za PKS (kontigovi 1, 3, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 17, 19 i 20). Od kontigova sa PKS sekvencom, njih 5 (kontigovi 1, 3, 17, 19 i 21) je pokazalo preklapanje sa sekvencom cos16, dok je 8 (kontigovi 5, 6, 8, 11, 12, 15, 16 i 20) sadržalo do sada ne pročitane delove PKS sekvence (Tabela 19.). Ukupna

dužina novopročitanih sekvenci iznosila je 4 096 bp. Dizajniranjem 3 specifična prajmera (Prilog I) sekvenca cos16 proširena je PKS sekvencama kontigova 15 i 21 cos33.

4.8.4.2. Sekvenciranje kozmida cos18

Sekvenciranjem kozmida cos18 pročitano je ukupno 19 457 sekvenci, a ukupan broj pročitanih baza iznosio je 3,55 Mbp (3 549 038 bp). Procenat poravnanih sekvenci iznosio je 96,94%, a broj poravnanih baza iznosio je 98,14 % (Tabela 20.). Nakon preklapanja sekvenci dobijena su 23 kontiga koji su sadržali ukupno 21 032 bp (Tabela 20.).

Tabela 20.– Statistika sekvenciranja kozmida cos18.

Statistika sekvenciranja	
Broj poravnanih sekvenci	18 862 (96,94%)
Broj poravnanih baza	3 482 548 (98,13%)
Broj preklapljenih sekvenci	18 683
Broj delimično pročitanih sekvenci	179
Broj ne preklapljenih sekvenci	208
Broj previše kratkih čitanja sekvenci	368
Statistika sklapanja sekvenci	
Ukupan broj kontigova	23
Broj baza u kontigovima	21 032
Broj velikih kontigova (>500 bp)	7
Broj bp u velikim kontigovima	16 316
Prosečna veličina velikih kontigova (bp)	2 330
Najduži kontig (bp)	7 394

Pretraživanje baza podataka NCBI pokazalo je da je približno 90% (89,97%) čitanja sekvenci pripada kontigovima čija je sekvenca homologa sa sekvencom vektora SuperCos 1 (kontigovi 4 i 23). Samo 10% čitanja sekvenci pripada kontigovima isključivo sa sekvencama iz *S. durmitorensis*. Sekvence *S. durmitorensis* koje nisu pokazale visok stepen homologije sa sekvencama u nukleotidnoj kolekciji NCBI, analizirane su poređenjem njihovih ORF sa bazama podataka za prisustvo konzerviranih domena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) koristeći BLASTp i DELTA-BLAST

algoritme. Dužina dobijenih kontigova kao i rezultati pretraživanja homologije sekvenci kontigova dati su u tabeli 21.

Tabela 21.– Rezultati pretraživanja homologije kontigova dobijenih sekvenciranjem cos18 kozmidnog klona iz biblioteke *S. durmitorensis*.

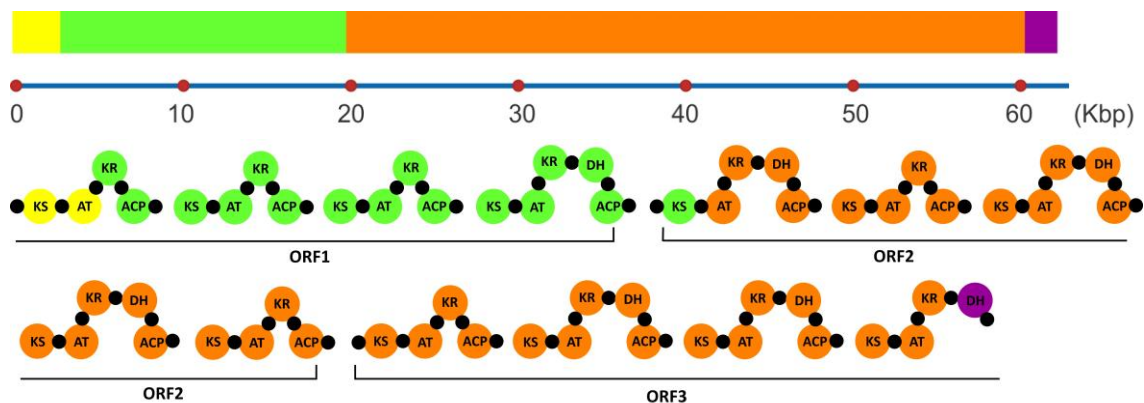
Kontig	Dužina (bp)	Broj sekvenci	Homologija
broj 23	7 394	16 513	SuperCos 1 vektor, TetR transkripcioni regulator, protein kinaza
broj 3	5 457	1 607	PKS (ACP i TE domen), GntR i ROK regulatori transkripcije, metilaza, nitrilaza
broj 5	931	40	PKS (AT domen)
broj 7	824	59	ekstradol dioksidgenaza
broj 4	613	778	SuperCos 1 vektor i cos83
broj 9	575	19	ZipA protein ćelijske deobe
broj 11	522	39	PKS (AT domen)
broj 10	463	6	membranski protein
broj 19	459	11	PKS (KS domen)
broj 1	417	15	PKS (AT domen)
broj 14	415	16	PKS (KS domen)
broj 6	390	12	PKS (KS i AT domeni)
broj 18	359	15	PKS (KS domen)
broj 20	324	11	PKS (AT domen)
broj 2	314	10	hipotetički konzervirani protein
broj 17	296	21	PKS (AT domen)
broj 22	261	8	PKS I (DH domen)
broj 8	226	9	PKS (AT domen)
broj 12	216	8	PKS (KS domen)
broj 13	199	7	PKS (KS domen)
broj 21	152	6	PKS
broj 16	122	2	PKS
broj 15	104	6	PKS

Kontigovi 4 i 23 su osim kompletne sekvence SuperCos1 vektora sadržali terminalne delove genomskog inserta *S. durmitorensis* koji su odgovarali sekvencama

dobijenim T3 i T7 prajmerima (Tabela 17.). Od 21 kontiga koji su se sastojali od sekvenci poreklom isključivo iz *S. durmitorensis*, 17 je sadržalo PKS sekvence (kontigovi 1, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 i 22). Od kontigova sa PKS sekvencom, njih 11 (kontigovi 4, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20 i 21) je pokazalo preklapanje sa sekvencom iz cos83, dok je 7 (kontigovi 1, 3, 5, 6, 18, 19 i 22) sadržalo do sada ne pročitane delove PKS klastera (Tabela 21.). Ukupna dužina novopročitanih sekvenci iznosila je 4 095 bp koliko čini dužina kontigova 1, 5, 6, 18, 19 i 22 i PKS deo (TE domen) kontiga 3. Dizajniranjem 3 specifična prajmera (Prilog I) proširena je sekvenca nizvodno od cos83 za 1 980 bp. Kontigovi sa novopročitanim PKS sekvencama dovoljne dužine da se mogu dizajnirati specifični prajmeri, takođe su prošireni pa su tako kontigovi 1 i 5 spojeni u jedan pomoću 8 specifičnih prajmera, a kontigu 3 pridodati su kontigovi 6 i 9 pomoću 7 specifičnih prajmera. 3' kraj cos18 proširen je dizajniranjem specifičnih prajmera, pa mu je tako pridodata sekvenca kontiga 7. Ukupno je pročitano 32 383 bp sekvence cos18.

4.8.5. Anotacija klastera

Nakon sklapanja sekvenci kozmida cos83, cos16, cos33 i cos18 dobijeno je 63 667 bp kontinuirane sekvence PKS (Slika 42.) i još 10 kontigova. Ukupno je detektovano 4 otvorena okvira čitanja (*eng.* open reading frame, ORF) u okviru PKS sekvence, 3 unutar najduže sekvence (od 19 156 bp, 24 810 bp i 19 649 bp) (Slika 42.) i još jedan početak ORF unutar kontiga 19 kozmida cos18.



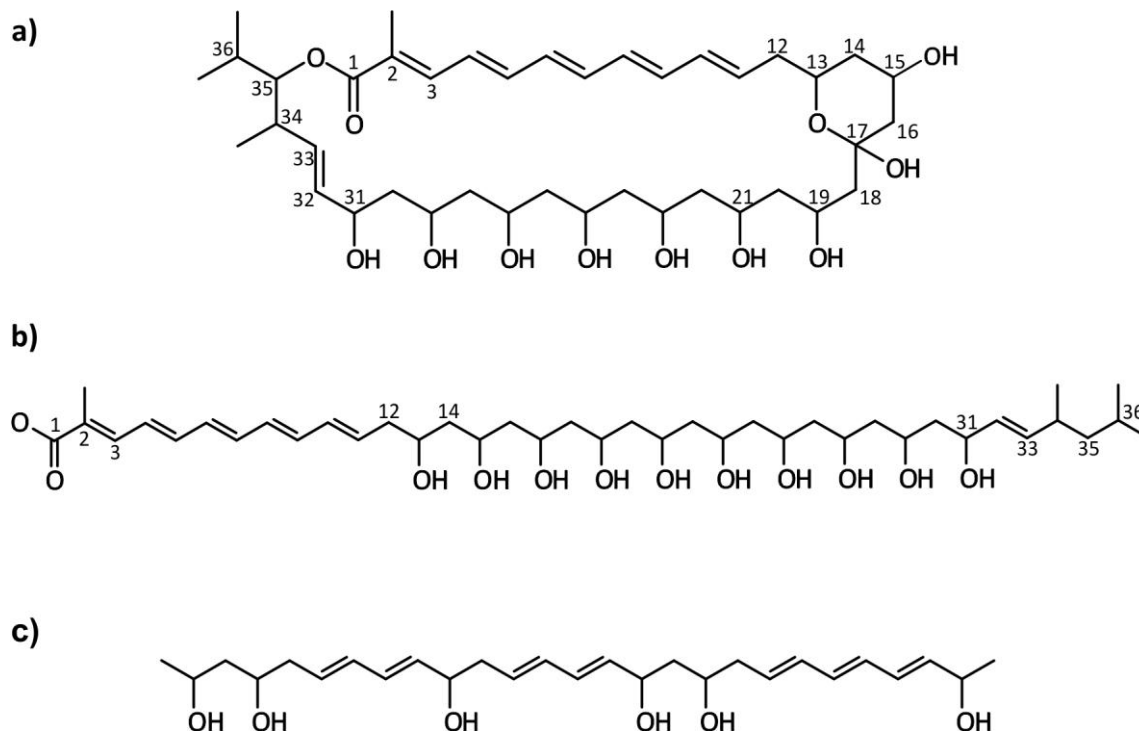
Slika 42. – Najduža kontinuirana sekvenca PKS klastera sintaze DDHR i moduli dobijeni na osnovu predikcije baze podataka MAPSI. ■ - sekvenca cos33; ■ - sekvenca cos16; ■ - sekvenca cos83; ■ - sekvenca cos18.

ORF unutar najduže sekvence dobijeni su predikcijom ChromasPro programa (Technelysium Pty, Helensvale, Australija). U okviru ove sekvence, samo početak ORF3 sadrži doking (*eng.* docking) region. Ovi regioni koji se nalaze na C- i N-terminusu proteinskih lanaca PKS svojim protein-protein interakcijama čine vezu odnosno linker između dva uzastopna proteinska lanca PKS i, delom, površinu preko koje dimerizuju dva paralelna PKS lanca (Broadhurst, Nietlispach et al. 2003). Prisustvo ove sekvence takođe sa sigurnošću označava početak nove PKS subjedinice. Četvrti ORF u okviru cos18 sekvence detektovan je upravo po prisustvu doking motiva. Sekvenca kontiga 19 cos18 proširena je sekvencom dobijenom prajmerom c18021us (Prilog I) i anotirana pomoću DELTA-BLAST algoritma koji pretražuje baze podataka konzerviranih domena proteina (CDD, *eng.* Conserved Domain Database) pri čemu su dobijeni domeni ACP i DOCKING-KS u dva različita okvira čitanja na (+) lancu DNK što predstavlja kraj jedog i početak sledećeg ORF.

Anotacija najveće kontinuirane sekvence iz PKS klastera vršena je pomoću programa ClustScan (Starcevic A 2008), MAPSI baze podataka (<http://gatesmallsoft.co.kr:8080/pks/mapsitools/index.pl>) i SBSPKS softvera (Anand, Prasad et al. 2010). Dobijeno je 13 modula (Slika 42.) - 7 modula β tipa (KS-AT-KR-ACP) i 6 modula γ tipa (KS-AT-DH-KR-ACP) (Jenke-Kodama, Börner et al. 2006). Prema predikciji, supstrat za sve anotirane AT domene u najdužoj sekvenci bio je malonil koenzim A, osim za jedan AT domen gde je predviđeni supstrat na osnovu sekvence bio metilmalonat. U okviru cos33 van kompletnih modula anotirane su još jedna KS

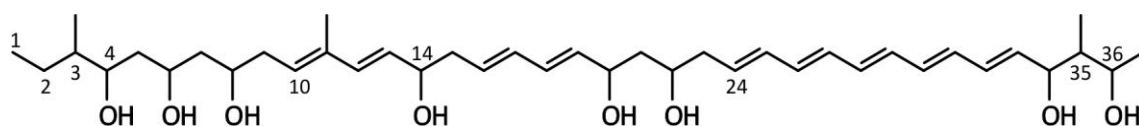
sekvenca, dve sekvence AT domena od kojih jedan ima supstratnu specifičnost za metilmalonat, jedan DH-ER didomen i jedan ACP domen, pa bi ovaj region mogao sadržati dva modula - početni (*eng.* loading module) i jedan modul δ tipa (KS-AT-DH-ER-KR-ACP). U okviru *cos18* van najduže anotirane sekvence nalaze se još jedan nepotpuni modul (KS-AT-DH) kod koga je za AT domen predikcija dala supstratnu specifičnost za metilmalonat, zatim jedan pojedinačni KS i jedan pojedinačni DH modul, jedan region koji sadrži kraj jednog modula odn. ORF i početak drugog modula i novog ORF (ACP, DOCKING-KS) kao i region koji sadrži kraj klastera – ACP-TE domen koji označava kraj PKS sekvence i odmah nizvodno lux-R regulator transkripcije i SAM zavisnu metilazu. S obzirom da ovaj region sadrži 3 KS i 3 ACP domena, a oba pripadaju setu domena koji mora sadržati osnovni, α PKS modul (KS-AT-ACP), može se pretpostaviti da ovaj region sadrži znači još 3 PKS modula, ali kom tipu modula pripadaju ne može se sa sigurnošću reći na osnovu dostupne sekvence.

Prema strukturi koju su odredili Stodulkova i saradnici (Stodulkova, Kuzma et al. 2011) DDHR je 36-člani makrolaktamski prsten sa 35 C atoma ugljenične okosnice u okviru prstena, dok je 36-ti C atom ugljenične okosnice u okviru dimetilpropanske grupe (Slika 43a.). Predviđena gradivna jedinica malonil koenzim A (malonil-CoA) dodaje na rastući acilni lanac po dva C atoma. Na osnovu ovoga 36-člana ugljenična okosnica bila bi sintetisana od strane PKS sa 18 modula sa starter molekulom koji takođe unosi 2 C atoma u okosnicu. Pošto sekvenca starter modula nije poznata ne možemo sa sigurnošću reći od kog C atoma počinje sinteza ugljenične okosnice. Na slici 43b data je ugljenična okosnica od arbitrarno uzetog C₁ atoma.



Slika 43. – a) Ciklična struktura DDHR. b) Linearna struktura DDHR predstavljena od arbitrarno određenog C₁ atoma. c) Ugljениčna okosnica dobijena na osnovu sekvence najužeg kontiga, uz pretpostavku da se subjedinice PKS koje kodiraju ORF1, 2 i 3 sklapaju u tom istom redosledu. Obe okosnice generisane su uz pomoć MAPSI baze podataka.

Unutar preostalih kontigova nalaze se još 2 nepotpuna modula u okviru kontigova iz cos33 sekvence i 3 nepotpuna modula u okviru poznate cos18 sekvence. Uz 13 modula iz najduže sekvence to čini ukupno 18 modula. Na osnovu sekvence i okosnice na slici 43b moguće je predložiti okosnicu koja se dobija na osnovu do sada poznatih modula (Slika 44.).



Slika 44. – hipotetički produkt generisan uz pomoć MAPSI baze podataka na osnovu delimične sekvence PKS klastera *S. durmitorensis* MS405.

Predpostavljeno je da se PKS subjedinice koje kodiraju ORF1, 2, 3 i 4 sjedinjuju u tom redosledu u zrelom PKS kompleksu. Starter molekul bio bi acetyl-CoA, a modul 1 δ tipa sa supstratnom specifičnošću za metilmalonil-CoA. Moduli 2, 3 i 4 su β tipa sa supstratnom specifičnošću za malonil-CoA. Modul 5 je γ tipa sa supstratnom specifičnošću za metilmalonil-CoA. Moduli 6 (γ tipa), 7 (β tipa), 8, 9 (γ tipa), 10, 11 (β tipa), 12, 13, 14 (γ tipa) ugrađuju u ugljeničnu okosnicu malonil. Za poslednja tri modula ne postoji dovoljno podataka, osim da jedan pokazuje supstratnu specifičnost za metilmalonil. Da bi se generisalo pet konjugovanih dvogubih veza u ovom regionu potrebno je da sva tri preostala modula budu β tipa, dva sa supstratnom specifičnošću za malonil i poslednji sa supstratnom specifičnošću za metilmalonil. Naravno, treba uzeti u obzir i mogućnost da se finalni izgled okosnice dobija nakon posttranslacione obrade enzimima koji pripadaju klasteru, a ne kodiraju za samu PKS okosnicu (*eng.* tailoring enzyme).

5. Diskusija

Sekundarni metaboliti aktinomiceta, a pre svega pripadnika roda *Streptomyces*, su tradicionalno jedan od glavnih izvora novih terapeutika pre svega zbog, za modernu medicinu, duge istorije otkrića različitih antibiotika poreklom iz ovih bakterija (Wallace, Rhymer et al. 1945; Carter, Gottlieb et al. 1948; Singh and Mitchison 1954; Umezawa, Ueda et al. 1957). Vrste roda *Streptomyces* su veoma zastupljene u uzorcima zemljišta i akvatičnih sedimenata i lako se izoluju na jednostavnim laboratorijskim medijumima (Kieser, Bibb et al. 2000). Iako se krajem prošlog veka izolacija prirodnih produkata iz sredinskih uzoraka smatrala zastarelim pristupom u odnosu na mogućnosti generisanja ogromnih hemijskih biblioteka potencijalno bioaktivnih molekula (Ghosh, Nie et al. 2006), ovo poglavlje daleko je od zatvorenog (Baltz 2008a). Nova tehnička rešenja učinila su čak i naj nepristupačnije lokalitete kao što su sedimenti okeanskog dna, vodena prostranstva ispod polarnih kapa ili visoki slojevi atmosfere dostupnim za uzorkovanje, te je broj okarakterisanih vrsta mikroorganizama, pa i streptomiceta, koje nastanjuju ekstemna staništa svakim danom sve veći (Pathom-Aree, Stach et al. 2006; Tan, Robinson et al. 2006; Mwirichia, Muigai et al. 2010). Stalno rastući broj dostupnih kompletnih genoma streptomiceta omogućio je razvoj metoda za usmereno pretraživanje u cilju pronalaženja novih klastera za nepoznate sekundrane metabolite (Nett, Ikeda et al. 2009). Samo broj novih antibiotika koje bi mogle da sintetišu bakterije u okviru roda *Streptomyces* procenjen je na oko sto hiljada (Watve, Tickoo et al. 2001).

Gotovo da nema biološki aktivne grupe prirodnih jedinjenja, a da nije otkriven i proizvođač iz roda *Streptomyces* - osim već pomenutih antibiotika tu su i jedinjenja sa antigljivičnim, antiparazitskim, antitumorskim, imunosupresorskim i insekticidnim delovanjem. Osim značaja u medicini, veterini, poljoprivredi, sekundarni metaboliti aktinomiceta kao što su pigmenti postaju sve značajniji i u prehrambenoj, tekstilnoj (Charkoudian, Fitzgerald et al. 2010), pa i kozmetičkoj industriji (Stafsnes, Josefsen et al. 2010).

5.1. Pretraživanje kolekcije aktinomiceta

Cilj ovog rada bio je izolacija i karakterizacija biološki aktivnih jedinjenja streptomiceta. Kolekcija zemljišnih izolata Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, IMGGI, je poslužila kao izvor sojeva, a izbor kriterijuma za selekciju sojeva koji će biti pregledani za proizvodnju sekundarnih metabolita bio je zasnovan na pretpostavci da su oni validni pokazatelji njihove produkcije, što se pokazalo opravdanim pristupom, jer je od 17 selektovanih sojeva 3 izabrano za detaljniju karakterizaciju skrativši na taj način značajno vreme koje bi bilo utrošeno na ne kritički pregled izuzetno velikog broja izolata.

5.1.1. Kriterijumi odabira izolata iz kolekcije aktinomiceta

Sojevi čiji produkti deluju na mutirani soj *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 su mogući proizvođači jedinjenja sa imunosupresivnim delovanjem kao što je FK506 koji deluje na kalcineurin inhibirajući signalni put za aktivaciju T-limfocita (Dumont 2000). Na tržištu ne postoji veliki broj imunosupresora sa takvim mehanizmom delovanja, a njihova složena makrolidna hemijska struktura čini ih nepogodnim za hemijsku sintezu ili modifikaciju, te je otkrivanje novih imunosupresivnih jedinjenja ovog tipa bio jedan od ciljeva ove, kao i ranijih studija (Savić 2004). Delovanje na *S. cerevisiae* FAV20 bio je polazni kriterijum na osnovu koga su za testiranje i dalji rad odabrani sojevi MSD12, MSD13, MSD15, MSG12, MSG13, NP10, NP11, NP13, MS407 i MS405, okarakterisan sada kao *Streptomyces durmitorensis* MS405^T sp. nov (Savic, Bratic et al. 2007).

Kao drugi kriterijum za odabir sojeva uzeto je prisustvo gena za poliketid sintaze tipa I (PKS I). Prisustvo PKS I pokazano je PCR pristupom korišćenjem degenerisanih prajmera MAK1 i MAK3 (Savic and Vasiljevic 2006) kod sojeva NP13 i *S. durmitorensis* MS405^T, što je značilo da ovi sojevi imaju potencijal sinteze bioaktivnog molekula poliketidnog tipa. Potrebno je dodati da samo prisustvo genske sekvence za sintezu sekundarnog metabolita ne znači nužno i prisustvo produkta. Sekvenciranje genoma streptomiceta otkrilo je više PKS klastera koji se ne eksprimiraju u svakom od sekvenciranih genoma (Baltz 2008a). Ovakvi kriptični klasteri mogu biti meta genetičke

manipulacije kojom bi se oni iz ne aktivnog stanja preveli u aktivno (Zazopoulos, Huang et al. 2003). Takođe, kod streptomiceta prisustvo biosintetskog puta sekundarnog metabolizma i odsustvo sinteze produkta može značiti da nisu pronadjeni uslovi gajenja pri kome bi se dati produkt proizvodio u dovoljnoj količini da bi bio detektovan, što se jasno može videti iz rezultata optimizacije medijuma za sojeve *Streptomyces* sp. JS520 i *S. durmitorensis* MS405, gde u neadekvatnim uslovima kultivacije (TSB medijum u prvom i GYM medijum u drugom slučaju) nema ni naznaka proizvodnje njihovih najzastupljenijih sekundarnih metabolita – undecilprodigiozina i didehidroroflamikoina (pogledajte 4.7.1. i 4.7.2.).

Sekundarni metaboliti streptomiceta mogu po svojoj strukturi biti ciklična i policiklična jedinjenja sa više kondenzovanih dvogubih veza što im daje osobine hromofore (Walker and Hawkins 1952). Poznati su mnogi obojeni sekundarni metaboliti streptomiceta kao što su plavi antibiotik aktinorodin i crveni prodiginozin kod *S. coelicolor* A3(2) (Wright and Hopwood 1976; Rudd and Hopwood 1980) ili žuti metaboliti sa antibiotskim delovanjem kod različitih vrsta *Streptomyces* (Selvameenal, Radhakrishnan et al. 2009; Lee, Han et al. 2012). Te je pigmentacija bio treći kriterijum, na osnovu koga su izabrani sojevi JS497, JS520, MS7, MS10, NP2, NP12 i NP60.

5.1.2. Kriterijumi za selektovanje odabranih izolata

Produkcija sekundarnih metabolita praćena je u JS i MSY medijumu preko apsorpcionih spektara etilacetatnih ekstrakata alikvota kultura (*eng.* crude extract, CRE) u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra (UV/Vis). Ovaj parametar je dobar kriterijum u odabiru sekundarnih metabolita jer mnogi bioaktivni molekuli poseduju hromofore. Na ovaj način se na primer mogu pretražiti CRE kultura na prisustvo polienskih antibiotika jer oni daju vrlo karakterističan troprsti UV/Vis profil (Hamilton-Miller 1973) sa pikovima čiji maksimumi apsorpcije zavise od broja konjugovanih dvogubih veza. U zasićenim vezama elektroni su čvrsto vezani i ova organska jedinjenja apsorbiraju UV svetlost vrlo kratkih talasnih dužina, dok prisustvo nezasićene veze kao što je dvoguba čiji su elektroni slabije vezani pomera opseg apsorpcije ka većim talasnim dužinama (Walker and Hawkins 1952), što se naziva batohromni efekat. Konjugovanje dvogubih veza aditivno povećava batohromni efekat i ako je ovaj

pomeraj dovoljno velik, organska jedinjenja počinju da apsorbiraju u vidljivom delu spektra. Tako su trieni (polieni sa tri konjugovane dvogube veze) jako blede žuti, tetraeni kao nistatin, rimocidin i pimaricin su svetlo žuti, pentaeni kao filipin žuti, a heptaeni kao amfotericin B intenzivno žuti, skoro narandžasti. Tako se na osnovu UV/Vis spektra polieni mogu ne samo detektovati, već i klasifikovati (Hamilton-Miller 1973). Treba naglasiti da prisustvo susednih hromofora u ovim složenim sekundarnim metabolitima menja karakterističan spektar poliena, pa je primećeno da konjugacija polienske hromofore sa keto grupom kao kod pentaena flavomikoina (Schlegel and Thrum 1971) ili heksaena dermostatina (Narasimhachari and Swami 1970) rezultuje u apsorpcionom spektru sa dva pika koji su pomereni ka višim talasnim dužinama nego što bi se očekivalo za samu poliensku grupu (Hamilton-Miller 1973).

I dinamika proizvodnje sekundarnih metabolita je važan je biotehnoški parametar jer kraće vreme fermentacije znači veću ekonomsku isplativost biotehnoškog procesa. Duga fermentacija sa kolebljivom stopom proizvodnje bioaktivnog jedinjenja i skupim komponentama medijuma udaljava produkt od njegove moguće tržišne primene. Praćenje UV/Vis profila CRE omogućilo nam je i preliminarno praćenje pojave sekundarnih metabolita u kulturi od trenutka inokulacije. Apsorpcioni profili CRE nekoliko ispitivanih sojeva ukazivali su na prisustvo hromofora. Odabrani UV/Vis spektri kultura i tabela sporulacije sojeva na različitim medijumima dati su u Prilogu II.

Nakon 15 dana fermentacije urađena je ukupna ekstrakcija i određena preliminarna biološka aktivnost CRE (Tabela 4.). CRE kultura su testirani na soju *S. cerevisiae* (FAV20) i sojevima *Escherichia coli* (ATCC25922), *Saphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857), standardnim laboratorijskim sojevima koji predstavljaju bakterijske vrste u veoma bliskom kontaktu sa čovekom s obzirom da su Gram-negativna bakterija *E. coli* i Gram-pozitivni *B. subtilis* predstavnici intestinalne mikroflore (Eckburg, Bik et al. 2005), a da se *S. aureus* često nalazi prisutan u mikroflori kože i nazalnih puteva gde može dovesti do lakših i/ili težih infekcija (Kluytmans, van Belkum et al. 1997). Osim toga pojava meticilin-rezistentnih sojeva *S. aureus* (MRSA) koji su postali rezistentni na većinu antibiotika u širokoj upotrebi (β -laktamskih antibiotika i cefalosporina) predstavlja jedan od važnijih zdravstvenih problema današnjice kada su bakterijske infekcije u pitanju (David and Daum 2010).

Pri daljem proučavanju bioaktivnosti prečišćenih produkata finalno izabranih sojeva spektar mikroorganizama je proširen na sojeve roda *Candida* i još neke Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, tako da je obuhvatao sojeve *S. cerevisiae* FAS20 (Ludwig 1991) i *S. cerevisiae* FAV20, *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 379), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Candida albicans je komensalni mikroorganizam koji ulazi u sastav normalne crevne flore kod čoveka. U isto vreme može uzrokovati oportunističke infekcije sluzokože koje se efikasno tretiraju dostupnim antimikoticima od kojih su neki od najpozantijih i najduže korišćenih upravo polienski makrolidi, produkti bakterija roda *Streptomyces*, kao što su nistatin i amfotericin B (Lampen 1969; Aszalos, Bax et al. 1985). S druge strane, za sistemske infekcije koje ugrožavaju život kod imunokompromitovanih pacijenata postoji malo primenljivih terapeutika, pre svega zbog njihove visoke toksičnosti (Heidemann, Gerkens et al. 1983; Cohen 1998; Zager 2000). Sojevi roda *Candida* mogu formirati biofilmove na površini medicinskih implanta i biti uzrok nozokomijanih infekcija pa predstavljaju sve značajniji faktor opšte zdravstvene zaštite. *Micrococcus luteus* je Gram-pozitivna saprofitska bakterija koje je rasprostranjena u zemljištu, vazduhu i vodama, deo je mikroflore kože kod sisara, ali može kolonizovati i sluzokože gornjih respiratornih puteva. *Enterococcus faecalis* je Gram-pozitivna komensalska vrsta koja je takođe deo gastrointestinalne mikroflore ljudi i, kao i bakterije roda *Bacillus*, služi kao probiotski dodatak ljudskoj ishrani (Foulque Moreno, Sarantinopoulos et al. 2006). Ipak, ovaj soj može biti uzrok smrtonosnih nozokomijalnih infekcija (Vebo, Snipen et al. 2009). *E. faecalis* je karakteristična po visokom nivou rezistencije na većinu antibiotika u širokoj upotrebi – aminoglikozide, semisintetske peniciline, cefalosporine, a sve češće i na vankomicin (Uttley, Collins et al. 1988). *Klebsiella pneumoniae* je Gram-negativna bakterija koja je deo normalne gastrointestinalne i mikroflore kože. Takođe je oportuni patogen, a poslednjih godina, postala je važan patogen nosokomijalnih infekcija (Podschun and Ullman 1998) stičući sve više faktora rezistencije na antibiotike (Brun-Buisson, Legrand et al. 1987). *Pseudomonas aeruginosa* je Gram-negativna bakterija koja se može naći u zemljištu, vodama, čini deo prirodne mikroflore kože i može da kolonizuje

mnoga prirodna i veštačka staništa. Oportuni je patogen i izazva bolesti ljudi i životinja uglavnom kolonizujući oštećena tkiva ili jedinke sa smanjenim imunitetom izazivajući inflamaciju i sepsu (Lyczak, Cannon et al. 2000). S obzirom da može da kolonizuje većinu staništa često se nalazi na medicinskoj opremi i implantima izazivajući infekcije. Nekoliko studija ukazuje na povećanje rezistencije na antibiotike i kod kliničkih izolata ove vrste (Van Eldere 2003). U svetlu porasta antibiotskih rezistencija kod oportunih patogena korisno je testirati upravo ovakve vrste u toku potrage za novim bioaktivnim molekulima.

Na osnovu tri kriterijuma - dinamike proizvodnje, UV/Vis profila i biološke aktivnosti izabrani su sojevi **NP10** i **JS520** za dalje proučavanje.

5.2. Izolat *Streptomyces* sp. NP10

5.2.1. Karakterizacija izolata NP10

Parcijalna sekvenca 16S rDNK soja NP10 od 1224 nukleotida deponovana u bazi podataka GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod pristupnim brojem JQ288108 poređenjem sa bazom podataka ribozomalnih DNK (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) i nukleotidnom kolekcijom NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pokazala je da soj NP10 pripada rodu *Streptomyces*, sa najvećom verovatnoćom poklapanja sekvence (99,7%) sa *Streptomyces badius* ((T) GenBank AY999783; NRRL B-2567; CSSP536 i GenBank AB184114; NBRC 12745;) i *S. rubiginosohelvolus* (T); (GenBank AB184240; NBRC 12912).

Prema ranoj klasifikaciji Pridama i saradnika (Pridham 1958) *S. badius* je prema boji spora svrstan u "olive-buff" maslinasto-smeđu seriju. U toku kultivacije u našoj laboratoriji izolat NP10 dao je na svim medijumima spore bele boje, uključujući i TO medijum koji su koristili i ovi autori. *S. badius* raste na 5% NaCl, a kao izvore ugljenika može da koristi glukozu, a ne koristi manitol, fruktozu i ksilozu (Wink 2009), dok soj NP10 raste na 9% NaCl i može da koristi sva četiri navedena izvora ugljenika. *S. badius* je poznat kao vrsta koja razlaže lignin (Barder and Crawford 1981; Giroux, Vidal et al.

1988), svojstvo koje nije testirano kod soja NP10. Soj *S. rubiginosohelvolus* (Pridham 1958) svrstan je takođe u “olive-buff” smeđu seriju. Raste na 5% NaCl, a kao izvore ugljenika može da koristi glukozu, manitol, fruktozu, a ne koristi i ksilozu (Wink 2009). Za neke od sojeva *S. rubiginosohelvolus* opisano je da proizvode antitumorski agens rubomicin (Lapchinskaia, Saburova et al. 1975). Dakle, bez obzira na visoku homologiju 16S rDNK sekvenci, velika je verovatnoća da je izolat NP10 nov soj.

5.2.2. Bioaktivna jedinjenja soja *Streptomyces sp.* NP10

Nakon prečišćavanja CRE kulture soja *Streptomyces sp.* NP10 najzastupljenije su bile dve frakcije, F1 (30% CRE) i F3 (12% CRE). F1, glavni produkt NP10, je smeša izoalkanskih kiselina sa najvećim udelom izopalmitinske kiseline koja zbog nedostatka hromofore ne doprinosi apsorpcionom profilu CRE NP10, te se njeno prisustvo u kulturi ne može pratiti ovom metodom. Drugi produkti soja NP10 označavan kao frakcija F3 jesu ciklični dipeptidi, pretežno ciklo-Pro-Val, ciklo-Pro-Ile i ciklo-Pro-Ala koji bi mogli biti odgovorni za apsorpcioni pik na 280 nm zbog prisustva bliskih keto grupa (Slika 14).

5.2.2.1. Izopalmitinska kiselina

Izopalmitinska kiselina (14-metilpentadekanska kiselina) je glavni produkt soja NP10. To je zasićena kiselina račvastog niza, hemijske formule $C_{16}H_{32}O_2$, gde se metil grupa nalazi na predposlednjem C-atomu. Sintetiše je sintaza kiselina račvastog niza (eng. Branched-Chain Fatty Acid Synthetase, BFAS) od prekursorskog molekula izobutiril-CoA na koga se kondenzacijom nadodaje još 6 malonilnih gradivnih blokova (Kaneda 1991). Prvi korak elongacije kod bakterijskih FAS (FAS II) katalizovan je od strane enzima 3-ketoacil-acil ACP sintaze III (KAS III). Ovaj enzim, koji kodira *fabH* gen katalizuje dekarboksilativnu kondenzaciju između starter acil-CoA, u slučaju sinteze masnih kiselina račvastog niza izobutiril-CoA, i malonil-ACP (Lai and Cronan 2003). Predpostavlja se da je supstratna specifičnost KAS III glavna determinanta u tome koja će vrsta masnih kiselina biti sintetisana – ravnog niza ili račvastog (Han, Lobo et al. 1998; Choi, Heath et al. 2000). Kiseline račvastog niza karakteristične su za bakterije kod kojih se nalaze u membranama povećavajući njihovu fluidnost. Udeo kiselina račvastog niza u ćelijskoj membrani bakterija je specifičan za vrstu ali i varira

od uslova sredine (Kaneda 1973; Kaneda 1991), te se povećavnje fluidnosti membrane smatra adaptivnim odgovorom bakterijske ćelije na promene uslova spoljašnje sredine. Prisustvo kiselina račvastog niza u membrani je neophodno za ćelijski rast i za neke vrste je određena donja granica zastupljenosti kiselina račvastog niza u membrani ispod koje rast i preživljavanje bakterije nisu mogući (Kaneda 1973). Uloga, regulacija i zastupljenost izokiselina ispitivana je uglavnom kod bakterija roda *Bacillus* (Kaneda, Smith et al. 1983). Svi navedeni podaci odnose se na procentnu zastupljenost kiselina račvastog niza u ćelijskoj membrani i u literaturi ne postoje podaci vezani za njihovu akumulaciju i apsolutnu količinu u bakterijama. Soj *Streptomyces* sp. NP10 pokazuje visoku produkciju izokiselina koja ne može biti pripisana samo membranskom poreklu, tim pre što ovaj soj u produkcionom MSY medijumu ne postiže visoku biomasu (Slika 11.), te možemo sa velikom sigurnošću da tvrdimo da soj *Streptomyces* sp. NP10 akumulira izokiseline sa najvećim udelom izopalmitinske kiseline. Takođe, skoro da ne postoje podaci vezani za izokiseline u eukariotskoj, a pre svega sisarskoj ćeliji, možda s toga što ih eukariotske ćelije ne sintetišu već mogu doći do njih samo putem ishrane (Harwood and Weselak 2012). Nema takođe literaturnih podataka o delovanju izokiselina na ćelije u kulturi. U ovoj studiji je prvi put u pokazano da izopalmitinska kiselina, odnosno smeša izokselina, ima neki efekat na ćelije u kulturi – u malim koncentracijama stimulatívni, u velikim citotoksični (Poglavlja 5.4.1.1. i 5.4.1.2.). Postojale su spekulacije da fluidnost membrane i kod eukariota utiče na ćelijske funkcije (Helmreich 2003), pa bi u tom svetlu mogli da se posmatraju efekti izopalmitinske kiseline na HTR-8/Svneo ćelije pri različitim koncentracijama. Nema literaturnih podataka da li izokiseline u visokim koncentracijama utiču na integritet ćelijske membrane eukariota kao i da li se putem internalizacije membrana ugrađuju u unutrašnje membrane i narušavaju njihov integritet te dovode do apoptoze i smrti ćelija. Slabo antibiotsko delovanje izokiselina je očekivano, s obzirom da je pokazano da one pomažu u preživljavanju stresa kod bakterija (Kaneda 1991). Sinteza izopalmitinske kiseline počinje od startnog gradivnog bloka izobutirila, koji je derivat valina te bi s toga egzogeno dodavanje L-Val moglo da bude način povećanja prinosa izopalmitinske kiseline (Grafe, Roth et al. 1982). Takođe bi bilo značajno klonirati i sekvencirati *fabH* gen kod soja *Streptomyces* sp. NP10 imajući u vidu ulogu koju ima KAS III, proizvod *fabH*, na izbor i započinjanje sinteze kiselina račvastog niza (Choi, Heath et al. 2000),

kao i ispitati njegovu regulaciju obzirom da je ovaj soj u stanju da produkuje velike količine masnih kiselina račvastog lanca. Uvid u sekvencu KAS III i njegovu regulaciju poslužio bi kao polazna tačka genetske modifikacije u cilju rasvetljavanja pojave akumulacije masnih kiselina račvastog lanca i daljeg povećanja njihovog prinosa (Smirnova and Reynolds 2001; Li, Florova et al. 2005).

5.2.2.2. Ciklični dipeptidi

Soj *Streptomyces* sp. NP10 kao manjinsku frakciju (F3, 12% CRE) produkuje smešu cikličnih dipeptida (diketopiperazina) koja se sastoji prevashodno od ciklo-Pro-Val, molekulske formule $C_{10}H_{16}N_2O_2$, ciklo-Pro-Ile molekulske formule $C_{11}H_{18}N_2O_2$ i ciklo-Pro-Ala molekulske formule $C_8H_{12}N_2O_2$ (Slika 15).

Ciklični dipeptidi (CDP) su najmanji ciklični peptidi. Po svojoj strukturi pripadaju klasi diketopiperazina, cikličnih organskih jedinjenja koja se sastoje od dve aminokiseline povezane peptidnom vezom da formiraju laktam. S obzirom na njihovu jednostavnu građu, struktura diketopiperazina je već dugo poznata (Corey 1938). Diketopiperazine sintetišu bakterije, gljive, kvasaci, lišajevi, česti su kod biljaka i životinja (Prasad 1995) uključujući i sisare i smatraju se sekundarnim metabolitima (Martins and Carvalho 2007). Nastaju kao sporedni produkt tokom sinteze proteina, kao i pri ne enzimatskoj degradaciji peptida. CDP imaju važnu ulogu kao modulatori ukusa hrane. Detektovani su u prženoj kafi i kakaou, pečenju, hlebu, sirevima i javljaju se kao produkti degradacije peptida tokom obrade hrane (Prasad 2005). Endogeno, generišu ih neke proteaze kao što su dipeptidil peptidaze koje odsecaju terminalne delove proteina dajući dipeptide koji zatim spontano ciklizuju dajući diketopiperazine (Martins and Carvalho 2007). Obično su prolin i N-alkilovana aminokiselina uključeni u spontanu ciklizaciju, reakciju katalizovanu slabim kiselinama kao što je sirćetna kiselina.

I prirodni i sintetički diketopiperazini imaju široko biološko dejstvo kao antitumorski (Nicholson, Lloyd et al. 2006), antivirusni (Sinha, Srivastava et al. 2004), antifungalni (Houston, Synstad et al. 2004) i antibakterijski (Kwon, Park et al. 2000) agensi. Novija istraživanja pokazuju da CDP mogu učestvovati u međucelijskoj komunikaciji i biti molekuli kvorum sensinga (*eng.* quorum sensing) kod vrsta *Vibrio* (Klose 2006). Za ciklo-His-Pro je pokazano da je endogen sisarima (Prasad 1995); široko rasprostranjen u telu i telesnim tečnostima, strukturno i ontološki je povezan sa

tireotropin-oslobađajućim hormonom (Prasad, Jayaraman et al. 1987), a u mozgu raznih životinjskih vrsta uključujući i čoveka podražava mnoga farmakološka dejstva dopamina (Prasad 2001). Jedan od najpoznatijih CDP je fitotoksin makulozin (ciklo-Tyr-Pro) koji je u upotrebi kao herbicid (Stierle, Cardellina et al. 1985) i koji sintetišu neke biljke. Za makulozin je pokazano da se vezuje za ćelijsku membranu (Lopes, Fedorov et al. 2004).

Struktura diketopierazina je stabilna, otporni su na proteolizu, a njihove bočne grupe deluju mimetički i lako se supstituišu. Diketopiperazini deluju kao katalizatori u enantioselektivnim reakcijama, služe kao nosač u organskim sintezama, kao donori i akceptori grupa pri formiranju vodoničnih veza (Horton, Bourne et al. 2000). Njihova rigidna struktura i hiralnost kao i raznovrsnost bočnih lanaca čini ih pogodnom osnovom za dizajniranje novih supstanci (Wang, Liang et al. 2002). Zbog svega ovoga postoji veliko interesovanje za diketopiperazine kao izvore novih struktura u kombinatorijalnoj hemiji i racionalnom dizajniranju novih terapeutika (Horton, Bourne et al. 2000).

Bicikličnih peptidi sintetisanih od strane *Streptomyces* sp. NP10, su detektovani u prženoj kafi (Ginz and Engelhardt 2000), dok je ciklo-Pro-Val detektovan i kao proizvod nekih gljiva (Kodaira 1961) proizvođača insekticidnih CDP i bakterija (Yang, Tan et al. 2002). Ciklo-Pro-Val poznat je i kao makulozin 5 <http://www.vvchem.com/sell/cas:2854-40-2,1750442.html>. Ciklo-Pro-Ala je detektovan kao proizvod morskog sunđera *Haliclona* sp. (Li, Wang et al. 2011). Ciklo-Pro-Ile detektovan je kao proizvod bakterija roda *Bacillus* (Fandi, Massadeh et al. 2012). CDP iz F3 nisu pokazali antimikrobnu aktivnost, osim slabog efekta na *E. faecalis*, dok su niske koncentracije ove smeše CDP (1 ng/ml i 1 µg/ml) imale stimulativan efekat na preživljavanje HTR-8/Svneo ćelija u kulturi i do 1,62 puta više u odnosu na kontrolu. Više koncentracije (1 mg/ml) dovodile su do citotoksičnog efekta kod oko 50% ćelija. U literaturi nema podataka o bioaktivnosti ovih CDP te bi bilo potrebno detaljnije proučiti uočene efekte na ćelije u kulturi proširivanjem eseja i na druge ćelijske linije.

5.3. Izolat *Streptomyces* sp. JS520

5.3.1. Karakterizacija izolata JS520

Parcijalna sekvenca 16S rDNK soja JS520 od 1319 nukleotida deponovana je u bazi podataka GenBank pod pristupnim brojem JQ288109. I ovaj izolat na osnovu 16S rDNK sekvence pripada rodu *Streptomyces*. Na osnovu pretraživanja RDP baze podataka rDNK sekvenca JS520 pokazuje najveće poklapanje (sa koeficijentom verovatnoće od 0,996) sa sojevima *S. violaceolatus* (GenBank NR027223; DSM 40438) i *S. humiferus* (GenBank NR025250; DSM43030). *S. violaceolatus* (Krassilnikov 1965) ima sivo-bele spore i produkuje tamno crveni pigment. Proizvođač je urdamicina A, tetracikličnog glikozilovanog antibiotika sa antikancerogenim dejstvom iz klase anguciklina.

5.3.2. Sekundarni metaboliti soja *Streptomyces* sp. JS520 – undecilprodigiozin

Streptomicete imaju mogućnost proizvodnje velikog broja strukturno različitih bioaktivnih sekundarnih metabolita uključujući i pigmente (Nett, Ikeda et al. 2009). Pigmentacija streptomiceta dobro je poznata i opisana u literaturi (Arai and Mikami 1972), a obojenost je dugo bila jedan od značajnih parametara za određivanje taksonomske pripadnosti unutar roda kod ovih bakterija (Antony-Babu, Stach et al. 2010). Pigmenti proizvedeni u biotehnološkom procesu imaju sve važniju ulogu u prehranbenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i proizvodnji boja jer predstavljaju alternativu hemijski sintetisanim kolorantima (Gupta, Khareb et al. 2004; Dufosse 2009). Osim prednosti “čistoće” biotehnološkog procesa proizvodnje prirodnih boja u odnosu na hemijske, neke od njih, kao one zasnovane na antrahinonu i prodigiozinu, imaju antibakterijska svojstva i mogu imati višestruku primenu i kao koloranti i kao konzervansi namirnica (Alihosseini, Ju et al. 2008).

U ovoj studiji se među izrazito pigmentisanim sojevima izdvojio soj JS520, anotiran kao *Streptomyces* sp. JS520, svojom sposobnošću da proizvodi velike količine tamno ljubičastog pigmenta. Soj je izolovan iz sedimenata uzorkovanih na teško

dostupnim terenima planine Miroč, u Rakinom ponoru, prema trenutnim podacima najdubljoj jami u Srbiji (http://www.asak.org.rs/caves/rakin/rakin_y.html). Podaci nakon LC-MS analize pokazali su da je glavni produkt soja JS520 undecilprodigiozin (UP) (Slika 18.), dok je sporedni produkt njegov oksidativno ciklizovani derivat koji se proizvodi u relativnoj srazmeri od 1:14 u odnosu na UP. Najstariji poznati proizvođač undecilprodigiozina među streptomicetama, *S. coelicolor* A3(2) (Rudd and Hopwood 1980), takođe proizvodi UP i butilcikloheptilprodigiozin, ali se oni obično javljaju u srazmeri 2:1 (Tsao, Rudd et al. 1985; Harris, Williamson et al. 2004). Za soj JS520 je karakteristično da vrlo rano, već nakon jednog dana vegetativnog rasta, počinje sa proizvodnjom pigmenta (Slika 29.) dok većina pripadnika roda *Streptomyces* sintezu sekundarnih metabolita počinje nakon faze vegetativnog rasta – ulaskom u stacionarnu fazu kod kultura u tečnom medijumu ili na početku morfološke diferencijacije kod kultura na čvrstim podlogama. Tada, usled smanjivanja količine nutrijenata, kod roda *Streptomyces* dolazi do stimulacije procesa morfološke diferencijacije i sinteze sekundarnih metabolita “otključavanjem” gena sekundarnog metabolizma (Bibb 2005). U signalnoj kaskadi od detekcije nutritivnog statusa okruženja do početka produkcije antibiotika takođe učestvuje i N-acetil glukozamin (NAG) koji se oslobađa iz ćelijskog zida prilikom degradacije vegetativnog micelijma kada ćelija ireverzibilno kreće putem sporulacije i završava svoj životni ciklus i utiče na globalni regulator DasR (Rigali, Nothhaft et al. 2006) koji kao represor kontroliše regulatore specifične za pojedine procese i puteve, kao što je *red* klaster, tokom otpočinjanja morfološke diferencijacije i prelaska na sekundarni metabolizam (Rigali, Titgemeyer et al. 2008).

Kod *Streptomyces coelicolor* A3(2) crveni pigment počinje da se sintetiše kasno i akumulira se u stacionarnoj fazi (Feitelson and Hopwood 1985; Hobbs, Frazer et al. 1990). Pokazano je da povećanje ćelijske koncentracije guanozin tetrafosfata (ppGpp), alarmona koji predstavlja čvorište u kako pozitivnoj, tako i u negativnoj regulaciji mnogih procesa kod bakterija, reguliše sintezu antibiotika kod ovog soja (Hesketh, Chen et al. 2007). Noviji podaci o globalnoj genskoj ekspresiji u kulturama sa strogo kontrolisanim uslovima dobijeni korišćenjem prilagođenog genskog čipa (Affymetrix genechip) potvrdili su da transkripcija gena *red* klastera odgovornog za sintezu UP kod *S. coelicolor* prati klasični metabolički prelaz na sekundarni metabolizam (Nieselt, Battke et al. 2010). Kod *Streptomyces sp.* JS520 pigment počinje da se sintetiše rano i

prati krivu rasta kulture (Slika 29.) do stacionarne faze. Prednost je da se ovaj produkt lako može detektovati vizuelno i kvantifikovati spektrofotometrijski. U toku inicijalne kultivacije soja JS520 primećeno je da kod CRE maksimum apsorpcije na 533 nm sa 2,5 koliko iznosi sedmog dana kultivacije pada na 0,12 trinaestog dana kultivacije. Sudbina razgrađenog UP u staroj kulturi soja JS520 nije dalje istraživana.

Sredinski faktori – temperatura, pH i stepen agitacije od koga zavisi količina kiseonika dostupnog u medijumu deluju na produkciju sekundarnih metabolita kod streptomiceta (James, Edwards et al. 1991; Demain, Davies et al. 1999), pa i na rast i nivo produkcije UP kod *Streptomyces* sp. JS520. Proizvodnja UP kod soja JS520 inhibirana je na temperaturama višim od 37°C i nižim od 20°C (Slika 30.), što je u skladu sa podacima dobijenim za proizvodnju prodigiozina kod sojeva *S. marcescens* (Giri, Anandkumar et al. 2004; Wei and Chen 2005) i *Vibrio* sp. DSM 14379 (Staric, Danevcic et al. 2010). Opseg pH medijuma u kome soj JS520 proizvodi UP kreće se od 4 do 9, sa maksimumom produkcije na pH između 7 i 8 (Slika 31.), dok *S. marcescens* SS-1 proizvodi prodigiozin u nešto užem opsegu pH (od 5 do 9), sa jasno izraženim optimumom proizvodnje na pH 8 (Wei, Yu et al. 2005). Količina rasvorenog kiseonika u medijumu pokazala se od ključnog značaja za proizvodnju UP kod soja JS520 (Slika 32.). Maksimum produkcije postignut je pri stopi agitacije od 150 obrt/min i dalje povećanje nema uticaja na produkciju UP, za razliku od soja *S. marcescens* kod kog optimalna stopa agitacije iznosi 200 obrt/min (Wei, Yu et al. 2005), a dalje povećanje stope agitacije dovode do inhibicije produkcije prodigiozina (Chang, Chen et al. 2011).

U cilju optimizacije medijuma za proizvodnju UP testiran je niz medijuma uključujući NB, TSB, i PSB. PSB medijum obezbeđuje veoma visoku produkciju UP kod *S. marcescens* (Giri, Anandkumar et al. 2004), a sličan efekat ima i na produkciju kod soja JS520 (Tabela 11.). Sa druge strane, definisani medijumi koji se rutinski koriste za izučavanje streptomiceta kao što su mM, HMM i R2YE uslovljavali su nizak prinos biomase, pa samim tim i niske ukupne prinose UP. Ipak, stopa produkcije UP po gramu suve mase ćelija bila je najviša u definisanom HMM medijumu (Tabela 11.) i iznosila je 14,85 što je 1,78 puta više od stope proizvodnje koju je pokazao *S. coelicolor* A3(2) u tom istom medijumu (Hobbs, Frazer et al. 1990). U MSY medijumu zabeležen je najveći nivo produkcije UP kod JS520 i ovaj medijum je izabran za dalju optimizaciju proizvodnje (Tabela 11.). Zamena izvora uljenika pokazala je da je

akumulacija biomase slična u toku rasta na fruktozi i glukozi i oko 7 puta manja nego na maltozi. U slučaju rasta na glukozi nije detektovana proizvodnja UP (Tabela 11.) što ukazuje na inhibitorni efekat glukoze na produkciju UP kod soja JS520. Kod *S. marcescens* produkcija prodigiozina je negativno regulisana glukozom posredstvom cikličnog 3' 5'-adenozinmonofosfata (cAMP) (Clements-Jewery 1976; Kalivoda, Stella et al. 2010), ali negativni efekat glukoze na produkciju UP kod streptomiceta nije do sada zabeležen. Glicerol, masne kiseline i biljna ulja smatraju se dobrim izvorima ugljenika za isplativu biotehnošku produkciju. Ipak, u slučaju soja JS520 medijum sa glicerolom nije dao dobar prinos biomase niti produkciju UP. U slučaju ulja koštica grožđa prinos biomase bio je visok, ali je nivo produkcije UP bio nizak (Tabela 11.). Kod *S. marcescens* SMAR (Wei and Chen 2005) upotreba biljnih ulja obezbeđivala je povećanu produkciju prodigiozina i sekreciju seravetina, ali kod izolata *Streptomyces* sp. JS520 to se nije moglo primeniti.

Oduzimanje različitih komponenti MSY medijuma ukazalo je na važnost odnosa ugljenika i azota u medijumu za produkciju UP kod soja JS520 (Tabela 11.). Odnos ugljenika i azota utiče na produkciju prodigiozina u *S. marcescens* dok je triptofan inhibira (Wei and Chen 2005; Wei, Yu et al. 2005). Ovo bi mogao da bude razlog zbog koga UP nije detektovan prilikom gajenja *Streptomyces* sp. JS520 u TSB medijumu (Tabela 11.). Dodavanje aminokiselina (0,3%, w/v) u MSY medijum imalo je negativan ili nikakav efekat na prinos UP, osim u slučaju aminokiselina prekursora UP (L-proline, L-glycine and L-serine) koje su dodavane u smeši (0.1%, w/v svake) (Tabela 11.). Razlog ovome mogao bi da leži u drugačijem korišćenju raspoloživih egzogenih izvora i endogenih rezervi aminokiselina u procesima sekundarnog metabolizma i sinteze proteina (Polsinelli, Albertini et al. 1965; Bell, Grunwald et al. 2008; Frappier, Kaufman et al. 2008). Istražujući interakcije puteva primarnog i sekundarnog metabolizma kod streptomiceta Hud i saradnici utvrdili su povećanje produkcije UP kod *S. coelicolor* A3(2) mutanta za transport prekursora prolina, što navodi na zaključak da je sinteza UP regulisana ukupnim fiziološkim stanjem ćelije (Schobesberger, Baltzer et al. 2008). Podaci dobijeni u ovoj studiji u skladu su sa postulatom o kompleksnoj regulaciji sekundarnog metabolizma koja je dobro proučena kod roda *Streptomyces* i nalazi se pod kontrolom kako globalnih tako i specifičnih regulatora koji interaguju sa različitim signalima (Baltzer 2008; Maltais, Bourbeau et al. 2008). Iako se za fiziološku

kontrolu produkcije UP kod streptomiceta zna već duže vreme ona nije dobro istražena. U ranim studijama Hobsova i saradnici izučavali su uticaj izvora azota i nivoa amonijuma i fosfata na produkciju aktinorodina i UP kod *S. coelicolor* A3(2) i utvrdili da se najviš prinos od 18 mg/l dobija u definisanom medijumu kada se natrijum nitrat koristi kao izvor azota, dok se 75 mM amonijum hlorid inhibira produkciju UP, a da sinteza i dalje postoji pri koncentracijama fosfata višim od 25 mM (Hobbs, Frazer et al. 1990). Najveći prinos UP u ovoj studiji dobijen je korišćenjem metil oleata kao suplementa MSY medijuma (Tabela 11.). Metil oleat je poznati suplement i veoma dobar izvor ugljenika za poboljšanje produkcije sekundarnih metabolita kao što su poliketidi (Frykman, Tsuruta et al. 2005; Arslanian 2008). Nedavno su publikovani rezultati optimizacije proizvodnje UP u *S. coelicolor* gde je porast izazvan dodavanjem mrtvih ćelija *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* u bioreaktor, sa maksimumom prinosa od 2,8 mg/l (Luti and Mavituna 2011). Prinos UP od 138 mg/l dobijen iz kultura soja *Streptomyces sp.* JS520 viši je od poznatog za bilo koju streptomicetu ili uopšte aktinomicetu u dosadašnjoj literaturi, što ukazuje na veliki potencijal ovog soja u biotehnoškoj proizvodnji UP.

Pokazano je da sredinski faktori i suplementacija medijuma imaju uticaja na produkciju UP (Cang, Sanada et al. 2000; Giri, Anandkumar et al. 2004), ipak, malo se zna o njegovoj ekofiziološkoj ulozi. Haddix i saradnici sugerišu da prodigiozin kod *S. marcescens* služi kao negativni regulator prekomerne produkcije ćelijske energije smanjujući produkciju adenozin trifosfata (ATP). Na taj način bi se smanjila produkcija slobodnih kiseoničnih radikala (ROS, *eng.* reactive oxigen species) i ćelija zaštitila od njihovog dejstva (Haddix, Jones et al. 2008). Tokom složenog životnog ciklusa zemljišne bakterije roda *Streptomyces* trpe razne uslove ishrane i sredinskog stresa, pa bi produkcija pigmenta mogla da znači kompetitivnu prednost u okruženju (Chater 2001; Staric, Danevcic et al. 2010). Takođe, UP bi mogao da igra ulogu u regulisanom razlaganju vegetativnog micelijuma u fazi izgradnje vazdušnog micelijuma (Manteca, Claessen et al. 2007), bakterijskom pandanu procesa apoptoze čiji je značaj i uloga tek od nedavno prepoznata u bakterijskom svetu (Rice and Bayles 2003). Čini se da je produkcija antibiotika kontrolisana mehanizmom sličnim apoptozi jer većina mutanata koji ne razvijaju spore takođe ne sintetišu ni antibiotike (Bibb 2005).

Dva glavna antagonistička mehanizma su kompeticija za nutrijente i produkcija jedinjenja koja inhibiraju rast drugih organizama (Burgess, Jordan et al. 1999). Zaista smo pokazali da UP prečišćen iz JS520 kulture ima antimikrobijalnu aktivnost protiv nekoliko vrsta bakterija i dve vrste roda *Candida albicans*. Antimikrobijalne osobine prodigiozina su poznate i započeta su prva istraživanja njihove moguće primene kao antibakterijskih koloranata (Alihosseini, Ju et al. 2008). Uloga sinteze prodigiozina kod bakterija nepoznata je, ali se predpostavlja da daje prednost u preživljavanju u kompeticiji sa ostalim mikroorganizmima iz okruženja (Staric, Danevcic et al. 2010). Nove predpostavke uključuju i ulogu u zaštiti od ultraljubičastog (*eng.* ultraviolet, UV) zračenja (Boric, Danevcic et al. 2011). Utvrđeno je da je jedan od mehanizama njegove citotoksičnosti da olakšava oskidativno dvolančano prekidanje DNK u prisustvu bakra (Melvin et al. 2002). Antioksidativna svojstva UP nisu bila pokazana do sada. U eseju koji meri sposobnost datog jedinjenja da inhibira autooksidaciju linolne kiseline UP nije pokazao tako dobre rezultate kao komercijalno dostupan antioksidant α -tokoferol. Ipak, UP je bio efektan u odlaganju peroksidacije lipida (Slika 26.), moguće je s toga što može da sakuplja vodonik peroksid koji se oslobađa u procesima peroksidacije, kao što to čine ranije opisani heterociklični aromatični supstrati koji sadrže azot u prstenu pri oksidaciji vodonik peroksidom što rezultira formiranjem odgovarajućih N-oksida (Laus 2001; Robinson, McMorn et al. 2001). U cilju određivanja mogućih fizioloških uloga UP ispitivana je osetljivost ćelija soja JS520 koje proizvode pigment i onih ne pigmentisanih u seriji testova (sa vodonik peroksidom, antibioticima, UV zračenjem). Dobijeni podaci ukazuju na višestruke protektivne uloge UP (Slika 27. i 28.). Iako ove ćelije ne pokazuju vidljive razlike u proliferaciji osim produkcije pigmenta dobijeno je da H_2O_2 i nekoliko antibiotika različitih po strukturi i delovanju preferencijano suprimiraju rast ne pigmentisanih ćelija Kao jedan od visoko reaktivnih ROS H_2O_2 je sposoban da izazove veliku štetu u ćeliji. H_2O_2 je relativno stabilan molekul koji može da prolazi kroz ćelijske membrane i indukuje različite ćelijske odgovore (Bienert, Schjoerring et al. 2006). Aerobne bakterije su razvile efikasan odgovor za prikupljanje ROS koji uključuje enzime kao što su superoksid dismutaza, katalaza i drugi ne enzimatične antioksidansi (Vandenbroucke, Robbens et al. 2008). Pokazano je da bakterijski pigmenti kao melanin daju zaštitu od H_2O_2 (Keith, Killip et al. 2007; Diraviyam, Radhakrishnan et al. 2011). Od rezultata dobijenih za prečišćeni UP u eseju

sa autooksidacijom linolne kiseline i povećane rezistencije na H₂O₂ pigmentisanih ćelija može se doneti zaključak o autooksidativnoj ulozi ovog pigmenta (Slika 26. i 27a.). Osim toga, pigmentisane ćelije JS520 su bile manje osetljive na različite antibiotike (Slika 27b.). Mehanizam ove multirezistencije nije proučavan, ali je moguće da leži u smanjenju oksidativnog stresa izazvanog antibioticima. Ova pojava je nedavno uočena za azot monoksid (NO) i vodonik sulfid (H₂S) (Gusarov, Shatalin et al. 2009; Shatalin, Shatalina et al. 2011).

U ovoj studiji cilj je bio selektivno izolovanje sojeva aktinomiceta efikasnih proizvođača pigmenata. Izolovan je soj proizvođač UP iz roda *Streptomyces* i istražen je njegov potencijal u proizvodnji pigmenata. Efekat medijuma i uslova gajenja (temperature, pH, stope agitacije) istraživani su u cilju da se utvrde najpogodniji uslovi za produkciju UP. U cilju odođivanja moguće fiziološke uloge UP utvrđeno je njegovo antibakterijsko, antioksidativno i UV-protektivno delovanje. Novoizolovani *Streptomyces* sp. JS520 soj sa sposobnošću da produkuje izuzetno velike količine UP može biti dalje korišćen u biotehnoškoj svrhe nakon optimizacije bioprosesovanja. Gram-pozitivne streptomicete su bolji izbor za produkciju na velikoj skali u odnosu na trenutno glavnog proizvođača UP, soj *S. marcescens* koji je oportuni humani patogen. Soj *S. marcescens* SS-1, iako najbolji proizvođač UP, do sada nije bio korišćen u komercijalne svrhe (Wei, Yu et al. 2005). Mogući uzrok je ograničena bezbednost koja se povezana sa ovim oportunističkim humanim patogenom koji je bio uzrok brojnih epidemija i nozokomijalnih infekcija (Hejazi and Falkiner 1997; Mahlen 2011). Sa druge strane, *Streptomyces coelicolor*A3(2), najbolje izučeni Gram-pozitivni proizvođač UP proizvodi samo niske koncentracije UP (Luti and Mavituna 2011). Stoga bi bilo značajno izolovati novi proizvodni soj UP, preferencijalno iz grupe Gram-pozitivnih aktinobakterija, poznatih kao organizmi sa dobrim karakteristikama u fermentativnoj proizvodnji sekundarnih metabolita na velikoj skali (Baltz and Hosted 1996; Nett, Ikeda et al. 2009). U svetlu potencijalne komercijalne vrednosti, postoji potreba za razvojem visoko efikasnog i jeftinog procesa biotehnoškoj proizvodnje ovog jedinjenja. Antioksidativno, antimikrobijalno i UV-protektivno dejstvo mogu biti dalje korišćeni za razne dvostruke primene u tekstilnoj, farmaceutskoj i prehranbenoj industriji.

5.4. *Streptomyces durmitorensis* MS405

Streptomyces durmitorensis sp. nov. MS405^T (=DSM 41863^T =CIP 108995^T) koji je morfološki, biohemijski i filogenetski detaljno okarakterisan (Savic, Bratic et al. 2007) proizvođač je poliketidnog polienskog makrolidnog antibiotika didehidroroflamikoina (DDHR) čija je citotoksičnost pokazana na ćelijama u kulturi (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). Streptomicete su glavni proizvođači poliketida i genetika i biohemija njihove biosinteze dobro je izučena (Hopwood 1997). Polienski makrolidi sintetišu se putem niza kondenzacija jednostavnih karboksilnih gradivnih blokova od strane modularnih poliketid sintaza tipa I (PKS I), koje su organizovane u repetitivne jedinice (module) gde je svaki modul sa po nekoliko katalitičkih domena zadužen za katalizu jednog elongacionog ciklusa i dodavanja jednog gradivnog bloka na poliketidni lanac procesom sličnim sintezi masnih kiselina (Donadio and Katz 1992). Reakcija se odvija po sličnom mehanizmu između različitih PKS I: 1) Ketosintazni domen (KS) se aciluje, 2) Acil transferazni domen (AT) bira gradivni blok kao što je malonil iz malonil-CoA i prebacuje ga na protein nosač acilne grupe (*eng.* acyl carrier protein, ACP), 3) ACP koji nosi gradivni blok prilazi acilovanoj KS koja katalizuje dekarboksilativnu kondenzaciju i produžava poliketid, 4) ACP prebacuje novoformirani β -ketoacil intermedijer do enzima za obradu kao što su ketoreduktaza (KR), koja može stereoselektivno da redukuje β -keto grupu i kontroliše orijentaciju α -substituenta, dehidrataza (DH), koja katalizuje dehidraciju produkujući *trans*- α,β -dvogubu vezu i enoil reduktaza (ER), koja možeda stereoselektivno redukuje dvogubu vezu i kontroliše orijentaciju α -substituenta, 5) kod modularnih PKS I ACP prebacuje rastući poliketid na sledeći modul ili do tioesteraze (TE), domena koji se nalazi na C terminusu poliketidnog klastera ako se lanac oslobađa sa enzima. Poliketidni lanac se zatim može obraditi serijom dodatnih reakcija (Kennedy, Auclair et al. 1999). Evolucija je favorizovala razvoj ovakvih multifunkcionalnih modularnih PKS zbog toga što vezivanje svih intermedijera koji nastaju tokom sinteze poliketidnog jedinjenja za PKS subjedinice, olakšava transfer supstrata sa jednog domena na drugi ("substrate channelling") (Huang and Holden 2001). Ova jedinstvena strukturna i funkcionalna modularnost koja potiče od same genetičke organizacije daje veliki potencijal za usmerene kombinatorijalne manipulacije na DNK nivou u cilju veštačkog stvaranja novih prirodnih molekula

(„veštački prirodni molekuli“) sa izmenjenim farmakološkim osobinama (Du, Cheng et al. 2003).

5.4.1. Bioaktivna jedinjenja *Streptomyces durmitorensis* - didehidroroflamikoin

Struktura makrolidnog pentaena didehidroroflamikoina (DDHR), glavnog produkta *S. durmitorensis* nedavno je određena kao i njegova citotoksičnost prema humanim i mišijim ćelijama u kulturi (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). Ipak neki aspekti njegovog delovanja morali su biti dodatno validirani. U ovoj studiji pokazano je da DDHR ima antifungalni efekat na gljive roda *Candida* sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) od 50 µg/ml, što ne iznenađuje s obzirom da polieni po pravilu pokazuju odličnu antifungalnu aktivnost (Omura and Tanaka 1984), a nistatin i amfotericin B su polienski antimikotici koji su već godinama u kliničkoj upotrebi (Zotchev 2003). Do inhibicije rasta FK506 senzitivnog soja pekarskog kvasca FAV20 dolazi pri MIK >1 mg/ml. Antibiotički efekat DDHR je takođe slabo izražen sa MIK za sve testirane bakterije >1 mg/ml.

Pokazano je da DDHR po svojoj strukturi makrolidni pentaen koji deli strukturnu sličnost sa drugim makrolidnim polienima koji su u humanoj upotrebi kao antimikotici – nistatinom, amfotericinom B, kandicidinom i pimarinom (Zotchev 2003), a to su prisustvo hidrofobnog polienskog regiona i polarnog regiona koji se satoji od poliolskog lanca i hemiketalnog regiona. Hemiketalni region DDHR razlikuje se od konzerviranog hemiketalnog C8 regiona kod navedenih antimikotika jer ne nosi vezani amino šećer i karboksilnu grupu značajne za biološku aktivnost molekula i mogućnost uvođenja različitih modifikacija (Borowski 2000). Na osnovu srodnosti hemijske građe predpostavljeni mehanizam delovanja DDHR bio bi sličan polienskim makrolidnim antimikoticima, a ne makrolidnim imunosupresorima FK506 tipa. Polienski makrolidi formiraju struktuirane pore u obliku bureta u ćelijskoj membrani sa hidrofobnim krajem okrenutim ka membrani i hidrofilnim kanalom (Neumann, Baginski et al. 2010). Hidrofilna unutrašnjost pore omogućuje slobodni protok jona iz ćelije, prevashodno Na⁺ i K⁺, kao i drugih malih molekula vitalnih za ćeliju usled čega dolazi do ćelijske smrti (de Kruijff, Gerritsen et al. 1974; Hammond 1977).

Efekat makrolidnog imunosupresora FK506 na kvašćevu ćeliju ostvaruje se inhibiranjem kalcineurina pri čemu dolazi do akumulacije Ca^{2+} jona u citoplazmi i narušavanja jonske homeostaze. FAV20 osetljiv je na FK506 već u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/ml}$ (Skoko, Vujovic et al. 2005). Ovo je mehanizam veoma različit od onoga koji ispoljavaju makrolidni polieni te je malo verovatno da on ima udela u delovanju DDHR na mutirani soj pekarskog kvasca FAV20. S obzirom da je wt soj pekarskog kvasca FAS20 rezistentan na njegovo delovanje, moguće je da DDHR nema veliku sposobnost formiranja pora niti u kvašćevoj ćelijskoj membrani niti u tonoplastu koji se po sastavu lipida i sterola razlikuje od ćelijske membrane, te da kvašćeva ćelija može da prevaziđe efekte DDHR bez vidljivog uticaja na rast i vijabilnost. Efekat makrolidnih poliena na kvašćevu ćeliju zavisi od njihove strukture. Tako glikozilovani nistatin i amfotericin B imaju sposobnost disrupcije tonoplasta vakuole, dok ne glikozilovani pentaenski makrolid filipin III (Rychnovsky and Richardson 1995) ostavlja vakuole intaktnim čak i pri visokim koncentracijama (Ogita, Fujita et al. 2010). U slučaju efekta DDHR na mutanta FAV20 čak i slaba sposobnost stvaranje pora i efluks jona kroz njih mogao bi da predstavlja dodatni pritisak na i onako narušenu jonsku ravnotežu tonoplasta što bi moglo rezultirati njegovom dezintegracijom koja dovodi do oslobađanja vakuolarnih enzima i autolize ćelije (Walker 1998).

Citotoksični efekat DDHR na različite ćelijske linije humanih i mišijih karcinoma (Stodulkova, Kuzma et al. 2011) potvrđen je u MTTeseju na HTR-8/SVneo liniji ćelija humanog trofoblata (Graham CH 1993), gde najvišu koncentraciju od 1 mg/ml preživljava oko 50% ćelija nakon 24 h (Tabela 9.). Stodulkova i saradnici pokazali su da DDHR lako prolazi kroz ćelijsku membranu HeLa ćelija i ulazi u sastav unutrašnjih membrana gde kolokalizuje sa markerima kasnih endozoma/lizozoma i izaziva fragmentaciju DNK već nakon 4 h (Stodulkova, Kuzma et al. 2011). Kontakt između poliena i membrane ostvaruje se preko sterola u membrani čiji sastav i zastupljenost utiče na formiranje pore i efekat koji polien ima na određeni tip ćelija (Recamier, Hernandez-Gomez et al. 2010). Ovim se objašnjava i razlika u efektu određenog poliena na membrane fungalnih ćelija koje u svom sastvu imaju prevashodno ergosterol i membrana humanih ćelija koje sadrže holesterol (Teerlink, de Kruijff et al. 1980). Očito je da je u slučaju DDHR efekat na obe vrste ćelijskih membrana jako izražen što je u skladu sa ranijim tvrdnjama da ne glikozilovani makrolidni polieni

imaju toksičniji efekat na humane ćelije zbog formiranja većih pora koje mogu dovesti i do fragmentacije membrane (Bolard 1986). U tom smislu moguća primena DDHR pre bi se mogla razvijati u pravcu anitumorskih lekova nego antimikotika.

Drugi aspekt proizvodnje DDHR detaljnije obrađen u ovoj studiji jeste biotehnološki aspekt. Proizvodnja DDHR testirana je u nekoliko bogatih medijuma (Tabela 12.). Prisustvo apsorpcionog profila karakterističnog za DDHR detektovano je u ukupnim ekstraktima kulture (*eng.* crude extract, CRE) kultura gajenih u JS, MSF i NEM medijumu. U JS medijumu postignuta je visoka proizvodnja DDHR, gde u uslovima gajenja u flasku oko 60% CRE čini DDHR (poglavlje 4.4.3.). U toku eksperimenata optimizacije medijuma primećeno je da je najstabilnija proizvodnja DDHR u NEM medijumu gde se iz kultura sa 4 puta manjom biomasom dobija 1,13 puta veća količina DDHR. U NEM sinteza DDHR drastično zavisi od prisustva manitola u medijumu, kao i od količine ali i vrste izvora ugljenika. Od ispitivanih izvora ugljenika manitol i metil oleat daju podjednak prinos DDHR u kulturi, dok glicerol i glukoza (NE medijum) daju značajno niže prinose (4 puta i 9 puta, respektivno). Produkcija DDHR nije uopšte detektovana u medijima sa argininom i amonijum sukcinatom kao jedinicima izvora ugljenika. Izbor izvora azota ima manje drastičan efekat na produkciju DDHR. U medijumu koji sadrži samo manitol i glukoza, bez ikakvih izvora azota, količina proizvedenog DDHR (g/l) je 1,3 odnosno 3,6 puta veća od one u NE medijumu i već pomenutom NE medijumu gde je glukoza zamenjena glicerolom (Tabela 13). *S. durmitorensis* proizvodi tamno zeleni pigment za koji postoje indicije da je njegova sinteza praćena sintezom jedinjenja koje inhibitorno deluje na oba soja kvasca (FAS20 i FAV20) (Savić 2004). U toku eksperimenata optimizacije primećeno je da se ovaj pigment u najvećoj meri proizvodi u medijumu sa glicerolom kao jedinicima izvorom ugljenika, kada je biomasa jednaka onoj u osnovnom NEM medijumu, ali je produktivnost DDHR 3,8 puta niža. U toku ekstrakcije etil acetatom ovaj pigment ostaje vezan za vodenu fazu i ne doprinosi TLC profilu hromatograma CRE iz ovih kultura (Slika 34.)

Iz eksperimenata optimizacije produkcije DDHR u NEM medijumu može se zaključiti da je podešavanjem uslova gajenja moguće povećati produkciju DDHR do određene granice, preko koje dolazi do nepotrebnog uvećavanja biomase i pada produktivnosti ili pomeranja ravnoteže ka proizvodnji nekih dugih metabolita. Dalje

povećanje produkcije DDHR moglo bi se postići metodama genetičkog inženjerstva modifikacijom unutar genskog klastera poliketid sintaze (PKS) odgovornog za njegovu sintezu, overekspresijom regulatornih gena (Martin and Liras 2010), povećanjem dostupnosti prekursora sekundarnih metabolita (Olano, Lombó et al. 2008; Rigali, Titgemeyer et al. 2008). Osim toga, blizak odnos biosinetskih puteva poliketida i masnih kiselina dao je mogućnost za novi vid modifikacije produkcije sekundarnih metabolita koji ne uključuje ranije korišćene pristupe. Većina biosintetskih klastera za poliketide (aktinorodin, doksorubicin, baumicin, germicidin) nema svoju malonil-CoA transferazu za prebacivanje starter molekula u sintezi poliketida na ACP poliketid sintaze, već za ovo koriste malonil-CoA:ACP transacilazu, enzim iz biosintetskog puta masnih kiselina (Koppisch and Khosla 2003). Kompeticija za resurse (prekursor, raspoloživost enzima) između ova dva puta mogla bi biti ograničavajući faktor u optimizaciji produkcije poliketida. Nova istraživanja pokazala su da bi za bliske biosinetske puteve mogli postojati specifični inhibitori, mali molekuli koji bi ometanjem jednog biosintetskog puta povećavali raspoloživost zajedničkog prekursora za drugi biosintetski put (Craney, Ozimok et al. 2012). U slučaju sinteze poliketida u *S. coelicolor* pokazano je da bi ARC2 molekuli slični antimikrobnom agensu triklosanu mogli da ometaju uključivanje prekursora acil-CoA u puteve primarnog metabolizma sinteze masnih kiselina preusmeravajući veći deo dostupnog acil-CoA ka sekundarnom metabolizmu povećavajući drastično prinos antibiotika.

5.4.1.1. Klaster za sintezu DDHR

PKS koja sintetiše DDHR pripada modularnim PKS tipa I, gigantskim multienzimskim kompleksima čija veličina je uporediva sa veličinom ribozoma (Keatinge-Clay 2012). S obzirom da je DDHR 36-člani makrolaktonski prsten, a da je *in silico* predikcija na osnovu sekvenci AT domena pokazala da glavna gradivna jedinica za ekstenziju poliketidnog lanca jeste malonil čija ugradnja produžuje ugljeničnu okosinicu za dva C atoma, može se pretpostaviti da minimalan broj modula koji sadrži DDHR PKS jeste 18. Za nistatin, prvi polienski antimikotik čiji je klaster u celosti sekvenciran pokazano je da je za sintezu njegovog 38-članog prstena zaduženo ukupno 19 modula, a da sa pridruženim modifikujućim enzimima ceo klaster izosi 123 580 bp (Brautaset, Sekurova et al. 2000; Brautaset, Sekurova et al. 2000). U do sada sekvenciranom delu klastera anotirano je 13 modula u okviru najveće kontinuirane

sekvence (Slika 42.) i još 4 nepotpuna modula u preostalim delovima sekvence (1 u okviru kontigova iz cos33 sekvence i 3 u okviru poznate cos18 sekvence). Broj nepotpunih modula određen je prema broju KS domena kojih ima 1 u cos33 sekvenci i 3 u cos18 sekvenci. Na osnovu sekvence kontiga 19 cos18 konstruisani su prajmeri c18021us i c18021ds (Prilog I). Za konstrukciju prajmera korišćen je Primer3 algoritam (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), a mesta alternativnog vezivanja prajmera unutar PKS sekvence dodatno su proveravana pomoću poravnavanja algoritmom BLAST sa bazom podataka formiranom od poznatih sekvenci kozmida (The Personal Sequence Database (Givan, Sullivan et al. 2007)). I pored ovih provera prajmer c18021ds vezao se za do sada ne sekvencirani region i dao sekvencu KS domena koja ne odgovara ni jednom od do sada sekvenciranih 16 KS domena, tako da ukupan broj sekvenciranih KS domena iznosi 17. Sekvenca kontiga 8 cos33 koja se preklapa sa T7 krajem cos9 daje sekvencu visoke homologije sa 3-oksoacil ACP sintazom odnosno ketoacil ACP sintazom III (KAS III), enzimima koji katalizuje kondenzaciju acil-ACP i malonil-ACP.

5.4.2. *Streptomyces durmitorensis* A10

Da bi se sa sigurnošću tvrdilo da neki klaster kodira za enzime zadužene za sintezu bioaktivnog jedinjenja potrebno je to potvrditi ili konstrukcijom inaktivacionog mutanta kod koga je izvršena disrupcija genskog klastera i pokazan izostanak sinteze bioaktivnog jedinjenja ili heterologno ekspresijom datog klastera pri čemu se sintetiše funkcionalni produkt. *S. durmitorensis* produkuje bioaktivno jedinjenje DDHR za koje je pokazano da deluje na mutirani soj kvasca *Sacharomyces cerevisiae* FAV20 (Skoko 2005). U pokušaju utvrđivanja da li je PKS I odgovorna za produkciju DDHR uz pomoć degenerisanih prajmera MAK1 i MAK3 amplifikovan je konzervirani region KS modularne PKS I i dobijeni produkt od 316 bp (Savic and Vasiljevic 2006) korišćen je za konstrukciju inaktivacione kasete sa marker genom za rezistenciju na tiosrepton (Tsr) na plazmidu pIM15PKS kojim je izvršena transformacija *S. durmitorensis* (Bratić 2006). S obzirom na dužinu genisanog fragmenta od 316 bp nije mogao biti primenjen metod dvostruke rekombinacije jer uspešnost inaktivacije ovim pristupom direktno zavisi od dužine DNK fragmenta koji se koristi, a koji ne bi trebalo da bude kraći od 500bp da bi se ostvario dovoljan region homologije (Kieser et al., 2001). Zato je mehanizam konstrukcije mutanta bio pomoću jednostrukog

rekombinacionog događaja ("single-crossover") koji podrazumeva da se inaktivaciona kasetna integriše u hromozom homologom rekombinacijom pri čemu će integrirani vektor biti omeđen mutiranim alelima gena koji su skraćeni na svojim 3' i 5' krajevima usled čega gen gubi svoju funkciju (Wach, Brachat et al. 1994). Ovaj pristup je vrlo jednostavan i zahteva samo jedno subkloniranje DNK fragmenta u vektor pri čemu će integracija vektora direktno uzrokovati mutaciju ciljnog gena (Hopwood 1985; Hopwood, Bibb et al. 1985). Međutim, mana ovog pristupa je ta što mutanti nastali usled jednostepene genske disrupcije mogu lako revertirati i samim tim izgubiti vektor sa kojim je rađena inaktivacija ciljnog gena. Izolovani Tsr rezistentni klon A10 (Bračić 2006) nije inhibirao rast *S.cerevisiae* FAV20 i predpostavljeno je da ne proizvodi aktivni DDHR. U ovoj studiji potvrdili smo da mutirani soj *S. durmitorensis* A10 zaista ne proizvodi funkcionalni DDHR, a osim toga u biološkim testovima sa više vrsta mikroorganizama pokazano je da soj A10 i dalje produkuje antibiotske supstance (Tabela 4.). Za razliku od apsorpcionog spektra CRE kulture *S. durmitorensis* wt sa širokim apsorpcioni pikom u opsegu 243-275 nm sa maksimumom apsorpcije na 260 nm i još jednim apsorpcionim maksimumom na 363 nm (Slika 19.) CRE mutanta A10 pokazuje apsorpciju u opsegu 245-410 nm sa maksimumom apsorpcije na 260 nm i više slabo definisanih sekundarnih apsorpcionih maksimuma (Slika 21.). NMR analiza je pokazala odsustvo produkata molekulskih masa između 611 i 683 koje odgovaraju članovima polienske familije DDHR (Stodulkova, Kuzma et al. 2011), ali je primećena pojava produkta molekulske mase 394,24 čija priroda nije dalje ispitivana (Slika 22b).

6. Zaključci

- ◆ Šesnaest izolata iz postojeće kolekcije aktinomiceta Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo selektovano je na osnovu profila bioaktivnosti njihovih ukupnih ekstrakata, pri čemu su se izdvojili izolati NP10 i JS520;
- ◆ UV/Vis spektroskopija, profil bioaktivnosti ukupnih ekstrakata tečnih kultura i pigmentacija micelijuma pokazali su se kao korisni kriterijumi pri odabiru sojeva iz kolekcije aktinomiceta, dok su se biološki esej na soju *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 i prisustvo gena za poliketid sintazu (PKS) pokazali kao ne informativni;
- ◆ Na osnovu parcijalne sekvence 16S rDNK utvrđeno je da izolati NP10 i JS520 pripadaju rodu *Streptomyces*;
- ◆ Prečišćeni su ukupni ekstrakti kultura i određena je hemijska struktura glavnih sekundarnih metabolita sojeva NP10 i JS520;
 - *Streptomyces* sp. NP10 akumulira izokiseline srednje dugog lanca sa 14-17 C atoma, sa najvećim udelom izoplamininske kiseline (C₁₆H₃₂O₂) i ciklične dipeptide pre svega ciklo-Pro-Val i ciklo-Pro-Ile;
 - *Streptomyces* sp. JS520 je proizvođač crvenog pigmenta udecilprodigiozina (UP), tripirolnog jedinjenja formule C₂₅H₃₅N₃O;
- ◆ Utvrđeno je dejstvo prečišćenih sekundarnih metabolita iz sojeva *Streptomyces* sp. NP10, *Streptomyces* sp. JS520 i *Streptomyces durmitorensis* (DSM 41863^T), proizvođača didehidroroflamikoina (DDHR), na različite mikroorganizme i humane ćelije u kulturi;
 - Smeša izokiselina i ciklični dipeptidi pokazuju u nižim koncentracijama (1 ng/ml i 1 µg/ml) stimulatívni efekat na

- vijabilnost HTR-8/SVneo trofoblastne ćelijske linije, dok pri koncentraciji od 1 mg/ml imaju citotoksični efekat;
- UP ima antibiotski efekat na soj *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) sa MIK 50 µg/ml, antimikotički efekat na sojeve *Candida albicans* sa MIK 100-200 µg/ml i stimulatívni efekat na vijabilnost HTR-8/SVneo trofoblastne ćelijske linije u nižim koncentracijama (1 ng/ml i 1 µg/ml), a citotoksični efekat u koncentraciji od 1 mg/ml;
 - DDHR ima antimikotički efekat na sojeve *Candida albicans* sa MIK 50 µg/ml i a citotoksični efekat na HTR-8/SVneo trofoblastnu ćelijsku liniju pri koncentraciji od 1 mg/ml;
- ◆ Moguća ekofiziološka uloga UP leži u njegovom antioksidativnom i UV-protektivnom dejstvu koje je pokazano u ovoj studiji;
 - ◆ Kod mutiranog soja *Streptomyces durmitorensis* A10 sposobnost sinteze DDHR je u potpunosti ukinuta;
 - ◆ Izborom medijuma i optimizacijom njegovog sastava može biti povećan prinos UP i DDHR;
 - U MSY medijumu suplementiranom 0,2% metil oleatom moguće je dobiti 139 mg/l undecilprodigiozina što je povećanje od 2,12 puta u odnosu na osnovni MSY medijum;
 - U NEM medijumu suplementiranom 0,2% uljem koštica grožđa moguće je dobiti 236 mg/l DDHR što je povećanje od 1,11 puta u odnosu na osnovni NEM medijum;
 - ◆ PKS sekvenca iz *S. durmitorensis* (DSM 41863^T) koja kodira za sintazu DDHR ima najmanje 4 otvorena okvira čitanja, 18 ili 19 modula i približno 100 Kb.

7. Literatura

- Alihosseini, F., K.-S. Ju, J. Lango, B. D. Hammock and G. Sun (2008). "Antibacterial colorants: Characterization of prodiginines and their applications on textile materials." Biotechnology Progress **24**: 742-747.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**: 3389-3402.
- Anand, S., M. V. Prasad, G. Yadav, N. Kumar, J. Shehara, M. Z. Ansari and D. Mohanty (2010). "SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases." Nucleic Acids Research **38**: W487-496.
- Antony-Babu, S. and M. Goodfellow (2008). "Biosystematics of alkaliphilic streptomycetes isolated from seven locations across a beach and dune sand system." Antonie Van Leeuwenhoek **94**: 581-591.
- Antony-Babu, S., J. E. M. Stach and M. Goodfellow (2010). "Computer-assisted numerical analysis of colour-group data for dereplication of streptomycetes for bioprospecting and ecological purposes." Antonie van Leeuwenhoek **97**: 231-239.
- Arai, T. and Y. Mikami (1972). "Chromogenicity of *Streptomyces*." Applied Microbiology **23**: 402-406.
- Arslanian, R. L. (2008). Production of polyketides. US. **US 7,323,573B**.
- Artsimovitch, I., M. N. Vassilyeva, D. Svetlov, V. Svetlov, A. Perederina, N. Igarashi, N. Matsugaki, S. Wakatsuki, T. H. Tahirov and D. G. Vassilyev (2005). "Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins." Cell **122**: 351-363.
- Aszalos, A., A. Bax, N. Burlinson, P. Roller and C. McNeal (1985). "Physico-chemical and microbiological comparison of nystatin, amphotericin A and amphotericin B, and structure of amphotericin A." The Journal of Antibiotics **38**: 1699-1713.
- Baltz, R. H. (2008a). "Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes." Current Opinion in Pharmacology **8**: 557-563.
- Baltz, R. H. (2008b). "Biosynthesis and genetic engineering of lipopeptide antibiotics related to daptomycin." Current Topics in Medicinal Chemistry **8**: 618-638.
- Baltz, R. H. and T. J. Hosted (1996). "Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes." Trends in Biotechnology **14**: 245-250.
- Baltzer, A. (2008). "All-ceramic single-tooth restorations: choosing the material to match the preparation--preparing the tooth to match the material." International Journal of Computerized Dentistry **11**: 241-256.
- Bao, K. and S. N. Cohen (2001). "Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*." Genes and Development **15**: 1518-1527.
- Barder, M. J. and D. L. Crawford (1981). "Effects of carbon and nitrogen supplementation on lignin and cellulose decomposition by a *Streptomyces*." Canadian Journal of Microbiology **27**: 859-863.
- Baylis, H., A. and Bibb, M., J. (1988). "Transcriptional analysis of the 16S rRNA gene of the *rrnD* gene set of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Molecular Microbiology **2**: 569-579.
- Bell, M. L., G. K. Grunwald, J. H. Baltz, G. O. McDonald, M. R. Bell, F. L. Grover and A. L. Shroyer (2008). "Does preoperative hemoglobin independently predict short-term outcomes after coronary artery bypass graft surgery?" The Annals of Thoracic Surgery **86**: 1415-1423.
- Belshaw, P. J., C. T. Walsh and T. Stachelhaus (1999). "Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. ." Science **284**: 486-489.

- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutheford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrel, J. Parkhill and D. Hopwood, A. (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Nature **417**: 141-147.
- Bibb, M. (2005). "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes." Current Opinion in Microbiology **8**: 208-215.
- Bienert, G. P., J. K. Schjoerring and T. P. Jahn (2006). "Membrane transport of hydrogen peroxide." Biochimica et Biophysica Acta **1758**: 994-1003.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." Methods in Enzymology **100**: 243-255.
- Bolard, J. (1986). "How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?" Biochimica et Biophysica Acta **864**: 257-304.
- Boric, M., T. Danevcic and D. Stopar (2011). "Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; A new UV-protective pigment." Microbial Ecology **62**: 528-536.
- Borowski, E. (2000). "Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity." Farmaco **55**: 206-208.
- Bratić, I. (2006). Karakterizacija *Streptomyces durmitorensis* PKS I. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu.
- Brautaset, T., O. N. Sekurova, H. Sletta, T. E. Ellingsen, A. R. Strom, S. Valla and S. Zotchev (2000). "Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway." Chemistry & Biology **7**: 395-403.
- Bredholdt, H., O. A. Galatenko, K. Engelhardt, E. Fjaervik, L. P. Terekhova and S. B. Zotchev (2007). "Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity." Environmental Microbiology **9**: 2756-2764.
- Brennan, P. J. (1988). *Mycobacterium* and other actinomycetes. Microbial Lipids. C. Ratledge and S. G. Wilkinson. New York, Academic Press, Inc. **1**: 203-298.
- Broadhurst, R. W., D. Nietlispach, M. P. Wheatcroft, P. F. Leadlay and K. J. Weissman (2003). "The structure of docking domains in modular polyketide synthases." Chemistry & Biology **10**: 723-731.
- Brun-Buisson, C., P. Legrand, A. Philippon, F. Montravers, M. Ansquer and J. Duval (1987). "Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*." Lancet **2**: 302-306.
- Bruntner, C., T. Binder, W. Pathom-aree, M. Goodfellow, A. T. Bull, O. Potterat, C. Puder, S. Horer, A. Schmid, W. Bolek, K. Wagner, G. Mihm and H. P. Fiedler (2005). "Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica." Journal of Antibiotics (Tokyo) **58**: 346-349.
- Bulkley, D., C. A. Innis, G. Blaha and T. A. Steitz (2010). "Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**: 17158-17167.
- Bull, A. T., A. C. Ward and M. Goodfellow (2000). "Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift." Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**: 573-606.
- Burgess, J. G., E. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg and K. Boyd (1999). "Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research." Journal of Biotechnology **70**: 27-32.

- Butler, M. S. (2008). "Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials." Natural Product Reports **25**: 475-516.
- Cane, D. E., C. T. Walsh and C. Khosla (1998). "Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations." Science **282**: 63-68.
- Cang, S., M. Sanada, O. Johdo, S. Ohta, Y. Nagamatsu and A. Yoshimoto (2000). "High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol." Biotechnology Letters **22**: 1761-1765.
- Carter, H. E., D. Gottlieb and H. W. Anderson (1948). "Chloromycetin and Streptothricin." Science **107**: 113.
- Castro-Melchor, M., S. Charaniya, G. Karypis, E. Takano and W. S. Hu (2010). "Genome-wide inference of regulatory networks in *Streptomyces coelicolor*." BMC Genomics **11**: 578.
- Centi, G. and S. Perathoner (2009). From green to sustainable industrial chemistry. Sustainable Industrial Processes. F. Cavani, G. Centi, S. Perathoner and F. Trifiro. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Cerdeno, A. M., M. J. Bibb and G. L. Challis (2001). "Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes." Chemistry & Biology **8**: 817-829.
- Chakraborty, R. and M. Bibb (1997). "The ppGpp synthetase gene (relA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation." Journal of Bacteriology **179**: 5854-5861.
- Challis, G. L., J. Ravel and C. A. Townsend (2000). "Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains." Chemistry & Biology **7**: 211-224.
- Chang, C.-C., W.-C. Chen, S.-F. Ho, H.-S. Wu and Y.-H. Wei (2011). "Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms." Journal of Bioscience and Bioengineering **111**: 501-511.
- Charaniya, S., S. Mehra, W. Lian, K. P. Jayapal, G. Karypis and W. S. Hu (2007). "Transcriptome dynamics-based operon prediction and verification in *Streptomyces coelicolor*." Nucleic Acids Research **35**: 7222-7236.
- Charkoudian, L. K., J. T. Fitzgerald, C. Khosla and A. Champlin (2010). "In living color: Bacterial pigments as an untapped resource in the classroom and beyond." PLoS Biology **8**: e1000510.
- Chater, K. (2001). "Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?" Current Opinion in Microbiology **4**: 667-673.
- Cheng, Y. Q., G. L. Tang and B. Shen (2003). "Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 3149-3154.
- Choi, J., J. Chen, S. L. Schreiber and J. Clardy (1996). "Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP." Science **273**: 239-242.
- Choi, K. H., R. J. Heath and C. O. Rock (2000). "beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis." Journal of Bacteriology **182**: 365-370.
- Chuck, J. A., C. Dunn, F. E. Facultad, C. Nakazono, J. Nikodinovic and K. D. Barrow (2006). "Amplification of DNA encoding entire type I polyketide synthase domains and linkers from *Streptomyces* species." Current Microbiology **53**: 89-94.
- Chun, J., A. Huq and R. R. Colwell (1999). "Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*." Applied and Environmental Microbiology **65**: 2202-2208.
- Clarke, L. and J. Carbon (1976). "A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome." Cell **9**: 91-99.
- Clarke, S. D., D. A. Ritchie and S. T. Williams (1993). "Ribosomal DNA restriction fragment analysis of some closely related *Streptomyces* species." Systematic and Applied Microbiology **16**: 256-260256.

- Clements-Jewery, S. (1976). "The reversal of glucose repressed prodigiosin production in *Serratia marcescens* by the cyclic 3'5'-adenosine monophosphate inhibitor theophylline." Experientia **32**: 421-422.
- Cohen, B. E. (1998). "Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels." International Journal of Pharmaceutics **162**: 95-106.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity and J. M. Tiedje (2009). "The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis." Nucleic Acids Research **37**: 141-145.
- Colwell, R., R. Clayton, A. B. Ortiz-Conde, A. D. Jacobs and E. Russek-Cohen (1995). The microbial species concept and biodiversity. Microbial diversity and ecosystem function. D. Allsopp, R. R. Colwell and D. L. Hawksworth. Oxon, CAB International: 3-15.
- Comroe, J. H., Jr. (1978). "Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman." The American review of respiratory disease **117**: 773-781.
- Conti, E., T. Stachelhaus, M. A. Marahiel and P. Brick (1997). "Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S." EMBO J **16**: 4174-4183.
- Corey, R. B. (1938). "Crystal Structure of Diketopiperazine." Journal of the American Chemical Society **60**: 1598-1616.
- Corre, C. and G. L. Challis (2009). "New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining." Natural Product Reports **26**: 977-986.
- Cortes, J., S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt and P. F. Leadlay (1990). "An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*." Nature **348**: 176-178.
- Craney, A., C. Ozimok, S. M. Pimentel-Elardo, A. Capretta and J. R. Nodwell (2012). "Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism." Chemistry & Biology **19**: 1020-1027.
- David, M. Z. and R. S. Daum (2010). "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic." American Society for Microbiology **23**: 616-687.
- de Kruijff, B., W. J. Gerritsen, A. Oerlemans, P. W. van Dijk, R. A. Demel and L. L. van Deenen (1974). "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation." Biochimica et Biophysica Acta **339**: 44-56.
- Del Vecchio, F., H. Petkovic, S. G. Kendrew, L. Low, B. Wilkinson, R. Lill, J. Cortes, B. A. Rudd, J. Staunton and P. F. Leadlay (2003). "Active-site residue, domain and module swaps in modular polyketide synthases." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **30**: 489-494.
- Demain, A. L., J. E. Davies and R. M. Atlas (1999). Manual of industrial microbiology and biotechnology. University of Michigan, ASM Press.
- Diraviyam, T., M. Radhakrishnan and R. Balagurunathan (2011). "Antioxidant activity of melanin pigment from *Streptomyces* species D5 isolated from desert soil, Rajasthan, India." Drug Invention Today **3**: 12-13.
- Donadio, S. and L. Katz (1992). "Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*." Gene **111**: 51-60.
- Du, L., Y. Q. Cheng, G. Ingenhorst, G. L. Tang, Y. Huang and B. Shen (2003). "Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects towards engineering novel molecules." Genetic engineering **25**: 227-267.
- Du, L., C. Sanchez, M. Chen, D. J. Edwards and B. Shen (2000). "The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting

- functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase." Chemistry & Biology **7**: 623-642.
- Du, L. and B. Shen (1999). "Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC 15003." Chemistry & Biology **6**: 507-517.
- Du, L. and B. Shen (2001). "Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products." Current Opinion in Drug Discovery & Development **4**: 215-228.
- Dufosse, L. (2009). Pigments, Microbial. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). M. Schaechter. Oxford, Academic Press: 457-471.
- Dufour, N. and R. P. Rao (2011). "Secondary metabolites and other small molecules as intercellular pathogenic signals." FEMS Microbiology Letters **314**: 10-17.
- Dumont, F. J. (2000). "FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function." Current Medicinal Chemistry **7**: 731-748.
- Duran, N., M. F. Teixeira, R. De Conti and E. Esposito (2002). "Ecological-friendly pigments from fungi." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **42**: 53-66.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**: 1635-1638.
- Elovson, J. and P. R. Vagelos (1968). "Acyl carrier protein. X. Acyl carrier protein synthetase." Journal of Biological Chemistry **243**: 3603-3611.
- EUCAST (2003). "Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution." Clinical Microbiology and Infection **9**: ix-xv.
- Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl and P. Green (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment." Genome Research **8**: 175-185.
- Faith, J. J., B. Hayete, J. T. Thaden, I. Mogno, J. Wierzbowski, G. Cottarel, S. Kasif, J. J. Collins and T. S. Gardner (2007). "Large-scale mapping and validation of *Escherichia coli* transcriptional regulation from a compendium of expression profiles." PLoS Biology **5**: e8.
- Fandi, K., M. Massadeh and H. Laatsch (2012). LC-MS/MS Profiling-based Metabolite Screening of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. International Conference on Applied Chemistry and Pharmaceutical Sciences (ICACPS'2012), Penang (Malaysia).
- Feitelson, J. S. and D. A. Hopwood (1985). "Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2)." Journal of General Microbiology **131**: 2431-2441.
- Feng, J. S., J. W. Webb and J. C. Tsang (1982). "Enhancement by sodium dodecyl sulfate of pigment formation in *Serratia marcescens* O8." Applied and Environmental Microbiology **43**: 850-853.
- Fiedler, H. P., C. Bruntner, A. T. Bull, A. C. Ward, M. Goodfellow, O. Potterat, C. Puder and G. Mihm (2005). "Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites." Antonie Van Leeuwenhoek **87**: 37-42.
- Firn, R. D. and C. G. Jones (2000). "The evolution of secondary metabolism - a unifying model." Molecular Microbiology **37**: 989-994.
- Fischbach, M. A., C. T. Walsh and J. Clardy (2008). "The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 4601-4608.
- Foulque Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou and L. De Vuyst (2006). "The role and application of enterococci in food and health." International Journal of Food Microbiology **106**: 1-24.
- Frappier, J. Y., M. Kaufman, F. Baltzer, A. Elliott, M. Lane, J. Pinzon and P. McDuff (2008). "Sex and sexual health: A survey of Canadian youth and mothers." Paediatrics & Child Health **13**: 25-30.

- Frykman, S. A., H. Tsuruta and P. J. Licari (2005). "Assessment of fed-batch, semicontinuous, and continuous epothilone D production processes." Biotechnology Progress **21**: 1102-1108.
- Fukuda, Y., T. Osawa, M. Namiki and T. Ozaki (1985). "Studies on antioxidative substances in sesame seed." Agricultural and Biological Chemistry **49**: 301-306.
- Furstner, A. (2003). "Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: A survey of the last 2500 years." Angewandte Chemie **42**: 3582-3603.
- Gerber, N., A. McInnes, D. Smith, J. Walter, J. Wright and L. Vining (1978). "Biosynthesis of prodiginines. ¹³C assignments and enrichment patterns in nonyl-, cyclononyl-, methylcyclodecyl-, and butylcycloheptylprodiginine produced by actinomycete cultures supplemented with ¹³C-labeled acetate and ¹⁵N-labeled nitrate." Canadian Journal of Chemistry **56**: 1155-1163.
- Ghosh, S., A. Nie, J. An and Z. Huang (2006). "Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery." Current Opinion in Chemistry & Biology **10**: 194-202.
- Gil, J. A., G. Naharro, J. R. Villanueva and J. F. Martin (1985). "Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*." Journal of General Microbiology **131**: 1279-1287.
- Ginz, M. and U. H. Engelhardt (2000). "Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 3528-3532.
- Giri, A., N. Anandkumar, G. Muthukumar and G. Pennathur (2004). "A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil." BMC Microbiology **4**: 1-10.
- Giroux, H., P. Vidal, J. Bouchard and F. Lamy (1988). "Degradation of Kraft Indulin Lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*." Applied and Environmental Microbiology **54**: 3064-3070.
- Givan, S. A., C. M. Sullivan and J. C. Carrington (2007). "The Personal Sequence Database: a suite of tools to create and maintain web-accessible sequence databases." BMC Bioinformatics **8**: 479.
- Glazebrook, M. A., L. C. Vining, R. L. White, K. C. Smith and E. G. Chedrawy (1993). "Nutrient effects on growth and the production of 5-hydroxy-4-oxonorvaline by *Streptomyces akiyoshiensis*." Canadian Journal of Microbiology **39**: 536-542.
- Gokhale, R. S., S. Y. Tsuji, D. E. Cane and C. Khosla (1999). "Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases." Science **284**: 482-485.
- Gordon, E. M., R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. Fodor and M. A. Gallop (1994). "Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions." Journal of Medicinal Chemistry **37**: 1385-1401.
- Grafe, U., M. Roth and D. Krebs (1982). "Effect of l-valine and l-isoleucine on fatty acid composition of *Streptomyces hygroscopicus* and *S. griseus*." Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie **22**: 595-599.
- Graham CH, H. T., Hawley RC, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N and Lala PK . (1993). "Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan." Experimental Cell Research **206**: 204-2011.
- Gross, H., V. O. Stockwell, M. D. Henkels, B. Nowak-Thompson, J. E. Loper and W. H. Gerwick (2007). "The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters." Chemistry & Biology **14**: 53-63.
- Gupta, D., S. K. Khareb and A. Laha (2004). "Antimicrobial properties of natural dyes against Gram-negative bacteria." Coloration Technology **120**: 167-171.
- Gusarov, I., K. Shatalin, M. Starodubtseva and E. Nudler (2009). "Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics." Science **325**: 1380-1384.
- Guthrie, E. P., C. S. Flaxman, J. White, D. A. Hodgson, M. J. Bibb and K. F. Chater (1998). "A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor*

- A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket." Microbiology **144**: 727-738.
- Haddix, P. L., S. Jones, P. Patel, S. Burnham, K. Knights, J. N. Powell and A. LaForm (2008). "Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*." Journal of Bacteriology **190**: 7453-7463.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R., M., Stackebrandt, E., and Rainey, F., A. (1997). "Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenetic spacers." International Journal of Systematic Bacteriology **47**: 202-206.
- Hakvag, S., E. Fjaervik, K. D. Josefsen, E. Ian, T. E. Ellingsen and S. B. Zotchev (2008). "Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway." Marine Drugs **6**: 620-635.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (1973). "Chemistry and Biology of the Polyene Macrolide Antibiotics" Bacteriological Reviews **37**: 166-196.
- Hamilton, G. S. and J. P. Steiner (1998). "Immunophilins: beyond immunosuppression." Journal of Medicinal Chemistry **41**: 5119-5143.
- Hammond, S. M. (1977). "Biological activity of polyene antibiotics." Progress in medicinal chemistry **14**: 105-179.
- Han, L., S. Lobo and K. A. Reynolds (1998). "Characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from *Streptomyces glaucescens* and its role in initiation of fatty acid biosynthesis." Journal of Bacteriology **180**: 4481-4486.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**: 557-580.
- Hanisch FG, D. F., Uhlenbruck G. (1993). Quantitative micro-adhesion assay on polystyrene matrices. Lectins and Glycobiology. G. HJ and G. S. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 411-417
- Hanson, J. R. (2003). Natural Products: The Secondary Metabolites. Cambridge, U K The Royal Society of Chemistry.
- Haraguchi, H., K. Hashimoto and A. Yagi (1992). "Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**: 1349-1351.
- Harris, A., N. Williamson, H. Slater, A. Cox, S. Abbasi, I. Foulds, H. Simonsen, F. Leeper and G. Salmond (2004). "The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species and strain-dependent genome context variation." Microbiology **150**: 3547-3560.
- Harwood, J. and R. J. Weselak. (2012, October 11th, 2012). "The AOCS Lipid Library."
- Heidemann, H. T. H., J. F. Gerkens, W. A. Spickard, E. K. Jackson and R. A. Branch (1983). "Amphotericin B nephrotoxicity in humans decreased by salt repletion." The American Journal of Medicine **75**: 476-481.
- Hejazi, A. and F. R. Falkiner (1997). "*Serratia marcescens*." Journal of Medical Microbiology **46**: 903-912.
- Helmreich, E. J. (2003). "Environmental influences on signal transduction through membranes: a retrospective mini-review." Biophysical Chemistry **100**: 519-534.
- Hemenway, C. S., K. Dolinski, M. E. Cardenas, M. A. Hiller, E. W. Jones and J. Heitman (1995). "vph6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* require calcineurin for growth and are defective in vacuolar H(+)-ATPase assembly." Genetics **141**: 833-844.
- Hesketh, A., W. J. Chen, J. Ryding, S. Chang and M. Bibb (2007). "The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Genome Biology **8**: R161.
- Ho, T.-F., C.-J. Ma, C.-H. Lu, Y.-T. Tsai, Y.-H. Wei, J.-S. Chang, J.-K. Lai, P.-J. Cheuh, C.-T. Yeh, P.-C. Tang, J. Chang, J.-L. Ko, F.-S. Liu, H. Yen and C.-C. Chang (2007). "Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53." Toxicology and Applied Pharmacology **225**: 318-328.

- Hobbs, G., C. Frazer, D. Gardner, F. Flett and S. Oliver (1990). "Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients." Journal of General Microbiology **136**: 2291-2296.
- Hobbs, G. C., C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Callum and S. G. Oliver (1989). "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture." Applied Microbiology and Biotechnology **31**: 272-277.
- Hodgkin, D. C. (1949). "The X-ray analysis of the structure of penicillin.." Advanced Science **6**: 85-89.
- Holt, G., J., N. Krieg, R., P. Sneeth, H.,A., J. Staley, T. and S. Williams, T. (1994). Bergey 's manual of deteminative bacteriology. Baltimore, Maryland, USA, Williams & Wilkins.
- Hopwood, D., A., Bibb, M., J., Chater, K.,F., Kieser, T., Bruton, C.,J., Kieser, H., M., Lydiate, C.,P., Smith, C.,P., Wards, J.,M. and Shrempf, H. (1985). Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual, John Innes Foundation, Norwich.
- Hopwood, D. A. (1997). "Genetic contributions to understanding polyketide synthases." Chemical Reviews **97**: 2465-2497.
- Horinouchi, S. and T. Beppu (1992). "Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system." Gene **115**: 167-172.
- Horton, D. A., G. T. Bourne and M. L. Smythe (2000). "Exploring privileged structures: The combinatorial synthesis of cyclic peptides." Molecular diversity **5**: 289-304.
- Houston, D. R., B. Synstad, V. G. Eijsink, M. J. Stark, I. M. Eggleston and D. M. van Aalten (2004). "Structure-based exploration of cyclic dipeptide chitinase inhibitors." Journal of Medicinal Chemistry **47**: 5713-5720.
- Huang, J., J. Shi, V. Molle, B. Sohlberg, D. Weaver, M. J. Bibb, N. Karoonuthaisiri, C. J. Lih, C. M. Kao, M. J. Buttner and S. N. Cohen (2005). "Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*." Molecular Microbiology **58**: 1276-1287.
- Huang, X. and H. M. Holden (2001). "Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions." Annual Review of Biochemistry **70**: 149-180.
- Hubbard, B. K. and C. T. Walsh (2003). "Vancomycin assembly: nature's way." Angewandte Chemie International Edition in English **42**: 730-765.
- Hull, D. L. (1997). The ideal species concept and why we can't get it. Species: the units of biodiversity. M. Claridge, F., H. Dawah, A. and M. Wilson, R. London, Chapman and Hall: 357-380.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura (2003). "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*." Nature Biotechnology **21**: 526-531.
- Istvan, E. S. and J. Deisenhofer (2001). "Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase." Science **292**: 1160-1164.
- James, P. D., C. Edwards and M. Dawson (1991). "The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat." Journal of General Microbiology **137**: 1715-1720.
- Jenke-Kodama, H., T. Börner and E. Dittman (2006). "Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. PLoS Comput Biol." PLoS Computational Biology **2**: 132-138.
- Jensen, A., M., Webster, A.,J. and Straus, N. (1993). "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction - amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms." Applied and Environmental Microbiology **59**: 945-952.
- Jez, J. M., J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon and J. P. Noel (2000). "Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase." Biochemistry **39**: 890-902.

- Kaempfer, P., R. M. Kroppenstedt and W. Dott (1991). "A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests." Journal of General Microbiology **137**: 1831-1891.
- Kalivoda, E. J., N. A. Stella, M. A. Aston, J. E. Fender, P. P. Thompson, R. P. Kowalski and R. M. Shanks (2010). "Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*." Research in Microbiology **161**: 158-167.
- Kane, P. M., C. T. Yamashiro and T. H. Stevens (1989). "Biochemical characterization of the yeast vacuolar H(+)-ATPase." Journal of Biological Chemistry **264**: 19236-19244.
- Kaneda, T. (1973). "Biosynthesis of branched long-chain fatty acids from the related short-chain -keto acid substrates by a cell-free system of *Bacillus subtilis*." Canadian Journal of Microbiology **19**: 87-96.
- Kaneda, T. (1988). "Stereoselectivity in the 2-methylbutyrate incorporation into *anteiso* fatty acids in *Bacillus subtilis* mutants." Biochimica et Biophysica Acta **960**: 10-18.
- Kaneda, T. (1991). "Iso- and Anteiso- Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic significance." Microbiological Reviews **55**: 288-302.
- Kaneda, T., E. J. Smith and D. N. Naik (1983). "Fatty acid composition and primer specificity of de novo fatty acid synthetase in *Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*, and *Bacillus psychrophilus*." Canadian Journal of Microbiology **29**: 1634-1641.
- Katz, L. (1997). "Manipulation of modular polyketide synthases." Chemical Reviews **97**: 2557-2576.
- Kawasaki, T., F. Sakurai and Y. Hayakawa (2008). "A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*." Journal of Natural Products **71**: 1265-1267.
- Keating, T. A., C. G. Marshall, C. T. Walsh and A. E. Keating (2002). "The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains." Nature Structural Biology **9**: 522-526.
- Keating, T. A. and C. T. Walsh (1999). "Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis." Current Opinion in Chemical Biology **3**: 598-606.
- Keatinge-Clay, A. T. (2012). "The structures of type I polyketide synthases." Natural Product Reports.
- Keith, K. E., L. Killip, P. He, G. R. Moran and M. A. Valvano (2007). "*Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate." Journal of Bacteriology **189**: 9057-9065.
- Keller, N. P., G. Turner and J. W. Bennett (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nature Reviews Microbiology **3**: 937-947.
- Kennedy, J., K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas and R. C. Hutchinson (1999). "Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis." Science **284**: 1368-1374.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood (2000). Practical Streptomyces Genetics. Norwich, England, The John Innes Foundation.
- Kim, C.-H., S.-W. Kim and S.-I. Hong (1999). "An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95." Process Biochemistry **35**: 485-490.
- Klenchin, V. A., R. King, J. Tanaka, G. Marriott and I. Rayment (2005). "Structural basis of swinholide A binding to actin." Chemistry & Biology **12**: 287-291.
- Klose, K. E. (2006). "Increased Chatter: Cyclic Dipeptides as Molecules of Chemical Communication in *Vibrio* spp." Journal of Bacteriology **188**: 2025-2026.
- Kluytmans, J., A. van Belkum and H. Verbrugh (1997). "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks." Clinical Microbiology Review **10**: 505-520.
- Knežević-Vukčević, J. i D. Simić (1999). Metode u mikrobiologiji-praktikum. Beograd.
- Kodaira, Y. (1961). "Toxic substances to insects produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*." Agricultural and Biological Chemistry (Tokyo) **25**: 261-270.

- Koppisch, A. T. and C. Khosla (2003). "Structure-based mutagenesis of the malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase from *Streptomyces coelicolor*." Biochemistry **42**: 11057–11064.
- Krassilnikov, N. A. (1965). "Microbial metabolites as factors of soil fertility." Annales de l'Institut Pasteur (Paris) **109**: Suppl:191-206.
- Kwon, O. S., S. H. Park, B. S. Yun, Y. R. Pyun and C. J. Kim (2000). "Cyclo(dehydroala-L-Leu), an alpha-glucosidase inhibitor from *Penicillium* sp. F70614." Journal of Antibiotics (Tokyo) **53**: 954-958.
- Labeda, D. P. (1992). "DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*." Gene **115**: 249-253.
- Labeda, D. P. (2011). "Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **61**: 2525-2531.
- Lai, C. Y. and J. E. Cronan (2003). "Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis." Journal of Biological Chemistry **278**: 51494-51503.
- Lambalot, R. H. and C. T. Walsh (1997). "Holo-(Acyl Carrier Protein) Synthase of *Escherichia coli*." Methods in Enzymology **279**: 254-262.
- Lampen, J. O. (1969). "Amphotericin B and other polyenic antifungal antibiotics." The American Journal of Clinical Pathology **52**: 138-146.
- Lapchinskaia, O. A., T. P. Saburova, O. P. Siniagina, N. V. Konstantinova and V. A. Filicheva (1975). "Spontaneous and induced variability in *Actinomyces rubiginosohelvolus*, a new producer of the antibiotic rubomycin." Antibiotiki **20**: 1061-1065.
- Laureti, L., L. Song, S. Huang, C. Corre, P. Leblond, G. L. Challis and B. Aigle (2011). "Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**: 6258.
- Laus, G. (2001). "Kinetics of acetonitrile-assisted oxidation of tertiary amines by hydrogen peroxide." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: 864–868.
- Lee, H. J., S. I. Han and K. S. Whang (2012). "*Streptomyces gramineus* sp. nov., an antibiotic-producing actinobacterium isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **62**: 856-859.
- Lee, J. S., Y.-S. Kim, S. Park, J. Kim, S.-J. Kang, M.-H. Lee, S. Ryu, J. M. Choi, T.-K. Oh and J.-H. Yoon (2011). "Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1." Applied and Environmental Microbiology **77**: 4967–4973.
- Li, H., B. Wang and Y. Li (2011). An unusual mercapto-containing and three known diketopiperazines from the marine sponge *Haliclona* sp. International Conference on Human Health and Biomedical Engineering (HHBE), Jilin, China.
- Li, W. J., L. P. Zhang, P. Xu, X. L. Cui, Z. T. Lu, L. H. Xu and C. L. Jiang (2002). "*Streptomyces beijiagensis* sp. nov., a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**: 1695-1699.
- Li, Y., G. Florova and K. A. Reynolds (2005). "Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH)." Journal of Bacteriology **187**: 3795-3799.
- Linne, U. and M. A. Marahiel (2000). "Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization." Biochemistry **39**: 10439-10447.
- Lipmann, F., W. Gevers, H. Kleinkauf and J. R. Roskoski (1971). "Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine." Advanced Enzymology and Related Areas of Molecular Biology **35**: 1-34.

- Liu, H. a. T., J.,S. (1994). "Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria " Annual Review of Microbiology **48**: 223 - 256.
- Liu, R., C. B. Cui, L. Duan, Q. Q. Gu and W. M. Zhu (2005). "Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov." Archives of Pharmacal Research **28**: 1341-1344.
- Locci, R. and G. Sharples, P. (1984). Morphology. In "The biology of actinomycetes". London, Academic Press.
- Lopes, S. C. D. N., A. Fedorov and M. A. R. B. Castanho (2004). "Cholesterol modulates maculosin's orientation in model systems of biological membranes Relevance towards putative molecular recognition." Steroids **69**: 825-830.
- Ludwig, D. L. (1991). Influence of copy number and chromosomal position effect on heterologous gene expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. Thesis, East Carolina University.
- Luti, K. J. K. and F. Mavituna (2011). "Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with dead cells of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in a bioreactor increases production of undecylprodigiosin." Applied Microbiology and Biotechnology **90**: 461-466.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon and G. B. Pier (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." Microbes and Infection **2**: 1051-1060.
- Mahlen, S. D. (2011). "*Serratia* infections: from military experiments to current practice " Clinical Microbiology Reviews **24**: 755-791.
- Maiya, S., A. Grundmann, X. Li, S. M. Li and G. Turner (2007). "Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*." ChemBioChem **8**: 1736-1743.
- Maltais, F., J. Bourbeau, S. Shapiro, Y. Lacasse, H. Perrault, M. Baltzan, P. Hernandez, M. Rouleau, M. Julien, S. Parenteau, B. Paradis, R. D. Levy, P. Camp, R. Lecours, R. Audet, B. Hutton, J. R. Penrod, D. Picard and S. Bernard (2008). "Effects of home-based pulmonary rehabilitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial." Annals of Internal Medicine **149**: 869-878.
- Manteca, A., D. Claessen, C. Lopez-Iglesias and J. Sanchez (2007). "Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event." FEMS Microbiology Letters **274**: 118-125.
- Marahiel, M. A. and L. O. Essen (2009). "Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains." Methods in Enzymology **458**: 337-351.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang and S. H. Bryant (2009). "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." Nucleic Acids Research **37**: D205-210.
- Martin, J. F. and P. Liras (2010). "Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*." Current Opinion in Microbiology **13**: 263-273.
- Martins, M. B. and I. Carvalho (2007). "Diketopiperazines: Biological Activity and Synthesis." Tetrahedron **63**: 9923-9932.
- Mayden, R., L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Species: the units of biodiversity. M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson. London, Chapman and Hall: 381-424.
- Mehling, A., U. F. Wehmeier and W. Piepersberg (1995). "Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR." Microbiology **141**: 2139-2147.

- Melvin, M. S., K. E. Wooton, C. C. Rich, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist and R. A. Manderville (2001). "Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrolic natural products." Journal of Inorganic Biochemistry **87**: 129-135.
- Menzella, H. G., R. Reid, J. R. Carney, S. S. Chandran, S. J. Reisinger, K. G. Patel, D. A. Hopwood and D. V. Santi (2005). "Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes." Nature Biotechnology **23**: 1171-1176.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman and W. Fenical (2002). "Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments." Applied and Environmental Microbiology **68**: 5005-5011.
- Miyata, M., J. F. Raven, D. Baltzis, A. E. Koromilas and H. Sabe (2008). "IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of monocyte U937 cells." Cell Cycle **7**: 3273-3281.
- Mo, S., B. Kim and K. Reynolds (2005). "Production of branched-chain alkylprodiginines in *S.coelicolor* by replacement of the 3-ketoacyl ACP synthase III initiation enzyme, RedP." Chemistry & Biology **12**: 191-2000.
- Moore, B. S. (2008). "Extending the biosynthetic repertoire in ribosomal peptide assembly." Angewandte Chemie International Edition in English **47**: 9386-9388.
- Mootz, H. D., D. Schwarzer and M. A. Marahiel (2002). "Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases." ChemBioChem **3**: 490-504.
- Mwirichia, R., A. W. Muigai, B. Tindall, H. I. Boga and E. Stackebrandt (2010). "Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya." Extremophiles **14**: 339-348.
- Narasimhachari, N. and M. B. Swami (1970). "Dermostatin: a revised hexaene structure." Journal of Antibiotics **23**: 566-571.
- Narva, K. E. and J. S. Feitelson (1990). "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Journal of Bacteriology **172**: 326-333.
- Nett, M., H. Ikeda and B. S. Moore (2009). "Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes." Natural Product Reports **26**: 1362-1384.
- Nettles, J. H., H. Li, B. Cornett, J. M. Krahn, J. P. Snyder and K. H. Downing (2004). "The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography." Science **305**: 866-869.
- Neumann, A., M. Baginski and J. Czub (2010). "How Do Sterols Determine the Antifungal Activity of Amphotericin B? Free Energy of Binding between the Drug and Its Membrane Targets." Journal of American Chemical Society **132**: 18266-18272.
- Nguyen, K. T., D. Ritz, J. Q. Gu, D. Alexander, M. Chu, V. Miao, P. Brian and R. H. Baltz (2006). "Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 17462-17467.
- Nguyen, T., K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck and J. Piel (2008). "Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection." Nature Biotechnology **26**: 225-233.
- Nicholson, B., G. K. Lloyd, B. R. Miller, M. A. Palladino, Y. Kiso, Y. Hayashi and S. T. Neuteboom (2006). "NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent." Anticancer Drugs **17**: 25-31.
- Nieselt, K., F. Battke, A. Herbig, P. Bruheim, A. Wentzel, O. M. Jakobsen, H. Sletta, M. T. Alam, M. E. Merlo, J. Moore, W. A. Omara, E. R. Morrissey, M. A. Juarez-Hermosillo, A. Rodriguez-Garcia, M. Nentwich, L. Thomas, M. Iqbal, R. Legaie, W. H. Gaze, G. L. Challis, R. C. Jansen, L. Dijkhuizen, D. A. Rand, D. L. Wild, M. Bonin, J. Reuther, W. Wohlleben, M. C. Smith, N. J. Burroughs, J. F. Martin, D. A. Hodgson, E. Takano, R. Breitling, T. E. Ellingsen and E. M. Wellington (2010). "The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*." BMC Genomics **11**: 10.

- Nikodinovic, J. (2004). Molecular genetics of amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*. PhD, The University of New South Wales.
- Nikodinovic, J., K. D. Barrow and J. A. Chuck (2003). "High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*." Biotechniques **35**: 932-934, 936.
- Nisbet, J., L. and M. Moore (1997). "Will natural products remain an important source of drug research for the future?" Current Opinion in Biotechnology **8**: 708-712.
- Ochi, K. (1995). "A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30." International Journal of Systematic Bacteriology **45**: 507-514.
- Ogita, A., K. Fujita, Y. Usuki and T. Tanaka (2010). "Targeted yeast vacuole disruption by polyene antibiotics with a macrocyclic lactone ring." International Journal of Antimicrobial Agents **35**: 89-92.
- Olano, C., F. Lombó, C. Méndez and J. A. Salas (2008). "Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering." Metabolic Engineering **10**: 281.
- Omura, S. and H. Tanaka (1984). Production, structure and antifungal activity of polyene macrolides. Macrolide Antibiotics: chemistry, biology and practice, Academic Press, Inc: 351-396.
- Pandey, R., R. Chander and K. B. Sainis (2009). "Prodigiosins as anti cancer agents: Living upto their name." Current Pharmaceutical Design **15**: 732-741.
- Papić, N. (2000). Izolacija aktinomiceta iz zemlje i njihova karakterizacija. Diplomski rad, Univerzitet u Beogradu.
- Parsons, W. H., N. H. Sigal and M. J. Wyvratt (1993). "FK-506--a novel immunosuppressant." Annals of the New York Academy of Sciences **685**: 22-36.
- Pathom-Aree, W., J. E. Stach, A. C. Ward, K. Horikoshi, A. T. Bull and M. Goodfellow (2006). "Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench." Extremophiles **10**: 181-189.
- Peiru, S., H. G. Menzella, E. Rodriguez, J. Carney and H. Gramajo (2005). "Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*." Applied and Environmental Microbiology **71**: 2539-2547.
- Perez-Tomas, R., B. Montaner, E. Llagostera and V. Soto-Cerrato (2003). "The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties." Biochemical Pharmacology **66**: 1447-1452.
- Perez-Tomas, R. and M. Vinas (2010). "New insights on the antitumoral properties of prodiginines." Current Medicinal Chemistry **17**: 2222-2231.
- Perez Luz, S., F. Rodriguez-Valera, R. Lan and P. R. Reeves (1998). "Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies." Journal of Bacteriology **180**: 2144-2151.
- Pernodet, J., L., Boccard, F., Alegre, M., T., Gagnat, J., Guerineau, M. (1989). "Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens*." Gene **79**: 33-46.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach (1999). "Recent trends in the biochemistry of surfactin." Applied Microbiology and Biotechnology **51**: 553-563.
- Pfeifer, B. A. and C. Khosla (2001). "Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**: 106-118.
- Pieper, R., S. E. Khosla, D. E. Cane and C. Khosla (1996). "Erythromycin biosynthesis: Kinetic studies on a fully active modular polyketide synthase using natural and unnatural substrates." Biochemistry **35**: 2054-2060.
- Ploux, O., P. Soularue, A. Marquet, R. Gloeckler and Y. Lemoine (1992). "Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate." Biochemical Journal **287**: 685-690.

- Podschun, R. and U. Ullman (1998). "*Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors." Clinical Microbiology Reviews **11**: 589–603.
- Polsinelli, M., A. Albertini, G. Cassani and O. Ciferri (1965). "Relation of biochemical mutations to actinomycin synthesis in *Streptomyces antibioticus*." Journal of General Microbiology **39**: 239-246.
- Prasad, C. (1995). "Bioactive cyclic dipeptides." Peptides **16**: 151-164.
- Prasad, C. (2001). "Role of endogenous cyclo(His-Pro) in voluntary alcohol consumption by alcohol-preferring C57BL mice." Peptides **22**: 2113-2117.
- Prasad, C. (2005). Food-Derived Neuroactive Cyclic Dipeptides. Nutritional Neuroscience. R. B. K. Edited by Harris R. Lieberman, Chandan Prasad, CRC Press
- Prasad, C., A. Jayaraman, H. J. Robertson and J. K. Rao (1987). "Is all cyclo(His-Pro) derived from thyrotropin-releasing hormone?" Neurochemical Research **12**: 767-774.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C.W., and Benedict, R.G. (1958). "A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups." Journal of Bacteriology: 52-57.
- Rastelli, G., R. Rosenfeld, R. Reid and D. V. Santi (2008). "Molecular modeling and crystal structure of ERK2-hypothemycin complexes." Journal of Structural Biology **164**: 18-23.
- Recamier, K. S., A. Hernandez-Gomez, J. Gonzalez-Damian and I. Ortega-Blake (2010). "Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes." Journal of Membrane Biology **237**: 31-40.
- Reeves, C. D., S. Murli, G. W. Ashley, M. Piagentini, C. R. Hutchinson and R. McDaniel (2001). "Alteration of the substrate specificity of a modular polyketide synthase acyltransferase domain through site-specific mutations." Biochemistry **40**: 15464-15470.
- Rice, K. C. and K. W. Bayles (2003). "Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death." Molecular Microbiology **50**: 729-738.
- Ridley, C. P., H. Y. Lee and C. Khosla (2008). "Evolution of polyketide synthases in bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 4595.
- Rigali, S., H. Nothaft, E. E. Noens, M. Schlicht, S. Colson, M. Muller, B. Joris, H. K. Koerten, D. A. Hopwood, F. Titgemeyer and G. P. van Wezel (2006). "The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development." Molecular Microbiology **61**: 1237-1251.
- Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A. W. Thomae, D. A. Hopwood and G. P. van Wezel (2008). "Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*." EMBO Reports **9**: 670-675.
- Robinson, D. J., P. McMorn, D. Bethell, P. C. B. Bulman Page, C. Sly, F. King, F. E. Hancock and G. J. Hutchings (2001). "N-oxidation of pyridines by hydrogen peroxide in the presence of TS-1." Catalysis Letters **72**: 233-234.
- Ronaghi, M., M. Uhlen and P. Nyren (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." Science **281**: 363, 365.
- Rossello-Mora, R. and R. Amann (2001). "The species concept for prokaryotes." FEMS Microbiology Reviews **25**: 39-67.
- Rudd, B. A. and D. A. Hopwood (1980). "A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster." Journal of General Microbiology **119**: 333-340.
- Rychnovsky, S. D. and T. I. Richardson (1995). "Relative and Absolute Configuration of Filipin III." Angewandte Chemie International Edition in English **34**: 1227-1230.
- Saddler, G. S., A. O'Donell, G., M. Goodfellow and D. E. Minikin (1987). "SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids." Journal of General Microbiology **133**: 1137-1147.

- Saintpierre-Bonaccio, D., H. Amir, R. Pineau, G. Y. Tan and M. Goodfellow (2005). "Amycolatopsis plumensis sp. nov., a novel bioactive actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 2057-2061.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., . (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F, N. S., Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**: 5463-5467.
- Savic, M., I. Bratic and B. Vasiljevic (2007). "*Streptomyces* durmitorensis sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **57**: 2119-2124.
- Savic, M. and B. Vasiljevic (2006). "Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **33**: 423-430.
- Savić, M. (2001). Razvoj metode za identifikaciju aktinomiceta i detekcija gena za biosintezu makrolidnih imunosupresora, diplomski rad, Univerzitet u Beogradu.
- Savić, M. (2004). Izolovanje i identifikacija soja *Streptomyces* sp. MS405, proizvođača novog imunosupresora. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu.
- Schirmer, A., R. Gadkari, C. D. Reeves, F. Ibrahim, E. F. DeLong and C. R. Hutchinson (2005). "Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*." Applied and Environmental Microbiology **71**: 4840-4849.
- Schlegel, H. G., H. Kaltwasser and G. Gottschalk (1961). "[A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]." Archives of Microbiology **38**: 209-222.
- Schlegel, R. and H. Thrum (1971). "A new polyene antibiotic, flavomycoin. Structural investigations. II. ." Journal of Antibiotics **24**: 368-374.
- Schlegel, R., H. Thrum, J. Zielinski and E. Borowski (1981). "The structure of roflamycoin, a new polyene macrolide antifungal antibiotic." Journal of Antibiotics (Tokyo) **34**: 122-123.
- Schobesberger, M., A. Baltzer, A. Oberli, A. Kappeler, M. Gugger, H. Burger and R. Jaggi (2008). "Gene expression variation between distinct areas of breast cancer measured from paraffin-embedded tissue cores." BMC Cancer **8**: 343.
- Schwarzer, D., R. Finking and M. A. Marahiel (2003). "Nonribosomal peptides: from genes to products." Natural Product Reports **20**: 275-287.
- Selvameenal, L., M. Radhakrishnan and R. Balagurunathan (2009). "Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening." Indian Journal of Pharmaceutical Sciences **71**: 499-504.
- Shatalin, K., E. Shatalina, A. Mironov and E. Nudler (2011). "H₂S: A universal defense against antibiotics in bacteria." Science **334**: 986-990.
- Shen, B. (2000). "Biosynthesis of aromatic polyketides." Topics in Current Chemistry **209**: 1-51.
- Shen, B. (2003). "Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms." Current Opinion in Chemistry & Biology **7**: 285-295.
- Shen, B., L. Du, C. Sanchez, D. J. Edwards, M. Chen and J. M. Murrell (2001). "The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **27**: 378-385.
- Shepherd, M. D., M. K. Kharel, M. A. Bosserman and J. and Rohr (2010). Laboratory Maintenance of *Streptomyces* Species Current Protocols in Microbiology.
- Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks, J. B. (1986). Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sieber, S. A. and M. A. Marahiel (2003). "Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides." Journal of Bacteriology **185**: 7036-7043.
- Simonson, C., T. Kokjohn and R. Miller (1990). "Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO." Journal of General Microbiology **136**: 1241-1249.
- Singh, B. and D. A. Mitchison (1954). "Bactericidal activity of streptomycin and isoniazid against tubercle bacilli." British Medical Journal **1**: 130-132.
- Sinha, S., R. Srivastava, E. De Clercq and R. K. Singh (2004). "Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1,3-dideazapurine and diketopiperazine." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **23**: 1815-1824.
- Skoko, N., J. Vujovic, M. Savic, N. Papic, B. Vasiljevic and G. Ljubijankic (2005). "Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes." Journal of Microbiological Methods **61**: 137-140.
- Smirnova, N. and K. A. Reynolds (2001). "Engineered fatty acid biosynthesis in *Streptomyces* by altered catalytic function of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III." Journal of Bacteriology **183**: 2335-2342.
- Sola-Landa, A., R. S. Moura and J. F. Martin (2003). "The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 6133-6138.
- Soto-Hernandez, J. L., D. Nunley, S. Holtsclaw-Berk and S. L. Berk (1988). "Selective medium with DNase test agar and a modified toluidine blue O technique for primary isolation of *Branhamella catarrhalis* in sputum." Journal of Clinical Microbiology **26**: 405-408.
- Stackebrandt, E., D. Witt, C. Kemmerling, R. Kroppenstedt and W. Liesack (1991). "Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes." Applied and Environmental Microbiology **57**: 1468-1477.
- Stafsnes, M. H., K. D. Josefsen, G. Kildahl-Andersen, S. Valla, T. E. Ellingsen and P. Bruheim (2010). "Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties." Journal of Microbiology **48**: 16-23.
- Stankovic, N., V. Radulovic, M. Petkovic, I. Vuckovic, M. Jadranin, B. Vasiljevic and J. Nikodinovic-Runic (2012). "*Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative and UV-protective properties." Industrial Microbiology and Biotechnology.
- Starcevic A, Z. J., Simunkovic J, Long PF, Cullum J, Hranueli D. (2008). "ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures." Nucleic Acids Research **36**: 6882-6892.
- Staric, N., T. Danevcic and D. Stopar (2010). "*Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production - A competitive advantage in the environment." Microbial Ecology **60**: 592-598.
- Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Natural Product Reports **18**: 380-416.
- Stebbins, C. E., A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl and N. P. Pavletich (1997). "Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent." Cell **89**: 239-250.
- Stierle, A. C., J. H. Cardellina and G. A. Strobel (1985). "Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**: 8008-8011.
- Stodulkova, E., M. Kuzma, I. B. Hench, J. Cerny, J. Kralova, P. Novak, M. Chudickova, M. Savic, L. Djokic, B. Vasiljevic and M. Fliieger (2011). "New polyene macrolide family produced by submerged culture of *Streptomyces durmitorensis*." Journal of Antibiotics (Tokyo) **64**: 717-722.

- Szafranska, A. E., T. S. Hitchman, R. J. Cox, J. Crosby and T. J. Simpson (2002). "Kinetic and mechanistic analysis of the malonyl CoA:ACP transacylase from *Streptomyces coelicolor* indicates a single catalytically competent serine nucleophile at the active site." Biochemistry **41**: 1421-1427.
- Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi and K. Sakata (1994). "A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **58**: 1780-1783.
- Tan, G. Y., S. Robinson, E. Lacey and M. Goodfellow (2006). "*Amycolatopsis australiensis* sp. nov., an actinomycete isolated from arid soils." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 2297-2301.
- Teerlink, T., B. de Kruijff and R. A. Demel (1980). "The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content." Biochimica et Biophysica Acta **599**: 484-492.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson and D. G. Higgins (2002). "Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX." Current Protocols in Bioinformatics **Chapter 2**: Unit 2.3.
- Thorson, J., S., Hosted, T., J., Jiang, J., Q., Biggins, J., B. and Ahlert, J. (2001). "Nature's carbohydrate chemists: the enzymatic glycolisation of bioactive bacterial metabolites." Current Organic Chemistry **5**: 139-167.
- Tian, X. P., Y. Xu, J. Zhang, J. Li, Z. Chen, C. J. Kim, W. J. Li, C. S. Zhang and S. Zhang (2012). "*Streptomyces oceani* sp. nov., a new obligate marine actinomycete isolated from a deep-sea sample of seep authigenic carbonate nodule in South China Sea." Antonie Van Leeuwenhoek **102**: 335-343.
- Tindall, B. J., J. Sikorski, R. A. Smibert and N. R. Krieg (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. Methods for General and Molecular Microbiology. C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznaket al. Washington, D.C, ASM Press: 330-393.
- Tsao, S. W., B. A. Rudd, X. G. He, C. J. Chag and H. G. Floss (1985). "Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives." Journal of Antibiotics (Tokyo) **38**: 128-131.
- Tseng, C. C., S. D. Bruner, R. M. Kohli, M. A. Marahiel, C. T. Walsh and S. A. Sieber (2002). "Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase." Biochemistry **41**: 13350-13359.
- Tsoi, C. J. and C. Khosla (1995). "Combinatorial biosynthesis of 'unnatural' natural products: the polyketide example." Chemistry & Biology **2**: 355-362.
- Tsuji, S. Y., D. E. Cane and C. Khosla (2001). "Selective protein-protein interactions direct channeling of intermediates between polyketide synthase modules." Biochemistry **40**: 2326-2331.
- Tucić, N. and D. Cvetković (2000). Evoluciona biologija. Beograd, NNK Internacional.
- Turina, S. (1984). Tankoslojna kromatografija. Zagreb, Sveučilišna naklada Liber.
- Umezawa, H., M. Ueda, K. Maeda, K. Yagishita, S. Kondo, Y. Okami, R. Utahara, Y. Osato, K. Nitta and T. Takeuchi (1957). "Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin." Journal of Antibiotics (Tokyo) **10**: 181-188.
- Uttley, A. H., C. H. Collins, J. Naidoo and R. C. George (1988). "Vancomycin-resistant enterococci." Lancet **1**: 57-58.
- Van Eldere, J. (2003). "Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **51**: 347-352.
- van Wezel, G. P., J. White, G. Hoogvliet and M. J. Bibb (2000). "Application of redD, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*." J Molecular Microbiology and Biotechnology **2**: 551-556.

- Vandenbroucke, K., S. Robbens, K. Vandepoele, D. Inze, Y. Van de Peer and F. Van Breusegem (2008). "Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: A comparative analysis." Molecular Biology Evolution **25**: 507-516.
- Vebo, H. C., L. Snipen, I. F. Nes and D. A. Brede (2009). "The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood." PLoS One **4**: e7660.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann and P. Philippsen (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **10**: 1793-1808.
- Walker, G. M. (1998). Yeast Physiology and Biotechnology, John Wiley & Sons.
- Walker, R. D. and J. E. Hawkins (1952). "The ultraviolet absorption spectra of some terpene hydrocarbons." Journal of American Chemical Society **74**: 4209-4210.
- Wallace, G. I., I. Rhymer and et al. (1945). "Studies on mode of action of streptomycin." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **60**: 127-131.
- Walsh (2000). "Molecular mechanism that confer antibacterial drug resistance." Nature **406**: 775-781.
- Walsh, C. T. (2003). Antibiotics: actions, origins, and resistance. Washington, D.C., ASM Press.
- Wang, D.-X., M.-T. Liang, G.-J. Tian, H. Lin and H.-Q. Liu (2002). "A facile pathway to synthesize diketopiperazine derivatives." Tetrahedron Letters **43**: 865-867.
- Wasserman, H. H., R. J. Skles, P. Peverada, C. K. Shaw, R. J. Cushley and C. R. Lipsky (1973). "Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of C-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by fourier transform nuclear magnetic resonance." Journal of the American Chemical Society **95**: 6874-6875.
- Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog and B. D. Bhole (2001). "How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?" Archives of Microbiology **176**: 386-390.
- Wei, Y.-H. and W.-C. Chen (2005). "Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMDR by medium improvement and oil-supplementation strategies." Journal of Bioscience and Bioengineering **99**: 616-622.
- Wei, Y.-H., W.-J. Yu and W.-C. Chen (2005). "Enhanced undecylprodigiosin production from *Serratia marcescens* SS-1 by medium formulation and amino- acid supplementation " Journal of Bioscience and Bioengineering **100**: 466-471.
- Wenner, T., V. Roth, B. Decaris and P. Leblond (2002). "Intragenomic and intraspecific polymorphism of the 16S-23S rDNA internally transcribed sequences of *Streptomyces ambifaciens*." Microbiology **148**: 633-642.
- Williams, R. P., J. A. Green and D. A. Rappo-Port (1956). "Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. I Spectral and paper chromatographic properties of prodigiosin." Journal of Bacteriology **71**: 115-120.
- Williamson, N. R., P. C. Fineran, T. Gristwood, S. R. Chawrai, F. J. Leeper and G. P. C. Salmond (2007). "Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines." Future Microbiology **2**: 605-618.
- Williamson, N. R., P. C. Fineran, F. J. Leeper and G. P. C. Salmond (2006). "The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines." Nature Reviews Microbiology **4**: 887-899.
- Wink, J. M. (2009). Compendium of Actinobacteria U. o. Braunschweig.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston and R. W.

- Davis (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." Science **285**: 901-906.
- Woese, C. (1987). "Bacterial evolution." Microbiological Reviews **51**: 221-271.
- Wright, L. F. and D. A. Hopwood (1976). "Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Journal of General Microbiology **96**: 289-297.
- Yamada, Y. (1999). Autoregulatory factors and regulation of antibiotic production in *Streptomyces*. Microbial Signalling and Communication. R. England, G. Hobbs, N. Bainton and D. L. McRoberts. Cambridge, UK, Society for General Microbiology, Cambridge University Press: 177-196.
- Yamazaki, H., A. Tomono, Y. Ohnishi and S. Horinouchi (2004). "DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*." Molecular Microbiology **53**: 555-572.
- Yang, L., R.-x. Tan, Q. Wang, W.-y. Huang and Y.-x. Yin (2002). "Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin." Tetrahedron Letters **43**: 6545-6548.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.
- Zager, R. A. (2000). "Polyene antibiotics: Relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content." American Journal of Kidney Diseases **36**: 238-249.
- Zazopoulos, E., K. Huang, A. Staffa, W. Liu, B. O. Bachmann, K. Nonaka, J. Ahlert, J. S. Thorson, B. Shen and C. M. Farnet (2003). "A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways." Nature Biotechnology **21**: 187-190.
- Zhou, Z., J. Gu, Y. Q. Li and Y. Wang (2012). "Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*." BMC Bioinformatics **13 Suppl 10**: S8.
- Zotchev, S. B. (2003). "Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy." Current Medicinal Chemistry **10**: 211-223.

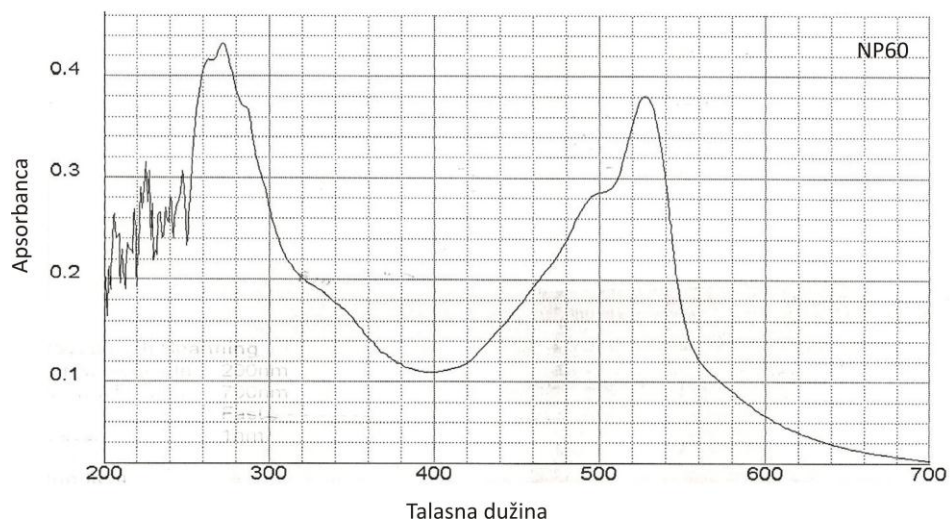
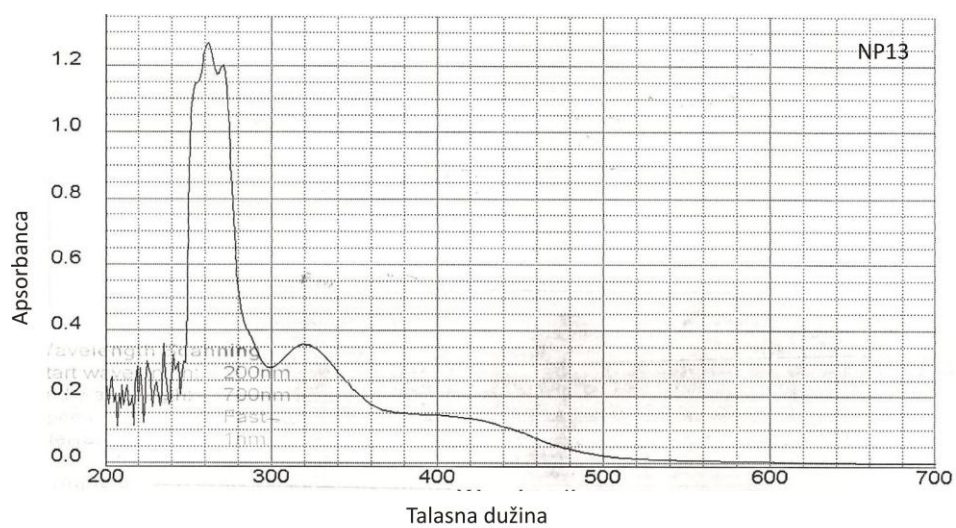
Prilog I: Oligonukleotidi korišćeni u sekvenciranju PKS klastera iz *Streptomyces durmitorensis* MS405T

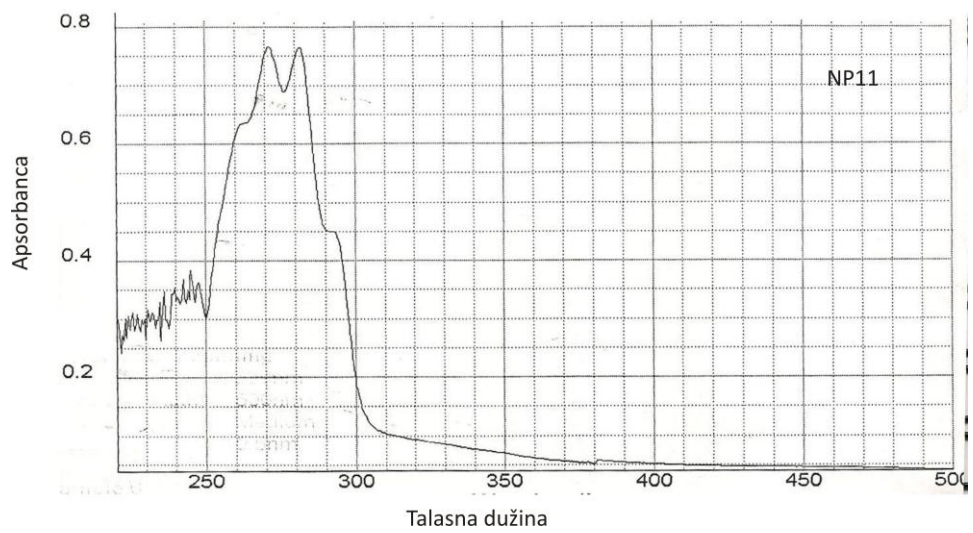
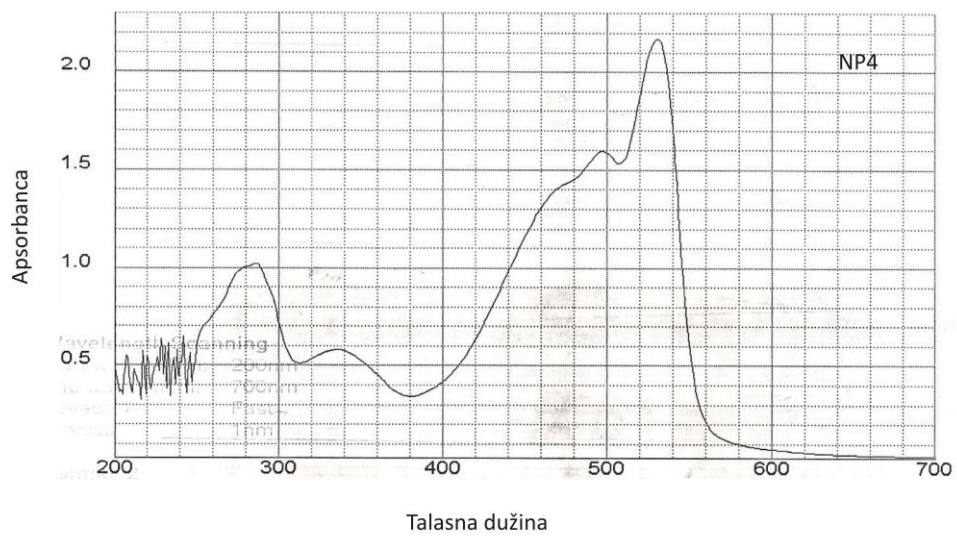
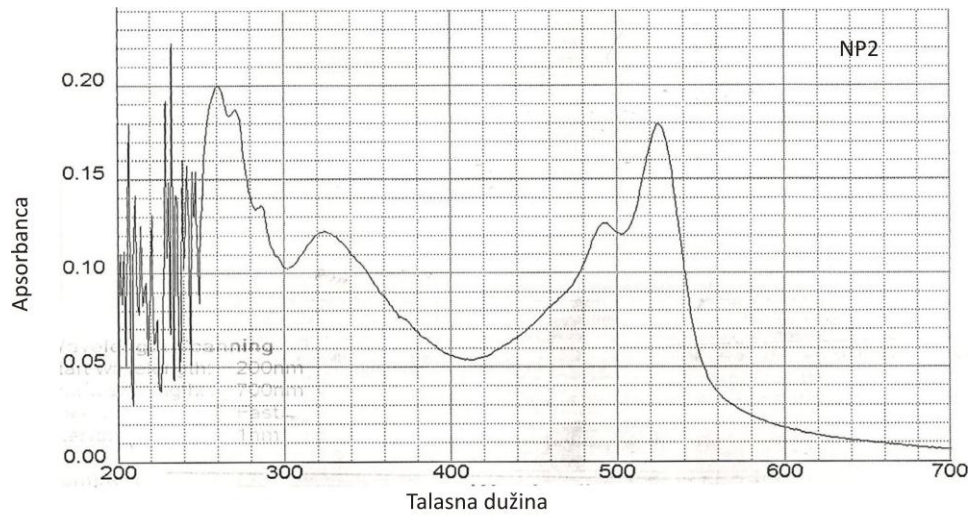
Naziv	sekvenca	Referenca/izvor
cos83T87A rev ds1	CGGGAGTCTTCATCGACTTC	ovaj rad
cos83T82ap	CACCCAGTCCAGGCGGAACAGC	ovaj rad
cos83T82ap	CGGAGGAACTGTGGGACG	ovaj rad
cos83T74	ACCCCGTACTCGCGGTGGTC	ovaj rad
cos83T69A ap	GACAGCTCGGTCCTGGTGAC	ovaj rad
cos83T68	CGGAGGAACTGTGGGACG	ovaj rad
cos83T68	CGGAGGAACTGTGGGACG	ovaj rad
cos83T35	CTCGTCGAACGTGGACTG	ovaj rad
cos83T35	CTCGTCGAACGTGGACTG	ovaj rad
cos83T25ap	GTTCCCCGTCAACCGTGGCTGG	ovaj rad
cos83T25ap	GTTCCCCGTCAACCGTGGCTGG	ovaj rad
cos83T120 ap	ACGAGCCGTCACCCACG	ovaj rad
cos83T120 ap	ACGAGCCGTCACCCACG	ovaj rad
cos18Rds	GAACGTCCTCGTGGTGGAG	ovaj rad
cos18R	GAGTGCAAATGGGGTTGAGG	ovaj rad
cos16T72ap	TGATCTGCTGGCTGCCGTAICTCG	ovaj rad
cos16T68ap	CGGAGCAGACGGCACTGACCTC	ovaj rad
cos16T68	CGAGGGTGTGAGTACGTTTCG	ovaj rad
c83T7prDS3	ACGAGGACGGCTGGAAGC	ovaj rad
c83T7prDS2	GTACACCCGGCGCTCCTT	ovaj rad
c83T7pr ds3	ACGAGGACGGCTGGAAGC	ovaj rad
c83T7pr ds2	GTGGACTCGCTGGTTCCTT	ovaj rad
c83T7pr ds	CCGACCTACGCCTTCCAGTA	ovaj rad
c83T76	GAGACACCCAGCACGACTCC	ovaj rad
c83T44us2	CTTCACGGCATCAGCAAGC	ovaj rad
c83T44	ATGGAACCGAACGGCCCCACGC	ovaj rad
c83T3pr us	CAGTTCGACCGGCATGGAC	ovaj rad
c83T145ds	GGCCCACCGCGCACCGCG	ovaj rad

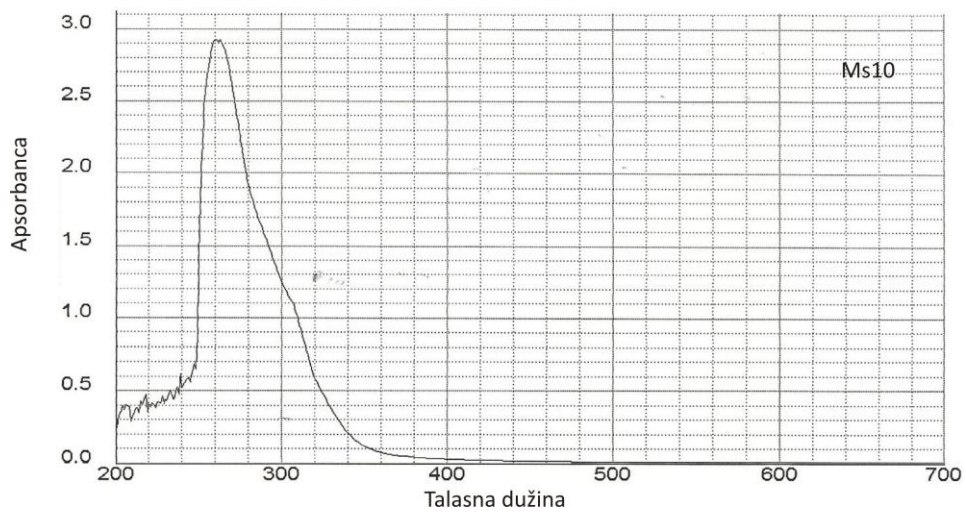
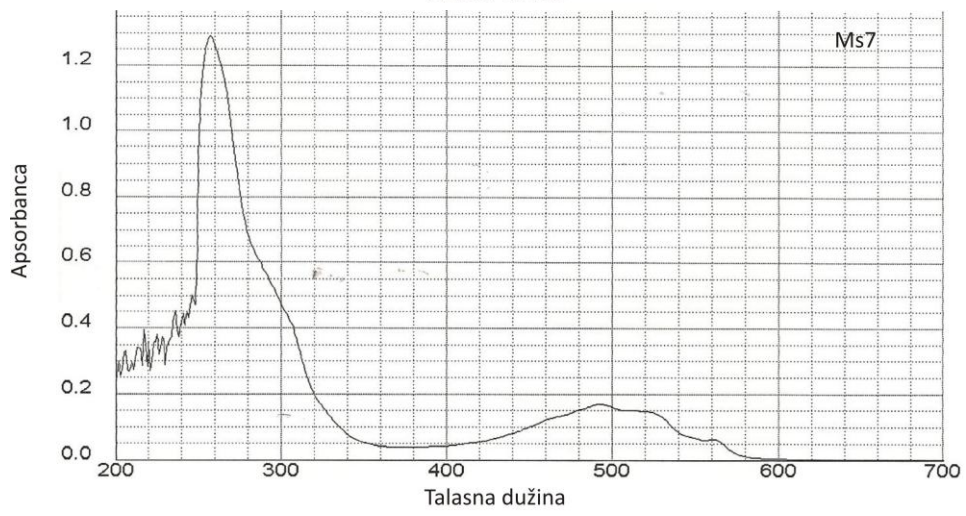
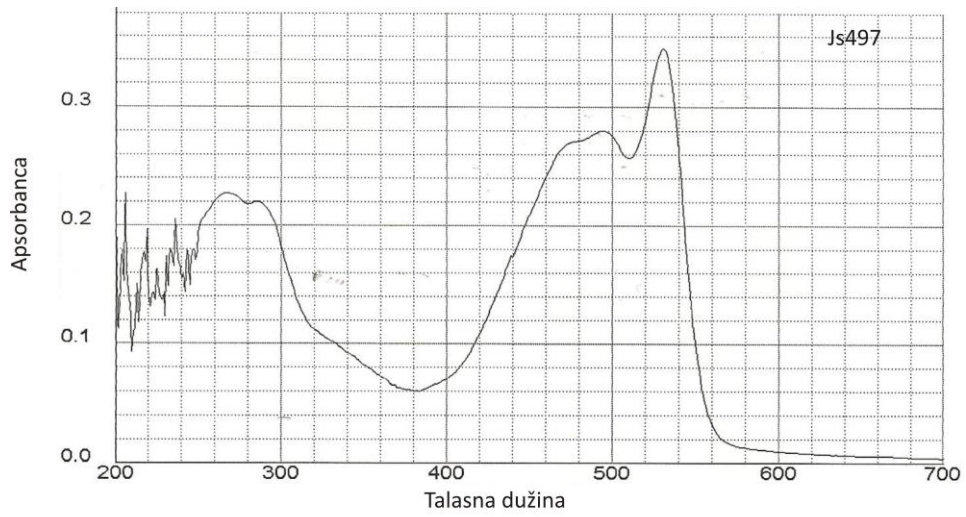
Oligonukleotidi korišćeni u sekvenciranju PKS klastera iz *Streptomyces durmitorensis* MS405^T (nastavak)

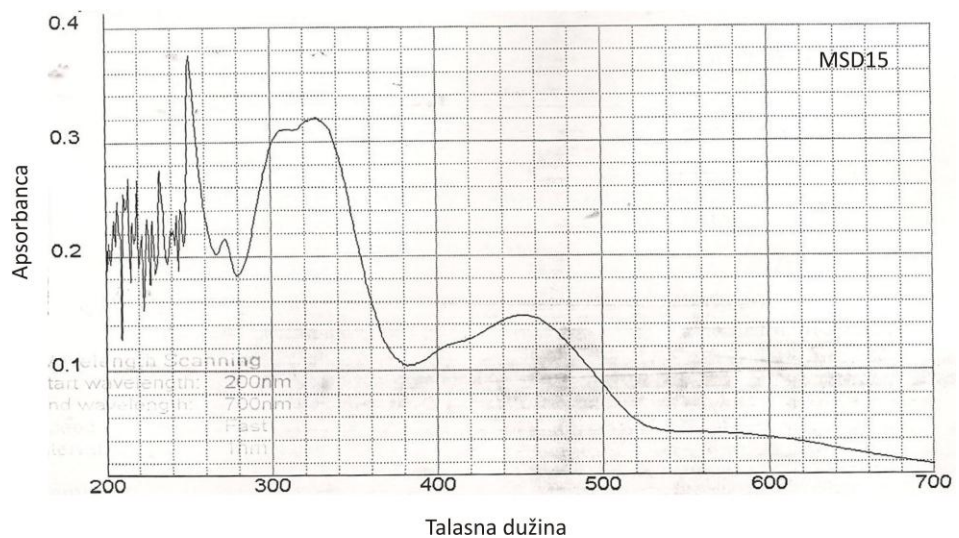
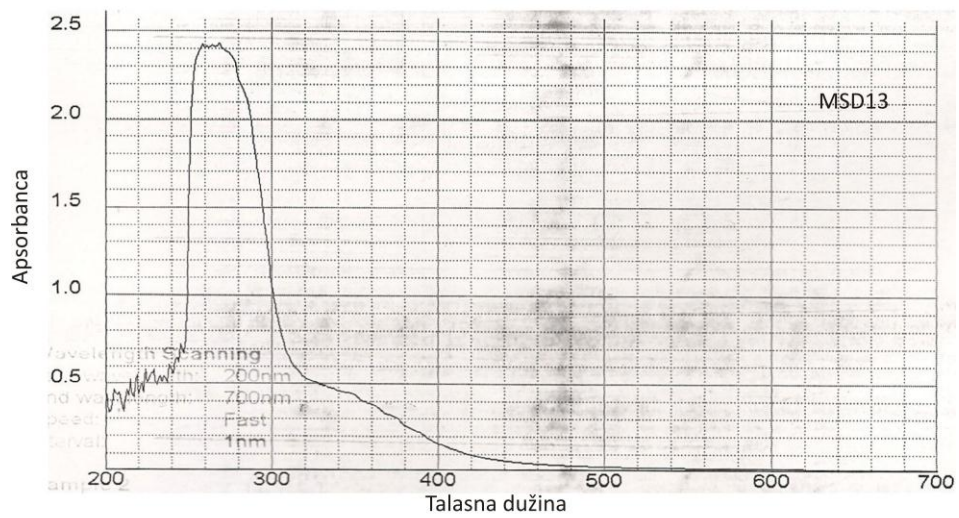
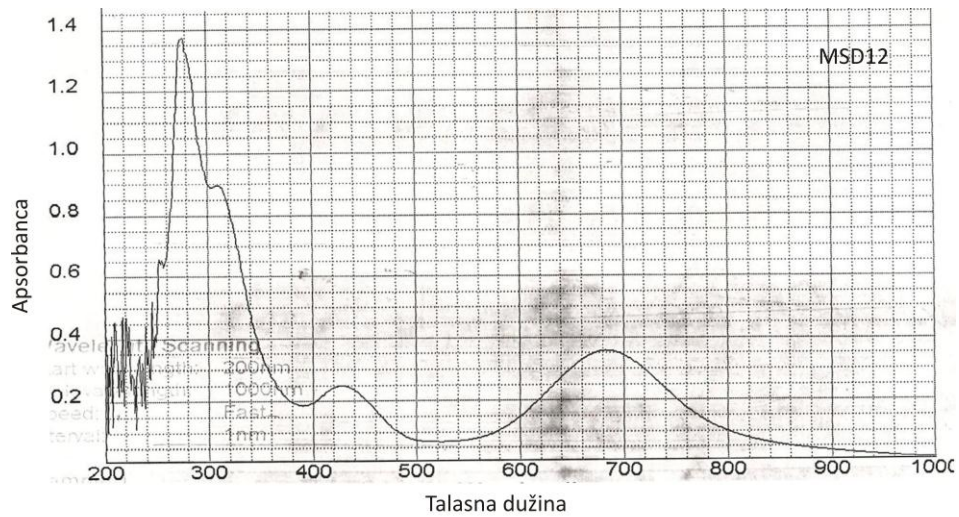
Naziv	sekvenca	Referenca/izvor
c83T145	GAAGAACACATCCCAGTCCA	ovaj rad
c83T120Rds	CTGTTCCGTCTCCTCGAGTC	ovaj rad
c83T120R	GCAGGTACGCGAAGTCCTCTT	ovaj rad
c33021ds2	ACTTGAGCGAGCCAAGGAG	ovaj rad
c33021ds	TCAAACAGGGACCGTGTCTGT	ovaj rad
c18021us2	GCGGTCAGTGAGTCGAAGC	ovaj rad
c18021ds2	GCCGTGTAGCTGCTGAGAGA	ovaj rad
c18021 us	TCCAGGAGTAACCGCTGCTG	ovaj rad
c18021 ds	CCTGCTCGTCCCTCCCTGGT	ovaj rad
c18010ds2	GATACGTCCTGTCAAGCGAGA	ovaj rad
c18010ds	GCGACATCAACCCCTATGGA	ovaj rad
c18008ds	CGCTGAGTGTGAAGGACGAC	ovaj rad
c18007us	GGCTCGACCAGGATTAGGG	ovaj rad
c18006us3	AGAACATGGGCACAAGCAC	ovaj rad
c18006us2	GAGGCCGAAGACGTAGGACA	ovaj rad
c18006 us	CGCACACACCATTCTGGAACA	ovaj rad
c18006 ds	GCAGCGCCATCACCATCTT	ovaj rad
c18003us3	GGTCAGCGAGGTGATCGTG	ovaj rad
c18003us2	TGCTCCTCCTTCCGTGAGAC	ovaj rad
c18003us	CGAAGATGCGCAAGTAGCC	ovaj rad
c18003ds	GGCAGCCAGGAGAAGTTGAT	ovaj rad
c18001us3	ACCGGCTTCCTCACCACAG	ovaj rad
c18001us2	ATCGACGCCTCTACGACAGC	ovaj rad
c18001 us	GTCCTCACCATCGGCGTGTC	ovaj rad
c18001 ds	GCGCACGACTCCATCAGCTC	ovaj rad
c16T7pr us	CTCGTTCTGCGTCTCGTCCT	ovaj rad
c16T65ds	CGACGAACTCGGAAAGTCCT	ovaj rad
c16T55ds	GCTGTCTTGGTGGACGAG	ovaj rad
c16T23ds	TTCTCTCCTACTCCTCGAT	ovaj rad
c135bcs210-3ds	CAGACGTTGCATGTGGAT	ovaj rad

Prilog II: Izabrani UV/Vis spektri proveravanih sojeva iz kolekcije zemljišnih izolata









Prilog III: Sporulacija sojeva aktinomiceta iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, IMGGI, na različitim čvrstim podlogama

Soj	TSB	MSF	TO	GYM	YMM
<i>Streptomyces durmitorensis</i> wt	--- ^a	++- ^b	+++ ^c	+-- ^d	+--
<i>Streptomyces durmitorensis</i> A10	---	+--	---	n.r. ^e	n.r.
NP2	n.r.	n.r.	+++	+++	n.r.
NP4	---	+++	+++	+++	n.r.
NP10	+--	+++	+++	+++	n.r.
NP11	n.r.	+++	n.r.	n.r.	n.r.
NP12	n.r.	n.r.	n.r.	+++	n.r.
NP13	n.r.	n.r.	++-	+--	n.r.
NP60	n.r.	n.r.	+++	n.r.	+++
MSG12	n.r.	+++	+++	n.r.	+++
MSG13	n.r.	+++	+++	n.r.	+++
MSD12	n.r.	+++	+++	+-	n.r.
MSD13	n.r.	+++	+++	---	n.r.
MSD15	n.r.	n.r.	+++	n.r.	+++
JS497	n.r.	n.r.	+++	n.r.	+++
JS520	n.r.	+++	+++	n.r.	+++
MS7	n.r.	+++	+-	n.r.	+--
MS10	n.r.	+-	n.r.	n.r.	+++

^a nije detektovana sporulacija ni nakon 14 dana; ^b srednja sporulacija detektovana nakon 7 dana; ^c dobra sporulacija detektovana nakon 3-4 dana; ^d slaba sporulacija detektovana nakon 10 dana; ^e nije ispitivano.

Prilog IV: 16S rDNK sekvence sojeva NP10 i JS520

Parcijalna sekvenca (1224 bp) 16S rDNK soja NP10:

AATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGC
 CCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
 AGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
 GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
 TTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATT
 CGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC
 AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCG
 AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTAG
 GTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGC
 TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATG
 GTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTAT
 GGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCAT
 GCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGA
 GGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA
 GTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCCGGCCTTGTACA
 CACCCCC

Prvih 10 rezultata pretraživanja banke podataka NCBI za soj NP10. Lista je generisana korišćenjem BLAST algoritma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pokrivenost pretraživanja 100%; E vrednost = 0,0; Maksimalna identičnost 99%.

Pristupni broj	Opis sekvence	Maksim alna vrednost	Ukupna vrednost
NR_041093.1	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> strain NBRC 12912 16S ribosomal RNA, partial sequence	2255	2255
NR_043350.1	<i>Streptomyces badius</i> strain NRRL B-2567 16S ribosomal RNA, partial sequence	2255	2255
NR_041205.1	<i>Streptomyces sindenensis</i> strain NBRC 3399 16S ribosomal RNA, partial sequence	2252	2252
NR_043834.1	<i>Streptomyces pluricolorescens</i> strain NRRL B-2121 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_043833.1	<i>Streptomyces parvus</i> strain NRRL B-1455 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_041425.1	<i>Streptomyces albovinaceus</i> strain NBRC 12739 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_041062.1	<i>Streptomyces anulatus</i> strain NBRC 12755 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_043377.1	<i>Streptomyces griseoplanus</i> strain AS 4.1868 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_043351.1	<i>Streptomyces fimicarius</i> strain ISP 5322 16S ribosomal RNA, partial sequence	2250	2250
NR_043369.1	<i>Streptomyces tanashiensis</i> strain IFO 12919 16S ribosomal RNA, partial sequence	2248	2248

Parcijalna sekvenca (1319 bp) 16S rDNK soja JS520:

AATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCTTGC
 AGGCATCTGCGAGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCC GCGCCTATCAGCTTGTTG
 GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAA
 AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGG
 GAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTC
 ACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTT
 CGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGG
 TGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
 ATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCAC TAGGTGTGGGCAACATTCACGTT
 GTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTG
 TACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAAGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCC
 GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGC
 ACACGTGCTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATAACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAG
 CCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
 AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
 AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTGTG

Prvih 10 rezultata pretraživanja banke podataka NCBI za soj JS520. Lista je generisana korišćenjem BLAST algoritma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pokrivenost pretraživanja 100%; E vrednost = 0,0; Maksimalna identičnost 99%.

Pristupni broj	Opis sekvence	Maksimalna vrednost	Ukupna vrednost
NR_027223.1	Streptomyces violaceolatus strain DSM 40438 16S ribosomal RNA, partial sequence	2431	2431
NR_025250.1	Streptomyces humiferus strain DSM 43030 16S ribosomal RNA, partial sequence	2431	2431
NR_041189.1	Streptomyces tricolor strain NBRC 15461 16S ribosomal RNA, partial sequence	2425	2425
NR_041168.1	Streptomyces anthocyanicus strain NBRC 14892 16S ribosomal RNA, partial sequence	2425	2425
NR_027222.1	Streptomyces coelestis strain AS 4.1594 16S ribosomal RNA, partial sequence	2425	2425
NR_041914.1	Streptomyces violaceoruber strain DSM 40049 16S ribosomal RNA, partial sequence	2425	2425
NR_041188.1	Streptomyces rubrogriseus strain NBRC 15455 16S ribosomal RNA, partial sequence	2414	2414
NR_042760.1	Streptomyces sp. 40003 strain 40003 16S ribosomal RNA, partial sequence	2409	2409
NR_042302.1	Streptomyces lienomycini strain LMG 20091 16S ribosomal RNA, complete sequence	2403	2403
NR_042829.1	Streptomyces sp. 40002 strain 40002 16S ribosomal RNA, partial sequence	2398	2398

BIOGRAFIJA AUTORA

Nada Stanković (rođ. Pavković) rođena je 1972. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije je upisala 1991. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Eksperimentalni deo diplomskog rada na temu "Ispitivanje uloge metalotioneina i HSP70 u regulaciji kapaciteta glukokortikoidnog receptora pod delovanjem kadmijuma" uradila je pod mentorstvom dr Jadranke Dunderski u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Diplomirala je 1998. godine sa prosečnom ocenom 9,13 i iste godine upisala poslediplomske studije na smeru Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u toku kojih je bila stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije. Eksperimentalni deo magistarske teze odbranjene 2001. godine na temu "Izučavanje uticaja kloniranih genetičkih elemenata na stabilnost 2 μ m plazmida *Saccharomyces cerevisiae*" uradila je pod mentorstvom dr Gorana Ljubijankića u Laboratoriji za molekularnu biotehnologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, čiji je član od 1998. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu čiji je član od 2006. godine, pod mentorstvom dr Branke Vasiljević. Tokom svog rada bila je uključena u četiri nacionalna i tri međunarodna projekta. Do sada je kao autor ili koautor objavila sedam radova u časopisima od međunarodnog i domaćeg značaja od kojih je „***Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative and UV-protective properties.**“ Appl. Microbiol. Biotechnol. Epub Jul 6, 2012. autora **Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B. i Nikodinovic-Runic, J.** rad iz ove doktorske teze.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Нада Н. Станковић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изолација и карактеризација биоактивних секундарних метаболита из одабраних сојева рода *Streptomyces*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 18. 10. 2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Нада Станковић _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада **Изолација и карактеризација биоактивних секундарних
метаболита из одабраних сојева рода *Streptomyces***

Ментор др Бранка Васиљевић и др Ђорђе Фира

Потписани _____ Нада Н. Станковић _____


изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 18. 10. 2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Изолација и карактеризација биоактивних секундарних метаболита из одабраних сојева рода *Streptomyces*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 18. 10. 2012.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.