

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Genom, transzkriptom és fermentációs vizsgálatokra alapozott törzsnemesítés a primycin-bioszintézis hatékonyságának növelése céljából

PhD értekezés

Készítette: Kovács Márk

Témavezetők:

Dr. Fekete Csaba, Tanszékvezető egyetemi docens

Dr. Kemenesi Gábor, Egyetemi adjunktus

.....
Dr. Fekete Csaba
Tanszékvezető egyetemi docens
Általános és Környezeti
Mikrobiológiai Tanszék

.....
Dr. Kemenesi Gábor
Egyetemi adjunktus
Genetikai és Molekuláris
Biológiai Tanszék

.....
Dr. Gábrriel Róbert
Tanszékvezető egyetemi tanár
Iskolavezető

Pécs, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| 2. BEVEZETÉS | 6 |
| 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 8 |
| 3.1. A Saccharomonospora nemzetség általános jellemzése | 8 |
| 3.1.1. <i>Saccharomonospora azurea</i> | 9 |
| 3.2. A primycin általános jellemzése | 11 |
| 3.3. Primycin bioszintézis útvonal | 12 |
| 3.4. Primycin hatásmechanizmusa | 16 |
| 3.5. Fermentációs eljárások | 17 |
| 3.5.1. <i>Hagyományos fermentáció optimalizálás</i> | 19 |
| 3.5.2. <i>Primycin fermentáció</i> | 20 |
| 3.6. Rekombináns DNS technikák ipari alkalmazása | 21 |
| 3.7. A kísérleteink során alkalmazott új generációs szekvenálási (NGS) technológiák | 22 |
| 3.7.1. <i>S. azurea SZMC 14600 genomszekvenálása</i> | 23 |
| 3.7.2. <i>S. azurea SZMC 14600 RNS szekvenálása</i> | 23 |
| 3.7.2.1. <i>SOLiD (Sequencing by Oligonucleotid Ligation and Detection) szekvenálás</i> | 25 |
| 4. CÉLKITŰZÉSEK | 28 |
| 5. ANYAG ÉS MÓDSZER | 29 |
| 5.1. Alkalmazott mikroorganizmusok | 29 |
| 5.2. Felhasznált anyagok | 29 |
| 5.2.1. <i>Táptalajok, tápoldatok</i> | 29 |
| 5.2.2. <i>Oldatok</i> | 29 |
| 5.3. Alkalmazott módszerek | 30 |
| 5.3.1. <i>Mikroorganizmusok tenyésztése</i> | 30 |
| 5.3.2. <i>Antimikrobiális hatás vizsgálat</i> | 30 |
| 5.3.3. <i>Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia</i> | 31 |
| 5.3.4. <i>DNS-DNS-hibridizáció</i> | 32 |
| 5.3.5. <i>Primycin bioszintézis génklaszter</i> | 33 |
| 5.3.6. <i>Primycin PKS génklaszter azonosítása és in silico strukturális elemzése</i> | 33 |
| 5.3.7. <i>Transzkriptomika</i> | 33 |
| 5.3.8. <i>Bioinformatikai analízis</i> | 34 |
| 5.3.9. <i>Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)</i> | 35 |
| 6. EREDMÉNYEK | 37 |
| 6.1. Primycintermelő-képesség | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2. Zsírsvav szubsztrátok primycin bioszintézisre gyakorolt hatása..... | 40 |
| 6.3. Deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek azonosítása HPLC/ESI-MS-sel..... | 45 |
| 6.4. A primycin bioszintézis génklaszter jellemzése | 46 |
| 6.4.1. <i>Primycin PKS génklaszter azonosítása és in silico strukturális elemzése.....</i> | <i>46</i> |
| 6.4.1.1. <i>AT domén szubsztrátspecifitásának jellemzése</i> | <i>48</i> |
| 6.4.1.2. <i>KR domén jellemzése</i> | <i>50</i> |
| 6.4.2. <i>L-arginin prekursor szintézis útvonal.....</i> | <i>51</i> |
| 6.5. Primycin szintézist módosító és szabályozó gének..... | 52 |
| 6.6. Funkcionális genomika..... | 52 |
| 6.7. qRT-PCR vizsgálatok..... | 58 |
| 7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA..... | 60 |
| 7.1. Primycintermelő-képesség | 60 |
| 7.2. Zsírsvav szubsztrátok primycin bioszintézisre gyakorolt hatása..... | 60 |
| 7.3. Primycin bioszintézis génklaszter strukturális jellemzése | 62 |
| 7.3.1. <i>Primycin PKS modell.....</i> | <i>63</i> |
| 7.3.2. <i>A primycin PKS multienzim-komplex szubsztrátspecifitása</i> | <i>64</i> |
| 7.3.3. <i>KR domén szerepe a sztereokémiai tulajdonságok kialakításában.....</i> | <i>64</i> |
| 7.3.4. <i>L-arginin prekursor szintézis útvonal.....</i> | <i>65</i> |
| 7.3.5. <i>Primycin szintézist módosító és szabályozó gének</i> | <i>66</i> |
| 7.4. Funkcionális genomika..... | 67 |
| 8. ÖSSZEFOGLALÁS | 70 |
| 9. SUMMARY..... | 72 |
| 10. HIVATKOZÁSOK..... | 74 |
| 11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK..... | 86 |
| 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 88 |
| 13. MELLÉKLETEK..... | 89 |

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-----------|--|
| ABC | ATP-kötő kazetta transzporter |
| ACP | acil-karrier protein |
| AMR | antimikrobiális rezisztencia |
| antiSMASH | Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell |
| AT | aciltranszferáz |
| ATCC | American Type Culture Collection (Amerikai tipizált törzsgyűjtemény) |
| BEV | butanol-etanol-víz |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | bázispár |
| cDNS | komplementer DNS |
| COG | Clusters of Orthologous Groups (ortológ csoportok klaszterei) |
| CPC | cephalosporin C |
| DAD | diódasoros detektor |
| DDH | DNS-DNS-hibridizáció |
| DEBS | 6-deoxieritromicin B szintáz |
| DEG | differenciáltan expresszáldó gén |
| DH | dehidratáz |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Németországi mikrobiológiai törzsgyűjtemény) |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav |
| EI | előinkubációs tápoldat |
| EF | fermentációs tápoldat |
| ER | enoilreduktáz |
| ESI-MS | elektrospray ionizációs tömegspektrométer |
| GGDC | genome-to-genome distance calculator (genom-genom távolság kalkulátor) |
| GO | Gene Ontology (gén ontológia) |
| HPLC | nagy teljesítményű folyadékkromatográfia |
| HSP | magas hasonlósági pontszámú szegmenspár |
| KoA | koenzim A |
| KR | ketoreduktáz |
| KS | ketoszintáz |
| LB | Luria-Bertani |

| | |
|---------|---|
| MACA | micro assay culture agar |
| MDR | multidrog-rezisztens |
| MRSA | meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> |
| m/z | molekulatömeg/töltés |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information (Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) |
| NGS | új generációs szekvenálás |
| NRPS | nem-riboszómális peptid szintáz |
| OH | hidroxil csoport |
| PCR | polimeráz láncreakció |
| PKS | poliketid szintáz |
| qRT-PCR | kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció |
| RIN | RNS integritás |
| RNS-Seq | RNS szekvenálás |
| SBL | szekvenálás ligálással |
| SBS | szekvenálás szintézissel |
| SOLID | szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással |
| SSF | szilárd fázisú fermentáció |
| SZMC | Szeged Microbiology Collection (Szegedi mikrobiológiai törzsgyűjtemény) |
| TBE | tris-borát-EDTA |
| TE | tioészteráz |
| TFR | TetR család transzkripció szabályozó |
| UV | ultraibolya |

2. BEVEZETÉS

Napjainkra a rezisztens baktériumok rohamos és egyre gyorsuló elterjedése világszerte komoly kihívások elé állítja az egészségügyi szakembereket. Az antibiotikumok túlzott mértékű és indokolatlan használata következtében mindinkább teret nyerő antimikrobiális rezisztencia (AMR) veszélyezteti a megbetegedések és elhalálozások jelentős hányadáért felelős patogén mikroorganizmusok okozta fertőzésekkel szembeni hatékony fellépést [1]. Az AMR folyamatos térhódítása az antimikrobiális gyógyszerkészítmények hatékonyságának fokozatos csökkenését vonja maga után, mely súlyos terheket ró a betegellátásra. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) évek óta próbálja felhívni a figyelmet a problémára. A legutóbbi 2019. évi jelentése szerint mintegy 700 ezer ember hal meg évente antibiotikum-rezisztens fertőzések következtében, köztük közel 230 000 a multidrog-rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* okozta tuberkulózisban. Egyes becslések szerint a mikrobiális fertőzések okozta halálesetek száma megfelelő intézkedések nélkül akár 10 millióra is emelkedhet 2050-re [2].

Multidrog rezisztencia kialakulása során a mikroorganizmusok olyan szerkezetében vagy hatásmechanizmusában eltérő, több antimikrobiális készítménnyel szemben is rezisztensnek bizonyulnak, melyekkel szemben korábban érzékenyek voltak [3]. A legismertebb multidrog-rezisztens (MDR) kórházi patogének között számontartott meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) hazánkban évi közel 900 regisztrált fertőzéssel az egyik legnagyobb esetszámú, multirezisztens kórokozó által okozott megbetegedésért felelős. Sikeressége kulcsa, hogy meticillin mellett sok esetben olyan általánosan alkalmazott antibiotikum csoportokkal szemben is rezisztensnek bizonyul, mint az aminoglikozidok, makrolidok, fluorokinolonok, klóramfenikol és tetraciklin, lényegesen megnehezítve az ellenük irányuló védekezést.

A helyzet komolyságát tovább erősíti, hogy az antibiotikumok penicillin felfedezésével kezdődő modern kora a 20. század derekán tapasztalt gyors felfutást követően a század végére komoly válságba jutott. A legújabb gyógyszeripari trendeket követve a gyártók fokozatosan a szintetikus vegyületkönyvtárak nagy áteresztőképességű szűrésére tértek át, mely jelentős mértékben visszavetette az új antibiotikumok felfedezésének mértékét. A tény, hogy az AMR kialakulása folyamatosan növekszik, mellyel párhuzamosan az új antimikrobiális ágensek után történő kutatások intenzitása csökken, szemléletváltást sürget a modernkori gyógyászatban.

A már régóta rendelkezésre álló antibiotikumainkkal kapcsolatos ismereteink mélyítése, valamint a korábban alkalmazott, de valamilyen okból perifériára szorult antibiotikumok ismételt bevezetése új alternatívát nyújthat az MDR patogénekkal szemben folytatott küzdelemben [4]. Ezen koncepcióba kiválóan illeszkedik a hazánkban közel 70 éve felfedezett primycin [5]. A

Saccharomonospora azurea faj képviselői által termelt nem polién típusú makrolid antibiotikum igazoltan fokozott antimikrobiális aktivitással rendelkezik számos gyakori Gram-pozitív kórokozóval szemben, beleértve több klinikai jelentőséggel bíró MDR törzset is. Ezen tulajdonságának, valamint a nem szaporodó baktériumokkal szemben megnyilvánuló baktericid hatásának köszönhetően a bakteriális patogének széles skálájával képes felvenni hatékonyan a versenyt [6]. Ugyan topikális készítmény formájában évtizedek óta sikeresen alkalmazzák Magyarországon, azonban formulációs problémák mindeztidáig nem tették lehetővé széleskörű felhasználását a klinikumban. Mindazonáltal alkalmazásában, kedvező antimikrobiális tulajdonságainak köszönhetően, komoly terápiás potenciál rejlik. A primycinnel kapcsolatos további lehetséges termékfejlesztést nagyban elősegítheti a primycin-termelő szervezetről és magáról az antibiotikum szintézis folyamatáról alkotott képünk bővítése.

Amellett, hogy az utóbbi években több kezdeményezés is indult az antibiotikum-kutatási és fejlesztési folyamatok élénkítése érdekében, a genom szinten történő elemzések alkalmazása klasszikus mikrobiológiai és analitikai módszerekkel párosulva egyáltalán nem jellemző folyamat ipari szinten. Ezen innovatív technológiákat alkalmazva célul tűztük ki a primycin-szintézis háttérben húzódó folyamatok mélyreható megismerését a termelő *S. azurea* törzsek összehasonlító strukturális és funkcionális elemzése révén, valamint a fermentációs eljárás hatékonyságának növelését, melyre a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék és a PannonPharma Kft. szerepvállalásával megvalósult közös kutatási projekt biztosított lehetőséget.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A *Saccharomonospora* nemzetség általános jellemzése

A *Pseudonocardiaceae* család *Saccharomonospora* nemzetségébe [7] tartozó szervezetek aerob, kemoorganotróf anyagcserét folytató, Gram-pozitív sejtfalszerkezettel rendelkező, fonalas baktériumok. Kivétel ez alól a *Saccharomonospora viridis*, mely ugyan magán hordozza a nemzetségre jellemző tipikus morfológiai bélyegeket, mégis Gram-negatív festést mutat [8]. A nemzetséget alkotó aktinomicéta fajok fő ismertető jegye a légmicéliumokon fejlődő, túlnyomórészt egyedülálló, esetenként párosan vagy rövid láncban elhelyezkedő spóra. A sejtfal felépítését tekintve jellemzően arabinóz és galaktóz cukrokat tartalmaz, valamint mezo-diaminopimelinsavat a peptidoglikán peptid oldallánc 3. pozíciójában [9].

Kezdetben a morfológiai bélyegek, fiziológiai és biokémiai sajátosságok meghatározásán nyugvó klasszikus módszerek segítségével, majd az elmúlt két évtizedben mindinkább teret nyerő genomszekvenálási projekteknek köszönhetően napjainkra mintegy 15 *Saccharomonospora* faj hiteles leírására került sor: *Saccharomonospora amisosensis*, *Saccharomonospora azurea*, *Saccharomonospora colocasiae*, *Saccharomonospora cyanea*, *Saccharomonospora glauca*, *Saccharomonospora halophila*, *Saccharomonospora iraqiensis*, *Saccharomonospora marina*, *Saccharomonospora oceani*, *Saccharomonospora paurometabolica*, *Saccharomonospora piscinae*, *Saccharomonospora saliphila*, *Saccharomonospora viridis*, *Saccharomonospora xiaoerkulensis* és *Saccharomonospora xinjiangensis* [10]. Előfordulásukat tekintve izolátumaik igen változatos környezeti élőhelyeket képviselnek, úgymint eltérő talajtípusok, komposzt, trágya, tőzeg vagy éppen óceáni üledék.

Az aktinomicéták régóta gazdag forrását képezik számos antibakteriális, antifungális, antivirális, antitumor, immunszuppresszáns, illetve egyéb más tulajdonsággal rendelkező biológiailag aktív másodlagos anyagcsereterméknek, melyek kiemelt klinikai jelentőséggel bírnak [11, 12]. A *Pseudonocardiaceae* családot szintén a szekunder metabolitok széles választékát szintetizálni képes szervezetek alkotják, melyek közül a terápia számára legismertebbek a vankomicin-termelő *Amycolatopsis orientalis* (*Amycolatopsis* nemzetség) [13], vagy az eritromicin-termelő *Saccharopolyspora erythraea* (*Saccharopolyspora* nemzetség) [14]. Habár az elmúlt évtizedben a *Saccharomonospora* nemzetség több fajának teljes genomszekvenálása is megtörtént, azonban a biológiailag aktív metabolitok termelésével kapcsolatos ismereteink továbbra is meglehetősen alulreprezentáltak a család többi tagjához képest. Mindazonáltal a nemzetség több tagjának jellemzése során is azonosításra kerültek szerkezetileg diverz bioaktív másodlagos anyagcseretermékek. Ezen molekulák közé változatos

antimikrobiális (pl.: AB-65, primycin, saccharonol A, taromycin A és B, thermoviridin), illetve antitumor (pl.: piericidin A₃, saccharonol B, saccharoquinoline, sakyomicin E) tulajdonságokkal rendelkező ágensek tartoznak (1. táblázat).

1. táblázat A *Saccharomonospora* nemzetség kapcsán leírt bioaktív szekunder metabolitok és azok termelő szervezetei.

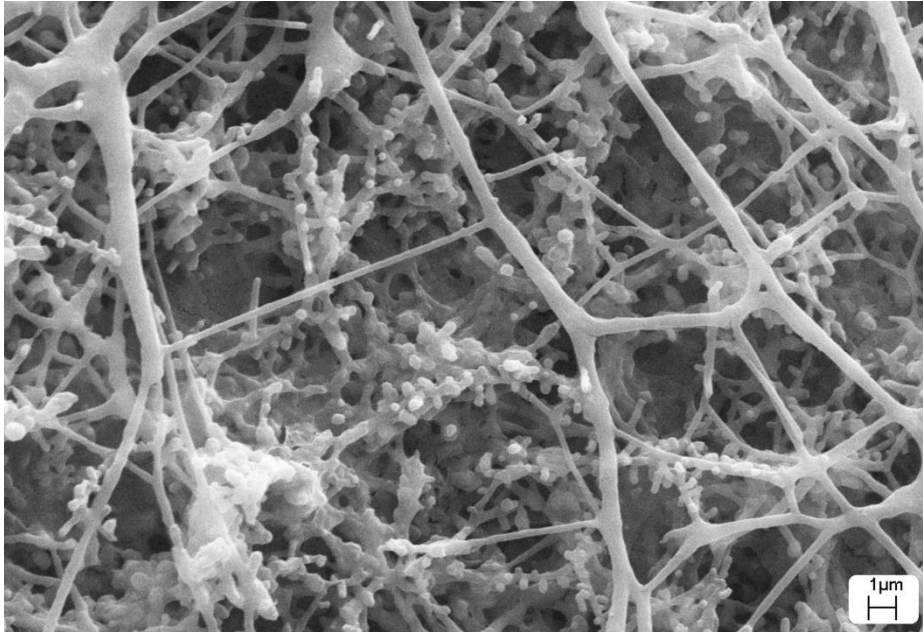
| Fajnév | Törzs | Bioaktív metabolit | Hatás | Hivatkozás |
|----------------------------------|------------|---------------------------|---------------------------------|------------|
| <i>Saccharomonospora azurea</i> | MTCC11714 | Saccharonol A | antibakteriális | [15] |
| | | Saccharonol B | antifungális | |
| | | Piericidin A ₃ | antitumor | |
| <i>Saccharomonospora azurea</i> | Na128 | Primycin | antibakteriális | [16] |
| | SZMC 14600 | | antifungális | |
| <i>Saccharomonospora oceani</i> | VJDS-3 | nem azonosított | antibakteriális antifungális | [17] |
| <i>Saccharomonospora sp.</i> | CNQ-490 | Saccharoquinoline | antitumor | [18] |
| | | Taromycin A és B | antibakteriális | [19] |
| <i>Saccharomonospora sp.</i> | DSM 4249 | Sakyomicin E | antibakteriális antitumor | [20] |
| <i>Saccharomonospora viride</i> | - | AB-65 | antibakteriális antifungális | [21] |
| <i>Saccharomonospora viridis</i> | - | Thermoviridin | antibakteriális | [22] |

3.1.1. *Saccharomonospora azurea*

A *Saccharomonospora azurea* faj első írásos említése 1987-re datálódik, amikor az új antibiotikumok felfedezését célzó szkrínelés keretében Runmao és munkatársai sikeresen izolálták és jellemezték a szecsuáni (Kína) Guangyun város közelében gyűjtött talajmintából a fajt reprezentáló *S. azurea* NA-128-as típus törzset [23]. Bő egy évtizedet követően Yoon és munkatársai 1999-es DNS-DNS hibridizációs vizsgálatai révén igazolást nyert, hogy a sokáig külön fajként kezelt *Saccharomonospora caesia* (korábban *Micropolyspora caesia*) valójában szintén megegyezik a Runmao által leírt *S. azurea*-val [24].

A szervezet morfológiai bélyegeinek meghatározása és kémiai elemzése alapján rendelkezik a nemzetség sajátosságának tekinthető főbb jellemzőkkel, miszerint szabálytalanul elágazó vegetatív micéliumainak átmérője 0,3-0,4 µm, míg monopodiálisan elágazó légmicéliumainak átmérője 0,3-0,6 µm. Elsődlegesen a légmicéliumokon, de ritkán a szubsztrát micéliumon is magányosan elhelyezkedő, sima felszínű, kerek spórái 0,8-1,0 µm nagyságúak (1. ábra).

Megfelelő tenyésztési körülmények között (pl.: Czapek Dox sucrose agar, ISP3 táptalajokon történő növesztés) légmicéliumi jellegzetes azúrkék színűek, melyre a fajnévben szereplő „azurea” kifejezés is utal. A sejtfal a IV sejtfaltípusra utaló mezo-diaminopimelinsavat, illetve arabinóz és galaktóz cukrokat tartalmaz [23]. Zsírsavösszetételére a 16 szénatomos zsírsavak markáns túlsúlya jellemző: iso-C16:0 (27,0%), C16:1 cis-9 (17,0%), iso-C16:0 2-OH (14,0%), C16:0 (palmitinsav, 13,0%), iso-C16:1 H (7,0%), anteiso-C16:0 (1,0%) [25].



1. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel az LB csészén növekedett *S. azurea* telep micélium hálózatáról és a hifákon elhelyezkedő spórákról.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok tükrében a *S. azurea*-t tekinthetjük a nemzetség egyik legsokoldalúbb bioaktív metabolit termelő szervezetének. A változatos struktúrájú bioaktív molekulák között szerepel α -piridon antibiotikum (Piericidin A₃), izokumarinok (Saccharonol A és B), valamint marginolakton típusú antibiotikum (Primycin) is, melyeknek közös jellemzője, hogy bioszintézisük egyaránt a moduláris poliketid szintáz (PKS) enzimkomplexein keresztül zajlik.

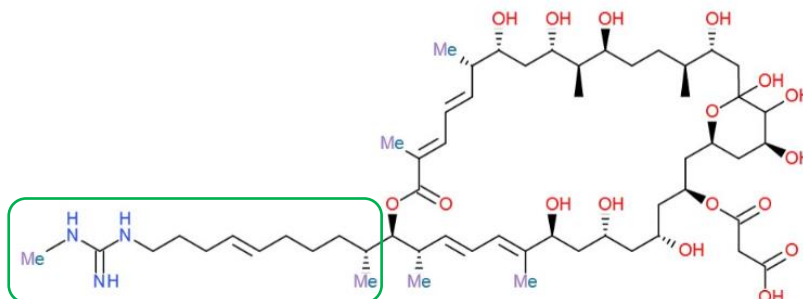
Klinikai jelentősége elsősorban a primycinnek ismert, melynek felfedezése és első írásos említése Vályi-Nagy és munkatársainak nevéhez köthető. Az antibiotikumok penicillin felfedezésével kezdődő modern korának kezdetén világszerte átfogó, változatos élőhelyeket érintő kutatások indultak, melyek fő célja addig ismeretlen, új antimikrobiális szerek felfedezése volt. Ezen kezdeményezésekhez kapcsolódva sikerült Vályi-Nagy és munkatársainak izolálnia a viaszmolylelő (Galleria mellonella) lárájának béltraktusából egy addig ismeretlen antibiotikum előállításáért felelős törzset, melyről a Nature folyóiratban megjelent 1954-es publikációjukban

számoltak be [5]. A primycin termelésért felelős törzset *Streptomyces primycini* néven azonosították, melyet a későbbiekben *Micromonospora galeriensis* néven emleget az irodalom [26]. A sikertelen törzsnemesítési törekvések követően azonban a törzs utóélete nem teljesen tisztázott, napjaink egyedüli primycin termelőjeként ismert szervezete a *S. azurea*.

A primycin első említése kapcsán Vályi-Nagy és munkatársai elsődlegesen annak staphylococcusokkal és mycobacteriumokkal szembeni antimikrobiális hatásosságáról számoltak be. Ígéretes tulajdonságainak köszönhetően ezt követően számos indikációban vizsgálták, úgymint urogenitális tuberkulózis [27], nem-gonorrhéás húgycsőgyulladás és periováriális fertőzések [28], illetve szemfertőzések [29], azonban a rossz vízoldhatósága kapcsán fennálló formulációs problémák nem tették lehetővé széleskörű és hatékony alkalmazását a klinikum számára. Megoldást az alkoholos gél formában (Ebrimycin[®] gél) történő topikális alkalmazása jelentett, mely bőrgyógyászati célokra történő felhasználása hatásosnak bizonyult különböző bakteriális eredetű fertőzések esetében. Sikeresen alkalmazták többek között akne és pyoderma okozta fertőzések [30], valamint Gram-pozitív baktériumokkal felülfertőzött égési sérülések kezelésére is [31].

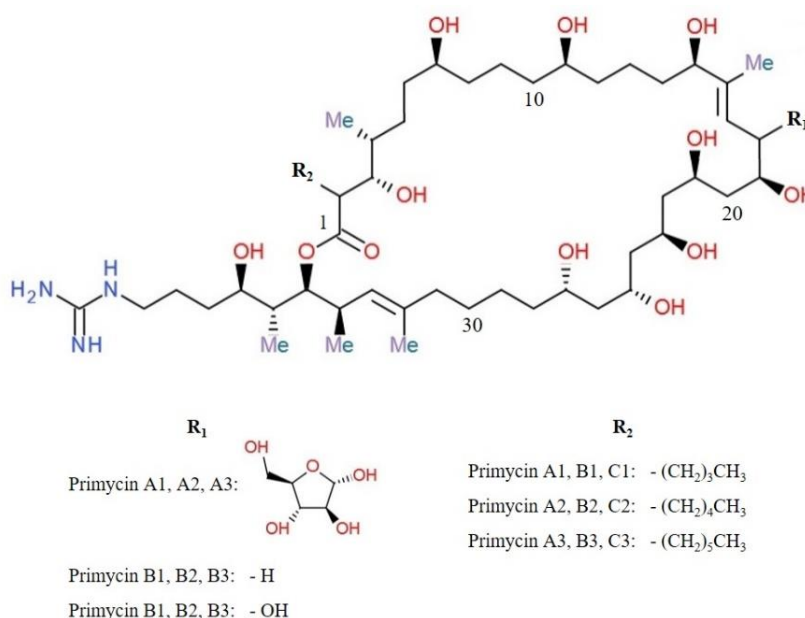
3.2. A primycin általános jellemzése

A primycin egy széles antimikrobiális spektrummal rendelkező, nem polién típusú makrolid antibiotikum. Szerkezeti tulajdonságai alapján a makrolidok családján belül a marginolakton antibiotikumok szűkebb csoportját képviseli, melynek tagjai olyan makrociklikus laktonok, melyek laktongyűrűje legalább 31 szénatomból áll, illetve további jellemző sajátosságuk, hogy a lakton karbonilhoz viszonyított α -pozícióban terminális amino vagy guanidino funkcióval rendelkező oldalláncot hordoznak (pl.: primycin, azalomycin, desertomycin) (2. ábra) [32].



2. ábra Azalomycin F4a szerkezete. A marginolaktonokra jellemző laktongyűrűhöz csatlakozó, guanidino funkcióval rendelkező oldallánc zölddel kiemelve.

Maga a primycin megnevezés egy többkomponensű antibiotikum-komplexet takar, melynek komponensei szerkezeti sajátosságaik alapján 3 fő csoportot (A, B és C) alkotnak. Vékonyréteg kromatográfiás elválasztás alapján ezen 3 fő csoportba összességében több, mint húsz különböző komponens sorolható [33]. A marginolaktonokra jellemző módon az alapváz kémiai szerkezetének kialakításában minden esetben egy 36 tagú laktongyűrű, illetve a guanidino funkciós csoporttal rendelkező oldallánc vesz részt, mely kiegészülve a C-18 (R₁) és C-2 (R₂) oldallánc variánsokkal eredményezi az egyes primycin komponensek végleges szerkezetét (3. ábra). A primycin-komplexet alkotó komponensek már önmagukban is antimikrobiális hatással rendelkeznek, de ezen egyedi komponensek által gyakorolt hatás messze elmarad az anyagkeverék esetében megnyilvánuló antimikrobiális tulajdonságoktól, azaz az egyes komponensek egymás hatását szinergista módon tovább erősítik.



3. ábra Primycin komponensek általános szerkezeti képlete.

3.3. Primycin bioszintézis útvonal

Mint ismert, számos klinikai jelentőséggel bíró másodlagos anyagcseretermék szintézise zajlik poliketid szintáz és nem-riboszómális peptid szintáz (NRPS) enzimkomplexeken keresztül, konzervált tiotemplát mechanizmusok által [34, 35]. A bakteriális szervezetek által termelt, diverz szerkezeti felépítéssel rendelkező poliketid molekulák bioszintézise alapvetően 4 eltérő típusú PKS által szabályozott szintézis útvonalon zajlik. Ennek megfelelően az egyes multienzim-komplexet alkotó egyedi enzimek strukturális szerveződése alapján megkülönböztetünk moduláris I-es típusú, iteratív I-es típusú, II-es típusú és III-as típusú PKS-eket.

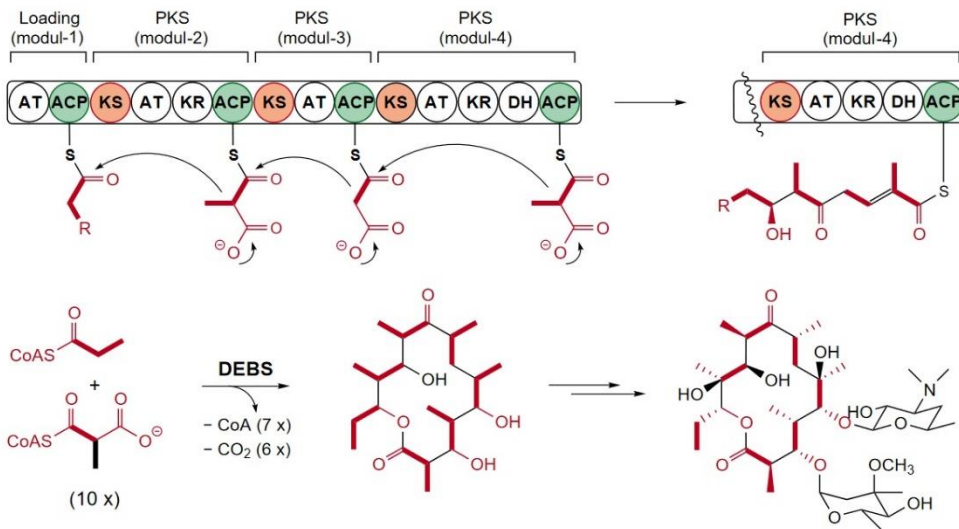
Elsősorban makrolidok, poliének és poliéterek bioszintéziséért felelős moduláris I-es típusú PKS-ek olyan modulokba szerveződött multifunkciós enzimek, melyek jól elkülönülő, nem iteratív módon működő katalitikus domén készlettel rendelkeznek. Ezen modulok mindegyike a növekvő poliketid lánc bioszintézise során egyetlen lánchosszabbító lépést katalizál, mint ahogyan azt a behatóan tanulmányozott 6-deoxieritromicin B szintáz (eritromicin PKS) kapcsán említi az irodalom [36]. Ezzel szemben az iteratív I-es típusú PKS-ek működése során egy adott modul akár több lánchosszabbító lépést is katalizálhat. Ezen típus előfordulása prokarióták körében ritka és többnyire kis aromás molekulák vagy poliének szintéziséért felelősek, mint például az egyes *Streptomyces* fajok által termelt azalomycin [37].

A kizárólag bakteriális szervezetekre jellemző II-es típusú PKS-ek olyan multienzimkomplexek, melyek egyetlen, iteratív módon működő domén készlettel rendelkeznek. Ezen típus által bioszintetizált bioaktív metabolitok elsősorban aromás, gyakran policiklikus poliketidek (pl.: tetracenomycin C). Az I-es típusú PKS-hez hasonlóan a II-es típusú PKS enzimkomplex esetében is az acil-karrier protein (ACP) domén segítségével történik az acil-KoA szubsztrát aktiválása és a növekvő poliketid intermedier közvetítése.

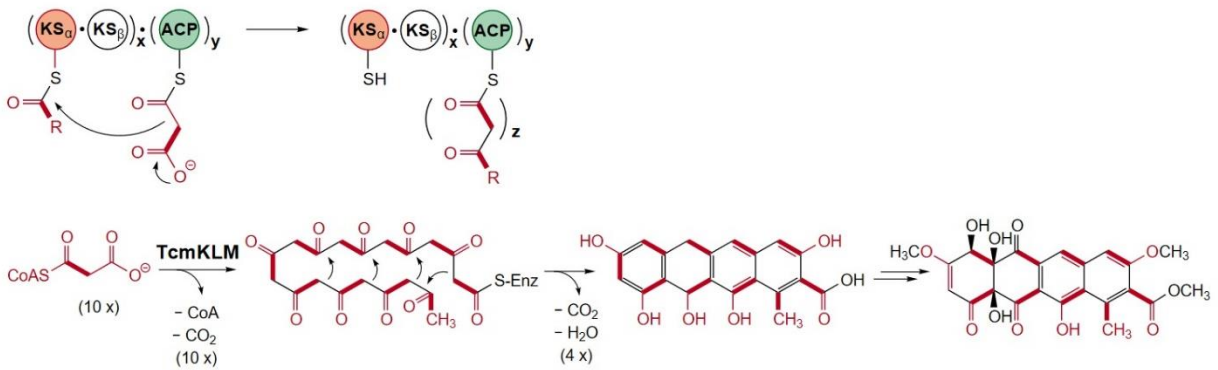
Főleg növényekben jellemző, azonban az utóbbi időben számos baktérium kapcsán is leírt III-as típusú PKS esetében iteratív módon működő homodimer ketoszintáz enzim végzi a különböző hosszúságú aromás poliketid molekulák bioszintézisét, amely során a kondenzációt katalizáló aktív centrumok ACP közvetítése nélkül képesek felismerni a lánchosszabbító acil-KoA molekulákat [38].

A moduláris poliketid szintáz és a nem-riboszómális peptid szintáz enzimkomplexek között fellelhető strukturális és katalitikus hasonlóságokból adódóan számos esetben megfigyelt jelenség, hogy az I-es típusú PKS és az NRPS modulok egymáshoz kapcsolódva, közös egységet alkotva hibrid bioszintetikus útvonalakat hoznak létre [39]. Ezenfelül szintén nem ismeretlen az irodalom számára a különböző PKS típusokból álló kevert bioszintetikus útvonalak sem, mint például III-as és I-es típus vagy I-es és II-es típusból álló útvonalak [40].

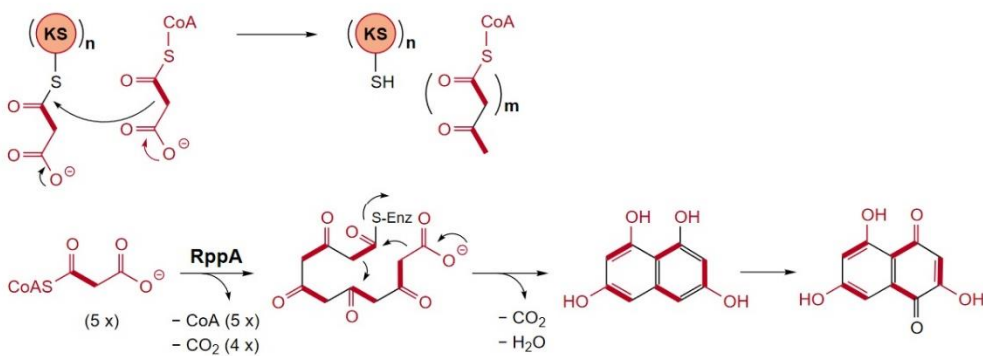
Moduláris I-es típusú PKS



II-es típusú PKS (iteratív)



III-as típusú PKS (ACP független és iteratív)



4. ábra A különböző típusú poliketid szintázok összefoglaló ábrája. A moduláris I-es típusú PKS működését a 6-deoxieritromicin B szintáz (DEBS) példáján, a II-es típusú PKS működését a tetracenomycin C bioszintéziséért felelős PKS (TcmKLM) példáján, míg a III-as típusú PKS működését a *Streptomyces lividans* kapcsán leírt III-as típusú PKS (RppA) példáján keresztül szemléltetve [38]. Az ábrán feltüntetett domén rövidítések: ACP - acil-karrier protein, AT - aciltranszferáz, DH - dehidratáz, KR - ketoreduktáz, KS - ketoszintáz.

A primycin molekulák bioszintézise, hasonlóan más guanidin oldalláncot hordozó makrociklikus poliketidekhez, szintén a bakteriális I-es típusú poliketid szintézis útvonalon zajlik. A szintézis útvonalban résztvevő multifunkciós PKS enzimek strukturális felépítésüket tekintve modulokba szerveződnek, mely modulokat jól definiált enzimátikus folyamatokért felelős, egymáshoz kovalensen kapcsolódó katalitikus centrumok (domének) alkotnak. Minden egyes PKS modul felépítésében alapvetően résztvevő domének a ketoszintáz (KS), aciltranszferáz (AT) és acil-karrier protein (ACP), melyek legtöbb esetben további kiegészítő doménekkel kombinációban fordulnak elő, úgymint ketoreduktáz (KR), dehidratáz (DH), enoilreduktáz (ER) és tioészteráz (TE). Általánosságban a poliketidek bioszintézise során az AT domén végzi a növekvő poliketid lánchoz szükséges specifikus lánchosszabbító egységek (tipikusan malonil-KoA, vagy metilmalonil-KoA) felismerését és begyűjtését, valamint az ACP domén 4'-foszforpantotén karjára történő felhelyezését tioészter kötés révén. A KS domén katalizálja az ACP-hez kötött (alkil)malonil lánchosszabbító egység és a szomszédos modul ACP doménjéhez kötött acil-tioészter között végbemenő dekarboxilatív Claisen-kondenzációt (szén-szén kötés kialakítását). Amennyiben a modulban további aktív centrumok vannak jelen, úgy annak megfelelően a növekvő poliketid lánc további módosulásokon megy keresztül. Ennek megfelelően a KR domén katalizálja a növekvő alkil-lánc β -keto csoportjának β -hidroxil csoporttá történő redukcióját NADPH segítségével, a DH domén eltávolítja a β -hidroxil csoportot α - β kettős kötéssel létrehozva, míg az ER domén katalizálja az α - β kettős kötés redukcióját β -metilén csoporttá szintén NADPH segítségével. A szintézis útvonal végső lépéseként a C-terminális TE domén végzi az azt megelőző modul ACP doménjéhez kötött poliketid lánc hidrolízisét előidézve a poliketid végtermék enzimkomplexről történő szabadon bocsátását [40, 41].

A PKS multienzim működéséhez köthető katalitikus folyamatok mellett a termék kialakításában még számos további bioszintézis enzim is aktívan közreműködik. A guanidin oldallánccal rendelkező poliketid molekulák bioszintézisének nélkülözhetetlen kiindulási egysége a L-arginin prekursor szintézis útvonalon keresztül szintetizálódó 4-guanidinobutanoil-KoA molekula. A többlépcsős szintézis folyamat katalizálását, amely során L-argininből 4-guanidinobutiramid és 4-guanidinobutánsav közti termékek keletkezésén keresztül 4-guanidinobutanoil-KoA képződik arginin monooxigenáz, 4-guanidinobutiramid hidroláz és 4-guanidinobutanoát:KoA ligáz enzimek végzik. Az aktivált 4-guanidinobutanoil csoport felhelyezése a PKS multienzim indító ACP doménjére egy dedikált aciltranszferáz enzim segítségével történik, melyet követően a kanonikus I-es típusú PKS bioszintézis logika mentén megy végbe a növekvő poliketid lánc szintézise [42].

Azt követően, hogy a TE domén az ACP-hez kötött poliketid lánc tioészter kötésének hidrolízise révén leválasztja a megszintetizált szénláncot a PKS enzimkomplexről és a ciklizáció révén megtörténik a végtermék gyűrűvé záródása, további posztszintetikus lépések követhetik a folyamatot. A primycin molekula bioszintézise során ezen módosítások egyik potenciális célpontja a guanidin csoportot tartalmazó oldallánc. Elsőként a desertomycin bioszintézise kapcsán került leírásra az ureohidroláz szupercsaládba tartozó amidinohidroláz enzim (DstH), mely a poliketid molekula amino és guanidino formái közti átalakulást katalizálja az amino szénatom nukleofil támadása révén [43]. A szerzők nagyfokú hasonlóságot állapítottak meg a DstH és a primycin génklaszterben kódolt géntermék (PriH) között, valamint sikerült is azonosítaniuk az enzimaktivásra utaló primycin A1 és deguanidino-amino-A1 komponensek jelenlétét fermentációs extraktumokban.

Az arabinozil funkciós csoporttal rendelkező primycin A1, A2 és A3 homológok bioszintézisének szintén egy késői szakaszában kerül sor a cukor csoport felhelyezésére a megszintetizált végtermékre. Az *Amycolaptosis orientalis* kapcsán azonosított glikozidos poliketid ECO-0501 bioszintézis útvonalához hasonló módon a lépést egy glikoziltranszferáz enzim katalizálja [44], melynek szintéziséért felelős gén közvetlenül a primycin PKS régió mellett található.

3.4. Primycin hatásmechanizmusa

Mint ismert, a makrolid antibiotikumok (pl.: eritromicin) jellemző módon a riboszómális RNS komplex 50S alegységhez kapcsolódva gátolják a baktériumok fehérjebioszintézisét [45], ezzel szemben a makrolid antibiotikumok egy szűkebb csoportját alkotó marginolaktonok elsősorban a sejtmembrán szerkezetének károsítása révén fejtik ki hatásukat. A primycin hatásmechanizmusát tekintve szintén ez utóbbi, szűkebb antibiotikum családra jellemző membrán támadásponttal jellemezhető.

Elsőként Horváth és munkatársai figyelték meg, hogy *Bacillus subtilis* sejtszuszpenzióhoz bakteriosztatikus koncentrációban adagolt primycin az optikai denzitás hirtelen lecsökkenését, illetve ezzel egyidejűleg a sejtszuszpenzió vezetőképességének növekedését eredményezte. A jelenség kapcsán igazolták, hogy a primycin a bakteriális sejtmembrán dezorganizációja révén képes növelni az ionpermeabilitást [46].

Hasonló következtetésre jutottak Virág és munkatársai is a primycin antifungális aktivitásának vizsgálata során. Eltérő membránszerkezeti karakterisztikával rendelkező *Candida albicans* (33erg⁺ törzs és erg-2) törzseken végzett kísérleteik alkalmával megfigyelték, hogy a primycin molekulák és a sejtmembrán között direkt kölcsönhatás alakul ki, mely a foszfolipid

kettősrétegének dezorganizációjával jár. A membránban végbemenő strukturális változások a membránfunkciók elvesztéséhez vezetnek, ami végső soron az intracelluláris sejtkomponensek kiáramlását eredményezi. Ezen kölcsönhatások során a primycin molekulák elsődleges célpontjai a membránban található telítetlen zsírsavak, ebből kifolyólag a membrán komplexitása, azaz a sejtet határoló kettősréteg zsírsavösszetétele döntően befolyásolja a hatás mértékét [47-49].

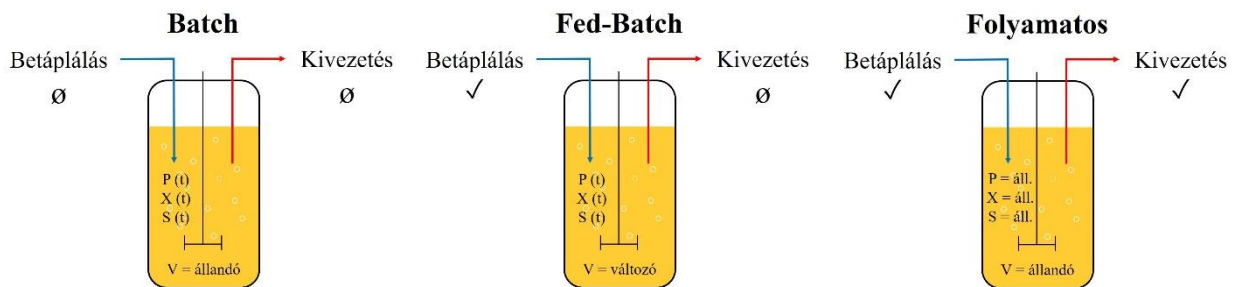
Szintén a marginolaktonok sejtmembrán támadáspontú szemléletét erősíti az azalomycin F_{5a} antibiotikum, mely a primycinhez hasonló guanidin oldalláncot hordozó makrociklikus poliketid. Laktongyűrűje révén képes erős kölcsönhatásba lépni a sejt foszfolipid kettősrétegének poláris fejrészével, minek következtében növeli a sejtmembrán permeabilitását. Ezzel párhuzamosan hatékonyságukat tovább növeli, hogy az antibiotikum molekula pozitív töltéssel rendelkező guanidin oldallánca és a sejtmembránhoz kapcsolódó negatív töltéssel rendelkező lipoteikolsav között szintén fellépő elektrosztatikus kölcsönhatással együttesen idézi elő a sejt autolízisét, ahogyan azt Yuan és munkatársai (2018) meticillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) sejtek esetében megfigyelték [50].

3.5. Fermentációs eljárások

A mikroba törzsekkel végzett fermentáció széles körben alkalmazott folyamat a gyógyszeripari biotechnológiában, amely során változatos kémiai szerkezetű, kedvező farmakológiai hatású anyagok bioszintézisét végzik. Nagyüzemi léptékben az ipari jelentőséggel bíró bioaktív metabolitok előállítása szilárd közegű (solid state fermentation, SSF) vagy folyadék kultúrák (szubmerz) fermentációs eljárások révén történik [51]. A szilárd közegű fermentáció során a mikroorganizmusokat tápanyagban gazdag, szilárd felületen tenyésztik minimális szabad víz jelenlétében. A rendszer az alacsony vízaktivitásnak köszönhetően kevésbé érzékeny a bakteriális szennyeződésre, ezért lényegesen alacsonyabb a sterilizálással járó energiaigénye a szubmerz fermentációkhoz képest. A technológia gazdaságilag még számos további előnyt kínál (pl.: alacsony üzemeltetési költség, kiváló térfogat-termelékenység, egyszerű feldolgozás), azonban ipari elterjedése a szubmerz fermentációkhoz képest mégis limitált, minthogy mérnöki szempontból kevésbé szabályozható folyamatról van szó [52]. A SSF korlátainak dacára számos ipari jelentőséggel bíró enzim termeltetése zajlik SSF eljárással - elsődlegesen az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombák révén - úgymint cellulázok, amilázok, proteázok és lipázok [53, 54].

A szubmerz eljárás során a mikrobák növekedéséhez szükséges tápanyagok vizes közegben, oldott vagy szuszpendált formában állnak rendelkezésre és a termelt anyagcseretermékek (pl.: antibiotikumok, alkoholok, szerves savak, vitaminok, stb.) legtöbb

esetben a fermentációs tápoldatba választódnak ki. A folyadékkultúras fermentációk kapcsán három alapvető módszert különböztetünk meg: szakaszos (batch), rátáplálós-zakaszos (fed-batch) és a folyamatos tenyésztési rendszer (5. ábra) [55].



5. ábra A batch, fed-batch és folyamatos fermentációs folyamatok sematikus ábrája (X = biomassza, S = szubsztrát, P = termék, t = idő, V = térfogat).

Batch fermentáció során zárt rendszeren belül történik a mikroorganizmusok tenyésztése. Az anyagcsere folyamatokhoz szükséges szubsztrátok már a fermentációs folyamat kezdetétől rendelkezésre állnak a termelő szervezetek számára, melyet elméletben későbbi input nem követ. A gyakorlatban ez alól kivételt képezhet néhány esetben a habgátló utólagos rátáplálása, illetve a fermentációs tápközeg pH-ját szabályozó ágensek bejuttatása. A fermentációs táptalaj beoltását követően a mikrobák fejlődése klasszikus növekedési görbét követ.

Szemben a batch fermentációs eljárással a fed-batch technológia egy félig nyitott rendszer, amelyben a kimerülő tápanyagforrások folyamatos visszapótlása révén akadályozzák meg a szubsztrát limitáció kialakulását. A technológia alapvető eljárássá vált és sikeresen alkalmazható olyan esetekben, ahol katabolikus represszió léphet fel a magas cukor koncentráció következtében [56]. Ezen fermentációs eljárás során a friss tápkomponensek kontrollált, aszeptikus betáplálását követően nem történik termékeltávolítás, így az idő előrehaladtával fokozatosan növekszik a fermentálé térfogat a bioreaktorban. A megnyújtott exponenciális növekedési fázisnak köszönhetően nagyobb biomassza termelés indukálható, amely végső soron több terméket eredményez. Jó példa erre a *Streptomyces clavuligerus* által termelt klavulánsav fermentációja, ahol fed-batch fermentációra történő átállással sikerült hozamnövekedést elérni a korábban alkalmazott batch fermentációkhoz képest [57].

A nyitott rendszerű folyamatos fermentáció során a friss tápanyagokat folyamatosan adagolják a bioreaktorhoz, mellyel egyidejűleg a sejteket és különböző metabolitokat tartalmazó, azonos mennyiségű fermentlevet távolítanak el a rendszerből. A szubsztrátok rendszeres időközönként történő betáplálása elősegíti a mikrobák exponenciális növekedési szakaszának hosszabb távú fenntarthatóságát, míg az előregedett fermentlé elvonása révén kiküszöbölhető a toxikus melléktermékek okozta gátló hatás. Mindamelllett az eljárás során valós kockázatot jelent

a kontamináció és a termelő törzs esetleges mutációja. A folyamatos fermentációs eljárás szabályozása több lehetséges módon valósulhat meg: a kemosztát elven működő fermentációk során egyetlen tápanyag határozza meg a mikrobiális növekedést, így a limitáló szubsztrát koncentrációjának finomhangolásával szabályozható a biomassza termelés; turbidosztát fermentációk során szubsztrát limitáció nélkül folyik a tenyésztés a sejttömeg állandó értéken tartásával, melyet a tenyészet optikai denzitása alapján határoznak meg; auxosztát eljárások során a rátáplálás mértékét pedig valamely változó paraméter (pl.: pH, oldott oxigén) alapján határozzák meg [51, 58].

3.5.1. Hagyományos fermentáció optimalizálás

A megfelelő fermentációs körülmények (pl.: pH, hőmérséklet, keverési sebesség, levegőztetés stb.), illetve a termelő közeg összetételének (pl.: szén, nitrogén és ásványi források) körültekintő megválasztása alapvetően meghatározza a termelő szervezetek anyagcsere folyamatait. A fermentációs folyamat optimalizálása általában számos kihívással járó és munkaigényes folyamat, azonban ezen paraméterek finomhangolása lehetőséget biztosít a maximális bioaktív metabolit termelés eléréséhez. A termelés hatékonyságának növelésére különféle stratégiák állnak rendelkezésre a klasszikus, de napjainkban is még gyakran alkalmazott „egyszerre egy faktor” (One Factor at a Time, OFAT) módszertől az egyre népszerűbb modern matematikai, statisztikai alapú (pl.: Response Surface Methodology, RSM; Plackett-Burman design, PBD) eljárásokig [59]. A szekunder metabolitok széles választékát szintetizálni képes *Streptomyces* fajok fermentációs körülményeire irányulóan számos optimalizálási törekvés ismert az irodalomban, melyek közül a tápközeg összetételének optimalizálása az egyik legintenzívebben kutatott terület [60]. A mikrobiális anyagcsere folyamatokhoz nélkülözhetetlen szén- és nitrogénforrások minőségi és mennyiségi beállítása [61-63] mellett nem elhanyagolandó a bioaktív szekunder metabolit bioszintézis szempontjából a termelőközegben rendelkezésre álló prekursorok adagolásának optimalizálása. Ennek jelentőségét példázza számos *Streptomyces* törzs bioaktív metabolit hozamnövekedését leíró tanulmány, úgymint a klavulánsav-termelő *S. clavuligerus* esetében az ornitin [64, 65], a tylosin-termelő *Streptomyces fradiae*-nél a palmitinsav, illetve a daptomycin-termelő *Streptomyces roseosporus*-nál a nátrium-dekanoát alkalmazása. Utóbbi esetében 72-szer nagyobb mennyiségű daptomycin szintézise volt elérhető nátrium-dekanoát jelenlétében a dekánsavhoz képest [66].

Egy adott szubsztrát változtatásán keresztül megvalósuló klasszikus tápközeg optimalizáló eljárások ugyan célravezetőek és könnyen kivitelezhető eljárások, azonban gazdaságosságuk és időigényük miatt mindinkább háttérbe szorulnak. Minthogy a tápközeg összetétele és a termelő

szervezet környezeti paraméterei egyaránt jelentősen befolyásolják az antibiotikum termelést, ezáltal az alacsony költségű szubsztrátok és a legkedvezőbb környezeti feltételek kombinációjának használata együttesen segíti az antibiotikum termelés hozamának javítását, valamint a termelési költségek és az idő minimalizálását [67, 68]. A statisztikai kísérleti megközelítések révén, az összes befolyásoló paraméter kollektív optimalizálásával leküzdhető a konvencionális technikák limitációja és relatíve gyorsan és nagy hatékonysággal meghatározható a fermentációs folyamatok szempontjából legelőnyösebb paraméterek kombinációja [69].

3.5.2. Primycin fermentáció

A primycin bioszintézisét a *Pseudonocardiaceae* családba tartozó Gram-pozitív (G+) fonalas baktérium, a *S. azurea* végzi, mely mindezidáig a primycin egyetlen ismert termelő szervezete [70]. A Vályi-Nagy és munkatársai által izolált termelő törzs eredetileg ugyan primycin szintézissel volt jellemezhető, azonban az antibiotikum termelés mértéke (250-300 µg/mL) becslések szerint egy nagyságrenddel elmaradt az iparilag rentábilis hozamtól (2000-3000 µg/mL). Az ipari hasznosíthatóság szempontjából is elfogadható hozam elérése a termelő szervezet klasszikus mutagenézise révén vált elérhetővé [71]. A primycin-termelő ipari törzs hiteles taxonómiai besorolása a Vályi-Nagy munkásságát követő években meglehetősen bizonytalan és nehezen követhető, azonban a 2010-es évek során Pénzes-Hüvös és munkatársai révén megtörtént a törzs molekuláris biológiai alapokon nyugvó rendszertani azonosítása. Az eredmények igazolták, hogy a jelenleg ipari primycin-termelő törzsként számontartott *S. azurea* SZMC 14600 ténylegesen a Runmao által leírt *S. azurea* faj képviselője [70].

A termelőszervezet felhasználásával zajló termeltetési folyamat iparilag szabályozott körülmények között jelenleg batch fermentációs eljárással történik, egy empirikusan meghatározott, antibiotikum szintézisre optimalizált komplex tápfolyadékban. A sejtek optimális növekedéséhez és zavartalan anyagcserefolyamataikhoz szerves szén- (vízoldható keményítő) és nitrogénforrás (szójaliszt), ásványi sók (NaCl, CaCO₃ és KH₂PO₄), illetve az antibiotikum termelés szempontjából kulcsfontosságú megfelelő prekursor (sztearinsav, napraforgóolaj) molekulák állnak rendelkezésre a fermentációs médiumban. Noha a magas zsírsavtartalmú növényi olajok, mint antibiotikum szintézis prekursorok gyakran szerepelnek az ipari fermentációs tápoldatok összetevői között [72], csak limitált mennyiségű ismeret áll rendelkezésre olyan fermentációk kapcsán, ahol direktbe alkalmazott, szabad zsírsavakat használtak volna fel az antibiotikum termelés hozamának fokozására. Utóbbira példa a palmitinsav *Streptomyces fradiae* tilozin termelésére gyakorolt pozitív hatása, mely nem csupán mikrobák növekedése szempontjából bizonyult előnyösnek, hanem ezzel egyidejűleg jelentős

mértékű antibiotikumtermelés növekedés is tapasztalható [73]. Ezzel szemben a változatos zsírsavösszetételű növényi olajok alkalmazása több antibiotikum-termelő szervezet kapcsán is igazolta hozamfokozó hatását, mint ahogy azt az eritromicin-termelő *Saccharopolyspora erythraea* [74], a salinomycin-termelő *Streptomyces albus* [75] vagy éppen a tetraciklin-termelő *Streptomyces aureofaciens* [76] esetében leírták. Primycin fermentáció szempontjából mindezidáig nem történt átfogó szubsztráthasznosítási vizsgálat, melynek tárgya az antibiotikum bioszintézis szempontjából meghatározó zsírsav prekursorok lettek volna.

3.6. Rekombináns DNS technikák ipari alkalmazása

Az ipari szempontból releváns mikróbák bioszintetikus képességeinek javítása a szintetizálni kívánt metabolitok hatékonyabb és nagyobb mennyiségben történő előállítására érdekében a modern biotechnológia egyik sarkalatos pontja. A fermentáció termelékenységének idő-, energia- és költséghatékony módon történő, jelentős mértékű növelése igazán csak a mikroba törzsek genetikai tartalmának módosításával vált elérhetővé. A termelő szervezetek örökítőanyagának termelés szempontjából kedvező irányba történő változtatása kezdetben mutagenézisen és az azt követő szkríneléses / szelekciós eljárásokon nyugvó hagyományos törzsnemesítés alapján zajlott. A tudomány fejlődésével ezt idővel olyan genetikai rekombinációs technikák váltották fel, mint például a protoplasztfúzió, transzformáció, konjugáció és rekombináns DNS technológia.

A mutagenézisen alapuló konvencionális törzsnemesítések révén számos ipari antibiotikum termelő mikroba törzs fermentációja során sikerült jelentős mértékű titernövekedést elérni [77]. A 20. századi törzsnemesítési törekvések egyik legismertebb sikertörténete a penicillin-termelő *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 mutáns törzseinek létrehozása volt, melyek segítségével 3 nagyságrendet is meghaladó növekedést értek el a penicillin felfedezését követő éra elsődleges ipari termelőjeként számontartott törzsnél [78]. Bár az 1960 évektől voltak korai törekvések a rekombináns technikák ipari hasznosítására, de az áttörést csak Cohen és munkatársainak úttörő munkássága hozta meg az 1970-es években, amikor *in vitro* megalkották az első bakteriális plazmid konstrukciót, melyet sikeresen transzformáltak *Escherichia coli* sejtekbe. Ezzel széles körben lehetővé vált a rekombináns géntechnológiával módosított organizmusok előállítása és célzott ipari felhasználása. Szintén jelentős előrelépés volt a protoplasztfúziós technikák elterjedése az 1980-as évektől, melynek segítségével jelentős kezdeti sikereket értek el a már említett *P. chrysogenum*, a karbapenem-termelő *Streptomyces griseus* [79] vagy éppen a cefalosporin C-termelő *Cephalosporium acremonium* (syn. *Acremonium chrysogenum*) törzsekkel [80]. A rekombinációval létrehozott mutánsoknál az antibiotikum

hozam növelése, illetve az ipar szempontjából előnyös tulajdonság (pl.: szubsztráthasznosítás, növekedési sebesség, spóráképzés) felerősítése mellett akár új antibiotikumok szintézise is indukálható az adott termelő törzsben [81].

Általános értelemben véve az ipari törzsnemesítést célzó rekombináns DNS technológiák alkalmazása valamely gazdasági előnnyel bíró gének szabályozott expresszióján alapul. Ez alatt értünk minden olyan genetikai rekombinációs eljárást, amely különböző szervezetekből származó genetikai anyagok izolálása, kombinálása, új gazdaszervezetbe történő átvitele és integrálódása révén új genetikai kombinációk előállítását eredményezi. Az újonnan létrehozott, megfelelő szelekciós markerekkel ellátott plazmid vektorok és a specifikus DNS-fragmensek gazdaszervezetbe történő bejutását segítő egyre hatékonyabb átviteli rendszerek (transzformáció, konjugáció vagy transzdukció) szisztematikus alkalmazása új távlatokat nyitott az ipari antibiotikum termelésben. Ezzel párhuzamosan, az antibiotikum szintézis útvonalak mind mélyrehatóbb megismerése révén lehetőség nyílt a bioszintézisben résztvevő szabályozó gének célzott irányú felhasználására, melyben új távlatokat nyitottak az új generációs szekvenálási technológiák megjelenése. A genetikai állomány részletes megismerése - különös tekintettel az ipar számára elsődlegesen fontos bioszintetikus génekre – nélkülözhetetlen mozzanat a termelő törzsben rejlő antibiotikum termelési képességek feltárásában.

3.7. A kísérleteink során alkalmazott új generációs szekvenálási (NGS) technológiák

Az 1970-es évek végi megjelenését követően majd 30 éven át a Sanger-féle láncterminációs (didezoxi) szekvenálás számított az alapvető genomszekvenálási eljárásnak a genomikai kutatások területén. A módszerhez olyan kiemelkedő jelentőségű eredményeket társíthatunk, mint az 1990 és 2003 között megvalósult Humán Genom Projekt [82]. Az utóbbi két évtizedben tapasztalt dinamikus technológiai fejlődésnek köszönhetően azonban az új generációs szekvenálási (NGS) technológiák megjelenése forradalmasította az iparágat. A tradicionális Sanger módszeren alapuló, első generációs kapilláris szekvenálással szemben jelentős áttörést eredményezett a nagy áteresztőképességű NGS technológiák sokoldalúsága, amely több minta masszív, párhuzamos analízisét teszi lehetővé egyidejűleg, költséghatékony módon, rövid idő alatt.

A második generációs szekvenálási módszerek alapvetően két főbb kategóriába csoportosíthatók, úgymint szekvenálás ligálással (SBL), illetve szekvenálás szintézissel (SBS) [83]. Mindkét esetben enzimikus alapon működő szekvenálási eljárásról beszélünk. Általánosságban véve az SBS módszer során a DNS polimeráz aktivitásán alapul a szekvenálási folyamat és fluorofór által emittált fény detektálásán vagy az ionkoncentráció változása alapján

történik a szintetizálódó DNS szálba beépülő nukleotid meghatározása. Ezzel szemben az SBL nem használ DNS polimerázt a nukleotidok beépítéséhez, hanem DNS-ligáz mediált úton zajlik a szekvenálási reakció, amely során a fluorofórral jelölt, ismert dinukleotidokat tartalmazó próba hibridizál a templát DNS fragmentummal a szintetizálódó szál szomszédos oligonukleotidjához kapcsolódva. A próba adott pozíciójával komplementer bázis vagy bázisok azonosítása szintén a fluorofór emissziós spektruma alapján történik.

3.7.1. *S. azurea* SZMC 14600 genomszekvenálása

Felismervén, hogy a *Streptomyces* genomok analízise felbecsülhetetlen forrását jelentheti az új gyógyszerek felfedezésére irányuló törekvéseknek, a dinamikus fejlődő bioinformatikai háttérrel meg támogatott genomszekvenálási projektek világszerte számos egyéb, ritka aktinomicéta fajra is fokozatosan kiterjedtek. Ezt a nemzetközi trendet követve 2012-ben két *S. azurea* törzs, név szerint a Runmao által leírt *S. azurea* NA-128^T (= DSM 44631) típus törzs [25], illetve a magyar vonatkozású *S. azurea* SZMC 14600 [84] genomszekvenálása is párhuzamosan megtörtént. Az emelt primycintermelő-képességgel jellemzett *S. azurea* SZMC 14600 genomszekvenálása a szegedi BayGen Intézetben valósult meg, melyet a rövid leolvasási kerettel dolgozó (50 bázispár) SOLiD 3 Plus, illetve a hosszabb leolvasási kerettel (400-500 bázispár) dolgozó Roche 454 FLX szekvenáló platformokat kombinálva hajtottak végre.

A PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén történt genomszekvenálási adatok feldolgozásának eredményeként Csepregi és munkatársai elkészítették a primycin PKS bioszintetikus génklaszter első, részleges leírását, valamint Kovács-Valasek és munkatársai nyomán megszületett egy mindaddig ismeretlen NRPS és egy PKS/NRPS hibrid kriptikus bioszintetikus génklaszter jellemzése is [85]. Bár a genomszekvenálási adatok birtokában részletes képet alkothattunk a primycin bioszintetikus génklaszter strukturális felépítéséről, a bioszintézisért felelős gének fermentációs körülmények között történő megnyilvánulása továbbra is megválaszolatlan kérdés maradt.

3.7.2. *S. azurea* SZMC 14600 RNS szekvenálása

Azzal, hogy a 2000-es évek elejétől kezdődően egyre nagyobb számban váltak elérhetővé különböző aktinomicéta (elsősorban *Streptomyces*) fajoktól származó jó minőségű teljes genomszekvenálási adatok [86-88] nyilvánvalóvá vált, hogy számos faj esetében genomi szinten jóval nagyobb gyakorisággal fordulnak elő másodlagos anyagcseretermékek bioszintéziséért felelős génklaszterek, mint az a klasszikus fermentációs eljárások alapján prediktálható lenne [89]. Ebből kifolyólag a genomszekvenálási adatok elemzése („genome mining”) egy új,

alternatív folyamatot biztosít a biológiailag aktív szekunder metabolitok felfedezésére, valamint a már ismert bioszintézis útvonalak mélyrehatóbb megismerését is lehetővé teszi [44, 90]. Mindazonáltal a bioszintetikus génklaszterek pusztán strukturális genomikai alapokon nyugvó megközelítése csupán a meglévő potenciál feltárását szolgálja. Az antibiotikum termelő törzsek bioaktív metabolit termelésének háttérében álló gének csak is funkcionális vizsgálatok tükrében értelmezhetőek.

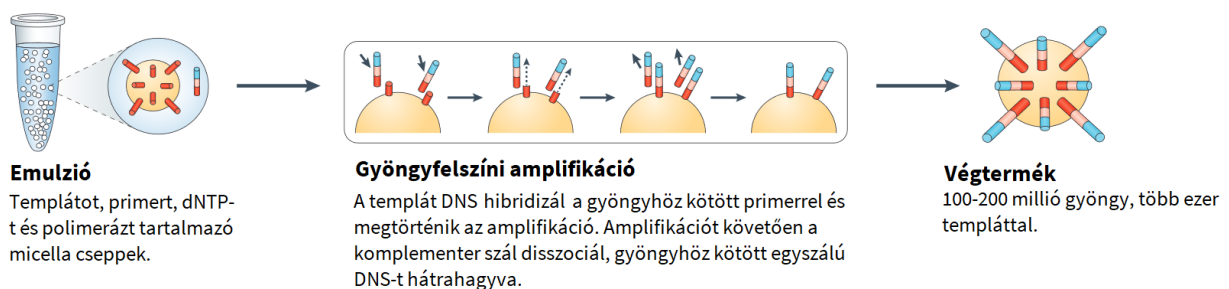
A metabolikus folyamatok során megnyilvánuló gének expressziós aktivitásának vizsgálatára több, széles körben elterjedt mérési módszer létezik. Az egyik alapvető és legrégebbi mérési technika a Northern-hibridizáció, mely az átfert transzkriptum mennyiségén túl annak minőségéről (pl.: méret, degradáció) is információt nyújt. Az izolált RNS molekulák elválasztásán és membránhoz kötött specifikus próbával történő hibridizáción alapuló módszer kiválóan alkalmas egy adott sejt pillanatnyi génexpressziós állapotának jellemzésére, habár a munkafolyamat rendkívül munkaigényes és nagy mennyiségű RNS-t igényel. Újabb eljárás, de szintén a hibridizáció elvén működő technológia a DNS chip (DNA microarray), melynek elterjedése forradalmasította a génexpressziós profilalkotást. A porózus membrán helyett szilárd hordozó felületére szabályos elrendezésben kikötött nagyszámú, jelölt specifikus DNS szekvencia, másnéven próba (pl.: gén fragmentum, oligonukleotid) révén akár több ezer transzkriptum egyidejű analízise is elérhetővé vált. Ugyan ezen technikák alapvető eszközei a különböző indíttatású génaktivitás vizsgálatoknak, azonban sok esetben nem rendelkeznek kellő szenzitivitással, így a változatos biológiai folyamatok során végbemenő génexpressziós változásokat csak hozzávetőlegesen képesek reprezentálni. Ezzel szemben a széles körben hozzáférhető, nagy érzékenységgű és csak kis mennyiségű RNS-t igénylő reverz transzkripciót követő kvantitatív polimeráz láncreakció lehetővé teszi az egyes transzkriptum változatok és homológ RNS molekulák specifikus azonosítását is, melyet ezáltal gyakran használnak az átfogó génexpressziós vizsgálatokból (pl.: DNS chip, RNS szekvenálás) származó megállapítások igazolására is. Az RNS szekvenálás (RNS-Seq) a nagy áteresztőképességű új generációs szekvenálási módszerek nyújtotta lehetőségeket kihasználva részletes bepillantást enged a sejtben lejátszódó pillanatnyi transzkripciók állapotokba. Az antibiotikum szintézis útvonalban résztvevő valamennyi kódoló RNS molekulának egyidejű megismerése lehetővé teszi a mikroorganizmusok különféle fiziológiai vagy környezeti körülményekre reagáló szabályozó mechanizmusainak pontosabb megértését, ahogyan azt több iparilag fontos *Streptomyces* faj transzkripció és transláció folyamatainak tanulmányozását célzó vizsgálat példázza [91]. A génexpressziós szintek átfogó analízise több egzotikus bioaktív metabolit, mint például natamycin vagy jamaicamid termelésének háttérében rejlő regulációs folyamat megértéséhez

segítette hozzá a kutatókat, mely végső soron fontos eszközzé válhat a racionális gyógyszertervezési eljárásoknak [92, 93].

A primycin bioszintézis transzkripcionális szinten történő megismerése lehetővé teszi számunkra az antibiotikum szintézis szempontjából kulcsfontosságú gének beazonosítását, melyek potenciális targetként szolgálhatnak a bioszintézis ipari szempontból történő hatékonyabbá tételéhez, illetve kontrollált szabályozásához. Ennek érdekében nem sokkal azután, hogy a PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék és a PannonPharma Kft. együttműködésének keretében megvalósult a primycin-termelő ipari törzs genomszekvenálása, a szegedi BayGen Intézetben sor került a törzs RNS szekvenálásra is.

3.7.2.1. SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) szekvenálás

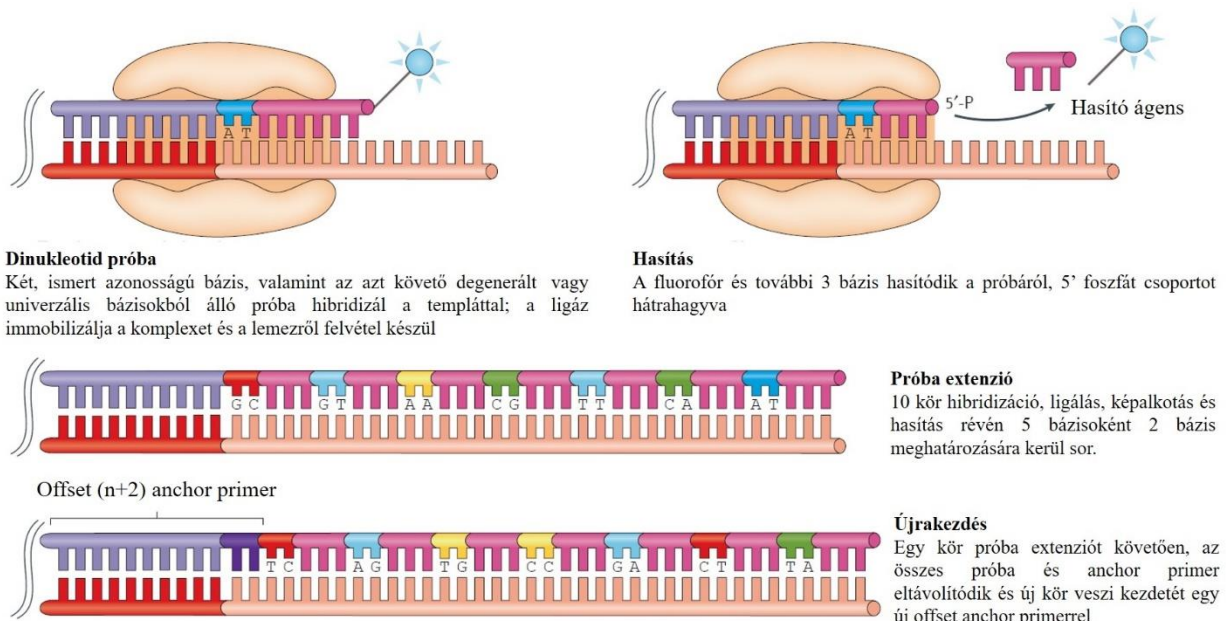
A primycin-termelő ipari törzs RNS szekvenálása SOLiD v4 platform segítségével történt. A SOLiD rendszer alapvetően kétfajta könyvtárral dolgozik, mely a felhasználás módjától, illetve a kinyert információtól függően lehet fragmentum könyvtár (pl.: célzott újraszekvenálás), vagy mate-pair könyvtár (pl.: *De novo* szekvenálás). Könyvtárkészítés során a nebulizációval / ultrahangos szonikálással mechanikusan vagy enzimatis úton fragmentált és méretszelektált DNS fragmentumokat első lépésben univerzális adapter szekvenciákhoz (P1 és P2) ligálják. A templát DNS 5' végéhez kötött P1 adapter, illetve a mikrogyöngyök felszínéhez kötött komplementer oligonukleotid szekvenciák hibridizációját követően emulziós PCR segítségével történik a templát klonális amplifikációja (6. ábra).



6. ábra Adapterhez ligált fragmentum könyvtár klonális amplifikációja emulziós PCR-rel, SOLiD szekvenálás során [83].

A felsokszorozott templát DNS-t hordozó gyöngyöket ezt követően egy üveglemez felületén immobilizálják, ahol lejátszódik a szekvenálási reakció. A fluoreszcensen jelölt próba és a gyöngyhöz kötött templát DNS adaptor régiójára specifikus oligonukleotid („anchor”) hibridizál a szekvenálandó DNS szállal. DNS-ligáz enzim segítségével az ismert régióhoz kötődő anchor szekvencia 5' végén hozzáférhető foszfát csoportot és a próba 3' végén lévő szabad

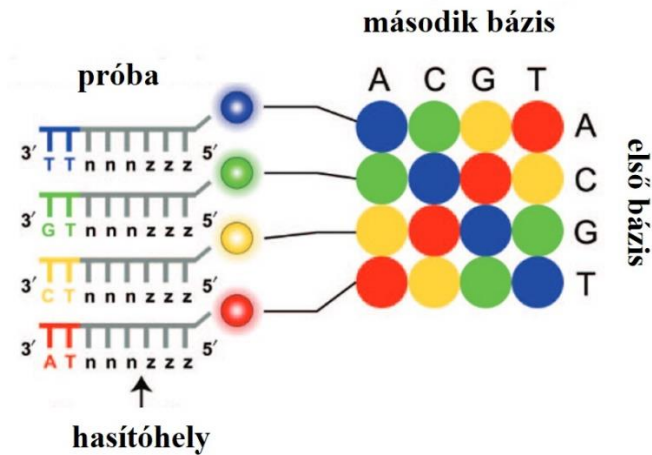
hidroxil csoportot egymáshoz kötnék. Ligálást követően a próba 5' végéről lehasadó fluorofór detektálásával azonosíthatóak a próba adott szakaszával komplementer bázisok (7. ábra) [83].



7. ábra SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) alapú szekvenálási folyamat sematikus ábrázolása [83].

Mivel a szekvenálás során 5 bázisonként 2 nukleotid azonosítására kerül sor, az adaptor szekvenciához kötött anchor primer komplett extenziójához 7-10 ligálási ciklus szükséges. Ezt követően a megszentetizált komplementer szál (anchor primer - próba komplex) denaturálódik és kezdetét veszi a következő ligálási kör. Az újabb, 7-10 ligálási ciklusból álló kör indítása, új („offset”) primer hozzáadásával indul, mely a korábbihoz képest 1 bázissal (n-1) elcsúsztatva (3' vég irányába) kötődik az adapterhez. A teljes templát DNS szál lefedésére összesen 5 kör ligálási ciklusra van szükség, mely során minden bázis kétszeri leolvasáson esik át [94].

A SOLID platformhoz használatos próbák 8 nukleotidból álló (oktamer) szekvenciák, melyek két bázist határoznak meg: a 3' végen található 2 darab próbaspecifikus bázist 6 degenerált nukleotid (nnzzzz) követ, az 5' véghez csatolt 4 lehetséges fluorofór egyikével. A próba szekvencia 5. és 6. nukleotidja között specifikus hasítóhely található, ahonnan a fluoreszcens jelölés ligálást követően lehasad. Mivel a 16 lehetséges dinukleotid kombinációhoz egyenként nem társítható egyedi fluorofór, ezért a rendszer 4 fluoreszcens szignált használ, melynek mindegyike 4 lehetséges dinukleotid kombinációnak feleltethető meg („color space” kódolás) (8. ábra). A DNS szál szekvenciájának meghatározása a color space kódolás visszafejtésével határozható meg [95].



8. ábra SOLID szekvenálásnál alkalmazott szinkódolási séma, négy lehetséges dinukleotid próba variációval [95].

A SOLID alapú szekvenálási eljárás fő limitációs tényezője, hogy rövid leolvasási kerettel dolgozik, mely megnehezíti a szekvenálási readok pontos összeszerelését. Ugyan ezen a téren történt előrelépés és a kezdeti 35 bp-ról sikerült 85 bp-ra növelni a leolvasási hosszt, azonban ez még mindig jelentősen elmarad a többi NGS technológiához képest. Emellett szintén a SOLID rendszer hátrányaként említendő a hosszú futási idő (7-14 nap) és hogy nehezen kezeli a palindrom szekvenciákat. Mindezekből kifolyólag a SOLID rendszer nagy, komplex genomok szekvenálására nem ajánlott. Ezzel szemben a technológia előnye a kedvező fajlagos költsége (0,13 \$ per millió bázis), valamint nagyfokú pontossága (>99,94%) köszönhetően a rövid read hosszának és hogy minden bázis kétszeri leolvasásra kerül [96, 97].

4. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy az utóbbi időben több kezdeményezés is indult az antibiotikum kutatás és fejlesztési törekvések újjáélesztésére, a klasszikus mikrobiológiai, analitikai és a modern kor technológiai színvonalának megfelelő genomikai eszközöket egyaránt ötvöző innovatív technológiák jelenléte nem mindennapos az iparban. Ezen eljárások kombinált felhasználásával munkánk céljaul fogalmztuk meg a primycin ipari léptékű előállításának javítását, valamint a primycin szintézis hátterében húzódó folyamatok mélyreható megismerését a termelő *Saccharomonospora azurea* törzsek összehasonlító strukturális és funkcionális genomikai elemzése révén.

A fenti elveket követve az alábbi célkitűzéseket fogalmztuk meg:

- A primycin-termelő *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsek antibiotikumtermelő-képességének meghatározását klasszikus mikrobiológiai és analitikai módszerek segítségével.
- A primycin fermentációs eljárás hatékonyságának növelését hagyományos fermentáció optimalizáció révén.
- A primycin bioszintézisért felelős génklaszter *in silico* strukturális jellemzését:
 - I-es típusú PKS struktúrgének, valamint a primycin molekula bioszintézisében résztvevő prekursor, illetve módosító gének azonosítása.
 - A primycin PKS modul és domén szerveződésének jellemzése.
 - A multienzim szubsztráthasznosításáért felelős katalitikus domének strukturális vizsgálata.
- A *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsek komparatív funkcionális analízisét:
 - RNS szekvenálásából származó adatok bioinformatikai feldolgozása.
 - A differenciáltan expresszáldott gének funkcionális azonosítása és besorolása GO (Gene Ontology), illetve COG (Clusters of Orthologous Groups) rendszerek segítségével.
 - Az eltérő expressziót mutató gének vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR-ral.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Alkalmazott mikroorganizmusok

- *Amycolatopsis orientalis* DSM 40040
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Kibdelosporangium aridum* DSM 43828
- *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600
- *Saccharomonospora azurea* DSM 44631

5.2. Felhasznált anyagok

5.2.1. Táptalajok, tápoldatok

- Előinkubációs tápoldat (EI): 3,00% szójaliszt (Sofarine), 4,20% vízdoldható keményítő (Sigma), 0,36% NaCl (Merck), 0,60% CaCO₃ (Roth), 0,50% napraforgóolaj (kereskedelemben kapható), pH 8,0
- Fermentációs tápoldat (EF): 4,00% szójaliszt (Sofarine), 4,00% vízdoldható keményítő (Sigma), 0,30% NaCl (Merck), 0,50% CaCO₃ (Roth), 0,30% sztearinsav (Sigma), 0,10% KH₂PO₄ (Molar), 0,60% napraforgóolaj (kereskedelemben kapható), pH 9,5
- Luria Bertani (LB) agar (Biolab): 1,00% tripton, 0,50% élesztőkivonat, 1,00% NaCl, 1,30% agar, pH 8,0
- Luria Bertani (LB) tápoldat: 1,00% tripton (Biolab), 0,50% élesztőkivonat (Biolab), 1,00% NaCl (Merck), pH 8,0
- Difco™ Micro Assay Culture Agar (MACA) (BD): 0,50% pepton, 2,00% élesztőkivonat, 1,00% dextróz, 0,20% KH₂PO₄, 0,01% poliszorbát 80, 1,00% agar, pH 6,7
- Mueller-Hinton Agar 2 (Sigma): 2,00% marhahúskivonat, 1,75% kazein savas hidrolizátuma, 0,15% vízdoldható keményítő, 1,30% agar, pH 7,3

5.2.2. Oldatok

- A eluens: 60,00% 10 mM NH₄OAc (Molar), hangyasav (Sigma), 40,00% acetonitril (Sigma)
- Butanol-etanol-víz (BEV) oldat: 25,00% n-butanol (Molar), 25,00% etanol (Molar), 50,00% desztillált víz
- Etanos foszfát puffer: 1,16% K₂HPO₄ (Molar), 0,91% KH₂PO₄ (Molar), 25,00% etanol (Molar)

5.3. Alkalmazott módszerek

5.3.1. Mikroorganizmusok tenyésztése

A primycin-termelő *S. azurea* törzsek hosszú távú tárolása 20% glicerinnel kiegészített LB tápoldatban, -80 °C-on történt felhasználásig. Az antibiotikum termelés indukálása egy többlépéses fermentációs eljárás során valósult meg. Az első, felszaporító lépés során a termelő törzset tartalmazó frissen kiolvasztott fagyasztott letétből 1 mL-t oltottunk 50 mL EI tápoldatot tartalmazó 300 mL-es Erlenmeyer lombikba, majd rázótermosztátban 37 °C-on, 2 napig, 200 rpm-en ráztuk. Ezt követően az alaposan homogenizált előtenyészetből 1 mL-t tovább oltottunk 50 mL EF tápoldatot tartalmazó 300 mL-es Erlenmeyer lombikba és a tenyészeteket kísérlet beállításától függően 5-7 napig ráztuk 28 °C-on, 200 rpm-en.

5.3.2. Antimikrobiális hatás vizsgálat

A primycin antimikrobiális hatásának vizsgálatát agardiffúziós biológiai értékméréssel végeztük el ötnapos rázatott lombikos fermentlé mintákból [98]. Mintafeltárás céljából 0,5 mL alaposan homogenizált fermentlevet tízszeresére hígítottunk BEV-vel, majd egy percen át ráztuk kémcsőrázó segítségével. Az így kapott homogenizátumból kilenctagú felező hígítási sort készítettünk etanolos foszfát pufferrel, melynek első tagja maga a feltárt tenyészet, az utolsó pedig ennek 256x hígítása.

A vizsgálatokhoz referencia standarként kristályos primycin-szulfát 1 mg/mL-es, BEV-es törzsoldatát használtuk. A kiindulási törzsoldatot első lépésként tízszeresére hígítottuk szintén BEV-el, majd kilenctagú felező hígítási sort készítettünk etanolos foszfát pufferrel az alábbi végkoncentrációkat kapva: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,250 µg/mL, 3,125 µg/mL, 7,563 µg/mL, 0,781 µg/mL, 0,390 µg/mL.

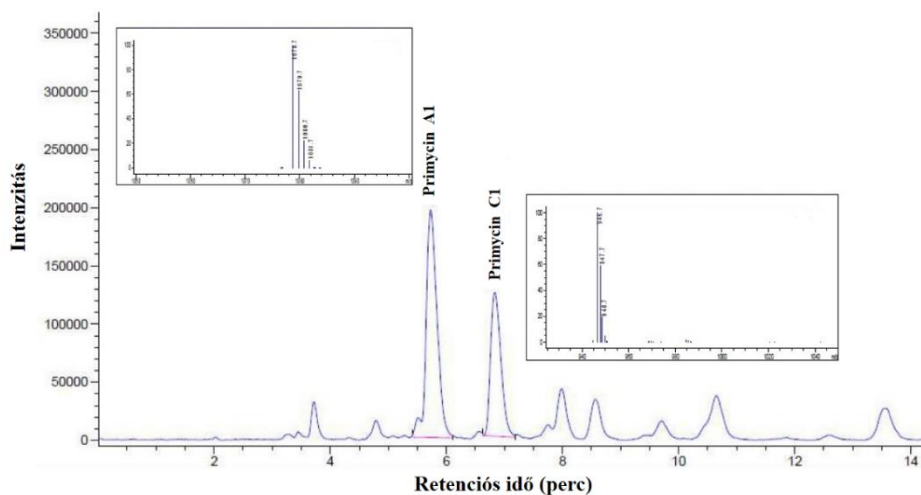
Az agardiffúziós biológiai értékmérésre MACA ferde agaron növesztett *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tesztörzs 24 órás tenyészeit használtuk. Az agar felszínéről steril desztillált vízzel lemosott sejtekből 3 mL ($\sim 10^6$ telepformáló egység / mL) sejtszuszpenziót oltottunk 200 mL, 50 °C-os Mueller-Hinton agar 2 táptalajba és alaposan elkevertük. A beoltott táptalajt Petri-csészékbe öntöttük és fülke alatt hagytuk megdermedni. Dermedést követően dugófúróval 9 mm átmérőjű, 5 mm mély mintatartó lyukakat fúrtunk a táptalajba. A lyukakba egyenként 100 µL mintát, illetve standardot pipettáztunk a hígítási sorok 4-9. tagjait felhasználva, legalább három technikai ismétlésben, majd a csészéket 30 °C-on, 20 óráig inkubáltuk. Másnap a gátlási zónák leolvasását mm pontossággal elvégeztük, a kapott értékeket átlagoltuk. A standard esetében ábrázoltuk a mért gátlási zónák nagyságát az ismert koncentrációk függvényében, majd a pontokra illesztett görbe egyenletébe behelyettesítve meghatároztuk a mintáknál mért gátlási

zónákhoz tartozó koncentráció értékeket. A hígítási fokkal történő korrekciót követően megkaptuk az egyes hígítási tagok esetében mért primycin koncentrációkat, melyeket átlagolva határoztuk meg a kiindulási fermentlé tényleges primycin koncentrációját.

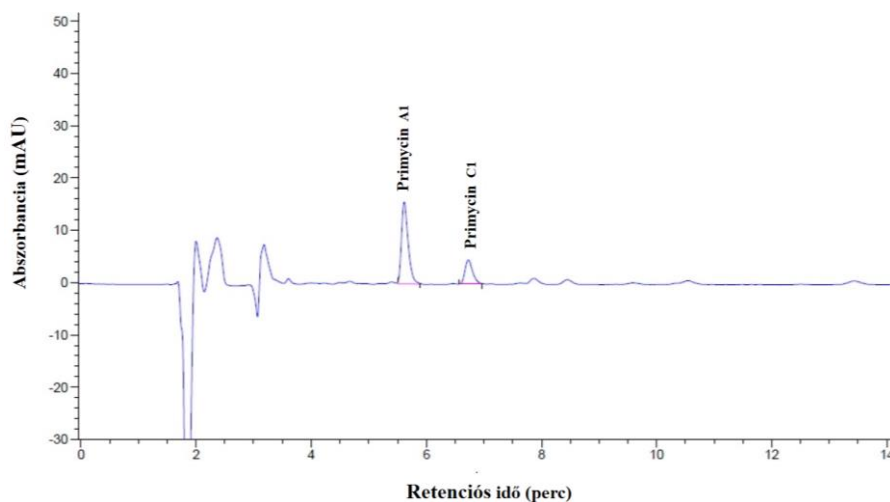
5.3.3. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

A fermentlé minták primycin koncentrációjának meghatározását, az antimikrobiális hatás vizsgálattal párhuzamosan, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS) is elvégeztük. A rázatott lombikos fermentációk különböző időpontjaiban megmintázott fermentleveiből 0,5 mL alaposan homogenizált fermentlé mintát használtunk fel, melyet 4,5 mL BEV-vel tízszeresére hígítottunk. A mintákat ezt követően egy percre intenzíven vortexeltük, majd 3800 g-n 10 percig centrifugáltuk (Hettich Universal 32). A felülúszót 0,45 µm pórusméretű, PTFE (politetrafluoretilén) fecskendőszűrőn (APG Europe) szűrtük injektálás előtt. Referencia standarként kristályos primycin-szulfát BEV-es oldatát használtuk közvetlenül, szűrés nélkül az alábbi koncentrációkban: 0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL és 0,20 mg/mL. A komponensek elválasztását Poroshell 120 SB C-18 (2,7 µm, 4,6 x 100 mm, Agilent) oszloppal ellátott Agilent 1100 folyadékkromatográf készüléken hajtottuk végre. A vizsgálatokhoz izokratikus elválasztási rendszert használtunk, melynek mobil fázisát 10 mM NH₄OAc puffer (0,8 g NH₄OAc 1000,0 mL HPLC minőségű vízben oldva és hangyasavval pH 5,0-re állítva) és acetonitril 60/40 v/v arányú keveréke (Eluens A) alkotta, 0,5 mL/perc áramlási sebesség mellett. Diódasoros detektálási (DAD) módban, 210 nm-en történt a detektálás, míg a tömegspektrométerrel pozitív ionizációs módban, m/z 900-1150 tartományban történt a primycin komponensek beazonosítása.

A fermentlé extraktumok mérése során az MS jel alapján történt a primycin komponensek egyértelmű beazonosítása (9. ábra), míg a hozzájuk tartozó DAD (diódasoros detektor) jel alapján a koncentráció meghatározása (10. ábra). A számítások során a primycin komplex 70-75%-át kitevő, két könnyen detektálható fő komponensnek, a primycin A1 (m/z: 1077,7) és primycin C1 (m/z: 945,7) terület értékeiből határoztuk meg a koncentráció értékeket, a standard kalibrációs egyenesbe behelyettesítve. Minden kísérletet legalább három biológiai és technikai ismétlésben végeztünk. Az eredmények statisztikai kiértékelését kéttényezős varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük GraphPad Prism statisztikai szoftver segítségével.



9. ábra Referencia standarként használt kristályos primycin-szulfát 0,10 mg/mL-es BEV-es oldatának extrahált ion kromatogramja. Primycin A1 csúchoz tartozó molekulatömeg (m/z): 1077,7 és a primycin C1 csúchoz tartozó molekulatömeg (m/z): 945,7.



10. ábra Referencia standarként használt kristályos primycin-szulfát 0,10 mg/mL-es BEV-es oldatának HPLC kromatogramja.

5.3.4. DNS-DNS-hibridizáció

A *Saccharomonospora* fajok *in silico* DNS-DNS-hibridizációját (DDH) a Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) web szerver (<https://ggdc.dsmz.de>) segítségével végeztük. A távolság értékek meghatározására a nem teljes, draft genomok összehasonlításához ajánlott 2-es formulát („Formula 2”) használtuk [99]. A vizsgálatba bevont *Saccharomonospora* genomok génbanki hozzáférési száma: *S. azurea* SZMC 14600 - AHBX01000000; *S. azurea* DSM 44631 - AGIU02000000; *S. amisosensis* DSM 45685 - JAAOYM000000000; *S. cyanea* DSM 44103 - AHLY000000000; *S. glauca* DSM 43769 - AGJI000000000; *S. halophila* DSM 44411 - AICX000000000; *S. marina* DSM 45390 - AHLX01000000; *S. paurometabolica* DSM 44619 - AGIT020000000; *S. piscinae* 06168H-1 - VCEK01000000; *S. saliphila* DSM 45087 -

AICY01000000; *S. viridis* DSM43017 - ABUM01000000; *S. xinjiangensis* DSM 44391 - AICV00000000.

5.3.5. Primycin bioszintézis génklaszter

A primycin bioszintézisért felelős génklaszter azonosítását az antiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) [100] online szoftvercsomag segítségével végeztük el. A program által bioszintetikus struktúrgénként és a további bioszintetikus génként azonosított gének és fehérjék homológia keresését a National Center for Biotechnology Information (NCBI) szerver nem redundáns fehérje adatbázisban végeztük BLASTp segítségével [101]. Az elvégzett homológia keresésben résztvevő gének pontos listája az 1. számú mellékletben lett feltüntetve.

5.3.6. Primycin PKS génklaszter azonosítása és *in silico* strukturális elemzése

A primycin PKS génklaszter azonosítása és további elemzése antiSMASH és SBSPKS (Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases) [102] online szoftverek, a katalitikus domének aminosav szekvenciájának többszörös illesztése CLUSTALW program segítségével történt [103]. Az adott primycin PKS domének aminosav szekvenciáinak illesztését amfotericin, azalomycin, eritromicin, rapamycin, stambomycin és thailandin PKS hasonló karakterisztikával bíró referencia szekvenciáival végeztük.

Az NCBI nem redundáns fehérje adatbázisban végzett homológia keresés eredményeképpen nagyfokú hasonlóságot mutató *K. aridum* és *A. orientalis* fajok képviselőire szintén kiterjesztettük a primycin-termelő *S. azurea* törzsek kapcsán elvégzett primycin PKS génklaszter *in silico* analízisét. A vizsgálathoz felhasznált genomok génbanki hozzáférési száma: *K. aridum* DSM 43828 - FWXV00000000; *K. aridum* A82846 - QHKI00000000; *K. aridum subsp. largum* NRRL B-24462 - JNYM01000003; *A. orientalis* B-37 - JXRD01000000; *A. orientalis* DSM 40040 - ASJB00000000.

5.3.7. Transzkriptomika

A transzkriptomikai vizsgálatokhoz szükséges RNS izolálását ötnapos EF fermentlevekből végeztük el Stiekema és munkatársai által kidolgozott fenol-kloroformos eljárással [104]. DNáz (Promega RQ1-RNase-free DNase) kezelést követően a minták RNS mennyiségének meghatározását Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) fluorométeren Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a minőségi meghatározást pedig Agilent Bioanalyzer 2100 készüléken Agilent RNA 6000 Nano kit segítségével végeztük. Mindkét primycin-termelő *S. azurea* törzs esetében a több biológiai ismétlésből származó, nagy tisztaságú, azaz megfelelő

RNS integritás (RIN) értékekkel (RIN >8,5) bíró RNS minták poolozásra kerültek. Egyesítést követően az RNS szekvenálást a szegedi BayGen Intézet SOLiD v4 szekvenáló rendszerével végeztük. A szekvenáláshoz SOLiD total RNA-Seq Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártói utasításnak megfelelően. A könyvtárkészítés során RiboMinus rRNA Removal Kit (Life Technologies) alkalmazásával elsőként 5 µg poolozott RNS minta dúsítását végeztük el a nagyméretű, riboszómális RNS molekulák eltávolításával, majd a maradék RNS-t fragmentáltuk RNáz III enzim segítségével. Az enzimátikus emésztést követően szelektáltuk a 100-200 bp méretű frakciót és adapterekhez ligáltuk, ahol ArrayScript™ Reverse Transcriptase enzim alkalmazásával 42 °C-on, 30 percig végeztük a komplementer DNS-szál (cDNS) szintézisét. A cDNS könyvtárat Qiagen MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk és 6% TBE-Urea denaturáló poliakrilamid gélben méretszelektáltuk. A 150-250 bp nagyságú cDNS frakció felsokszorozását AmpliTaq® DNA Polymerase-zal végeztük 100 µL-es reakció térfogatban emulziós PCR segítségével. A SOLiD P1 DNA Beads gyöngyökhöz kötött szekvenciák amplifikálása során alkalmazott hőmérsékleti profil: 95 °C - 5 perc (kezdeti denaturáció), majd 15 cikluson keresztül 93 °C - 30 másodperc (denaturáció), 62 °C - 30 másodperc (primer kapcsolódás), 72 °C - 30 másodperc (lánc hosszabbítás), végül 72 °C - 7 perc (végső lánc hosszabbítás). PCR amplifikációt követően a terméket Agencourt AmPureXP Beads (Beckman Coulter) segítségével tisztítottuk. A könyvtárak DNS koncentrációjának meghatározása SOLiD Library TaqMan Quantitation Kit (Life Technologies) segítségével történt. A gyöngyöket végül szekvenáló lemezekre rögzítettük és a SOLiD v4 szekvenáló rendszerben elvégeztük a szekvenálást.

5.3.8. Bioinformatikai analízis

Az RNS szekvenálásból származó adatok analízisét a Galaxy szerver online platformján (<https://usegalaxy.org>) végeztük [105]. A *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 transzkriptomikai „read”-ek illesztése a *S. azurea* SZMC 14600 referencia genomhoz történt Bowtie2 segítségével, míg a transzkriptom összeszerelést és differenciál expressziós vizsgálatokat a Cufflinks programcsomaggal hajtottuk végre [106]. A legalább kétszeres eltérést mutató (>2 vagy <-2, log₂), eltérően expresszázó gének funkcionális annotációja Blast2GO (ver. 5.2.4.) szoftverrel történt [107]. A GO besorolást az NCBI szerver nem redundáns fehérje adatbázisban végeztük BLASTx segítségével, 10e-3 „e-value” kimutatási küszöb mellett.

A differenciáltan expresszázó gének (DEG) COG funkcionális csoportokba történő besorolását a Joint Genome Institute (JGI) Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IGM/M) rendszer alapján végeztük [108, 109].

5.3.9. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A szekvenálási adatok feldolgozásának eredményeképpen több olyan eltérő expressziót mutató gént sikerült azonosítanunk a két *S. azurea* törzsből, melyek potenciálisan köthetők a primycin bioszintézishez. A kapott eredmények igazolására hét kiválasztott gén (2. táblázat), köztük az agmatináz gén expressziójának vizsgálatát végeztük el kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) segítségével ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) készüléken. A vizsgálatok alapjául szolgáló *S. azurea* RNS mintákat független fermentációkból (biológiai ismétlések) származó fermentlevelekből izoláltuk Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) kittel a gyártói utasításoknak megfelelően. Az izolált minták RNS mennyiségének meghatározását Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) fluorométeren Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. Egy µg totál RNS-ből kiindulva RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük a cDNS szintézist. A PCR reakcióhoz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-et használtunk 25 µL-es reakció térfogatban. A vizsgált génszakaszok amplifikálása specifikus oligonukleotidokkal történt, melyeket a 2. táblázat foglal össze:

2. táblázat A qRT-PCR vizsgálatokhoz használt primerek.

| Primer név | Target | Szekvencia (5' → 3') | Hosszúság (bázis) |
|--------------|---|----------------------|-------------------|
| ABC-1_F | ABC transzporter ATP-kötő fehérje (EHK80158.1) | GGTCTTTCTTCGGTCTCGTC | 21 |
| ABC-1_R | | CGTGGTCGCACATCAACTC | 19 |
| ABC-2_F | ABC-transzporter transzmembrán fehérje (EHK80159.1) | GCTCGTGGTGGTTCGGTAG | 18 |
| ABC-2_R | | TCGGACTCAGGATGGTGTG | 19 |
| Agm_F | agmatináz (EHK80172.1) | GGAACACACCGACGACAA | 18 |
| Agm_R | | GTTGACCAGACGCCAGAT | 18 |
| HK_F | kétkomponensű hisztidin kináz (EHK80176.1) | GTCCTGGGCTACTTTCGTCT | 20 |
| HK_R | | GCACCTTGCTACCGTCT | 18 |
| TetR-1_F | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó (EHK88153.1) | GATGACAGCAGCAGGAACAG | 20 |
| TetR-1_R | | GGGGAAGTGGCGGTAGAC | 18 |
| 3O-ACP_F | 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz (EHK87608.1) | GGTTGGAGGAGGGCTACG | 18 |
| 3O-ACP_R | | GTGGCGGTCGTTCTGCTT | 18 |
| 3O-ACP_III_F | 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz III (EHK84821.1) | GCACCAGGACGGGAATCT | 18 |
| 3O-ACP_III_R | | CGATGTTGACGACGAGACTG | 20 |
| G3PDH_F | glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (EHK85321.1) | GATGGCTCACCTGCTCAAG | 19 |
| G3PDH_R | | ATGGGCTCCTCGCTGTAG | 18 |

A PCR paraméterek beállítása során az alábbi kondíciókat alkalmaztuk: 95 °C - 10 percig (kezdeti denaturáció), majd 40 cikluson keresztül 95 °C - 15 másodperc (denaturáció), 58 °C - 30 másodperc (primer kapcsolódás), 72 °C - 30 másodperc (lánc hosszabbítás). A PCR reakció

lejátszódását követően az alábbi paraméterek szerint zajlott az olvadási görbék felvétele: 95 °C - 15 másodperc, 58 °C - 15 másodperc és 95 °C 15 másodperc. A relatív génexpressziós értékeket $\Delta\Delta C_t$ módszerrel [110] határoztuk meg gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) belső kontrollra vonatkoztatva. Minden biológiai mintát legalább három technikai ismétlésben vizsgáltunk. Az RNS-seq és az qRT-PCR eredmények közötti összefüggés kiszámítására Pearson-korrelációt alkalmaztunk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Primycintermelő-képesség

A PTE TTK Biológiai Intézet Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék korábbi munkássága során bizonyítást nyert, hogy a *Saccharomonospora* nemzetségbe tartozó, a *S. azurea*-val legközelebbi rokonságot mutató fajok nem rendelkeznek primycintermelő-képességgel. A vizsgálatokba bevont *S. cyanea*, *S. glauca*, *S. xinjiangensis* és *S. viridis* ugyan képesek voltak a primycin termelést indukáló fermentációs tápoldatban növekedésre és szaporodásra, azonban antibiotikum termelés nem volt kimutatható sem a klasszikus agardiffúziós biológiai értékméréssel, sem pedig a folyadékkromatográfiás analitikai módszerrel.

Munkánk során a primycintermelő-képesség meglétét vizsgáltuk genomi szinten a *Saccharomonospora* nemzetségbe tartozó, nyilvánosan hozzáférhető genom szekvenálási adatok átfogó feldolgozásával. A vizsgált *Saccharomonospora* fajok genetikai távolságának meghatározása során az azonos fajhoz tartozó *S. azurea* törzsek nagyfokú azonossága mellett csupán kismértékű hasonlóságot véltünk felfedezni a *S. azurea* SZMC 14600 és a nemzetségbe tartozó többi faj között (3. táblázat).

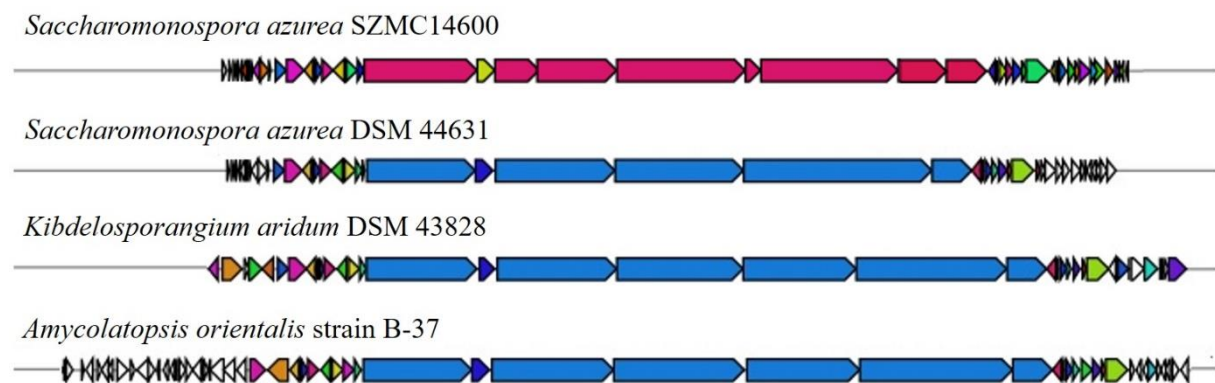
3. táblázat *S. azurea* SZMC 14600 genom összehasonlítása a *Saccharomonospora* nemzetség nyilvánosan elérhető genomjaival, Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) alapján.

| Fajnév | Törzs azonosító | HSP hossz/ teljes hossz ¹ | azonosság/ HSP hossz ² | azonosság/ teljes hossz ³ |
|---------------------------|--------------------|---|--------------------------------------|---|
| <i>S. azurea</i> | DSM 44631 | 91,30 | 93,40 | 93,90 |
| <i>S. cyanea</i> | DSM 44106 | 49,80 | 28,00 | 43,10 |
| <i>S. glauca</i> | DSM 43769 | 50,80 | 26,30 | 43,00 |
| <i>S. xinjiangensis</i> | DSM 44391 | 41,70 | 24,50 | 36,00 |
| <i>S. viridis</i> | DSM 43017 | 33,40 | 22,60 | 29,60 |
| <i>S. halophila</i> | DSM 44411 | 18,70 | 22,60 | 18,40 |
| <i>S. piscinae</i> | 06168H-1 | 35,70 | 22,30 | 31,00 |
| <i>S. saliphila</i> | DSM 45087 | 21,60 | 22,10 | 20,70 |
| <i>S. paurometabolica</i> | DSM 44619 | 19,50 | 21,90 | 19,00 |
| <i>S. marina</i> | DSM 45390 | 19,30 | 20,30 | 18,70 |
| <i>S. amisosensis</i> | DSM 45685 | 19,10 | 20,30 | 18,50 |

¹ Összes HSP hossz és a teljes genom hossz hányadosa (%), ² HSP-n belül talált összes azonosság és a teljes HSP hossz hányadosa (%), ³ HSP-n belül talált összes azonosság és a teljes genom hossz hányadosa (%), ahol a HSP jelentése magas hasonlósági pontszámú szegmenspár.

Az *in silico* DNS-DNS-hibridizáció vizsgálat nem teljes, draft genomok összehasonlításához ajánlott 2-es formulája alapján, amely a genomokon belül található magas hasonlósági pontszámú szegmenspárokon (HSP-n) belül feltárt összes azonosság és a teljes HSP hossz arányát veszi alapul, a két *S. azurea* törzs összevetése 93,40%-os DDH értéket eredményezett, azonban a nemzetség többi képviselője esetében ezen érték minden esetben 30% alatt maradt.

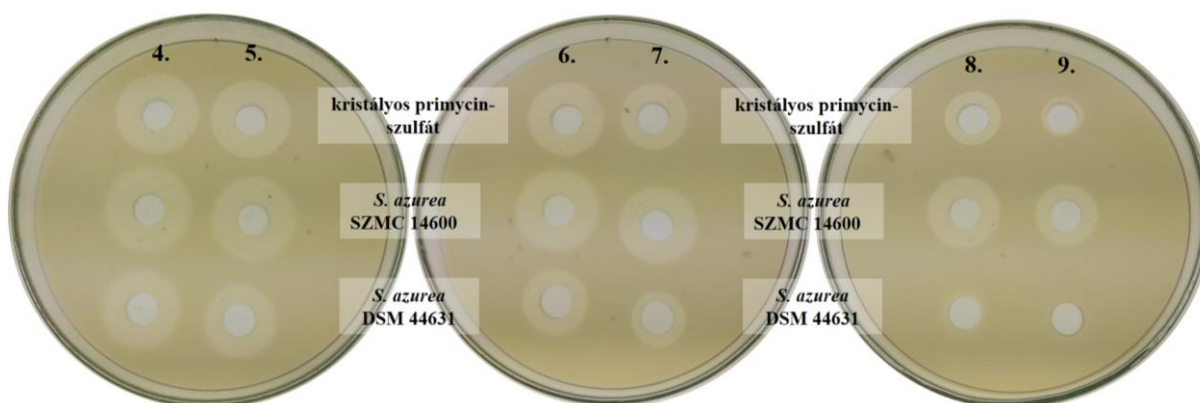
A vizsgált 11 *Saccharomonospora* faj genomszekvenálási adatainak mélyrehatóbb analízise során egyedül a két *S. azurea* törzs esetében sikerült a primycin bioszintéziséért felelős génklasztert *in silico* azonosítani. Mindazonáltal kiterjesztett vizsgálatunk a *Pseudonocardiaceae* család további két nemzetségén belül is azonosított olyan fajokat, melyek rendelkeznek a primycin bioszintéziséhez szükséges génkészlettel. Mind az *Amycolatopsis* nemzetségbe tartozó *A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040 törzsek, mind a *Kibdelosporangium* nemzetségbe tartozó *K. aridum* DSM 43828 törzs esetében is egyaránt azonosításra került a komplett primycin bioszintézis génklaszter (11. ábra). Ezen törzsek esetében azonban a primycin bioszintéziséért felelős struktúrgének megléte nem társul aktív antibiotikum szintézissel, ugyanis primycin fermentációs tápoldatban egyik törzs esetében sem tudtunk primycin termelést kimutatni sem agardiffúziós biológiai értékméréssel, sem pedig HPLC/ESI-MS módszerrel.



11. ábra A primycin bioszintézis génklaszter sematikus genetikai térképe a primycin-termelő *S. azurea* törzsek és a *Pseudonocardiaceae* családon belül azonosított *A. orientalis* B-37 és *K. aridum* DSM 43828 törzsek esetében. Az I-es típusú PKS struktúrgének *S. azurea* SZMC 14600 esetében sötét rózsaszín (■), míg a másik 3 törzs esetében világoskék (■) színnel jelölve, a további bioszintézisben résztvevő gének pontos sorrendjét az 1. számú melléklet tartalmazza. A nyilak orientáltsága a génátíródás irányát szemlélteti.

Annak ellenére, hogy az egyazon fajhoz tartozó, genetikailag közelálló *S. azurea* törzsek minden ismert képviselője alkalmas primycin termelésre, a primycin termelés hozamában jelentős különbségek figyelhetők meg. A primycintermelő-képességben mutakozó eltérések,

illetve az ezt meghatározó genomi komponensek transzkripcionális szinten történő vizsgálatára kiválasztott *S. azurea* DSM 44631 és *S. azurea* SZMC 14600 törzsek primycintermelő-képességének validálását mind agardiffúziós biológiai értékméréssel, mind HPLC/ESI-MS mérési módszerekkel elvégeztük. A vizsgálatok alapján mindkét *S. azurea* törzs primycin-termelőnek bizonyult, azonban jelentős különbség volt megfigyelhető az antibiotikum termelés mértékében. Az agardiffúziós biológiai értékmérés alapján meghatározott primycin koncentrációkat tekintve közel 7x magasabb hozam volt megfigyelhető a *S. azurea* SZMC 14600 ($1173 \pm 66,22$ mg/L) törzs esetében a *S. azurea* DSM 44631 ($168 \pm 9,35$ mg/L) törzshöz viszonyítva (12. ábra).

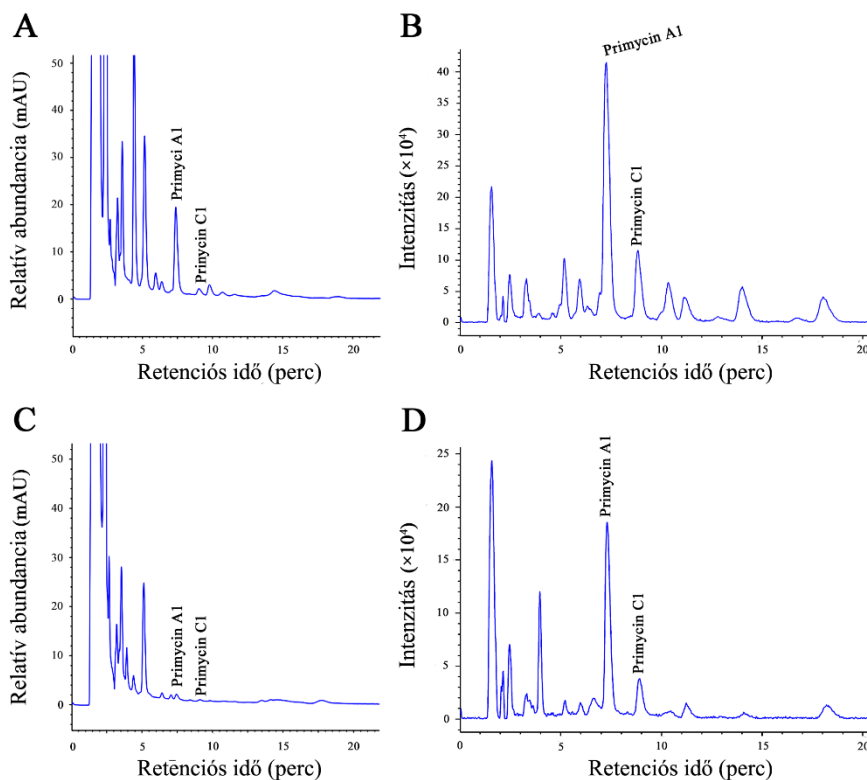


12. ábra *S. azurea* DSM 44631 és *S. azurea* SZMC 14600 törzsek primycintermelő-képességének vizsgálata agardiffúziós biológiai értékméréssel. Felső sor: kristályos primycin-szulfát, középső sor: *S. azurea* SZMC 14600, alsó sor: *S. azurea* DSM 44631. Számmal jelölve a hígítási sor tagjai: 4 - 12,5 µg/mL; 5 - 6,250 µg/mL; 6 - 3,125 µg/mL; 7 - 7,563 µg/mL; 8 - 0,781 µg/mL; 9 - 0,390 µg/mL.

Az antibiotikum termelés mértékében mutatkozó különbségeket HPLC/ESI-MS módszerrel szintén sikerült megerősíteni (4. táblázat és 13. ábra).

4. táblázat Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS) különböző fermentációs időpontokban mért primycin koncentráció értékek a *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsek esetében.

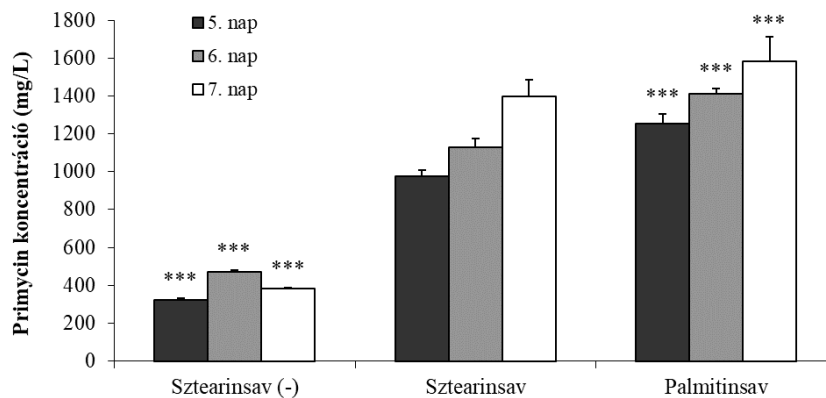
| Törzs | Primycin koncentráció (mg/L) | | | | |
|------------|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 3. nap | 4. nap | 5. nap | 6. nap | 7. nap |
| SZMC 14600 | 325,45 ± 6,18 | 728,24 ± 21,65 | 1113,89 ± 36,10 | 1248,08 ± 44,37 | 1261,06 ± 15,54 |
| DSM 44631 | 190,36 ± 14,16 | 220,10 ± 8,68 | 197,66 ± 3,41 | 219,81 ± 6,45 | 210,48 ± 5,66 |



13. ábra HPLC-vel kapcsolt ESI-MS kromatogramok az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 (A, B), illetve az alacsony primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* DSM 4463 (C, D) sejtextraktumok esetében. A HPLC kromatogramokon (A, C) 7,38 percnél és 9,03 percnél megjelenő csúcsok primycin A1-nek (m/z 1078,7) és primycin C1-nek (m/z 946,5) felelnek meg az ESI/MS-sel (B, D) mért molekula tömegek alapján. Az adatgyűjtés 22 perces futás mellett történt, 950-1150 m/z tartományban, pozitív ion módban.

6.2. Zsírsv sav szubsztrátok primycin bioszintézisre gyakorolt hatása

Fermentációs tápközeg optimalizációs vizsgálataink során a fermentációs tápoldat zsírsvsavösszetétel módosításának primycin termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérlet első lépéseként a primycin fermentációs tápközegben eredendően 3 g/L koncentrációban jelenlévő sztearinsavat a *S. azurea* sejtekben domináns telített zsírsvsava, a palmitinsavra (3 g/L) cseréltük. A fermentáció 5-7. napjai között HPLC/ESI-MS módszerrel mért primycin koncentrációkból jól látható (14. ábra), hogy az eredeti 3 g/L sztearinsav-tartalmú tápközeghez viszonyítva a palmitinsav-tartalmú fermentációs tápoldat szignifikánsan nagyobb hozamot eredményezett minden egyes nap összevetésében, míg ezzel szemben a zsírsvs nélküli fermentációs tápoldatban szignifikáns mértékű csökkenés figyelhető meg. A legmagasabb primycin koncentrációt a 7. napon mértük palmitinsav esetében (1583,63 mg/L), ami a sztearinsavhoz (1395,09 mg/L) képest mintegy 14%-os hozamnövekedést jelent. Ezzel szemben a zsírsvs nélküli fermentációs tápoldatban a 6. napon mért csúcskoncentráció mindössze 470,91 mg/L volt.



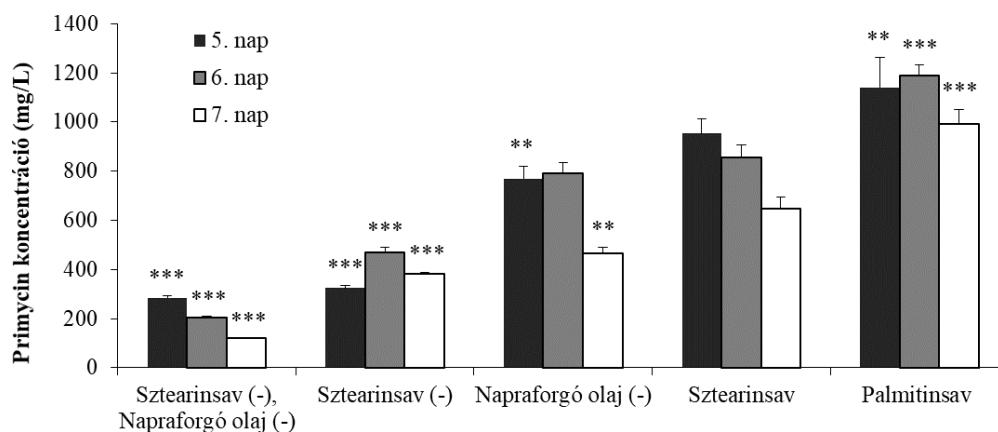
14. ábra Primycin koncentrációk alakulása zsírsavmentes és 3 g/L kiindulási koncentrációjú sztearinsav-/palmitinsav-tartalmú fermentálé extraktumokban, különböző fermentációs időpontokban (5-7. nap). Az egyes oszlopok magassága az adott zsírsav esetében mért primycin koncentrációk átlagát jelenítik meg, a hibasávok pedig a standard deviációt (***: $p < 0,001$).

A primycin fermentációs tápoldathoz direktbe hozzáadott zsírsav szubsztrát mellett a komponensek között megtalálható napraforgóolaj összetételéből adódóan szintén potenciális forrását képezheti a primycin bioszintézis folyamata során hasznosuló malonil-KoA, illetve metilmalonil-KoA prekursor molekuláknak. Ebből kifolyólag a sztearinsav módosítása mellett felmértük a napraforgóolaj primycin hozamra gyakorolt hatását is.

Korábbi vizsgálatainkkal összhangban a sztearinsav elhagyása ezen kísérlet sorozatunk alkalmával is negatívan hatott a primycin szintézis mértékére. A HPLC/ESI-MS módszerrel meghatározott primycin koncentrációk értelmében a mintegy 50%-kal alacsonyabb mértékű antibiotikum termelésben megnyilvánuló csökkenés statisztikailag is szignifikáns eltérést mutat az eredeti sztearinsavas összetétellel való összevetésében. Ezenfelül a fermentációs tápközeg ugyancsak csökkent primycin termelést indukáló képességgel bírt a szintén potenciális zsírsavforrásként szolgáló napraforgóolaj elhagyása esetében is, habár ennek mértéke jelentősen elmaradt a zsírsavmentes tápközeghez képest. A sztearinsavas összetétellel történő összevetésben ugyan az 5. illetve 7. napokon is szignifikáns eltérést tapasztaltunk ezen két összetétel között, a fermentáció ideje alatt elért maximális hozamot tekintve a napraforgóolaj-mentes összetétel (6. nap - 791,26 mg/L) már csak 17%-kal maradt el az eredeti sztearinsav összetétel kapcsán mért maximális hozamtól (5. nap - 952,43 mg/L).

A sztearinsav- és napraforgóolaj-mentes fermentációs tápoldat primycin termelést indukáló képessége ezzel szemben statisztikailag igazolható módon is jelentős mértékben elmaradt az eredeti 3 g/L sztearinsav-tartalmú tápoldat indukáló képességéhez képest, a fermentáció minden egyes napján. A primycin hozamra vetítve mindez összességében mintegy

70-80%-os csökkenést eredményezett. A fermentáció 5. napján mért legmagasabb primycin koncentráció sem haladta meg a 300 mg/L-es értéket. A legmagasabb antibiotikum hozamot újfent a sztearinsav palmitinsavra történő cseréje indukálta. A két zsírsav összevetésében minden egyes mérési napon szignifikánsan magasabb primycin koncentráció értékeket mértünk a palmitinsav javára. A maximális primycin koncentrációkat tekintve ezen különbség mintegy 25%-os antibiotikum termelés növekedésben fejezhető ki (15. ábra).



15. ábra Primycin koncentrációk alakulása zsírsav- és napraforgóolaj-mentes, zsírsavmentes, napraforgóolaj-mentes, sztearinsav-, illetve palmitinsav-tartalmú fermentlé extraktumokban, különböző fermentációs időpontokban (5-7. nap). Az egyes oszlopok magassága az adott zsírsav esetében mért primycin koncentrációk átlagát jelenítik meg, a hibásávok pedig a standard deviációt (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

A fermentációs tápoldathoz adagolt zsírsav szubsztrát primycin termelésre gyakorolt hatását vizsgálva, egy kiterjesztett analízis során a korábban vizsgált sztearinsav és palmitinsav mellett még további 5, gyakori zsírsav (laurinsav, kaprinsav, önantsav, kapronsav és vajsav) vizsgálatát is elvégeztük (5. táblázat).

Egyhetes fermentációt követően a legmagasabb primycin koncentrációt (1432,82 mg/L) ez esetben is a palmitinsav alkalmazása mellett mértük, melyet a sztearinsav (eredeti összetétel) és a laurinsav követett egyaránt 1000 mg/L feletti értékekkel. Ettől jelentősen elmaradva 450 mg/L alatti értékeket mértünk kapronsav, illetve vajsav esetében, míg a közepes lánchosszúságú kaprinsavnál és önantsavnál nem volt megfigyelhető sejtnövekedés, így primycin termelés sem.

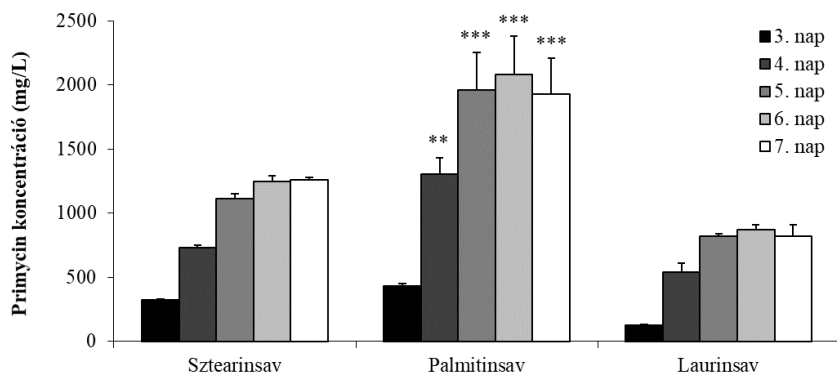
A fermentáció ideje alatt nem tapasztaltunk jelentős különbségeket a mért primycin komponensek egymáshoz viszonyított arányában (A1/C1) függetlenül a vizsgált zsírsavtól. A primycin A1 komponens aránya 70-90% között mozgott minden esetben, míg a primycin C1 komponens 10-30% között.

5. táblázat Primycin koncentrációk alakulása különböző, 3 g/L kiindulási koncentrációjú zsírsavat tartalmazó fermentlé extraktumokban, eltérő fermentációs időpontokban (5-7. nap).

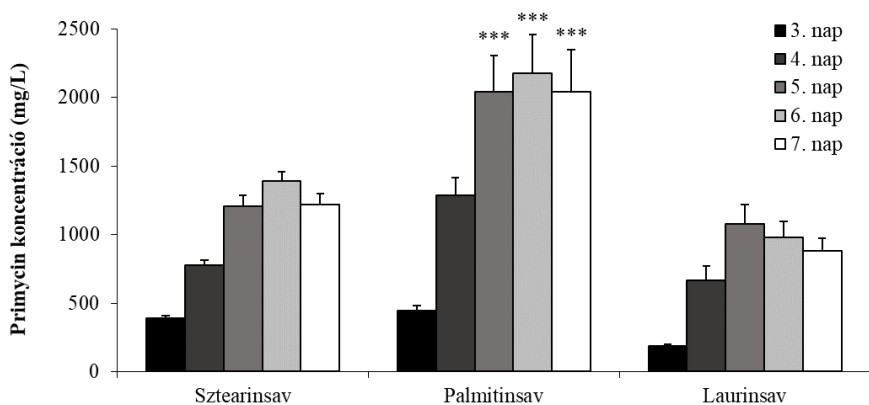
| Név | Jelölés | Zsírsav | Primycin koncentráció (mg/L) | | |
|--------------------|---------|--------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | Koncentráció (g/L) | 5. nap | 6. nap | 7. nap |
| <i>Sztearinsav</i> | C18:0 | 3 | 870,81 ± 25,43 | 996,50 ± 12,4 | 1251,60 ± 24,76 |
| <i>Palmitinsav</i> | C16:0 | 3 | 1047,21 ± 20,63 | 1293,70 ± 26,13 | 1432,82 ± 9,83 |
| <i>Laurinsav</i> | C12:0 | 3 | 1226,45 ± 12,32 | 1147,78 ± 17,36 | 1039,55 ± 44,01 |
| <i>Kaprinsav</i> | C10:0 | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Önantsav</i> | C7:0 | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <i>Kaprónsav</i> | C6:0 | 3 | 366,87 ± 8,80 | 363,17 ± 14,85 | 272,79 ± 2,75 |
| <i>Vajsav</i> | C4:0 | 3 | 406,41 ± 2,37 | 437,79 ± 6,67 | 425,50 ± 3,53 |

A legmagasabb primycin hozamot eredményező palmitinsav, sztearinsav és laurinsav további vizsgálata során megnéztük a három különböző zsírsav primycin termelésre gyakorolt koncentráció-függő hatását. Ahogyan a 16-18. ábrák szemléltetik ismételten a palmitinsav bizonyult a leghatásosabbnak minden egyes tesztelt zsírsav koncentráció (3 g/L, 4,5 g/L és 6 g/L) alkalmazása mellett függetlenül az eltelt időtől. Az eredeti sztearinsav-tartalmú fermentációs tápközeggel való összevetésben a palmitinsav statisztikailag is szignifikáns növekedést eredményezett a primycin termelésben. A laurinsav esetében viszont a mért primycin koncentrációk ezúttal elmaradtak a sztearinsavas összetételű fermentlevek által indukált primycin koncentrációk értékeitől, mindazonáltal ezen összevetésben szignifikáns csökkenést csak a 6 g/L laurinsavat tartalmazó fermentlevek esetében tapasztaltunk a fermentáció 7. napján.

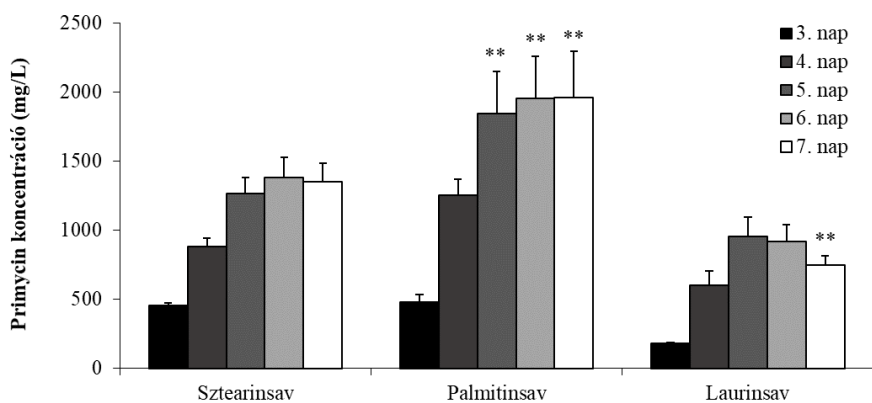
Az elért maximális hozamokat tekintve mindhárom zsírsav esetében a 4,5 g/L-es kiindulási zsírsav koncentráció mellett mértük a legmagasabb primycin koncentrációkat. Palmitinsav esetében ezen érték meghaladta a 2000 mg/L-es értéket (2177,19 mg/L), míg ettől jócskán elmaradva sztearinsav esetében 1388,87 mg/L-es, a laurinsav esetében mindössze 1076,70 mg/L-es maximális hozamokat regisztráltunk a fermentáció során. Ugyan a kiindulási zsírsav koncentrációk összevetéséből látható, hogy az alkalmazott zsírsav típusától függetlenül a 4,5 g/L-es koncentráció volt a legkedvezőbb a primycin termelés szempontjából, azonban statisztikailag is igazolható szignifikáns különbség nem volt kimutatható a 3 g/L-es, illetve a 6 g/L-es koncentrációkhoz képest.



16. ábra Primycin koncentrációk alakulása 3 g/L zsírsavat tartalmazó fermentleveknél, eltérő fermentációs időpontokban (3-7. nap). Az egyes oszlopok magassága az adott zsírsv. esetében mért primycin koncentrációk átlagát jelenítik meg, a hibásávok pedig a standard deviációt (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).



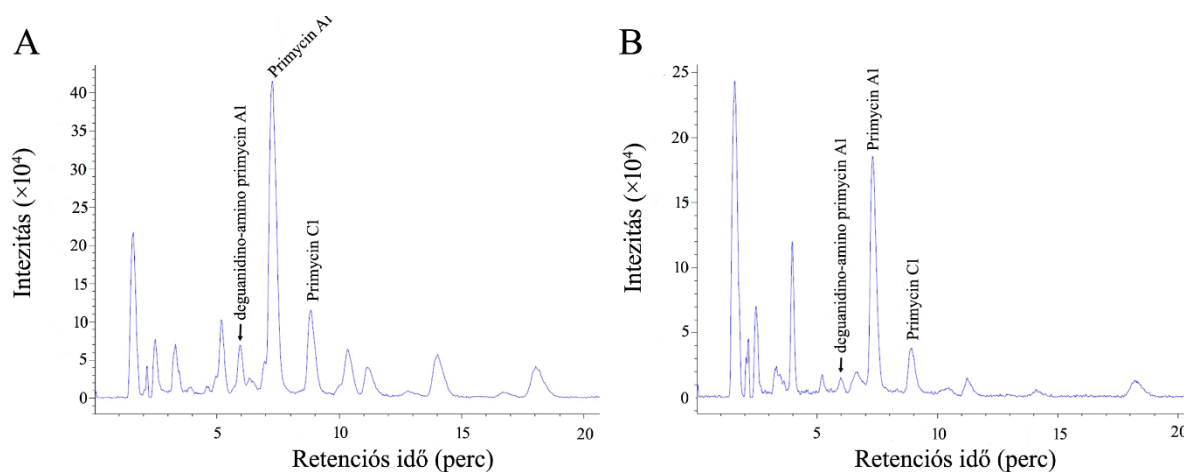
17. ábra Primycin koncentrációk alakulása 4,5 g/L zsírsavat tartalmazó fermentleveknél, eltérő fermentációs időpontokban (3-7. nap). Az egyes oszlopok magassága az adott zsírsv. esetében mért primycin koncentrációk átlagát jelenítik meg, a hibásávok pedig a standard deviációt (***: $p < 0,001$).



18. ábra Primycin koncentrációk alakulása 6 g/L zsírsavat tartalmazó fermentleveknél, eltérő fermentációs időpontokban (3-7. nap). Az egyes oszlopok magassága az adott zsírsv. esetében mért primycin koncentrációk átlagát jelenítik meg, a hibásávok pedig a standard deviációt (**: $p < 0,01$).

6.3. Deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek azonosítása HPLC/ESI-MS-sel

A HPLC/ESI-MS módszerrel történő primycin koncentráció meghatározással párhuzamosan vizsgáltuk az agamtináz enzim aktivitására utaló deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek jelenlétét a fermentlé extraktumokban. Az m/z értékek alapján mindkét primycin-termelő *S. azurea* törzs esetében egyértelműen sikerült azonosítanunk a deguanidino-amino-A1 és A1 (guanidino-A1) primycin molekulát is (19. ábra), azonban az UV elnyelés alapján történő mennyiségi meghatározás során a deguanidino-amino-A1 kimutatási határérték alatt maradt a fermentlé extraktumok vizsgálatakor. Ennek értelmében a totál primycin A1 (deguanidino-amino-A1 + A1) mennyiségének kevesebb, mint 10%-át teszi ki a deguanidino-amino-A1 primycin. A rendelkezésre álló MS kromatogram terület értékekből származtatva a detektálható totál primycin A1 mennyiségnek hozzávetőlegesen 10%-át alkotja a deguanidino-amino-A1 forma *S. azurea* SZMC 14600-nál, míg az alacsony primycintermelő-képességgel bíró *S. azurea* DSM 44631-nél ezen érték 5% körülire tehető. A fermentléből HPLC/ESI-MS módszerrel mérhető másik major komponenshez (primycin C1) viszonyítva a kimutatható deguanidino-amino-A1 a primycin C1 komponens 30%-ának megfelelő mennyiségben fordul elő *S. azurea* SZMC 14600-nál, míg *S. azurea* DSM 44631-nél 20%-ban (6. táblázat).



19. ábra *S. azurea* SZMC 14600 (A) és *S. azurea* DSM 44631 (B) fermentlé extraktumok ESI-MS kromatogramjai. Deguanidino-amino-A1 csúcshoz tartozó molekulatömeg (m/z): 1036,7, primycin A1 csúcshoz tartozó molekulatömeg (m/z): 1077,7 és a primycin C1 csúcshoz tartozó molekulatömeg (m/z): 945,7.

6. táblázat Deguanidino-amino-A1 primycin százalékos arányának változása az eltérő időpontokon vett fermentlé mintákban, totál primycin A1 (deguanidino-amino-A1 + A1) mennyiségéhez viszonyítva, MS csúcsterületekből származtatott értékek alapján. A *S. azurea* DSM 44631 törzs 6-7. napi mintáiban mért deguanidino-amino-A1 mennyiség az 5%-os kimutatási határt nem érte el.

| Törzs | Deguanidino-amino A1 (%) | | |
|-----------------------------|--------------------------|------------|-----------|
| | 5. nap | 6. nap | 7. nap |
| <i>S. azurea</i> SZMC 14600 | 10,2 ± 2,8 | 10,2 ± 3,8 | 9,2 ± 4,2 |
| <i>S. azurea</i> DSM 44631 | 5,3 ± 0,9 | - | - |

6.4. A primycin bioszintézis génklaszter jellemzése

A korábban hozzáférhetővé vált *S. azurea* SZMC 14600 draft genom adatok [84] újbóli elemzése során feltártuk és beazonosítottuk a komplett primycin bioszintetikus génklasztert, mely magába foglalja az I-es típusú PKS struktúrgéneket, továbbá a biológiailag aktív primycin molekula bioszintéziséhez nélkülözhetetlen prekursor, illetve módosító géneket (1. számú melléklet). A szintézisben résztvevő gének egymáshoz viszonyított genomiális pozícióját a 20. ábra szemlélteti. A primycin bioszintetikus génklaszterhez köthető gének és fehérjék NCBI adatbázisban lefuttatott homológia keresése alapján a *K. aridum*, valamint *A. orientalis* fajok homológ fehérjéivel mutatták a legnagyobb fokú azonosságot.

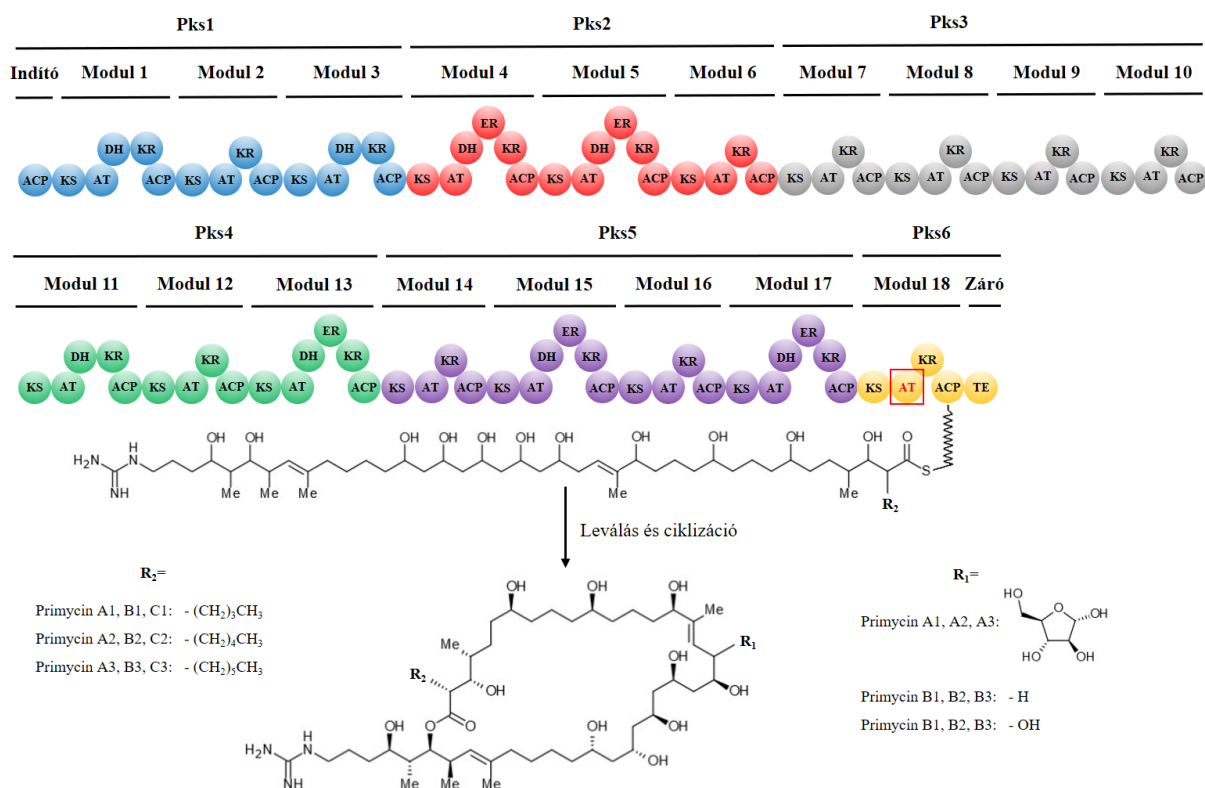


20. ábra A primycin bioszintézis génklaszter genetikai térképe. Az I-es típusú PKS struktúrgének piros nyíllal, a primycin bioszintézis útvonalhoz köthető további gének zöld nyíllal jelölve. Betűvel jelölt gének: a, acil-KoA karboxiláz (EHK80154.1); b, citokróm P450 (EHK80160.1); c, glikoziltranszferáz (EHK80161.1); d, S-maloniltranszferáz (EHK80162.1); e, agmatináz (EHK80172.1); f, acil-KoA ligáz (EHK88415.1); g, amidohidroláz (EHK88411.1) és h, amin oxidáz (EHK88410.1).

6.4.1. Primycin PKS génklaszter azonosítása és *in silico* strukturális elemzése

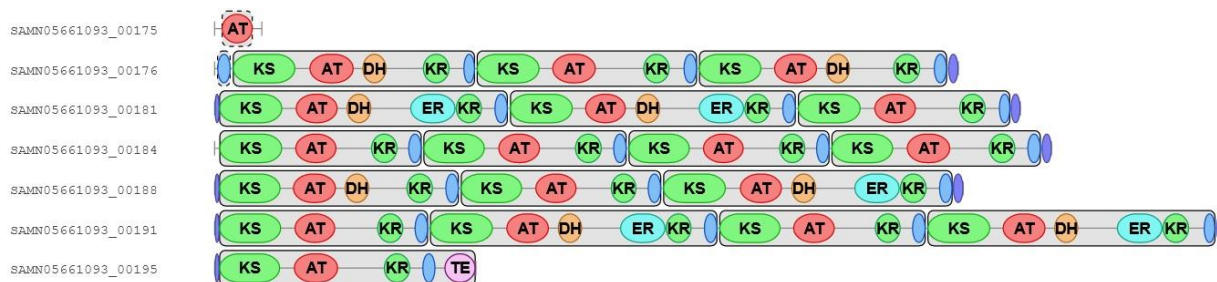
A genomszekvenálási adatok módszeres revíziója során meghatároztuk a primycin bioszintézisért felelős PKS multienzim pontos szerkezeti felépítését, ugyanis a tanszéken végzett korábbi munkák [84] során prediktált, 16 modulból felépülő primycin PKS modell, illetve az abból származtatott termék kémiai szerkezete nem voltak összhangban az ismert primycin komponensek tényleges szerkezetével. Az újonnan összeszerelt primycin PKS-t összesen 6 alegység alkotja, melyek kapcsolódását 5 darab intermoduláris dokkoló domén segíti. Az egyes

alegységek felépítésében 1 indító („load”) és 18 lánchosszabbító modul vesz részt. A modulok további felosztása, azaz a katalitikus domének pontos szerveződése a 21. ábrán látható.



21. ábra Az I-es típusú primycin PKS modul és domén szerveződése *S. azurea* SZMC 14600-ban, a prediktált poliketid láncsal és a szintetizált végtermékkel. A 18. modulban található, nem szokványos szubsztát specifitással bíró aciltranszferáz domén pirossal kiemelve. Az ábrán feltüntetett domén rövidítések: ACP - acil-karrier protein, AT - aciltranszferáz, DH - dehidratáz, ER - enoilreduktáz, KR - ketoreduktáz, KS - ketoszintáz, TE - tioészteráz.

Míthogy a primycin bioszintézis génklaszter kapcsán lefuttatott homológia keresés nagyfokú hasonlóságot mutatott a *K. aridum*, valamint az *A. orientalis* fajok bioszintetikus génjeivel, így az NCBI adatbázisban hozzáférhető genomszekvenálási adatok felhasználásával elvégeztük ezen fajok átfogó, szekunder metabolizmushoz köthető bioszintetikus génjeinek analízisét. Az adatbázisban fellelhető, összesen 3 *K. aridum* (*K. aridum* DSM 43828, *K. aridum* A82846 és *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462), illetve 4 *A. orientalis* (*A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040) törzs genomszekvenancia adatait hasonlítottuk össze. Ezek alapján mindhárom *K. aridum* törzs, valamint két *A. orientalis* törzs esetében sikerült teljes értékű, 18 modulból álló primycin PKS génklasztert azonosítanunk (22. ábra).



22. ábra A *K. aridum* DSM 43828 törzs kapcsán feltárt I-es típusú primycin PKS enzimkomplex domén szerveződése. Az ábrán feltüntetett domén rövidítések: ACP - acil-kARRIER protein, AT - aciltranszferáz, DH - dehidratáz, ER - enoilreduktáz, KR - ketoreduktáz, KS - ketoszintáz, TE - tioészteráz.

6.4.1.1. AT domén szubsztrátspecifitásának jellemzése

A primycin PKS enzimkomplexben fellelhető AT domének aminosav szekvenciáinak illesztése során malonil-KoA specifitással bíró AT doméneket azonosítottunk a 4-10. és 12-16. modulokban, melyek egyaránt hordozzák a jellemző GHSx[LVIFAM]G és HAFH konzervált szekvencia-motívumokat (23. ábra). Az 1-3., 11. és 17. modulok esetében metilmalonil-KoA szubsztrátspecifitás figyelhető meg a tipikus GHSx[QMI]G és YASH szekvencia-motívumokkal (24. ábra). Ezeketől eltérően, nem szokványos szubsztrát specifitással bíró AT domént találtunk a 18. modulban. Amíg az antiSMASH szoftver segítségével végzett *in silico* analízis etilmalonil-KoA beépülést prediktál ezen modulban, addig ezzel ellentétben a 88-92. pozícióban található GHSQG és 192-195. pozícióban található GAGH szekvenciamotívumok jelenléte butilmalonil-KoA, pentilmalonil-KoA vagy hexilmalonil-KoA beépülését vetíti előre, jó összhangban az ismert primycin molekulák kémiai szerkezetével (25. ábra).

| | | |
|---------|---|-------|
| PriAT4 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEEVA...SVSHAFHSPL...RQAVRFA... | 272aa |
| PriAT5 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL...RQAVRFA... | 272aa |
| PriAT6 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...YVMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL...REAVRFA... | 282aa |
| PriAT7 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL...REAVRFA... | 273aa |
| PriAT8 | LFTGQGAQ...ACTQVAL...VLVGHSVGEIA...RVSHAFHSPL...RHAVRFA... | 282aa |
| PriAT9 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...AVSHAFHSPL...REAVRFA... | 272aa |
| PriAT10 | LFTGQGAQ...GYAQPAL...YLLGHSIGEIA...TVSHAFHSPL...RQAVRFA... | 291aa |
| PriAT12 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...AVSHAFHSPL...RQAVRFA... | 272aa |
| PriAT13 | LFTGQGAQ...VFTQAAL...YLMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL...RRPVRFA... | 285aa |
| PriAT14 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL... | 204aa |
| PriAT15 | LFTGQGAQ...VFTQAAL...YLMGHSIGEIA...SVSHAFHSPL...RRPVRFA... | 285aa |
| PriAT16 | LFTGQGAQ...EFAQAAL...FLMGHSIGEIA...AVSHAFHSPL...REAVRFA... | 272aa |
| AmpAT1 | LFSGQGSQ...GWTQPAL...AVVGHSVGEIA...AVSHAFHSPL...RGTVRFA... | 294aa |
| AmpAT4 | LFSGQGSQ...GWTQPAL...YVGHSIGEIA...RVSHAFHSPL...REAVRFA... | 290aa |
| AzaAT1 | LFTGQGAQ...MFTQAGL...FLMGHSVGEIA...RVSHAFHSPL...REAVRFA... | 306aa |
| AzaAT4 | LFSGQGAQ...AFTQPAL...VLI GHSIGEIA...RVSHAFHSPL...REAVRFA... | 303aa |
| RapAT2 | VFPGQGSQ...GYAQPAL...AVVGHSVGEIA...PTSHAFHSAR...RDTVRFG... | 260aa |
| RapAT5 | VFPGQGSQ...GYAQPAL...AVVGHSVGEIA...ATSHAFHSAR...RDTVRFG... | 256aa |
| StaAT1 | LFTGQGSQ...VYAQAGL...VLVGHSIGEIA...AVSHAFHSAR...REPVRFA... | 277aa |
| StaAT2 | LFTGQGSQ...VYAQAGL...VLVGHSVGEIA...AVSHAFHSAR...REPVRFA... | 278aa |
| ThaAT1 | LFSGQGSQ...GWTQPAL...FVAGHSIGEIA...KVS HAFHSPL...RDAVRFA... | 276aa |
| ThaAT2 | LFSGQGSQ...GWTQPAL...FVAGHSIGEIA...KVS HAFHSPL...RGAVRFA... | 276aa |

23. ábra A primycin (Pri) poliketid szintáz (PKS) malonil-KoA specificitással bíró aciltranszferáz (AT) doménjeinek aminosav szekvencia illesztése az amfotericin (Amp), azalomycin (Aza), rapamycin (Rap), stambomycin (Sta) és thailandin (Tha) PKS hasonló karakterisztikával bíró AT doménjeinek szekvenciáival. Az AT doméneken konzervált aktív centrumai pirossal kiemelve.

| | | |
|---------|---|-------|
| PriAT1 | PGQGS...VVQPL...VVGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHSA...YSTVD...YRNLR... | 297aa |
| PriAT2 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHSE...YSTVD...YRNLR... | 292aa |
| PriAT3 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSK...VDYASHSE...YSTVD...YRNLR... | 292aa |
| PriAT11 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSK...VDYASHSE...YSTVD...YRNLR... | 292aa |
| PriAT17 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHSA...YSTVD...YRNLR... | 305aa |
| AmpAT2 | PGQGS...VVQPA...VVGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHSH...FSTVT...FRSLR... | 297aa |
| AmpAT3 | PGQGS...VVQPA...VVGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHGR...YSTVT...YTNLR... | 301aa |
| AzaAT2 | PGQGA...VVQPV...VMGHSQGEI...ALRSQ...VDYASHSA...YSTVS...YRNLR... | 298aa |
| AzaAT3 | PGQGA...VVQPV...VMGHSQGEI...TLRSQ...VDYASHSA...YSTVS...YRNLR... | 298aa |
| EryAT1 | PGQGW...VVQPV...VIGHSQGEI...ALRSR...VDYASHSS...FSTVT...YRNLR... | 301aa |
| EryAT2 | PGQGA...VVQPV...VIGHSQGEI...ARRSR...VDYASHTA...FSTLT...YRNLR... | 298aa |
| RapAT1 | PGQGW...VVQPA...VVGHSQGEI...TLRSQ...VDYASHTP...LSTVD...YRNLR... | 273aa |
| RapAT3 | PGQGW...VVQPA...VIGHSQGEI...TLRSQ...VDYASHTP...LSTVD...YRNLR... | 272aa |
| StaAT5 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSR...VDYASHSV...YSTVT...FENLR... | 296aa |
| StaAT7 | PGQGS...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSR...VDYASHSV...YSTVT...FENLR... | 296aa |
| ThaAT6 | PGQGQ...VVQPV...VVGHSQGEI...ALRSR...VDYASHSP...YSTLT...YRNLR... | 308aa |

24. ábra A primycin (Pri) poliketid szintáz (PKS) metilmalonil-KoA specificitással bíró aciltranszferáz (AT) doménjeinek aminosav szekvencia illesztése az amfotericin (Amp), azalomycin (Aza), eritromicin (Ery), rapamycin (Rap), stambomycin (Sta) és thailandin (Tha) PKS hasonló karakterisztikával bíró AT doménjeinek szekvenciáival. Az AT doméneken konzervált aktív centrumai pirossal kiemelve.

| | | |
|---------|---|-------|
| PriAT18 | ...DVV Q PVL...AVV GHSQGE IA...VAL RS -R...GAP GAGH SPQ... | 298aa |
| AntAT1 | ...--A FLAL ...AFI GHS LG EY T...VA ERI --...-MP AAAH SHV... | 283aa |
| CinAT2 | ...DI Q PVL...ALV GHS LG EVA ...AV ARS -R...-VER AGH SVL... | 295aa |
| NeoAT7 | ...DVL Q PVS...AVV GHS LG EIA ...MV HR SRI...GIN GAAH SSQ... | 299aa |
| StaAT12 | ...DVI Q PVL...AVV GHSQGE IA...V THR S-R...GAD AAGH SAQ... | 297aa |
| ThaAT13 | ...EVN Q PVL...AVV GHSQGE EVA...VV HR A-R...-IK GAAH SAV... | 287aa |

25. ábra A primycin (Pri) poliketid szintáz (PKS) nem szokványos szubsztrát specificitással bíró aciltranszferáz (AT) doménjeinek aminosav szekvencia illesztése az antimycin (Ant), cinnabaramid (Cin), neoansamycin (Neo), stambomycin (Sta) és thailandin (Tha) PKS hasonló karakterisztikával bíró AT doménjeinek szekvenciáival. Az AT doméne konzervált aktív centrumai pirossal kiemelve.

6.4.1.2. KR domén jellemzése

Az aminosav szekvencia illesztéseket követően összesen 7 darab A1-típusú (2R, 3S) KR domént azonosítottunk a primycin PKS esetében, a 141-es pozícióban fellelhető, A-típusú ketoreduktázokra jellemző triptofán (W) alapján (26. ábra), míg 10 darab B1-típusú (2R, 3R) és 1 darab B2-típusú (2S, 3R) KR domént azonosítottunk a B-típusú KR-ra jellemző leucinből és két aszparaginsavból (LDD) álló szekvenciamotívum (94-96. pozícióban) alapján (27. ábra). A KR doménre jellemző lizin (K), szerin (S) és tirozin (Y) konzervált katalitikus triád elemei a szekvencia 112., 136., illetve 149. pozícióiban találhatóak.

| | | | |
|---------|---|-------|-------------|
| PriKR6 | ...IAG K VAG...FVV FSS IAGV W GSAGQV Y SA... | 174aa | (A1) |
| PriKR8 | ...VAA K VLG...FVV FSS IAAT W GS GG QSAYAV... | 177aa | (A1) |
| PriKR10 | ...MSG K VAG...FIV FSS IAAT W GS GG QCGYAA... | 175aa | (A1) |
| PriKR12 | ...VAG K VAG...FIV FSS IAAT W GS GG QCGYAA... | 173aa | (A1) |
| PriKR14 | ...VAG K VAG...FIV FSS IAAT W GS GG QCGYAA... | 93aa | (A1) |
| PriKR16 | ...VAG K VAG...FIV FSS IAAT W GS GG QCGYAA... | 169aa | (A1) |
| PriKR18 | ...YAG K VSG...FVLF SS CAGV W GGIGQAAYAA... | 175aa | (A1) |
| AmpKR2 | ...VHA K V TG ...FVLY SS TAGM W SGVHAA Y VA... | 179aa | (A2) |
| AmpKR3 | ...MRA K LTA...FVLF SS GAAV W GS GG QPGYAA... | 180aa | (A1) |
| AzaKR7 | ...VSG K ATG...FVV FSS IAGV W GS GG QAAYGA... | 179aa | (A1) |
| AzaKR9 | ...VSG K ATG...FVV FSS IAGV W GS GG QAAYGA... | 179aa | (A1) |
| EryKR2 | ...VAA K AGG...FLL FSS GAGV W GSARQ GAY AA... | 177aa | (A1) |
| EryKR5 | ...ADV K V R G...FVLF SS NAGV W GS PGL AS Y AA... | 177aa | (A1) |
| StaKR5 | ...LGA K V TG ...FVV FSS GAAV W GG GG Q GAY AA... | 178aa | (A1) |
| StaKR6 | ...LRA K V TG ...FVV FSS IAAT W GS GG Q GAY AA... | 177aa | (A1) |
| ThaKR8 | ...LGA K V DG ...FIL FSS IAGT W GG GG QQAAYAA... | 176aa | (A1) |
| ThaKR10 | ...LSA K V DG ...FVLF SS IAGV W GS GH QAAYAA... | 176aa | (A1) |

26. ábra A primycin (Pri) poliketid szintáz (PKS) A-típusú sztereoekémiai tulajdonságért felelős ketoreduktáz (KR) doménjeinek aminosav szekvencia illesztése az amfotericin (Amp), azalomycin (Aza), eritromicin (Ery), stambomycin (Sta) és thailandin (Tha) PKS hasonló karakterisztikával bíró KR doménjeinek szekvenciáival. Az A-típusú KR domének sztereoekémiai sajátosságait meghatározó konzervált aktív centrum pirossal, illetve a *lys* (K), *ser* (S) és *tyr* (Y) konzervált katalitikus triád lilával kiemelve.

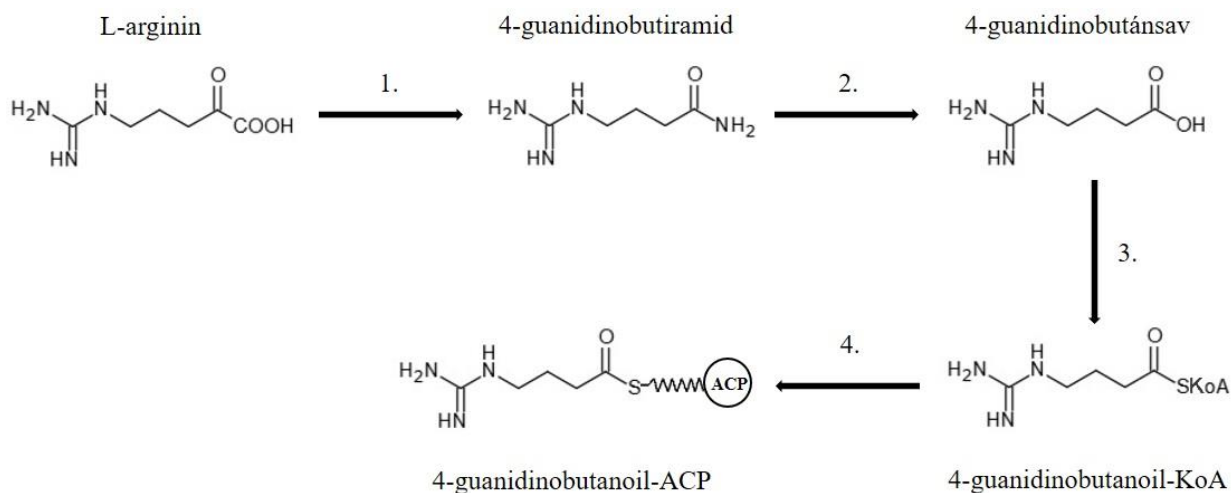
| | | | |
|---------|---|-------|-------------|
| PriKR1 | ...LTAVVHTAAV LDD GLVTALTPQR...RPKVD...FSSVA...ANYAA... | 177aa | (B1) |
| PriKR2 | ...VTAVFHVAAV LDD SLIDSLTVEQ...GVKVG...FSSFA...GNYAP... | 174aa | (B2) |
| PriKR3 | ...LTAVVHTAAV LDD GLVTSFTPER...RPKAD...FSSGA...ANYAA... | 179aa | (B1) |
| PriKR4 | ...LTAVVHAAGV LDD GVVTALDRDR...RPKAE...FSSGA...GNYAA... | 172aa | (B1) |
| PriKR5 | ...LTAVVHTAGV LDD GVVESMTAQR...APKAL...FSSAS...ANYSA... | 170aa | (B1) |
| PriKR7 | ...LTAVVHTAGV LDD GVLEHMSAEQ...GAKAD...FSAFA...GNYAA... | 175aa | (B1) |
| PriKR9 | ...PSAVVHAAGV LDD GVIEGLTPDR...RAKVD...FSAFA...ASYAA... | 172aa | (B1) |
| PriKR11 | ...LTGVVHTAGA LDD GLIGDLTPER...RAKAD...YSGAA...ANYAA... | 176aa | (B1) |
| PriKR13 | ...LTGVVHTAGV LDD GVVESLTAQR...DPKAS...FSSAS...ANYSA... | 160aa | (B1) |
| PriKR15 | ...LTAVVHTAGV LDD GVVESMTAQR...APKAL...FSSAS...ANYSA... | 170aa | (B1) |
| PriKR17 | ...LTGVVHTAGT LDD GLVDNLTPER...RSKVD...YSGAA...SSYAA... | 176aa | (B1) |
| AmpKR5 | ...LVAVVHTAGV LDD GVLDLSTEER...RPKVD...FSSVA...ANYAA... | 179aa | (B1) |
| AmpKR6 | ...LRAVVHTAGV LDD GVLGSLTEER...RPKVD...FSSVA...ANYAA... | 179aa | (B1) |
| AzaKR1 | ...LTAVVHAAGV LDD GVIDTLSPKR...EPKVD...FSSVA...GNYAA... | 179aa | (B1) |
| AzaKR2 | ...LSGVVHAAGV LDD GLLTSLTRER...RAKVD...FSSAT...SNYAA... | 180aa | (B1) |
| EryKR1 | ...LSAVFHAAAT LDD GTVDTLTGER...RAKVL...FSSFA...GGYAP... | 178aa | (B2) |
| RapKR1 | ...LTAVIHTAGA LDD GVVESLTTQQ...RPKAD...YSSAA...GNYAA... | 176aa | (B1) |
| RapKR3 | ...LTAVIHTAGA LDD GVVESLTTQQ...RPKAD...YSSAA...GNYAA... | 175aa | (B1) |
| StaKR1 | ...VTSVVHTAGV LDD GLLTSLTPER...RPKAE...FSSVA...ASYAA... | 174aa | (B1) |
| StaKR2 | ...LTAVVHAAGV LDD GVIDGLTPER...RAKTL...FSSFT...ANYAA... | 179aa | (B1) |
| ThaKR1 | ...LTAVFHAAAGV LDD GVLDGLTPER...APKAG...FSSMV...AAYAA... | 179aa | (B1) |
| ThaKR2 | ...VTGVVHTAGV LDD GVVDAITPQR...RPKVD...FSSVA...GAYAA... | 175aa | (B1) |

27. ábra A primycin (Pri) poliketid szintáz (PKS) B-típusú sztereokémiai tulajdonságért felelős ketoreduktáz (KR) doménjeinek aminosav szekvencia illesztése az amfotericin (Amp), azalomycin (Aza), eritromicin (Ery), rapamycin (Rap), stambomycin (Sta) és thailandin (Tha) PKS hasonló karakterisztikával bíró KR doménjeinek szekvenciáival. Az KR domének konzervált aktív centrumai pirossal kiemelve. A B-típusú KR domének sztereokémiai sajátosságait meghatározó konzervált aktív centrum pirossal, illetve a *lys* (K), *ser* (S) és *tyr* (Y) konzervált katalitikus triád lilával kiemelve.

6.4.2. L-arginin prekursor szintézis útvonal

A primycin bioszintézis kiindulási egysége az L-arginin prekursor szintézis útvonalon keresztül szintetizálódó 4-guanidinobutanoil-KoA molekula. A többlépcsős szintézis folyamat során a kiindulási L-arginin molekulából elsőként 4-guanidinobutiramid, majd 4-guanidinobutánsav és végül 4-guanidinobutanoil-KoA képződik, mely reakciókat *S. azurea* SZMC 14600 esetében az amin oxidáz (EHK88410.1), amidohidroláz (EHK88411.1) és acil-KoA ligáz (EHK88415.1) enzimek katalizálnak (28. ábra). A létrejött 4-guanidinobutanoil-KoA molekula végül az S-maloniltranszferáz (EHK80162.1) enzim közvetítésével kapcsolódik a primycin bioszintézist végző PKS multienzim első acil-karrier protein (ACP) doménjéhez.

Az L-arginin prekursor szintézis útvonalhoz köthető gének, illetve fehérjék NCBI adatbázisban elvégzett homológia keresésének eredménye az amin oxidáz (EHK88410.1) esetében 82% azonosságot állapított meg a *Streptomyces* sp. ID38640 törzssel, míg az amidohidroláz (EHK88411.1), acil-KoA ligáz (EHK88415.1) és az S-maloniltranszferáz (EHK80162.1) enzimek a *K. aridum* faj képviselőinek fehérjéivel mutatták a legnagyobb fokú homológiát 69%-os, 72%-os, illetve 80%-os azonosság értékek mellett (1. sz. melléklet).



28. ábra L-arginin prekursor szintézis útvonal primycin bioszintézis esetében. A bioszintézisben részvevő enzimek: 1 - amin oxidáz (EHK88410.1); 2 - amidohidroláz (EHK88411.1); 3 - acil-KoA ligáz (EHK88415.1) és 4 - S-maloniltranszferáz (EHK80162.1).

6.5. Primycin szintézist módosító és szabályozó gének

A primycin PKS struktúrgének és L-arginin prekursor szintézis útvonalban résztvevő katalitikus enzimeket kódoló gének mellett a primycin molekula bioszintézisében résztvevő további 16 módosító, illetve szabályozó gén is azonosításra került, mely magas fokú homológiát mutat a *K. aridum* primycin PKS kapcsán jellemzett génekkel. Ezen változatos funkciójú fehérjéket kódoló gének között egyaránt azonosítottunk a polikeid termék ciklizációjában fontos szerepet játszó gént (citokróm P450 - EHK80160.1), a primycin bioszintézist követő poszt-szintetikus módosító enzimeket kódoló géneket (acil-KoA karboxiláz - EHK80154.1, glikoziltranszferáz - EHK80161.1 és agmatináz - EHK80172.1), multidrog-, illetve self-rezisztencia folyamatokhoz köthető ABC transzport fehérjék szintéziséért felelős géneket (ABC transzporter ATP-kötő fehérje - EHK80158.1 és EHK80174.1, valamint ABC transzporter permeáz - EHK80159.1 és EHK80175.1), kétkomponensű szignáltranszdukciós útvonalhoz köthető géneket (kétkomponensű szenzor hisztidin kináz - EHK80176.1 és válasz regulátor - EHK80177.1), általánosabb funkciót ellátó fehérjéket kódoló géneket (penicillin aciláz család fehérje - EHK80155.1, DUF418 domént hordozó fehérje - EHK80156.1, cukor dehidrogenáz - EHK80164.1, AAA család ATPáz - EHK80178.1), továbbá két ismeretlen funkciót ellátó hipotetikus fehérjét (EHK80157.1 és EHK80173.1).

6.6. Funkcionális genomika

Annak érdekében, hogy minél részletesebb betekintést nyerjünk az alacsony termelőképességű és az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* törzsek génexpressziós szinten megnyilvánuló különbségeibe új generációs szekvenálásra alapozott transzkriptomikai

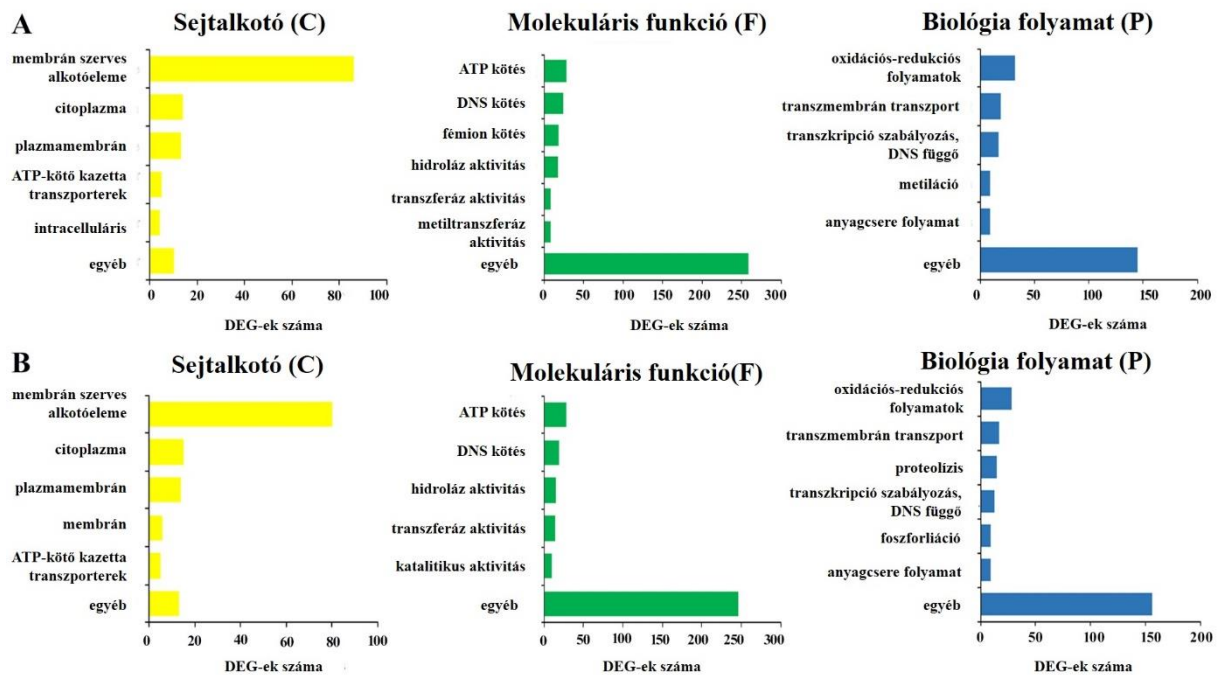
vizsgálatot végeztünk. A nagy áteresztőképességű SOLiD V4 rendszerben történt szekvenálás összesen 48115904 és 33373930 trimmelt readet eredményezett, mely 484 és 336-szoros lefedettséget jelent a *S. azurea* SZMC 14600 és a DSM 44631 genomok tekintetében. A Cufflinks „pipeline”-on keresztül végigvitt transzkriptomikai analízis következtében 330 differenciáltan expresszázó gént azonosítottunk *S. azurea* SZMC 14600 esetében, míg *S. azurea* DSM 44631-nél ez a szám 356 volt, 2-es (\log_2) „cutoff” érték mellett.

A differenciáltan expresszázó gének (DEG-ek) funkcionális csoportokba történő besorolása érdekében Gene Ontology (GO) analízist végeztünk. Az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 esetében a 330 azonosított DEG-ből összesen 253 gén funkcionális annotációja és GO kategóriákba való besorolása történt meg. A három fő GO kategóriát tekintve az annotált gének között az alábbi megoszlás volt megfigyelhető: 132 sejtalkotó (C), 362 molekuláris funkció (F) és 231 biológiai folyamat (P). A sejtalkotók között leggyakoribb alkategóriák a membrán szerves alkotóeleme (GO:0016021), citoplazma (GO:0005737), plazmamembrán (GO:0005886), ATP-kötő transzporter komplex (GO:0043190) és intracelluláris (GO:0005622) voltak. Molekuláris funkciót (F) illetően az ATP kötés (GO:0005524), DNS kötés (GO:0003677), fémion kötés (GO:0046872), hidroláz aktivitás (GO:0016787), transzferáz aktivitás (GO:0016740) és a metiltranszferáz aktivitás (GO:0008168) alkategóriák bizonyultak a leginkább reprezentáltaknak. Az öt leggyakoribb biológiai folyamat (P) pedig az oxidációs-redukációs folyamatok (GO:0055114), transzmembrán transzport (GO:0055085), transzkripció szabályozás, DNS függő (GO:0006355), metiláció (GO:0032259) és anyagcsere folyamat (GO:0008152) alkategóriák voltak (29. ábra).

Az alacsony primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* DSM 44631 törzsnél a 356 azonosított DEG-ből 276 gén funkcionális annotációja és besorolása történt meg az alábbiak szerint: 133 sejtalkotó (C), 332 molekuláris funkció (F) és 247 biológiai folyamat (P).

Az egyes fő kategóriákba sorolt GO meghatározások reprezentáltságát tekintve gyakorlatilag megegyező eloszlást figyelhettünk meg a *S. azurea* DSM 44631 törzsnél is. A sejtalkotók között leggyakoribb GO meghatározások a membrán szerves alkotóeleme (GO:0016021), citoplazma (GO:0005737), plazmamembrán (GO:0005886), membrán (GO:0016020) és ATP-kötő transzporter komplex (GO:0043190). Molekuláris funkciót (F) tekintve ATP kötés (GO:0005524), DNS kötés (GO:0003677), hidroláz aktivitás (GO:0016787), transzferáz aktivitás (GO:0016740) és katalitikus aktivitás (GO:0003824) mutatták a legnagyobb előfordulást. Biológiai folyamat (P) kategóriában a leggyakoribb GO meghatározások az oxidációs-redukációs folyamatok (GO:0055114), transzmembrán transzport (GO:0055085),

transzkripció szabályozás, DNS függő (GO:0006355), foszforiláció (GO:0016310) és az anyagcsere folyamat (GO:0008152) voltak (29. ábra).



29. ábra A differenciáltan expresszálódó gének (DEG-ek) között leggyakoribb Gene Ontology (GO) meghatározások megoszlása a három fő GO kategóriában. (A) *S. azurea* SZMC 14600, (B) *S. azurea* DSM 44631. „Egyéb” kategória foglalja magába azon széles változatosságot mutató GO meghatározásokat, melyekre a kapott találatok száma nem érte el az ötöt.

A differenciáltan expresszálódó gének prediktált funkció szerint történő osztályozása COG adatbázis alapján összesen 294 és 313 azonosított gént eredményezett az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező, illetve az alacsony primycintermelő-képességű törzs összevetésében, mely 22 egyedi kategóriát reprezentál. A COG azonosítóval nem rendelkező géntermékeket (túlnyomórészt hipotetikus fehérjék), illetve a funkciójuk alapján kevésbé jellemzett, azaz az általános funkcionális predikció (R) és az ismeretlen funkció (S) kategóriákba sorolt géntermékeket a későbbi összevetések során nem vettük figyelembe.

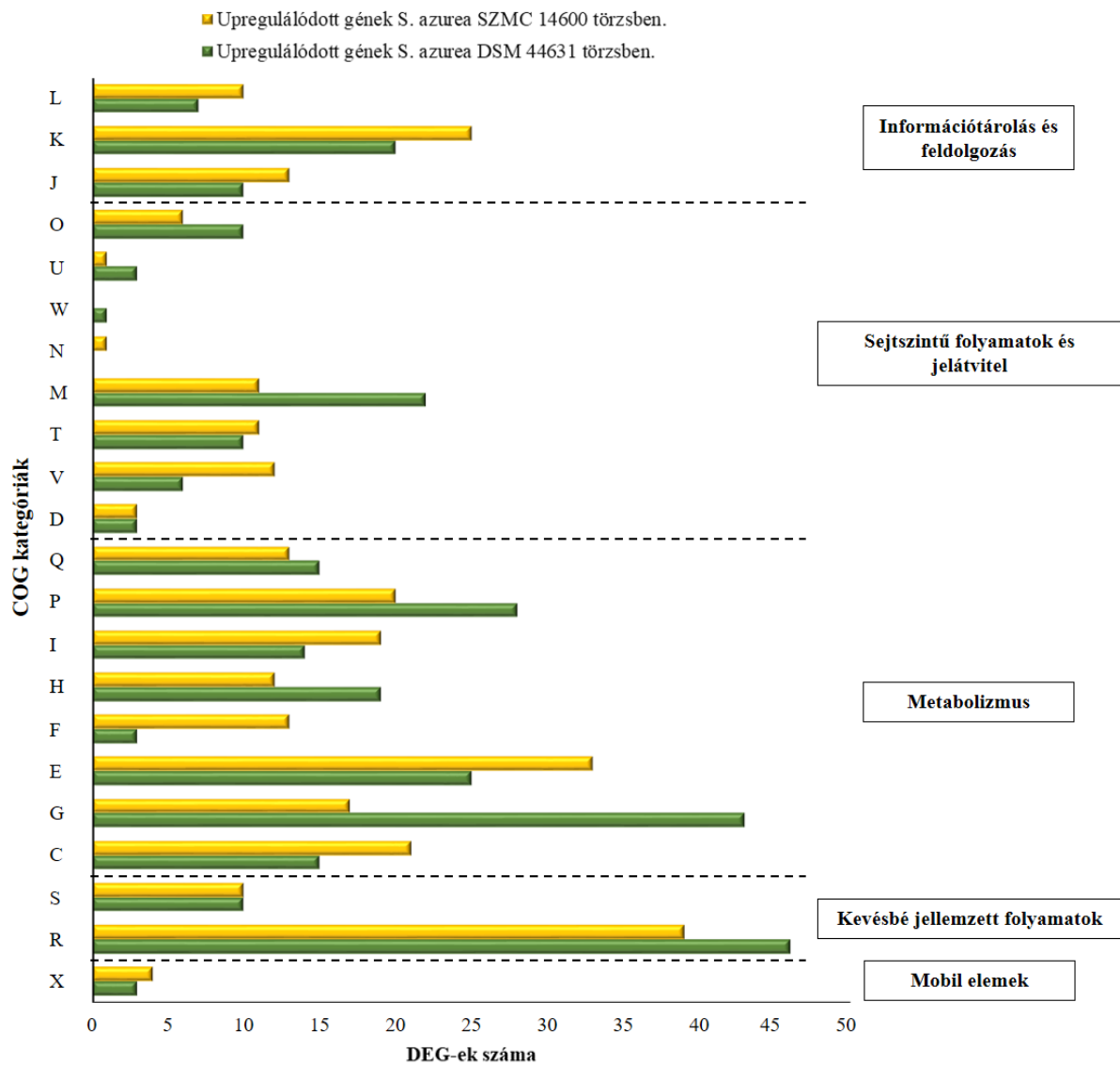
A funkcionális kategóriák reprezentáltságát tekintve az aminosav transzport és metabolizmus (E), a transzkripció (K) és az energiatermelés és átalakítás (C) kategóriák voltak uralkodók a *S. azurea* SZMC 14600-ban. Ezzel szemben az alacsony primycintermelő-képességű *S. azurea* DSM 44631 törzs analízise során olyan ortológ szekvenciákat azonosítottunk, melyek eltérő biológiai folyamatokban vesznek részt, úgymint a szénhidrát transzport és metabolizmus (G), a szervetlen ion transzport és metabolizmus (P). Továbbá jelentős különbségek adódtak az egyes kategóriákba sorolt gének számában is (mely megegyezik az up- és downregulálódó gének számával), ahogyan azt a 7. táblázat is bemutatja.

7. táblázat Clusters of Orthologous Groups (COGs) funkcionális kategóriák reprezentáltsága a differenciáltan expresszáló gének (DEG-ek) között *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsekben.

| COG azonosító | Funkcionális kategória | Annotált gének száma és % | |
|--|--|---------------------------|------------|
| | | SZMC 14600 | DSM 44631 |
| <i>Információtárolás és feldolgozás</i> | | | |
| J | Transzláció, riboszómális struktúra és biogenezis | 13 (4,4%) | 10 (3,2%) |
| K | Transzkripció | 25 (8,5%) | 20 (6,4%) |
| L | Replikáció, rekombináció és repair | 10 (3,4%) | 7 (2,2%) |
| <i>Sejtszintű folyamatok és jelátvitel</i> | | | |
| D | Sejtciklus szabályozás, sejtsztódás, kromoszóma megosztás | 3 (1,0%) | 3 (1,0%) |
| V | Védelmi mechanizmusok | 12 (4,1%) | 6 (1,9%) |
| T | Szignáltranszdukciós folyamatok | 11 (3,7%) | 10 (3,8%) |
| M | Sejtfal/membrán/burok biogenezis | 11 (3,7%) | 22 (7,0%) |
| N | Sejt motilitás | 1 (0,3%) | 0 (0%) |
| W | Extracelluláris struktúrák | 0 (0%) | 1 (0,3%) |
| U | Intracelluláris anyagáramlás, szekréciós és vezikuláris transzport | 1 (0,3%) | 3 (1,0%) |
| O | Poszttranszlációs módosítások, protein turnover, chaperonok | 6 (2,0%) | 10 (3,2%) |
| <i>Metabolizmus</i> | | | |
| C | Energiatermelés és átalakítás | 21 (7,1%) | 15 (4,8%) |
| G | Szénhidrát transzport és metabolizmus | 17 (5,8%) | 43 (13,7%) |
| E | Aminosav transzport és metabolizmus | 33 (11,2%) | 25 (8,0%) |
| F | Nukleotid transzport és metabolizmus | 13 (4,4%) | 3 (1,0%) |
| H | Koenzim transzport és metabolizmus | 12 (4,1%) | 19 (6,1%) |
| I | Lipid transzport és metabolizmus | 19 (6,5%) | 14 (4,5%) |
| P | Szervetlen ion transzport és metabolizmus | 20 (6,8%) | 28 (8,9%) |
| Q | Szekunder metabolit bioszintézis, transzport és katabolizmus | 13 (4,4%) | 15 (4,8%) |
| <i>Mobil elemek</i> | | | |
| X | Mobilom: profágok, transzpozonok | 4 (1,4%) | 3 (1,0%) |
| <i>Kevésbé jellemzett folyamatok</i> | | | |
| R | Általános funkcionális predikció | 39 (13,3%) | 46 (14,7%) |
| S | Ismeretlen funkció | 10 (3,4%) | 10 (3,2%) |
| | | Σ COG | 294 (100%) |
| | | | 313 (100%) |

Figyelembe véve a markánsabb expressziós különbségeket a két eltérő antibiotikumtermelő-képességű *S. azurea* között, a következő COG kategóriákban mutatott jelentősebb downregulációt az SZMC 14600-as törzs: szénhidrát transzport és metabolizmus (G), sejtfal/membrán/burok biogenezis (M), szervetlen ion transzport és metabolizmus (P) és koenzim transzport és metabolizmus (H). Ezzel szemben a nukleotid transzport és metabolizmus (F),

aminosav transzport és metabolizmus (E), energiatermelés és átalakítás (C) és védelmi mechanizmusok (V) COG kategóriákba sorolt DEG-ek többsége a megnövekedett primycintermelő-képességgel rendelkező törzsnél mutatott upregulációt (30. ábra).



30. ábra Clusters of Orthologous Groups (COGs) funkcionális kategóriák reprezentáltsága a differenciáltan expresszálódó gének (DEG-ek) között *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsekben. A COG funkcionális kategóriák azonosítói: (C) Energiatermelés és átalakítás; (D) Sejtciklus szabályozás, sejtsztódás, kromoszóma megosztás; (E) Aminosav transzport és metabolizmus; (F) Nukleotid transzport és metabolizmus; (G) Szénhidrát transzport és metabolizmus; (H) Koenzim transzport és metabolizmus; (I) Lipid transzport és metabolizmus; (J) Transzláció, riboszómális struktúra és biogenezis; (K) Transzkripció; (L) Replikáció, rekombináció és repair; (M) Sejtfa/membrán/burok biogenezis; (N) Sejt motilitás; (O) Poszttranszlációs módosítások, protein turnover, chaperonok; (P) Szeretlen ion transzport és metabolizmus; (Q) Szekunder metabolit bioszintézis, transzport és katabolizmus; (R) Általános funkcionális predikció; (X) Mobilom: profágok, transzpozonok; (S) Ismeretlen funkció; (T) Szigénáltranszdukciós folyamatok; (U) Intracelluláris anyagáramlás, szekréción és vezikuláris transzport; (V) Védelmi mechanizmusok; (W) Extracelluláris struktúrák

Az RNS szekvenálási adatok alapján az aminosav transzport és metabolizmus (E) COG kategóriába sorolt agmatináz enzimet kódoló gén, mely közvetlenül a PKS génklaszter 3' pozíciójában helyezkedik el (20. ábra) upregulációt mutatott az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező törzsben, 2,62 \log_2 fold-change mértékben.

Jól ismert tény, hogy a poliketid- és a zsírsavszintézis útvonalak szorosan kapcsolódó, közös evolúciós múltra vezethetők vissza. A magas szintű szerkezeti diverzitást mutató molekulák bioszintézise során a két megaszintáz összeszerelési folyamataiban homológ domének vesznek részt, valamint olyan közös prekursor molekulákon osztoznak, mint az acetyl- és malonyl-KoA [111]. A zsírsavszintézis folyamatában kulcsszereppel bíró 3-oxoacil-(acyl-karrier-protein) szintáz kódoló gének (EHK89245.1, EHK87608.1 és EHK84821.1) génexpressziós profilját vizsgálva megfigyelhető volt, hogy ezen géneket alacsonyabb expressziós szint jellemezte az emelt primycintermelő-képességű törzsben (8. táblázat).

A védelmi mechanizmusok (V) COG kategóriát képviselve, közvetlenül a primycin PKS génklaszter mellett azonosítottunk két ABC multidrog transzportert kódoló gént (EHK80158.1 és EHK80159.1), melyek 8,0 és 3,8 \log_2 fold-change értékekkel overexpresszálódtak *S. azurea* SZMC 14600-ban. Hasonlóképpen a TetR család transzkripció szabályozói (TFR) között, melyek olyan változatos folyamatok szabályozásában vesznek részt, mint az antibiotikum termelés, efflux pumpák szabályozása, valamint multidrog- és self-rezisztencia, több gén is magasabb expressziós szinten nyilvánult meg (2,08 és 5,23 \log_2 fold-change értékek között) az emelt primycintermelő-képességű törzsben.

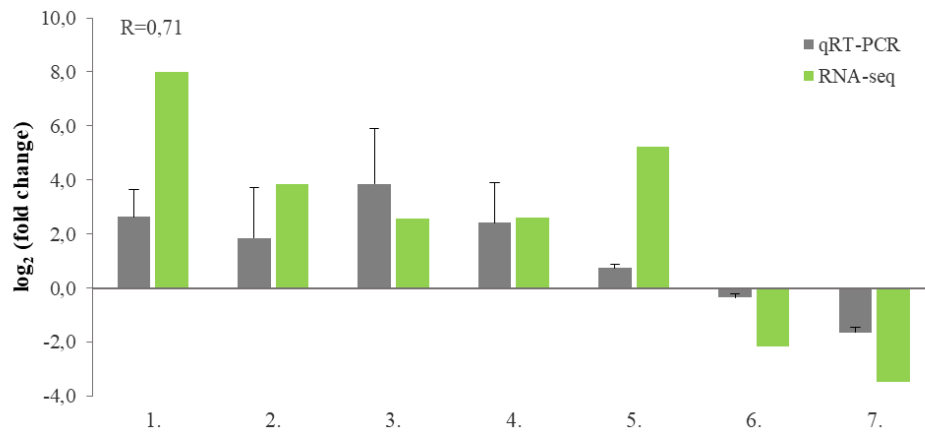
Habár a primycin bioszintézis génklaszter komparatív analízise nem mutatott ki strukturális különbségeket a *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 között, azonban a génklaszteren belül a kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszert felépítő hisztidin kináz receptort (EHK80176.1) és a hozzákapcsolódó válasz szabályozót (EHK80177.1) kódoló gén is upregulálódott a emelt primycintermelő-képességű törzsben. Továbbá a leucin-fogékony szabályozó fehérje (EHK88701.1) szintén eltérő expressziót mutatott a vizsgált két törzs között (8. táblázat).

8. táblázat A primycin bioszintézishez potenciálisan köthető, up- és downregulációt mutató gének az alacsony, illetve emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 és DSM 44631 törzsek összevetésében.

| COG | Név | Fehérje azonosító | Relatív „fold-change” (\log_2) | |
|--|--|-------------------|------------------------------------|----------------------------|
| | | | <i>S. azurea</i> SZMC 14600 | <i>S. azurea</i> DSM 44631 |
| Zsírsvszintézis | | | | |
| IQ | 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz | EHK89245.1 | - | 2,07 |
| IQ | 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz | EHK87608.1 | - | 3,46 |
| I | 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz III | EHK84821.1 | - | 2,17 |
| Másodlagos anyagcserefolyamatok | | | | |
| E | Agmatináz | EHK80172.1 | 2,62 | - |
| T | Kétkomponensű hisztidin kináz | EHK80176.1 | 2,57 | - |
| KT | Kétkomponensű rendszer válasz szabályozó | EHK80177.1 | 1,76 | - |
| K | Lrp/AsnC család transzkripcionális szabályozó | EHK88701.1 | 4,24 | - |
| Self-rezisztencia | | | | |
| V | ABC transzporter ATP-kötő fehérje | EHK80158.1 | 8,01 | - |
| V | ABC-transzporter transzmembrán fehérje | EHK80159.1 | 3,83 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK82841.1 | 2,08 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK88308.1 | 2,33 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK82470.1 | 5,00 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK88153.1 | 5,23 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK88592.1 | 3,16 | - |
| K | TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó | EHK83942.1 | 4,29 | - |

6.7. qRT-PCR vizsgálatok

A qRT-PCR méréseink során szelektáltan vizsgáltuk a primycin bioszintézishez potenciálisan köthető, eltérő expressziót mutató gének megnyilvánulását. Az RNS-Seq eredmények hitelessége statisztikailag is igazolható, a qRT-PCR és az RNS-Seq mérési adatok 0,71-es korrelációs együtthatóval jellemezhetőek ($p < 0,05$). A \log_2 transzformált génexpressziós értéket figyelembe véve a kétkomponensű hisztidin kináz (3,9), az ABC transzporter ATP-kötő fehérje (2,6), az ABC-transzporter transzmembrán fehérje (1,9), az agmatináz (2,4) és a TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó (0,8) kódolásáért felelős gének egyaránt overexpressziót mutattak az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 törzs esetében. Ezzel szemben a zsírsvszintézishez köthető 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz III (-0,4), 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz (-1,6) enzimeket kódoló gének egyaránt downregulálódtak a *S. azurea* DSM 44631 törzshöz képest (31. ábra).



31. ábra A primycin bioszintézishez köthető gének expressziójának vizsgálata qRT-PCR-rel. A szürke oszlopok reprezentálják a qRT-PCR-rel mért, log₂ transzformált génexpressziós értéket, míg a zöld oszlopok az RNS szekvenálásból származó log₂ „fold-change” értékek. 1.: ABC transzporter ATP-kötő fehérje (EHK80158.1); 2.: ABC-transzporter transzmembrán fehérje (EHK80159.1); 3.: Kétkomponensű hisztidin kináz (EHK80176.1); 4.: Agmatináz (EHK80172.1); 5.: TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó (EHK88153.1); 6.: 3-oxoacil-(acil-kARRIER-protein) szintáz III (EHK84821.1); 7.: 3-oxoacil-(acil-kARRIER-protein) szintáz (EHK87608.1). Pearson-féle korrelációs együttható: $R = 0,71$ ($p < 0,05$).

7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

7.1. Primycintermelő-képesség

Ahogy az a 4.1.1. *Saccharomonospora azurea* című fejezetben már korábban tárgyaltuk, jelen ismereteink szerint primycin-termelő szervezetként kizárólag a *Pseudonocardiaceae* családba tartozó *S. azurea* faj képviselői tekinthetőek. A közeli rokon *Saccharomonospora* fajokról (*S. cyanea*, *S. glauca*, *S. xinjiangensis* és *S. viridis*) korábban kísérletes úton már bebizonyosodott, hogy primycin fermentációs körülmények között nem képesek antibiotikum szintézisre, azonban arról, hogy genom szinten potenciálisan rendelkeznek-e a primycin termeléshez szükséges génkészlettel, mindezidáig nem állt rendelkezésünkre hitelt érdemlő adat. Jelen munka keretein belül elvégeztük a primycin bioszintetikus génklasztert célzó, átfogó strukturális genomikai összehasonlítást az online adatbázisokban hozzáférhető *Saccharomonospora* fajok (összesen 11) genomszekvenálási adatainak összevetésével. A lefuttatott szekvenanciaanalízis a primycin PKS struktúrgének hiányát tárta fel az összes egyéb faj esetében, kihangsúlyozva a *S. azurea* nemzetségen belül betöltött unikális szerepét.

Ugyan a *Saccharomonospora* nemzetség tagjairól bizonyosságot nyert, hogy nem rendelkeznek a primycin termelésért felelős genomi háttérrel, a *S. azurea* SZMC 14600 termelő törzs primycin bioszintézis génklaszterének strukturális vizsgálata a *Pseudonocardiaceae* család két közeli nemzetségének (*Amycolatopsis*, illetve *Kibdelosporangium* nemzetségek) képviselőjére irányította a figyelmet. Az antiSMASH szoftverrel végzett *in silico* szekunder metabolit analízis mind az *A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040, mind a *K. aridum* DSM 43828, *K. aridum* A82846 és *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462 törzsek kapcsán komplett primycin génklasztert tárt fel. Mivel ezen törzsek genetikai adottságukat tekintve potenciálisan rendelkeznek a primycin termelés képességével, ezért megkíséreltük két kiválasztott törzs, a *K. aridum* DSM 43828 és az *A. orientalis* DSM 40040 primycin fermentációs tápoldatban történő termeltetését megvalósítani, azonban antibiotikum termelés nem volt detektálható sem agardiffúziós biológiai értékméréssel, sem pedig HPLC/ESI-MS módszerrel. A bioszintézisért felelős gének indukálása érdekében a fermentációs paraméterek további optimalizálásra szorúlnak.

7.2. Zsírsv sav szubsztrátok primycin bioszintézisre gyakorolt hatása

A fermentációs tápoldathoz adagolt zsírsavak, mint az antibiotikum bioszintézis fontos prekursorai kulcsfontosságú szerepet töltenek be a PKS szintézis útvonalon keletkező antibiotikumok bioszintézisében [112]. A primycin fermentációs eljárás során az empirikusan

optimalizált ipari fermentációs tápközegben megtalálható sztearinsav jelenti elsődleges forrását a primycin PKS szintézis útvonal alapvető építőköveinek számító malonil-KoA, illetve metilmalonil-KoA molekuláknak.

Kísérletes munkánk folyamán bizonyítást nyert, hogy az ipari szempontból hatékony primycin termeltetésnek előfeltétele a fermentációs tápoldathoz adagolt, primycin bioszintézishez köthető prekursor zsírsav molekulák, melyek hiánya a termelés jelentős mértékű (akár 65%-os) csökkenését eredményezheti (14. ábra). A zsírsav komponens elhagyása azonban nem járt a primycin szintézis teljes gátlásával, hiszen a termelő szervezet anyagcserefolyamataihoz elengedhetetlen, elsődleges szénforrás (vízoldható keményítő), valamint a technológia jellegéből adódóan (a tápközeg leégését meggátolandó sterilizálás közben) napraforgóolaj is rendelkezésre áll a mikrobák számára. Utóbbi szintén potenciális zsírsavforrás, mely összetételében sztearinsav (1-7%), palmitinsav (4-9%), olajsav (14-40%) és linolsav (48-74%) is egyaránt szerepel [113]. Az elvégzett vizsgálatok értelmében a napraforgóolaj elhagyása szintén a primycin fermentációs tápközeg antibiotikum termelés indukálásának csökkenését (17%) vonja maga után, azonban a jelentkező negatív hatása kisebb mértékű a zsírsav elvételhez képest (15. ábra).

Vizsgálataink során igazolást nyert továbbá, hogy a primycin bioszintézis mértékét döntően befolyásolja a tápközegben található zsírsav komponens minősége és mennyisége. Különböző lánchosszúságú zsírsavak (sztearinsav, palmitinsav, laurinsav, kaprinsav, önantsav, kapronsav és vajsav) bevonásával végzett analízis során a legjobb antibiotikum termelést indukáló szubsztrátnak a hosszabb szénlánccal rendelkező sztearinsav, palmitinsav és laurinsav hármasa bizonyult. A laurinsav annak ellenére kedvező, primycin termelést indukáló komponensként jellemezhető, hogy irodalmi adatok antibakteriális hatásáról számolnak be több Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium esetében is [114, 115]. A közepes szénlánc-hosszúságú kaprinsav és önantsav alkalmazása mellett a termelő törzs nem mutatott sejtnövekedést, ebből kifolyólag antibiotikum termelés sem volt tapasztalható a fermentáció során. Ezen megfigyeléseink jó összhangban vannak azon irodalmi adatokkal, melyek a közepes szénlánc-hosszúságú zsírsavak antimikrobiális aktivitásáról számolnak be [116, 117]. Az általánosan elfogadott nézet szerint a zsírsavak disszociálatlan formában könnyedén áthatolnak a sejtmembrán foszfolipid kettősrétegén, majd a citoszolba jutva ezek a gyenge karbonsavak ionjaikra disszociálnak. Annak érdekében, hogy a sejt fent tudja tartani az optimális (közel semleges) pH körülményeket, arra kényszerül, hogy a feleslegben jelenlévő protonokat adenozin-trifoszfát felhasználása mellett eltávolítsa, ami végső soron az energiaforrások kimerüléséhez vezet [118]. A szintén közepes szénlánc-hosszúságú kapronsavat vagy a rövid

szénláncú vajsavat tartalmazó fermentációs tápközeg esetében bár megfigyelhető volt sejtnövekedés, azonban ez alacsony primycintermelő-képességgel társult. A 300-400 mg/L körüli primycin koncentráció értékek gyakorlatilag megegyeztek a korábban sztearinsavmentes fermentlevekben mért primycin koncentrációval. Tehát e két zsírsav kapcsán megállapítható, hogy ugyan nem rendelkeznek a termelő törzssel szemben antimikrobiális hatással, azonban primycin termelést indukáló hatással sem.

A legnagyobb hozamú primycin fermentációk során alkalmazott zsírsavak (sztearinsav, palmitinsav és laurinsav) összevetésében vizsgáltuk az alkalmazott zsírsav koncentráció hozamra gyakorolt hatását. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy minden tesztelt koncentráció esetében a palmitinsav bizonyult primycin termelés szempontjából a leghatékonyabb szubsztrátnak (16-18. ábra). A hozamra gyakorolt hatását tekintve a 4,5 g/L-es koncentrációt találtuk a legeffektívebbnek, mely felhasználásával akár 2100 mg/L-t is meghaladó primycin koncentrációt sikerült elérnünk. Lévén, hogy a prokarióta sejtszerveződések zsírsavsintézisének elsődleges terméke a palmitinsav [119], valamint, hogy a primycin-termelő *S. azurea* sejtek zsírsav spektrumát majd 80%-ban a palmitinsav dominálja, feltételezhető, hogy a termelő szervezet enzimatikus apparátusa hatékonyabban képes hasznosítani a palmitinsav formájában rendelkezésre álló zsírsav szubsztrátot. Köztudott továbbá, hogy a poliketid szintézis, illetve a zsírsavsintézis evolúciós tekintetben egymáshoz szorosan köthető folyamatok. A két megaszintáz által szabályozott összeszerelési útvonalak homológ doméneket és prekursor molekulákat használnak, mint például acetyl-CoA és a malonyl-CoA [111]. Így lehetséges, hogy a palmitinsav negatív visszacsatolási mechanizmus révén képes gátolni saját bioszintézisét, ezáltal a PKS szintézis útvonal irányába eltolódó bioszintetikus folyamatok során nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre a hasznosítható építőelemek.

Mindezek tükrében az elvégzett vizsgálataink igazolták a palmitinsav primycin bioszintézisében betöltött hatékony termelést indukáló szerepét, mely így nemcsak a sztearinsav alternatív komponenseként használható fel a fermentációs közegben, hanem az újonnan tervezett és rendkívül hatékony primycin termelő fermentációs közeg standard komponenseként is szolgálhat.

7.3. Primycin bioszintézis génklaszter strukturális jellemzése

A megnövekedett primycintermelő-képességgel bíró *S. azurea* SZMC 14600 törzs primycin bioszintéziséért felelős génklaszterének feltáró, strukturális genomikai jellemzését a törzs 2012-ben megvalósult genomszekvenálási projektje tette lehetővé. A PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék munkatársai által végzett genom összeszerelésnek

köszönhetően megszületett nem teljes, draft genom [84] megteremtette a lehetőséget a primycin-termelő törzs bioaktív szekunder metabolit szintézishez köthető génkészleteinek azonosítására. A szekvencia adatok analízise révén Csepregi és munkatársai elkészítették a primycin PKS bioszintetikus génklaszter első, részleges leírását [120], míg Kovács-Valasek és munkatársai két további kriptikus (NRPS és hibrid PKS/NRPS) bioszintetikus génklaszterről számoltak be [121].

Ugyan Csepregi és munkatársainak úttörő munkássága nagyban hozzásegített minket az újonnan leírt primycin szintézisért felelős génklaszter strukturális felépítésének, ezáltal a bioszintézis folyamatának részleteiben történő megismeréséhez, azonban számos kérdés továbbra is megválaszolatlan maradt. A leíró munka elsősorban a primycin PKS struktúrgének jellemzésén alapul, ennek következtében a primycin molekula bioszintéziséhez nélkülözhetetlen prekursor, illetve módosító gének azonosítására és jellemzésére nem került sor. Továbbá a szekvenálási adatok alapján jellemzett primycin PKS génklaszter alapján prediktálható antibiotikum molekula felépítését tekintve diszkrepanciát mutat a primycin molekula tényleges kémiai szerkezetével. A Csepregi és munkatársai által felállított primycin PKS modell egy összesen 16 modulból álló multienzim-komplexet ismertet, amely a kanonikus I-es típusú PKS bioszintézis útvonalat követve, elméletileg egy 32 szénatomból álló laktongyűrű szintézisét teszi lehetővé, szemben az ismert primycin molekula 36 szénatomot számláló laktongyűrűjével.

7.3.1. Primycin PKS modell

Annak érdekében, hogy közelebb kerüljünk a primycin bioszintézis folyamatainak alapjaiban történő megértéséhez, a fent említett hiányosságok szükségessé tették az emelt primycintermelőképességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomszekvenálásából származó adatok módszeres revízióját. A Csepregi és munkatársai által közölt eredmények óta a bioinformatika területén tapasztalt folyamatos fejlődés, kifinomultabb algoritmusok alapján működő szoftvercsomagok alkalmazását tette lehetővé, mely a rendelkezésre álló szekvencia adatok pontosabb interpretálását vonta maga után. Ennek köszönhetően a primycin PKS struktúrgének újbóli analízise során sikerült azonosítanunk a *S. azurea* SZMC 14600 törzs AHXB01000216 kontigja kapcsán korábban leírt, összesen 16 modul szintéziséért felelős génklaszter mellett, a primycin molekula szerkezeti tulajdonságai alapján indokolt további két modult, melyek az AHXB01000133-as kontigon foglalnak helyet. Az újonnan jellemzett katalitikus, illetve intermoduláris domének figyelembevételével újraalkotott I-es típusú primycin PKS multienzim-komplex alapján *in silico* prediktált primycin molekula immáron tényleges egyezést mutat az ismert primycin molekula kémiai szerkezetével (21. ábra).

7.3.2. A primycin PKS multienzim-komplex szubsztrátspecifitása

A változatos kémiai szerkezettel rendelkező poliketid molekulák sokszínűsége a PKS összeszerelési útvonalban résztvevő, különböző katalitikus funkciókat ellátó aktív centrumok variabilitásának köszönhető. Az általunk jellemzett új primycin PKS modellből kiindulva megtörtént a primycin molekula bioszintézise kapcsán meghatározó szerepet betöltő domének, úgymint a szubsztráthasznosítást elsődlegesen meghatározó AT, illetve a sztereokémiai tulajdonságok kialakításában döntő KR domének jellemzése.

Általánosságban a PKS útvonalon keresztül végbemenő szintézis folyamatok során alapvetően malonil-KoA, metilmalonil-KoA vagy etilmalonil-KoA beépülése figyelhető meg. Ennek megfelelően a primycin PKS AT domének aminosav szekvencia illesztése során 12 modul esetében malonil-KoA, valamint 5 modul esetében metilmalonil-KoA szubsztrát specificitással rendelkező katalitikus centrumokat azonosítottunk a GHSx[LVIFAM]G és HAFH, illetve GHSx[QMI]G és YASH konzervált szekvenciamotívumok alapján [122, 123]. Mindazonáltal az irodalomból ismert, hogy néhány antibiotikum esetében ezektől eltérő, nem megszokott szubsztrát hasznosulása is végbe mehet a bioszintézis során. Például az *Actinokineospora bangkokensis* 44EHW^T-ben leírt thailandin bioszintézis útvonal kapcsán butilmalonil-KoA specificitással rendelkező AT doménről [124], míg a *Streptomyces* sp. JS36 által termelt cinnabaramide bioszintézise kapcsán hexilmalonil-KoA hasznosító AT doménről számoltak be [125]. Léteznek továbbá kevésbé specifikus AT domének is, melyek több szubsztrát beépítését is lehetővé teszik, mint például a neoansamycint termelő *Streptomyces* sp. LZ35 esetében butilmalonil-KoA és pentilmalonil-KoA [89] vagy az antimycin kapcsán leírt propanilmalonil-KoA, butilmalonil-KoA, pentilmalonil-KoA és hexilmalonil-KoA molekulák [124]. A primycin PKS enzim felépítésében résztvevő AT domének analízise során szintén a szokásostól eltérő szubsztráthasznosítási tulajdonsággal rendelkező AT domént találtunk a 18-as modulban. Az antiSMASH szoftver által végzett *in silico* elemzés elméletileg etilmalonil-KoA hasznosulását vetítette előre, azonban az aminosav szekvencia adatok részletes összevetéséből kiderült, hogy a kérdéses AT domén aktív centrumaiban megtalálható GHSQG és GAGH konzervált szekvenciamotívumok butilmalonil-KoA, pentilmalonil-KoA vagy hexilmalonil-KoA beépülését teszik lehetővé, melynek következménye a primycin molekulák R₂-es oldalláncában (n-butil, n-pentil és n-hexil) mutatott variabilitás.

7.3.3. KR domén szerepe a sztereokémiai tulajdonságok kialakításában

A poliketid molekulák sztereokémiai komplexitása meghatározó szerepet játszik a specifikus receptorokhoz való kötődésben. A PKS enzimkomplex egyes moduljaiban található KR domén

határozza meg a szintetizálódó termék szekunder hidroxil-, illetve metil csoportot hordozó sztereogén centrumainak konfigurációját. Az A- és a B-típusú KR domének aktív centrumaiban található lizin (K), szerin (S) és tirozin (Y) konzervált katalitikus triád 3S vagy 3R orientációval rendelkező β -hidroxil csoportot hoz létre az α -szubsztituens 2R orientációjának módosítása nélkül, NADPH mediált útvonalon. A 2-es altípusú (A2, B2) KR domének esetében szintén ugyanezen katalitikus centrumok révén szabályozott a 2S sztereokémia kialakulása az α -szubsztituens pozícióban [126].

A *S. azurea* SZMC 14600 törzs primycin PKS enziméhez köthető KR domének aminosav szekvencia illesztései során összesen 7 db KR domén esetében tártuk fel az A-típusra jellemző triptofán (W), míg további 11 KR esetében a B-típusra jellemző, leucinből és két további aszparaginsavból (LDD) álló szekvenciamotívumokat [127]. A vizsgált szekvencia adatok alapján azonosítottuk továbbá a *lys-ser-tyr* katalitikus triádot. A 7-es és 9-es modul KR doménje esetében megfigyelhető azonban, hogy a 112-es pozícióban található lizint (K) aszparaginsav (A), míg a 11-es és a 17-es modul KR doménje esetében glicin (G) helyettesíti. Ezen szubsztitúciók a termékképződést nem befolyásolják, az aktív centrumhoz köthető katalitikus folyamatok eredménye szintén B1-típusú sztereokémiával jellemezhető. A primycin PKS esetében szintén azonosítottuk a KR doménekre jellemző TGGTGxLG szekvenciamotívumokat is, melyek a NADPH kofaktor kötését teszik lehetővé [128].

7.3.4. *L-arginin prekurzor szintézis útvonal*

Hasonlóan sok más, guanidin oldalláncot hordozó makrociklikus poliketidhez, a primycin bioszintézis kiindulási egysége szintén a 4-guanidinobutanoil-KoA molekula, mely az L-arginin prekurzor szintézis útvonalon keresztül szintetizálódik [42]. Az L-arginin szubsztrát molekulától dedikált, katalitikus enzimek által szabályozott, több lépésből álló szintézis folyamat vezet a primycin PKS által közvetlenül hasznosítható 4-guanidinobutanoil-KoA molekuláig.

Az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomszekvenálás adatainak strukturális genomikai analízise során azonosítottuk ezen prekurzor szintézis útvonal enzimátikus szereplőit, melyek a szintézis folyamatnak megfelelően az alábbi sorrendben követik egymást: az L-arginin és a 4-guanidinobutiramid molekulák közti konverzióért az amin oxidáz (EHK88410.1), a 4-guanidinobutiramid és a 4-guanidinobutánsav közti átalakulásért az amidohidroláz (EHK88411.1), míg a 4-guanidinobutánsav és a 4-guanidinobutanoil-KoA közt lejátszódó reakció katalizálásáért az acil-KoA ligáz (EHK88415.1) enzimek felelősek. Az aktivált 4-guanidinobutanoil csoport felhelyezését a primycin bioszintézist végző PKS multienzim indító acil-karrier protein (ACP) doménjére az S-

maloniltranszferáz (EHK80162.1) enzim végzi. A leírt enzimeket kódoló gének a primycin PKS struktúrgéneket egyaránt magába foglaló primycin bioszintézisért felelős génklaszteren belül helyezkednek el, melyek egymáshoz viszonyított relatív genomai pozícióját a 20. ábra szemlélteti.

A primycin bioszintézisért felelős génklaszterhez tartozó gének, illetve fehérjék NCBI adatbázisban elvégzett homológia keresésének eredménye szintén megerősítette az L-arginin prekursor szintézis útvonalat szabályozó enzimek primycin szintézishez köthető szerepét. Ugyanis a bizonyítottan primycin-termelő *S. azurea* faj tagjain kívül, az amidohidroláz (EHK88411.1), az acil-KoA ligáz (EHK88415.1) és az S-maloniltranszferáz (EHK80162.1) enzimek is egyaránt a szintén primycin génklaszterrel rendelkező *K. aridum* homológ enzimeivel mutatták a legnagyobb fokú azonosságot.

7.3.5. Primycin szintézist módosító és szabályozó gének

A primycin bioszintetikus génklaszter analízise során a primycin PKS struktúrgének és az L-arginin szintézis útvonalban résztvevő gének mellett azonosításra került további 16 gén, melyek valamilyen szinten köthetők a primycin molekula szintézis folyamatának egyes szakaszaihoz. Ezen 16 gén magas fokú hasonlóságot mutat a *K. aridum*-ban is azonosított primycin PKS-sel szorosan kapcsolt génekkel, alátámasztva a primycin génklaszterben betöltött szerepüket. Az azonosított gének között megtalálható a primycin A1 és deguanidino-amino-A1 komponensek közötti átalakulást katalizáló agmatináz (EHK80172.1) [43], a primycin A1, A2 és A3 molekulák esetében az arabinozil funkciós csoport felhelyezéséért felelős glikoziltranszferáz (EHK80161.1) [44] vagy a primycin PKS 18-as moduljának AT doménje által hasznosított, nem szokványos butilmalonil-KoA, pentilmalonil-KoA és hexilmalonil-KoA szubsztrátok szintéziséért felelős acil-KoA karboxiláz (EHK80154.1) kódoló gének [129]. Szintén a génklaszter része a citokróm P450 (EHK80160.1) által kódolt enzim, mely feltételezésünk szerint az I-es típusú primycin PKS utolsó moduljának ACP-jéhez kötött poliketid lánc C-35-ös szénatomjának hidroxilezését katalizálja szemben a primycin PKS 6. moduljának KR-a által mediált ketoredukcióval. A keletkező hidroxil csoport kulcsfontosságú eleme a PKS enzimkomplex C terminusán található TE domén által katalizált laktongyűrű záródásnak [130].

A primycin PKS struktúrgének közvetlen környezetében, 5' illetve 3' irányban is két-két (összesen 4) ABC transzport fehérje szintéziséért felelős gént azonosítottunk. Mint ismert az ABC transzport fehérjék központi szerepet játszanak a bioaktív metabolitokat termelő sejtek self-rezisztencia folyamataiban, ezáltal az általunk azonosított gének potenciálisan közreműködhetnek a primycin termelés eredményeként jelentkező antibiotikum aktív kiválasztásban [131]. A kanonikus ABC transzporterek felépítésüket tekintve négy funkcionális

alegységbe szerveződnek, melyet két nukleotidkötő domén és két transzmembrán domén alkot [132]. Ennek megfelelően a primycin PKS-től 5' irányban együttesen helyezkedik el az ABC transzporter ATP-kötő fehérje (EHK80158.1), illetve a hozzá tartozó ABC transzporter permeáz (EHK80159.1) szintéziséért felelős gén, valamint 3' irányban a hasonló funkciót ellátó EHK80174.1 és az EHK80175.1. azonosítóval ellátott géntermékek szintéziséért felelős gének.

Közvetlenül az utobbi két ABC transzporter gén mellett szintén azonosításra kerültek a bakteriális kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszereket képviselő két-komponensű szenzor hisztidin kinázt (EHK80176.1) és a hozzá kapcsolódó válasz regulátort (EHK80177.1) kódoló gének. Általánosságban véve ezen kétkomponensű rendszerek számos biológiailag aktív szekunder metabolit, ezáltal a primycin bioszintetikus szabályozásában is részt vehetnek [133, 134]. Mindazonáltal a primycin bioszintézisben betöltött egzakt szerepük, akárcsak a génklaszter általánosabb funkcióit ellátó fehérjéit (penicillin aciláz család fehérje - EHK80155.1, DUF418 domént hordozó fehérje - EHK80156.1, cukor dehidrogenáz - EHK80164.1, AAA család ATPáz - EHK80178.1) valamint a két ismeretlen funkciót ellátó hipotetikus fehérjét (EHK80157.1 és EHK80173.1) kódoló géneknek mindezidáig még nem tisztázott.

7.4. Funkcionális genomika

A *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* 44631 törzsek komplex génexpressziós profiljának összehasonlítása révén vizsgáltuk a primycintermelő-képességben mutatkozó kvantitatív különbségek transzkripcionális szinten történő megnyilvánulását. Az emelt, illetve csökkent primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* törzsek RNS szekvenálásából származó adatok bioinformatikai feldolgozása összesen 686 DEG-et eredményezett, beállított 2-es „cutoff” érték mellett. Ezen gének funkcionális annotációja és GO kategóriákba való besorolása nagy változatosságot mutat, azonban a fő kategóriákba sorolt GO meghatározások reprezentáltságát tekintve nem tapasztaltunk lényegi eltérést a két primycin-termelő *S. azurea* törzs között.

Az eltérő expressziót mutató gének COG funkcionális csoportokba történő besorolásuk alapján szintén igen változatos kategóriákat képviselnek, habár általánosságban az anyagcsere folyamatokhoz köthető COG kategóriák domináns túlsúlya jellemző, melyek az összes találat több mint 50%-át reprezentálják. Közülük kiemelendő az aminosav transzport és metabolizmus (E) osztályba tartozó agmatináz enzimet kódoló gén, mely 2,62-szeres upregulációt mutatott a primycin-túltermelő törzsben. A primycin bioszintetikus génklaszterhez szorosan köthető gén emelkedett expressziós szintje rávilágít annak kiemelt jelentőségére a guanidino oldalláncot hordozó poliketid molekulák bioszintézisében, ahogyan arról Hong és munkatársainak desertomycin kapcsán tett megfigyelései is tanúskodnak [43]. Yuan és munkatársai a

Streptomyces hygroscopicus var. *azalomyceticus* által termelt azalomicin F5_a hatásmechanizmusa kapcsán szintén a guanidino oldallánc marginolakton antibiotikumok antibakteriális hatásának kifejtésében betöltött kulcsfontosságú szerepéről számolnak be [50]. Következésképpen az agmatináz gén expressziós szintjének módosítása ígéretes célpontnak mutatkozik a primycin molekula által kifejtett antibakteriális aktivitás fokozásának érdekében.

Az expressziós profilalkotás szintén több DEG-et tárt fel a zsírsav-bioszintézishez köthető enzimek kódoló génjei között. A zsírsavak és a poliketidek *de novo* bioszintéziséért felelős enzimikus mechanizmusok számos közös tulajdonsággal rendelkeznek, úgymint homológ katalitikus domének használata vagy éppen a szintézishez felhasznált prekursor molekulák minősége [119]. Utóbbi okán a két multienzim-komplex között elméletileg nem zárható ki szubsztrát kompetíciós hatás. Eredményeink, melyek az emelt, illetve csökkent primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* törzsek azonos fermentációs körülmények (azonos növekedési fázis) között történő összevetésén alapul, nem támasztották alá azon hipotézist, miszerint a két bioszintetikus folyamat között általában nem jelentkezik versengés azok időbeli eltolódása miatt [135]. A zsírsavszintézishez kapcsolt gének alacsony primycin-termelő *S. azurea* DSM 44631 törzsben tapasztalt emelt expressziós szintje arra enged következtetni, hogy a zsírsav-, illetve a poliketid szintézishez köthető mechanizmusok nem egyértelműen elhatárolható szekvenciális folyamatok, hanem inkább kisebb-nagyobb mértékben ugyan, de átfedésben vannak.

A *S. azurea* által termelt primycin egy nem polién marginolakton antibiotikum, mely bizonyítottan magas antimikrobiális aktivitással rendelkezik a gyakori Gram-pozitív kórokozókkal szemben, beleértve több klinikai jelentőséggel bíró multirezisztens törzset is [6]. Annak érdekében, hogy a termelő szervezet meg tudja védeni magát a saját maga által termelt bioaktív anyagcseretermékektől, az antibiotikum-termelő sejtben lejátszódó self-rezisztencia mechanizmusok kulcsfontosságú szerephez jutnak. Annak ellenére, hogy a primycin története immáron több mint 60 évre nyúlik vissza, a *S. azurea* fajok self-rezisztencia folyamatainak szabályozása kapcsán rendelkezésre álló tudományos ismereteink limitáltak. A két primycin-termelő *S. azurea* törzs felhasználásával most elvégzett transzkripciós analízis azonban több, a multidrog-, illetve self-rezisztencia folyamatokhoz köthető, megnövekedett expressziós szinttel rendelkező gént azonosított a túltermelő törzsben. Köztük két, az ABC transzporter szupercsaládot képviselő gént, melyek lokalizációjukat tekintve szorosan kapcsolódnak a primycin bioszintézis génklaszterhez [131, 132]. Hasonlóképpen további 6, antibiotikum rezisztenciához köthető TetR család transzkripciós szabályozó fehérjét kódoló gént azonosítottunk, melyek szintén az emelt primycintermelő-képességgel jellemzett *S. azurea* SZMC 14600 törzsben mutattak jelentős overexpressziót [136, 137]. Ezen megállapítások alátámasztják

azon hipotézist, miszerint a rezisztencia gének expresszióját feltehetően a megszintetizált primycin molekula vagy annak származékai indukálják a koncentráció függvényében.

A bakteriális kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszerek nemcsak a környezeti változásokra adott komplex adaptív válaszok szempontjából játszanak fontos szerepet, hanem részt vesznek a szekunder metabolitok széles skálájának bioszintetikus szabályozásában is [133,134]. Példának okáért a *Streptomyces coelicolor*-ban jellemzett kétkomponensű AfsQ1/Q2 rendszer képes stimulálni a termelő szervezet aktinorodin, undecilprodigiosin és a kalcium-függő antibiotikum termelését is [138]. Továbbá szintén bizonyították, hogy a *Streptomyces clavuligerus* kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszerét alkotó orf22 és orf23 pozitívan szabályozzák a klavulánsav bioszintézisét, minek következtében overexpressziójuk megnövekedett hozamú antibiotikum termelést eredményez [139]. Ismereteink szerint mindeközéig ez az első tanulmány, amely a *S. azurea* SZMC 14600 törzs megemelkedett primycin bioszintetikus kapacitásával kapcsolatban hisztidin kináz receptort és a hozzá kapcsolódó válasz szabályozót kódoló gének overexpressziójáról számol be.

Habár a másodlagos anyagcserefolyamatok transzkripciós szinten megnyilvánuló szabályozása alaposan tanulmányozott *Streptomyces*-ekben [140], az egyéb, iparilag fontos ritka aktinomicéták esetében a rendelkezésre álló adatok meglehetősen alulreprezentáltak. Az irodalomból ismert, hogy *S. coelicolor*-ban az Lrp/AsnC család transzkripciós szabályozó fehérjéit kódoló gének (SCO2140 és SCO3361) az antibiotikum-termelés pozitív szabályozásáért felelősek [141, 142]. Ezzel összhangban az emelt primycin termeléssel jellemzett *S. azurea* törzsben szintén megfigyelhetünk magasan expresszált Lrp/AsnC család transzkripciós szabályozó gént.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az újonnan, illetve ismételten felbukkanó mikrobiális kórokozók gyors evolúciós fejlődése és a klinikumban alkalmazott antibiotikumokkal szemben mutatott alkalmazkodó képessége nem csupán az új antimikrobiális szerek felfedezésére irányuló kutatások fontosságát emeli ki, hanem a már meglévő antibiotikumokkal kapcsolatos ismeretek elmélyítésének szükségességét is hangsúlyozza. Ebbe a koncepcióba kiválóan illeszkedik a hazánkban 1954-ben felfedezett primycin, melyben a Gram-pozitív baktériumokkal szemben mutatott kedvező antimikrobiális tulajdonságainak köszönhetően komoly terápiás potenciál rejlik.

Jelen tanulmány során multidiszciplináris megközelítést alkalmazva hagyományos mikrobiológiai, analitikai kémiai, illetve fejlett bioinformatikai eszközzel támogatott strukturális, funkcionális és összehasonlító genomikai eljárások segítségével célként fogalmaztuk meg a primycin ipari léptékű előállításának javítását, valamint a primycin szintézis háttérében húzódo folyamatok mélyreható megismerését a termelő *S. azurea* törzsek összehasonlító elemzése révén.

Klasszikus fermentáció optimalizációs vizsgálataink során igazoltuk, hogy az ipari szempontból hatékony primycin termeltetésben kritikus paraméter a fermentációs tápközeghez adagolt zsírsav szubsztrát minősége és mennyisége. A primycin bioszintetikus folyamatok szempontjából leghatékonyabb prekursor molekulának a hosszú, 16 szénatomot tartalmazó szénlánccal rendelkező palmitinsav bizonyult. A zsírsav koncentrációk tekintetében a 4,5 g/L-es végkoncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak a hozamra gyakorolt hatás szempontjából. Eredményeink igazolták, hogy a palmitinsav nem csupán a sztearinsav alternatív komponenseként használható fel a fermentációs közegben, hanem a jövőben az újonnan tervezett és rendkívül hatékony primycin termelő fermentációs közeg standard komponenséül is szolgálhat.

A *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomszekvenálási adatainak szisztematikus revíziójának köszönhetően jellemeztük a teljes primycin bioszintetikus génklasztert, amely kapcsán a primycin PKS struktúrgének és az L-arginin szintézis útvonalban résztvevő gének mellett további 16 gént azonosítottunk, melyek a primycin molekula bioszintézis folyamatának különböző szakaszaihoz köthetőek. Annak ellenére, hogy a *S. azurea* SZMC 14600 kapcsán újonnan összeszerelt és jellemzett primycin PKS génklaszter *in silico* elemzése nem mutatott ki szignifikáns strukturális különbségeket a két primycin-termelő törzs között, egyértelmű bizonyítékot találtunk a primycin PKS 18-as moduljában található aciltranszferáz domén szokatlan szubsztrátspecifitására.

A primycin bioszintézis génklaszter azonosítására irányuló *in silico* vizsgálataink megerősítették eddigi ismereteinket, miszerint az egyedüli primycin-termelőként ismert *S.*

azurea mellett a *Saccharomonospora* nemzetség többi tagja nem rendelkezik a primycin termeléshez szükséges genetikai potenciállal. Mindazonáltal a primycin bioszintetikus gének és fehérjék NCBI adatbázisban lefuttatott homológia keresése nyomán mindezidáig ismeretlen, de teljes értékű, 18 modulból álló primycin PKS génklasztert és a kapcsolt módosító és szabályozó géneket tártunk fel *K. aridum* DSM 43828, *K. aridum* A82846 és *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462, valamint *A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040 törzsekben.

A primycintermelő-képességben jelentkező mennyiségi különbségek háttérében rejlő folyamatok feltárása céljából elvégzett komparatív transzkripcionális analízis számos eltérő expressziót mutató gént eredményezett, melyeket prediktált funkciójuk alapján változatos GO, illetve COG kategóriákba soroltunk. Közülük a zsírsavszintézissel, self-rezisztenciával és másodlagos anyagcsere szabályozásával kapcsolatos gének, valamint a primycin A1 és deguanidino-amino-A1 komponensek közötti átalakulást katalizáló agmatináz enzimet kódoló gén primycin bioszintésben betöltött szerepét tárgyaltuk. Transzkriptomikai vizsgálatainkkal párhuzamosan az agmatináz enzim aktivitására utaló deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek jelenlétét nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrométerrel szintén igazoltuk mindkét *S. azurea* törzs esetében a fermentlé extraktumokból.

A primycin bioszintézisért felelős génklaszter és vele együtt a primycin bioszintézis szabályozásának háttérében rejlő folyamatok megismerésére irányuló törekvéseink jó kiinduló pontként szolgálnak a tudatos törzsnemesítésen keresztül megvalósuló antibiotikum hozam növelésére, valamint lefektetik a primycin molekulák felhasználásán nyugvó racionális gyógyszertervezés alapjait.

9. SUMMARY

Emerging and re-emerging microbial pathogens, together with their rapid evolution and adaptation against antibiotics, highlight the importance not only of screening for new antimicrobial agents, but also for deepening knowledge about existing antibiotics. Primycin produced by *Saccharomonospora azurea* exhibit advantageous antimicrobial properties against a wide range of Gram-positive bacteria, which serves it a strong therapeutic potential and makes it an ideal target for these purposes.

In this study, we have presented a comprehensive work based on multidisciplinary approaches e.g. traditional microbiology; analytical chemistry; structural, functional and comparative genomics supported by a wide variety of bioinformatic tools in order to improve industrial scale primycin production and gain insight into primycin biosynthesis by comparative analysis of the primycin producer *S. azurea* strains.

Due to our traditional fermentation optimization efforts it turned out that not only quantity but quality of fatty acid substrate play a pivotal role in the rate of primycin fermentation. The most effective precursor molecule for primycin biosynthetic processes was palmitic acid (C16:0). Regarding fatty acid concentration, 4.5 g/L palmitic acid treatment proved to be the most effective in terms of antibiotic yield enhancement. Our results demonstrated that palmitic acid plays an essential role in primycin production and may be used not only as an alternative component of stearic acid in the fermentation media but may also serve as a standard component of a newly designed and highly effective primycin producing fermentation media.

According to the systematic revision of the *S. azurea* SZMC 14600 genome sequencing data, we could characterized the entire primycin biosynthetic gene cluster. Beside the primycin PKS biosynthetic core genes and genes involved in the L-arginine precursor synthesis pathway, we identified 16 additional genes which can be linked to different stages of the primycin biosynthetic processes. Although *in silico* analysis of the newly assembled and characterized primycin PKS gene cluster for *S. azurea* SZMC 14600 did not reveal significant structural differences between the two primycin-producing strains, we found clear evidence of an unusual acyltransferase domain substrate specificity in the module 18 of the primycin PKS.

Our *in silico* analysis to identify the primycin biosynthesis gene clusters supported our previous knowledge that beside *S. azurea* the other members of the *Saccharomonospora* genus do not have the genetic potential to produce primycin. In contrast sequence similarity searching to identify homologous genes and proteins in the NCBI database revealed complete, 18-module containing primycin PKS gene cluster with the associated modifying and regulatory genes in *K.*

aridum DSM 43828, *K. aridum* A82846, *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462, *A. orientalis* B-37 and *A. orientalis* DSM 40040 strains.

Concerning quantitative differences in primycin producing ability, the performed comparative transcriptomic analysis resulted several DEGs, classified into various GO and COG categories. Among them, genes related to fatty acid synthesis, self-resistance, regulation of secondary metabolism and an agmatinase encoding gene responsible for catalyze conversion between primycin A1 and deguanidino-amino-A1 forms of primycin were discussed. In parallel to the performed transcriptomic analysis, the presence of deguanidino-amino-A1 and A1 primycin components referring to agmatinase enzyme activity was also confirmed by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray-mass spectrometry for both *S. azurea* strains.

As a result our efforts to investigate the primycin biosynthetic gene cluster and the mechanisms lying behind the regulation of primycin biosynthesis provides clues for antibiotic yield- and strain-improvement as well as laying the foundation for rational drug design.

10. HIVATKOZÁSOK

1. Lee Ventola C (2015) The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. P T 40(4):277-283
2. World Health Organization (2019) No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections - Report to the Secretary-General of the United Nations. United Nations Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance 2019. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en>
3. Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. Annu Rev Biochem 78:119-146
4. World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: World Health Organization. ISBN: 9789241564748
5. Vályi-Nagy T, Úri J, Szilágyi I (1954) Primycin, a New Antibiotic. Nature 174:1105-1106
6. Feiszt P, Mestyán Gy, Kerényi M, Dobay O, Szabó J, Dombrádi Zs, Urbán E, Emődly L (2014) Re-evaluation of in vitro activity of primycin against prevalent multiresistant bacteria. Int J Med Microbiol 304:1077-1085
7. Nonomura H, Ohara Y (1971) Distribution of actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes. J Ferment Technol 49:895-903
8. Pati A, Sikorski J, Nolan M, Lapidus A, Copeland A, et al. (2009) Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101). Stand Genomic Sci 1(2):141-149
9. Kim SB (2015) *Saccharomonospora*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley, pp 1-11
10. <https://lpsn.dsmz.de/species/saccharomonospora-azurea>
11. Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J (2018) Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. Pol J Microbiol 67(3):259-272
12. Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A (2012) Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Cent Eur J Biol 7(3):373-390
13. Xu L, Huang H, Wei W, Zhong Y, Tang B, Yuan H, Zhu L, Huang W, Ge M, Yang S, Zheng H, Jiang W, Chen D, Zhao GP, Zhao W (2014) Complete genome sequence and comparative genomic analyses of the vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis*. BMC Genomics 15(1):363

14. Oliynyk M, Samborskyy M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* 25(4):447-53
15. Singh B, Parshad R, Khajuria RK, Guru SK, Pathania AS, Sharma R, Chib R, Aravinda S, Gupta VK, Khan IA, Bhushan S, Bharate SB, Vishwakarma RA (2013) Saccharonol B, a new cytotoxic methylated isocoumarin from *Saccharomonospora azurea*. *Tetrahedron Lett* 54:6695-6699
16. Juhász Á, Péntes Á, Péteri Z, Pallos JP, Seffer D, Feiszt P, Pesti M, Fekete Cs, Vágvölgyi Cs, Gazdag Z, Papp G. Process for producing primycin, primycin component(s), precursors and metabolites thereof via fermentation by the use of bacterial species *Saccharomonospora azurea*. 5 May 2011, WIPO patent application WO/2011/051741
17. Indupalli MD, Muvva V, Munaganti RK, Mangamuri UK (2016) *Saccharomonospora oceani* VJDS-3, a potent actinobacterial strain from Mangrove ecosystem. *Asian J Pharm Clin Res* 9(1):370-373
18. Le TC, Lee EJ, Lee J, Hong A, Yim CY, Yang I, Choi H, Chin J, Cho SJ, Ko J, Hwang H, Nam SJ, Fenical W (2019) Saccharoquinoline, a cytotoxic alkaloidal meroterpenoid from marine-derived bacterium *Saccharomonospora* sp. *Mar Drugs* 17(2):98
19. Reynolds KA, Luhavaya H, Li J, Dahesh S, Nizet V, Yamanaka K, Moore BS (2018) Isolation and structure elucidation of lipopeptide antibiotic taromycin B from the activated taromycin biosynthetic gene cluster. *J Antibiot (Tokyo)* 71:333-338
20. Kraemer HP, Robbel L, Schwenen LM (1989) Sakyomicin E and the derivatives thereof, a process for the preparation thereof and the use thereof. European Patent Office, EP0336349A2
21. Tamura A, Takeda I (1975) Antibiotic AB-65, a new antibiotic from *Saccharomonospora viride*. *J Antibiot (Tokyo)* 28(5):395-7
22. Schuurmans DM, Olson BH, Clemente CLS (1956) Production and Isolation of Thermoviridin, an Antibiotic Produced by *Thermoactinomyces viridis* n. sp. *Appl Microbiol* 4(2):61-6
23. Runmao Hu (1987) *Saccharomonospora azurea* sp. nov., a New Species from Soil. *Int J Syst Bacteriol* 37:60-61
24. Yoon J-H, Kim S-B, Lee ST, Park Y-H (1999) DNA-DNA relatedness between *Saccharomonospora* species: “*Saccharomonospora caesia*” as a synonym of *Saccharomonospora azurea*. *Int J Syst Evol Micr* 49(2):671-673

25. Klenk HP, Held B, Lucas S, Lapidus A, Copeland A, et al. (2012) Genome sequence of the soil bacterium *Saccharomonospora azurea* type strain (DSM 44631T). *Stand Genomic Sci* 6:220-229
26. Szabó IM, Marton M, Kulcsár G, Buti I (1976) Taxonomy of primycin producing actinomycetes. I. Description of the type strain of *thermomonospora galeriensis*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 23:371-6
27. Kelenhegyi M, Uzvölgyi F, Gurdon J (1956) Clinical experiences with a new Hungarian-made antibiotic primycin in urogenital tuberculosis. *Magy Seb* 9:198-200
28. Molnár G, Bíró L (1958) Local administration of primycin in the therapy of inflammations of the uterine region. *Magy Nőorv Lapja* 21: 155-160
29. Alberth B, Elek P, Herpay Z, Szilágyi I (1957) Primycin and penicillic acid in ophthalmology. *Ophtalmologica* 134:54-61
30. Viktorinova M (1998) New antibiotic primycin in the treatment of pyodermas and acne. *Ces Dermatol* 73:153-157
31. Papp T, Ménesi L, Szalai I (1990) Experiences in the Ebrimycin gel treatment of burns. *Ther Hung* 38(3):125-128
32. Song X, Yuan G, Li P, Cao S (2019) Guanidine-Containing Polyhydroxyl Macrolides: Chemistry, Biology, and Structure-Activity Relationship. *Molecules* 24(21):3913
33. Frank J, Dékány Gy, Pelczer I, ApSimon JW (1987) The composition of primycin. *Tetrahedron Lett* 28(24):2759-2762
34. Wang H, Fewer DP, Holm L, Rouhiainen L, Sivonen K (2014) Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(25):9259-9264
35. Du L, Lou L (2010) PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* 27:255-278
36. Cane DE (2010) Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *J Biol Chem* 285(36):27517-23
37. Hong H, Sun Y, Zhou Y, Stephens E, Samborsky M, Leadlay PF (2016) Evidence for an iterative module in chain elongation on the azalomycin polyketide synthase. *Beilstein J Org Chem* 12:2164-2172
38. Shen B (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7:285-295
39. Du L, Sánchez C, Shen B (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab* 3(1):78-95

40. Hertweck C (2009) The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Edit* 48:4688-4716
41. Tsai SC, Ames BD (2009) Structural enzymology of polyketide synthases. *Methods Enzymol* 459:17-47
42. Hong H, Fill T, Leadlay PF (2013) A common origin for guanidinobutanoate starter units in antifungal natural products. *Angew Chem Int Edit* 52:13096-13099
43. Hong H, Samborskyy M, Lindner F, Leadlay PF (2016) An amidinohydrolase provides the missing link in the biosynthesis of amino marginolactone antibiotics. *Angew Chem Int Edit* 55:1118-1123
44. Banskota AH, McAlpine JB, Sørensen D, Ibrahim A, Aouidate M, Pira, Alarco AM, Farnet CM, Zazopoulos E (2006) Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class. *J Antibiot* 59(9):533-542
45. Mankin AS (2008) Macrolide myths. *Curr Opin Microbiol* 11:414-421
46. Horváth I, Kramer M, Bauer PI, Büki KG (1979) The Mode of Action of Primycin. *Arch Microbiol* 121:135-139
47. Virág E, Juhász Á, Kardos R, Gazdag Z, Papp G, Péntes Á, Nyitrai M, Vágvölgyi Cs, Pesti M (2012) *In vivo* direct interaction of the antibiotic primycin on a *Candida albicans* clinical isolate and its ergosterol-less mutant. *Acta Biol Hung* 63:38-51
48. Virág E, Belagyi J, Gazdag Z, Vágvölgyi Cs, Pesti M (2012) Direct *in vivo* interaction of the antibiotic primycin with the plasma membrane of *Candida albicans*: An EPR study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1818:42-48
49. Virág E, Belagyi J, Kocsubé S, Vágvölgyi Cs, Pesti M (2013) Antifungal activity of the primycin complex and its main components A1, A2 and C1 on a *Candida albicans* clinical isolate, and their effects on the dynamic plasma membrane changes. *J Antibiot (Tokyo)* 66:67-72
50. Yuan G, Xu L, Xu X, Li P, Zhong Q, Xia H, Hu Y, Li P, Song X, Li J, Liu Q (2019) Azalomycin F5a, a polyhydroxy macrolide binding to the polar head of phospholipid and targeting to lipoteichoic acid to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Pharmacother* 109:1940-1950
51. Paulová L, Patáková P, Brányik T (2013) Engineering Aspects of Food Biotechnology. Chapter: Advanced Fermentation Processes. Taylor & Francis Group pp 89-110
52. Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 44:13-18

53. Soccol CR, da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov* 1:52-71
54. Subramaniyam R, Vimala R (2012) Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat* 3(3):480-486
55. EL Moslamy SH (2019) Application of Fed-Batch Fermentation Modes for Industrial Bioprocess Development of Microbial Behaviour. *Ann Biotechnol Bioeng* 1:1001
56. Elsayed EA, Farid MA, El-Enshasy HA (2019) Enhanced Natamycin production by *Streptomyces natalensis* in shake-flasks and stirred tank bioreactor under batch and fed-batch conditions. *BMC Biotechnol* 19:46
57. Ser HL, Law JW, Chaiyakunapruk N, Jacob SA, Palanisamy UD, Chan KG, Goh BH, Lee LH (2016) Fermentation Conditions that Affect Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review. *Front Microbiol* 7:522
58. Karthikeyan S, Ramesh D, Iniya KM (2019) Perspectives and Prospects of Fermentation Technology. In: *Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies*. CRC Press, pp 217-232
59. Panda BP, Ali M, Javed S (2007) Fermentation Process Optimization. *Res J Microbiol* 201-208
60. Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CK (2017) Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front Microbiol* 7:2087
61. Gouveia ER, Baptista-Neto A, Badino AC, Hokka CO (2001) Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Lett* 23:157-161
62. Pandey A, Shukla A, Majumdar SK (2005) Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. *African J Biotechnol* 4:909-910
63. Al-Ghazali LH, Omran R (2017) Optimization of medium composition for antibacterial metabolite production from *Streptomyces* sp. *Asian J Pharm Clin Res* 10:381-385
64. Wang YH, Yang B, Ren J, Dong ML, Liang D, Xu AL (2005) Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem* 40:1161-1166
65. Romero J, Liras P, Martin JF (1986) Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Appl Environ Microbiol* 52:892-897

66. Ng IS, Ye C, Zhang Z, Lu Y, Jing K (2014) Daptomycin antibiotic production processes in fed-batch fermentation by *Streptomyces roseosporus* NRRL11379 with precursor effect and medium optimization. *Bioprocess Biosyst Eng* 37:415-423
67. Al Farraj DA, Varghese R, Vágvölgyi Cs, Elshikh MS, Alokda AM, Mahmoud AH (2020) Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment. *J King Saud Univ - Sci* 32:1528-1535
68. Padma PN, Rao AB, Yadav JS, Reddy G (2002) Optimization of Fermentation Conditions for Production of Glycopeptide Antibiotic Vancomycin by *Amycolatopsis orientalis*. *Appl Biochem Biotechnol* 102:395-405
69. Ibrahim AA, El-Housseiny GS, Aboshanab KM, Yassien MA, Hassouna NA (2019) Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: Statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens. *BMC Microbiol* 19:18
70. Péntes-Húvös Á (2019) Primycin termelő ipari baktérium törzs polifázikus azonosítása, a hatóanyag jellemzése és *in vitro* vizsgálata. Doktori értekezés, Pécsi Tudományegyetem, Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola
71. Vályi-Nagy T, Kulcsar G, Szilágyi I, Valu G, Magyar K, Hegyaljai Kiss G, Hor I (1966) "United States Patent Office," vol. 18, no. 587
72. Choi DB, Park Y, Okabe M (1998) Effects of Rapeseed Oil on Activity of Methylmalonyl-CoA Carboxyltransferase in Culture of *Streptomyces fradiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(5):902-906
73. Lee PC, Loh PC, Ho CC (1997) Production of tylosin by *Streptomyces fradiae* in palm oil medium. *World J Microbiol Biotechnol* 13(1):69-71
74. Rostamza M, Noohi A, Hamedi J (2008) Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding-media. *DARU* 16(1):13-17
75. Procházka P, Nohýnek M, Vaněk Z, Rokos J (1983) Utilization of a lipid substrate for submerged fermentation of *Streptomyces albus*. *Folia Microbiol (Praha)* 28(5):406-408
76. Jones AM, Porter MA (1998) Vegetable oils in fermentation: Beneficial effects of low-level supplementation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21(4-5):203-207
77. Demain AL, Adrio JL (2008) Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. *Prog Drug Res* 65: 253-289

78. Guzmán-Chávez F, Zwahlen RD, Bovenberg RAL, Driessen AJM (2018) Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Front Microbiol* 9:2768
79. Lein J, Vanek Z, Hostalek Z (1986) The Panlabs penicillin strain improvement program. Over production of Microbial Metabolites; Strain Improvement and Process Control Strategies. Boston, MA Butterworth Publishers 105-139
80. Hamlyn PF, Ball C (1979) Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. *Genet Ind Microorg* 185-191
81. Gomi S, Ikeda D, Nakamura H, Naganawa H, Yamashita F, Hotta K, Kondo S, Okami Y, Umezawa H, Iitaka Y (1984) Isolation and structure of a new antibiotic, indolizomycin, produced by a strain SK2-52 obtained by interspecies fusion treatment. *J Antibiot (Tokyo)* 37(11):1491-4
82. International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945
83. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17:333-351
84. Csepregi K, Valasek A, Péntzes Á, Tóth Zs, Kiss ÍÉ, Kerepesi I, Horváth B, Nagy I, Fekete Cs (2012) Draft genome sequence of an efficient antibiotic-producing industrial strain of *Saccharomonospora azurea*, SZMC 14600. *J Bacteriol* 194(5):1263
85. Kovács-Valasek A (2016) Omik-technológiák a *Saccharomonospora azurea* törzsnemesítési és termékfejlesztési törekvéseinek szolgálatában, PhD értekezés. Pécs.
86. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR et al. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147
87. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526-531
88. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 190:4050-4060
89. Li S, Li Y, Lu C, Zhang J, Zhu J, Wang H, Shen Y (2015) Activating a Cryptic Ansamycin Biosynthetic Gene Cluster to Produce Three New Naphthalenic Octaketide Ansamycins with n-Pentyl and n-Butyl Side Chains. *Org Lett* 17:3706-3709

90. Li Z, Zhu D, Shen Y (2018) Discovery of novel bioactive natural products driven by genome mining. *Drug Discov Ther* 12:318-328
91. Kim W, Hwang S, Lee N, Lee Y, Cho S, Palsson B, Cho BK (2020) Transcriptome and translatoe profiles of *Streptomyces* species in different growth phases. *Sci Data* 7:138
92. Wang D, Shen W, Yuan J, Wei L, Zhang Y (2019) Transcriptome analysis of the regulation of natamycin biosynthesis in *Streptomyces natalensis* HW-2 by fungal elicitor. DOI:10.21203/rs.2.18475/v1
93. Jones AC, Gerwick L, Gonzalez D, Dorrestein PC, Gerwick WH (2009) Transcriptional analysis of the jamaicamide gene cluster from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and identification of possible regulatory proteins. *BMC Microbiol* 9:247
94. Garai Á (2013) Géntechnológia és fehérjemérnökség. 5. fejezet - DNS szekvenálás, Budapest
95. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 55(4):641-58
96. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012:251364
97. Kulski J (2016) Next-Generation Sequencing - An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications, Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. IntechOpen DOI:10.5772/61964
98. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6:71-79
99. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Oker MG (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60
100. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47:W81-W87
101. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
102. Anand S, Prasad MVR, Yadav G, Kumar N, Shehara J, Ansari MZ, Mohanty D (2010) SBSPKS: Structure based sequence analysis of polyketide synthases. *Nucleic Acids Res* 38:W487-496

103. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
104. Stiekema WJ, Heidekamp F, Dirkse WG, van Beckum J, de Haan P, Bosch CT, Louwerse JD (1988) Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol Biol* 11:255-269
105. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, et al. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W537-W544
106. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi AM, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold B, Pachter L (2010) Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nat Biotechnol* 28(5):511-515
107. Götz S, García-Gómez J, Terol J, Williams T, Nagaraj S, Nueda M, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420-3435
108. Markowitz VM, Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Chu K, Kyrpides NC (2009) IMG ER: A system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics* 25:2271-2278
109. Markowitz VM, Chen IMA, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y, Ratner A, Jacob B, Huang J, Williams P, Huntemann M, Anderson I, Mavromatis K, Ivanova NN, Kyrpides NC (2012) IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res* 40:D115-122
110. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* 25(4):402-8
111. Smith S, Tsai SC (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* 24:1041-1072
112. Pham JV, Yilma MA, Feliz A, Majid MT, Maffetone N, Walker JR, Kim E, Cho HJ, Reynolds JM, Song MC, Park SR, Yoon YJ (2019) A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Front Microbiol* 10:1404
113. Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission (2017). European Pharmacopoeia. 9th edition, 3701, Strasbourg

114. Fischer CL, Drake DR, Dawson DV, Blanchette DR, Brogden KA, Wertz PW (2012) Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1157-1161
115. Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME (2009) Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 129:288-294
116. Skrivanova E, Marounek M, Benda V, Brezina P (2006) Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Vet Med (Praha)* 51:81-88
117. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL (2011) Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 56(7):650-654
118. Ricke SC (2003) Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82(4):632-639
119. Cronan JE, Thomas J (2009) Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol* 459:395-433
120. Csepregi K, Valasek A, Péntzes Á, Tóth Zs, Kiss ÍÉ, Kerepesi I, Hunyadkürti J, Horváth B, Nagy I, Fekete Cs (2012) Structural and functional characterization of polyketide synthase gene clusters found in newly sequenced bacterial genome. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award - Final Programme, Szeged, 22-25 March, 2012. Szegedi Tudományegyetem, pp 238-238
121. Valasek A, Csepregi K, Tóth Zs, Kiss ÍÉ, Urbán P, Kerepesi I, Kukolya J, Horváth B, Nagy I, Fekete Cs (2013) Genome-guided approach for identifying cryptic biosynthetic pathways and novel natural products in *Saccharomonospora azurea*. Hungarian Molecular Life Sciences 2013 - Programme & book of abstracts, Budapest, 5-7 April, 2013. Diamond Congress Kft, pp 105-106
122. Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D (2003) Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J Mol Biol* 328:335-363
123. Haydock SF, Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, Khaw LE, König A, Marsden AF, Galloway IF, Staunton J, Leadlay PF (1995) Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases. *FEBS Lett* 374(2):246-248
124. Greule A, Intra B, Flemming S, Rommel MG, Panbangred W, Bechthold A (2016) The draft genome sequence of *Actinokineospora bangkokensis* 44EHWT reveals the

- biosynthetic pathway of the antifungal thailandin compounds with unusual butylmalonyl-CoA extender units. *Molecules* 21(11):1607
125. Rachid S, Huo L, Herrmann J, Stadler M, Köpcke B, Bitzer J, Müller R (2011) Mining the Cinnabaramide Biosynthetic Pathway to Generate Novel Proteasome Inhibitors. *ChemBioChem* 12:922-931
 126. Moretto L, Vance S, Heames B, Broadhurst RW (2017) Dissecting how modular polyketide synthase ketoreductases interact with acyl carrier protein-attached substrates. *Chem Commun* 53:11457-11460
 127. Xie X, Garg A, Keatinge-Clay AT, Khosla C, Cane DE (2016) Epimerase and Reductase Activities of Polyketide Synthase Ketoreductase Domains Utilize the Same Conserved Tyrosine and Serine Residues. *Biochemistry* 55:1179-1186
 128. Zheng J, Keatinge-Clay AT (2013) The status of type I polyketide synthase ketoreductases. *Med Chem Commun* 4:34-40
 129. Ray L, Valentic TR, Miyazawa T, Withall DM, Song L, Milligan JC, Osada H, Takahashi S, Tsai SC, Challis GL (2016) A crotonyl-CoA reductase-carboxylase independent pathway for assembly of unusual alkylmalonyl-CoA polyketide synthase extender units. *Nat Commun* 7:13609
 130. Song L, Laureti L, Corre C, Leblond P, Aigle B, Challis GL (2014) Cytochrome P450-mediated hydroxylation is required for polyketide macrolactonization in stambomycin biosynthesis. *J Antibiot* 67:71-76
 131. Méndez C, Salas JA (2001) The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res Microbiol* 152(3-4):341-350
 132. Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7:14
 133. Zschiedrich C, Keidel V, Szurmant H (2016) Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J Mol Biol* 428(19):3752-3775
 134. Rodríguez H, Rico S, Díaz M, Santamaría R (2013) Two-component systems in *Streptomyces*: Key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb Cell Fact* 12:127
 135. Gago G, Diacovich L, Arabolaza A, Tsai SC, Gramajo H (2011) Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* 35:475-497
 136. Cuthbertson L, Nodwell JR (2013) The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol R* 77(3):440-75
 137. Deng W, Li C, Xie J (2013) The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal* 25:1608-1613

138. Wang R, Mast Y, Wang J, Zhang W, Zhao G, Wohlleben W, Lu Y, Jiang W (2013) Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 87(1):30-48
139. Jnawali HN, Oh T, Liou K, Park BC (2008) Two-component regulatory system involved in clavulanic acid production. *J Antibiot* 61:651-659
140. Bibb MJ (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8:208-215
141. Liu J, Li J, Dong H, Chen Y, Wang Y, Wu H, Li C, Weaver D, Zhang L, Zhang B (2017) Characterization of an Lrp/AsnC family regulator SCO3361, controlling actinorhodin production and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biot* 101(14):5773-5783
142. Yu L, Pan Y, Liu G (2016) A regulatory Gene SCO2140 is involved in antibiotic production and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Curr Microbiol* 73(2):1-6

11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A disszertáció témakörében készült tudományos publikációk:

1. **Kovács M**, Seffer D, Péntes-Hüvös Á, Juhász Á, Kerepesi I, Csepregi K, Kovács-Valasek A, Fekete Cs (2020) Structural and functional comparison of *Saccharomonospora azurea* strains in terms of primycin producing ability. *World J Microbiol Biotechnol* 36:160 doi.org/10.1007/s11274-020-02935-x IF: 3.312 (2020)
2. **Kovács M**, Sefferné Szalai M, Seffer D, Pallos JP, Drávavölgyi G, Kovács-Valasek A, Kerepesi I (2019) Understanding the role of fatty acid substrates on primycin biosynthesis by *Saccharomonospora azurea* during batch fermentation. *Nat Prod Commun* 14:1-6 doi.org/10.1177/1934578X19858210 IF: 0.484 (2019)
3. Fodor I, Valasek A, Urbán P, **Kovács M**, Fekete Cs, Kerepesi I (2017) A comparative study on optimisation of protein extraction methods for *Saccharomonospora azurea*. *Acta Biol Szeged* 61(1):45-50
4. Valasek A, Kiss ÍÉ, Fodor I, **Kovács M**, Urbán P, Jámbor É, Fekete Cs, Kerepesi I (2016) Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. *Acta Biol Hung* 67(4):424-430 doi.org/10.1556/018.67.2016.4.8 IF: 0.578 (2016)

A disszertáció témakörében készült konferencia absztraktok:

1. **Kovács M**, Seffer D, Péntes-Hüvös Á, Juhász Á, Kerepesi I, Csepregi K, Kovács-Valasek A, Fekete Cs (2020): Comparative Transcriptome Analysis of *Saccharomonospora azurea* strains in terms of primycin producing ability. Hungarian Molecular Life Science Conference 2021, 5-7 November 2021, Eger, Hungary
2. **Kovács M**, Sefferné Szalai M, Seffer D, Pallos JP, Drávavölgyi G, Kovács-Valasek A, Kerepesi I (2020) Enhancing of primycin production by *Saccharomonospora azurea* with various fatty acid substrates during batch fermentation. *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI*, 10-12. september 2020, Debrecen, Hungary
3. Valasek A, Kiss ÍÉ, Fodor I, **Kovács M**, Urbán P, Jámbor É, Fekete Cs, Kerepesi I (2016) Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. 10th Central and Eastern European Proteomic Conference, 11-14. October 2016, Budapest, Hungary

4. Valasek A, Fodor I, Kiss IÉ, **Kovács M**, Tóth Zs, Urbán P, Jámbor É, Márk L, Fekete Cs, Kerepesi I (2015) From genomics to proteomics in the field of antibiotic research. Hungarian Molecular Life Sciences 2015, 27-29 March 2015, Eger, Hungary

II. 2. Egyéb konferencia absztraktok:

1. Sass V, Imri Á, **Kovács M**, Csicsek G, Ortmann-Ajkai A, Czakó-Vér K (2014) Talajmikrobiológiai vizsgálatok a Bükkhát Erdőrezervátum lékjeiben. Magyar Talajtani Társaság Vándorgyűlése, Keszthely, 2014. szeptember 4-6.
2. Imri Á, **Kovács M**, Kozma P, Csikász-Krizsics A, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2012) A vízellátottság meghatározó szerepe a szőlő mikorrhiza kapcsolat alakulásában. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2012. október 24-26.
3. **Kovács M**, Imri Á, Mátyás Á, Kozma P, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2012) Mikorrhiza gyökérkolonizáció vizsgálata Jázmin szőlőfajtánál a termőre-fordulás évében. Talajtani Vándorgyűlés, Miskolc, 2012. augusztus 23-24-25.
4. **Kovács M**, Imri Á, Dudás M, Vincze V, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2011) Soil dependent efficiency of plant-microbe (wheat-mycorrhiza) interaction at increasing doses of nitrogen fertilizer. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 20-20 July 2011, Budapest, Hungary
5. Imri Á, **Kovács M**, Tamási K, Czakó-Vér K, Árvay Gy (2011) Evaluation of a potential mycorrhiza inoculum on salt-affected contrasting soils and wheat host. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 20-20 July 2011, Budapest, Hungary
6. Czakó-Vér K, **Kovács M**, Imri Á, Biró B, Árvay Gy (2011) Mycorrhiza inoculation for improved grapevine production at vineyard conditions. 10th Alps-Adria Scientific Workshop, 14-19 March 2011, Opatija, Croatia
7. **Kovács M**, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2010) Szőlő nedvességtartalmának alakulása mikorrhiza oltás mellett szabadföldi körülmények között. XVI. Nemzetközi Környezetvédelmi és Vidékfejlesztési Diákkonferencia, Mezőtúr, 2010. június 30. - július 2.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek doktori tanulmányaimat, és ezen dolgozat elkészítését.

Mindenekelőtt köszönetemet fejezném ki témavezetőimnek Dr. Fekete Csabának és Dr. Kemenesi Gábornak, hogy szakmai iránymutatásukkal, tanácsaikkal és támogatásukkal mindvégig segítségemre voltak munkám során.

Köszönettel tartozom Pallos József Péternek a PannonPharma Kft. ügyvezető igazgatójának, és a cég valamennyi munkatársának, hogy lehetővé tették számomra, hogy a primycin témával foglalkozhassak és biztosították a tudományos munka feltételeit. Külön köszönettel tartozom a fejlesztési csoport egykori és jelenlegi munkatársainak Sefferné Szalai Máriának, Dr. Pénzes-Hüvös Ágotának, Seffer Dénesnek, Dr. Juhász Ákosnak, Scháden Alexandrának, Klonfár Dórának és Drávavölgyi Gábornak, hogy a kutatás során minden szakmai és emberi támogatást megadtak számomra.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kerepesi Ildikónak a munkám során nyújtott rengeteg segítségért, illetve hogy felmerülő kérdéseimmel hozzá bármikor bizalommal fordulhattam.

Szeretném megköszönni a Pécsi Tudományegyetem Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék dolgozóinak a segítőkész hozzáállásukat és a munkavégzéshez nyújtott inspiráló környezetet. Köszönetemet fejezem ki Urbán Péternek a szekvenálási témakörben nyújtott értékes tanácsaiért, melyek nagymértékben hozzájárultak a színvonalas értekezés elkészítéséhez.

Hálásan köszönöm Czakóné Dr. Vér Klárának a PhD-s éveim kezdetén nyújtott segítségét és hogy elindított tudományos pályámon, valamint Imri Ádámnak és Strasszer Márk PhD-s társaimnak a kezdeti évek önfelelt hangulatát és a közös munkát.

Köszönöm Dr. Parádi Istvánnak és a dijoni National Institute of Agronomic Research (INRA) intézet dolgozóinak, hogy bevezettek a molekuláris biológia rejtelmeibe és hogy a Franciaországban eltöltött hónapok alatt értékes nemzetközi tapasztalatot szerezhettem. Az ott elsajátított tudás felbecsülhetetlen értékűnek bizonyult dolgozatom létrejöttében.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen köszönettel tartozom szüleimnek, hogy őszinte szeretetükkel és önzetlen támogatásukkal mindvégig mellettem voltak és végigkísértek a rögös úton. Köszönöm húgomnak a rengeteg segítséget és támogatását. Mindenekelőtt köszönöm azonban feleségemnek Dr. Kovács-Valasek Andreának a PhD évek alatt nyújtott mérhetetlen szeretetet, támogatást, kitartó türelmet és értékes szakmai tanácsait, amelyek nélkül ez a dolgozat nem jött volna létre. Zárásképpen köszönöm gyermekeinknek Kovács-Valasek Mórnak és Kovács-Valasek Mirának, hogy vidámságukkal rengeteg erőt kölcsönöztek számomra.

13. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet *S. azurea* SZMC 14600 primycin bioszintézis génklaszter fehérjét kódoló génjeinek listája és a velük legnagyobb homológiát mutató proteinek tulajdonságai.

| Gén azonosító | Fehérje azonosító | Méret (aa) | Azonosság (%) | Faj | Putatív funkció | Adatbázis azonosító |
|---------------|-------------------|------------|---------------|---|---|---------------------|
| 359731039 | EHK80153.1 | 144 | 84 | <i>Saccharomonospora</i> sp. 31sw | citidin deamináz | WP_134718058.1 |
| 359731040 | EHK80154.1 | 535 | 80 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | acil-KoA karboxiláz béta alegység | WP_033393689.1 |
| 359731041 | EHK80155.1 | 774 | 70 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | penicillin aciláz család fehérje | WP_084424155.1 |
| 359731042 | EHK80156.1 | 393 | 84 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | DUF418 domént hordozó fehérje | WP_084424156.1 |
| 359731043 | EHK80157.1 | 112 | 78 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | hipotetikus fehérje | WP_033393693.1 |
| 359731044 | EHK80158.1 | 262 | 90 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | ABC transzporter ATP- kötő fehérje | WP_084424157.1 |
| 359731045 | EHK80159.1 | 517 | 81 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | hipotetikus fehérje | WP_084424158.1 |
| 359731046 | EHK80160.1 | 428 | 86 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | citokróm P450 | WP_084424159.1 |
| 359731047 | EHK80161.1 | 501 | 78 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | glikoziltranszferáz család 39 fehérje | WP_143446207.1 |
| 359731048 | EHK80162.1 | 318 | 80 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | ACP S-maloniltranszferáz | WP_084424161.1 |
| 359731049 | EHK80163.1 | 5141 | 82 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | SDR család NAD(P)- függő oxidoreduktáz | WP_160096434.1 |
| 359731050 | EHK80164.1 | 763 | 82 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | cukor dehidrogenáz | WP_084424163.1 |
| 359731051 | EHK80165.1 | 1998 | 81 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | SDR család NAD(P)- függő oxidoreduktáz | WP_125727737.1 |
| 359731052 | EHK80166.1 | 3702 | 82 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | I-es típusú poliketid szintáz | WP_084424164.1 |
| 359731053 | EHK80167.1 | 5860 | 69 | <i>Amycolatopsis</i> <i>orientalis</i> | I-es típusú poliketid szintáz | WP_083255320.1 |
| 359731054 | EHK80168.1 | 642 | 85 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | SDR család NAD(P)- függő oxidoreduktáz | WP_125727735.1 |
| 359731055 | EHK80169.1 | 6354 | 81 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | SDR család NAD(P)- függő oxidoreduktáz | WP_160096224.1 |
| 359731056 | EHK80170.1 | 1659 | 83 | <i>Kibdelosporangium</i> <i>aridum</i> | SDR család NAD(P)- függő oxidoreduktáz | WP_160096224.1 |

| | | | | | | |
|-----------|------------|------|----|--|---|----------------|
| 359731057 | EHK80171.1 | 1828 | 79 | <i>Amycolatopsis orientalis</i> | I-es típusú poliketid szintáz | WP_084424166.1 |
| 359731058 | EHK80172.1 | 375 | 86 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | agmatináz | WP_084424167.1 |
| 359731059 | EHK80173.1 | 67 | 82 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | hipotetikus fehérje | WP_033384458.1 |
| 359731060 | EHK80174.1 | 331 | 85 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | ATP-kötő kazetta domént hordozó fehérje | WP_084424168.1 |
| 359731061 | EHK80175.1 | 269 | 86 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | ABC transzporter permeáz | WP_033384457.1 |
| 359731062 | EHK80176.1 | 398 | 82 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | két-komponensű szenzor hisztidin kináz | WP_033384455.1 |
| 359731063 | EHK80177.1 | 212 | 88 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | válasz regulátor transzkripció faktor | WP_033384465.1 |
| 359731064 | EHK80178.1 | 982 | 80 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | AAA család ATPáz | WP_084424169.1 |
| 359739571 | EHK88433.1 | 213 | 84 | <i>Phytoactinopolyspora</i> sp. XMNu-373 | TetR család transzkripció szabályozó | WP_162448384.1 |
| 359739570 | EHK88432.1 | 141 | 88 | <i>Phytoactinopolyspora</i> sp. XMNu-373 | SnoaL-szerű domént hordozó fehérje | WP_162448385.1 |
| 359739569 | EHK88431.1 | 282 | 86 | <i>Phytoactinopolyspora</i> sp. XMNu-373 | NAD(P)H-kötő fehérje | WP_162448386.1 |
| 359739568 | EHK88430.1 | 216 | 99 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | válasz regulátor transzkripció faktor | WP_005459328.1 |
| 359739567 | EHK88429.1 | 229 | 93 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | válasz regulátor transzkripció faktor | WP_005459324.1 |
| 359739566 | EHK88428.1 | 465 | 92 | <i>Saccharomonospora</i> sp. 31sw | HAMP domént hordozó hisztidin kináz | WP_134717240.1 |
| 359739565 | EHK88427.1 | 259 | 87 | <i>Saccharomonospora</i> sp. 31sw | DeoR/GlpR transzkripció szabályozó | WP_134719049.1 |
| 359739564 | EHK88426.1 | 342 | 84 | <i>Saccharomonospora glauca</i> | galaktóz-1-foszfát uridiltranszferáz | WP_005466292.1 |
| 359739563 | EHK88425.1 | 351 | 88 | <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> | tripszin-szerű szerin proteáz | WP_006239189.1 |
| 359739562 | EHK88424.1 | 166 | 95 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | MogA/MoaB család molibdén kofaktor bioszintézis fehérje | WP_005459309.1 |
| 359739561 | EHK88423.1 | 63 | 74 | <i>Saccharomonospora glauca</i> | hipotetikus fehérje | WP_005466289.1 |
| 359739560 | EHK88422.1 | 202 | 74 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | Ostoros fehérje FlgA | WP_005459305.1 |
| 359739559 | EHK88421.1 | 115 | 97 | <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> | FmdB család transzkripció szabályozó | WP_006239195.1 |

| | | | | | | |
|-----------|------------|-----|----|--|---|----------------|
| 359739558 | EHK88420.1 | 203 | 82 | <i>Saccharomonospora glauca</i> | 5-formiltetrahydrofolát ciklo-ligáz | WP_005466285.1 |
| 359739557 | EHK88419.1 | 300 | 96 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | UTP-glükóz-1-foszfát uridiltranszferáz | WP_005459302.1 |
| 359739556 | EHK88418.1 | 407 | 96 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | molibdopterin molibdotranszferáz MoeA | WP_005459301.1 |
| 359739555 | EHK88417.1 | 225 | 81 | <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> | GNAT család N-acetiltranszferáz | WP_006239199.1 |
| 359739554 | EHK88416.1 | 290 | 78 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | hipotetikus fehérje | WP_005459296.1 |
| 359739553 | EHK88415.1 | 471 | 72 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | acil-KoA ligáz | WP_084424151.1 |
| 359739552 | EHK88414.1 | 275 | 86 | <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> | tioészteráz | WP_006239208.1 |
| 359739551 | EHK88413.1 | 884 | 62 | <i>Streptomyces</i> sp. NEAU-S7GS2 | hélix-turn-hélix transzkripció szabályozó | WP_109887999.1 |
| 359739550 | EHK88412.1 | 288 | 55 | <i>Streptomyces libani</i> | hipotetikus fehérje | WP_159490773.1 |
| 359739549 | EHK88411.1 | 263 | 69 | <i>Kibdelosporangium aridum</i> | szén-nitrogén hidroláz család fehérje | WP_037266615.1 |
| 359739548 | EHK88410.1 | 551 | 82 | <i>Streptomyces</i> sp. ID38640 | amin oxidáz | AVV61994.1 |
| 359739547 | EHK88409.1 | 447 | 97 | <i>Saccharomonospora glauca</i> | NADP-specifikus glutamát dehidrogenáz | WP_005466280.1 |
| 359739546 | EHK88408.1 | 616 | 69 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | szerin/treonin fehérje kináz | WP_005459282.1 |
| 359739545 | EHK88407.1 | 286 | 59 | <i>Saccharomonospora cyanea</i> | szerin/treonin fehérje kináz | WP_005459281.1 |