

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Bára Seidlová

ERGOTHIONEIN A MYKOTHIOL V BIOSYNTÉZE
LINKOSAMIDŮ

Ergothioneine and mycothiol in the biosynthesis of lincosamides

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
Bára Seidlová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi, Ph.D., za uvedení do dané problematiky, trpělivost, odborné vedení práce a cenné rady během experimentálního a písemného zpracování diplomové práce. Chtěla bych zároveň poděkovat celému kolektivu laboratoře Biologie sekundárního metabolitu za vytvoření přátelského prostředí, ve kterém byla radost pracovat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě během celého studia bezmezně podporovali.

Abstrakt

Specializované mikrobiální metabolity jsou popisovány jako nízkomolekulární bioaktivní látky, které svému producentovi neslouží pro růst, vývoj, ani reprodukci. Do této skupiny látek se řadí také linkosamidy, produkované převážně některými druhy bakterií z rodu *Streptomyces*. Součástí biosyntézy těchto antibiotik jsou mimo jiné dva nízkomolekulární thiole, ergothionein (ESH) a mykothiol (MSH). Mykothiol v této biosyntetické dráze figuruje jako zdroj síry, zatímco ergothionein tvoří s aminooktosovou jednotkou konjugát, který je jakožto substrát neobvyklého kondenzačního enzymu následně schopný vazby s enzymaticky aktivovanou aminokyselinou.

Cílem této práce je izolace substrátu enzymu LmbD – linkomycinového biosyntetického konjugátu ESH a aminooktosy. Dalším cílem je pak studovat propojení metabolismu MSH a ESH s biosyntézou linkosamidů, konkrétně linkomycinu, celesticetinu a intervencinu, které jsou produkovány třemi různými kmeny.

Bakteriální kmeny byly kultivovány v laboratorních podmínkách a k jednotlivým analýzám byly použity metody kapalinové chromatografie s UV a MS detekcí, jejichž konkrétní parametry byly vyvinuty a optimalizovány v rámci této diplomové práce.

Výsledkem této diplomové práce je purifikovaný konjugát ESH s aminooktosovou jednotkou o hmotnosti 1,39 mg a čistotě 71,4 %. Dále se podařilo zjistit, že minimálně u dvou kmenů produkujících linkosamidy souvisí množství vyloučených linkosamidů do kultivačního média s množstvím thiolů v buňkách produkčních kmenů.

Klíčová slova: ergothionein, mykothiol, linkosamidy, biosyntéza, LmbD substrát, purifikace, UHPLC-DAD-MS, HPLC-UV

Abstract

Specialized microbial metabolites are described as low-molecular-weight bioactive compounds, which are dispensable for the growth, evolution, or reproduction of its producer. This group of substances includes the lincosamides, which are produced mainly by the bacteria of the *Streptomyces* genera. Apart from other precursors, two low-molecular-weight thiols, ergothioneine and mycothiol, are essential participants of the lincosamide biosynthesis. Mycothiol (MSH) serves in this pathway as a source of sulphur, on the other hand, ergothioneine (ESH) constitutes a conjugate with the aminosugar moiety of lincosamide structure. The conjugate is condensed with an activated amino acid, which is catalyzed by an unusual enzyme to form a core of the lincosamide molecule.

The objective of this diploma thesis is to isolate the conjugate of ESH and aminooctose, which serves as a substrate of the LmbD biosynthetic protein. Another aim is to study the links between the thiol metabolism and the biosynthesis of three lincosamides, lincomycin, celesticetin, and intervencin, which are produced by different bacterial strains.

Bacterial strains were cultivated under laboratory conditions and methods of liquid chromatography with UV and MS detection were used for the analysis. The parameters of the methods were developed and optimized within this work.

The outcome of this diploma thesis is the purified conjugate of ESH and aminosugar in an amount of 1.39 mg and purity of 71.4 %. Furthermore, it was found out that the amount of the excreted lincosamides into the media relates to the amount of thiols in the cells in the case of at least two the producing microorganisms.

Keywords: ergothioneine, mycothiol, lincosamides, biosynthesis, LmbD substrate, purification, UHPLC-DAD-MS, HPLC-UV

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Specializované metabolity	11
2.1.1	Linkosamidy	11
2.1.1.1	Chemická struktura linkosamidů	12
2.1.1.2	Biosyntéza linkosamidů	13
2.1.1.3	Biologická aktivita a klinické využití linkosamidů	21
2.1.1.4	Význam syntézy nových antibiotik	22
2.1.2	Nízkomolekulární thioly	24
2.1.2.1	Ergothionein (ESH)	24
2.1.2.2	Mykothiol (MSH)	27
2.1.2.3	Bacillithiol (BSH)	29
2.1.2.4	Cystein (Cys)	31
2.1.2.5	γ -glutamylcystein (γ GC)	32
2.1.2.6	Glutathion (GSH)	33
2.1.2.7	Deriváty glutathionu	34
2.1.2.8	Koenzym A (CoA)	36
2.1.2.9	Ovothioly	38
2.1.2.10	Ostatní thioly	39
2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	40
2.2.1	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)	41
2.2.2	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)	41
2.2.3	Detekce v kapalinové chromatografii	42
2.3	Extrakce na pevné fázi (SPE)	43
3	Experimentální část	44
3.1	Bakteriální kmeny	44
3.2	Chemikálie	44
3.3	Kultivační média	45
3.4	Pufry	47
3.5	Instrumentace	47
3.6	Zpracování dat a software	48

3.7	Metody použité k produkci a purifikaci intermediátu 28	48
3.7.1	Kultivace kmenů pro produkci intermediátu 28	48
3.7.2	Extrakce médií obsahujících intermediát 28	48
3.7.3	Preparativní HPLC metody pro izolaci intermediátu 28	49
3.7.4	UHPLC-DAD-MS analýzy intermediátu 28	50
3.8	Postup stanovení ESH a MSH u různých bakteriálních kmenů rodu <i>Streptomyces</i>	51
3.8.1	Kultivace bakteriálních kmenů	51
3.8.2	Extrakce médií s linkosamidy	52
3.8.3	Derivatizace thiolů pomocí monobromobimanu	52
3.8.4	UHPLC-DAD-MS analýza linkosamidů a derivatizovaných thiolů	52
4	Výsledky a diskuze	54
4.1	Purifikace intermediátu 28	54
4.2	Stanovení ESH a MSH	60
5	Závěr	73
	Příloha	74
	Seznam použité literatury	78

Seznam použitých zkratek a symbolů

AMP	adenosinmonofosfát
APD	4-alkyl-L-prolinové deriváty
BEH	hybridní stacionární fáze modifikovaná ethylenovými můstky (z <i>angl.</i> bridged ethylene hybrid)
BPI	(z <i>angl.</i> base-peak ion chromatogram)
BSH	bacillithiol
C ₁₈	oktadecyl
CoA	koenzym A
CoB	koenzym B
CoM	koenzym M
Cys	cystein
ESH	ergothionein
ESI ⁺	ionizace elektrosprejem v kladném módu
EPL	4-ethyl-L-prolin
γGC	γ-glutamylcystein
GDP	guanosindifosfát
GSH	glutathion
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z <i>angl.</i> hydrophilic interaction liquid chromatography)
HLB	z <i>angl.</i> hydrophylic-lipophilic balanced (sorberent)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl.</i> high performance liquid chromatography)
IMPasa	inositolmonofosfát fosfatasa
MCX	z <i>angl.</i> mixed-mode strong cation exchange (sorberent)
MF	mobilní fáze
MLS _B	skupina antibiotik zahrnující makrolidy, linkosamidy a streptograminy B
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostně-spektrometrický/hmotnostní spektrometr (z <i>angl.</i> mass-spectrometry)

MSH	mykothiol
<i>m/z</i>	poměr hmotnost/náboj
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích (z <i>angl.</i> normal-phase HPLC)
PBD	pyrrolobenzodiazepiny
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PPL	4-propyl-L-prolin
RNS	reaktivní formy dusíku (z <i>angl.</i> reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z <i>angl.</i> reactive oxygen species)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (z <i>angl.</i> reversed-phase HPLC)
RPM	otáčky za minutu (z <i>angl.</i> rotation per minute)
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SF	stacionární fáze
SM	specializované metabolity
SPE	extrakce na pevné fázi (z <i>angl.</i> solid phase extraction)
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC-DAD-MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s detektorem s diodovým polem a hmotnostním spektrometrem
<i>v/v</i>	objemový zlomek
$\Delta lmbC$	inaktivovaný gen pro enzym LmbC
$\Delta lmbD$	inaktivovaný gen pro enzym LmbD
$\Delta lmbN$	inaktivovaný gen pro enzym LmbN
λ	vlnová délka

1 Úvod

Specializované mikrobiální metabolity jsou látky nízkomolekulárního charakteru, které dosahují významu především díky svému širokému rozmezí funkcí. Tento typ látek je produkován řadou organismů, avšak mezi nejvýznamnější patří bakterie a houby, konkrétně Aktinobakterie jsou zdrojem nepřeborného množství bioaktivních látek, především antibiotik, jakými jsou např. linkosamidy produkované převážně některými půdními bakteriemi rodu *Streptomyces*. Biosyntéza těchto antibiotik plně závisí na dvou nízkomolekulárních thiolech, ergothioneinu a mykothiolu, jejichž obvyklou rolí v buňce je ochrana před oxidativním stresem a detoxifikace. Mykothiol zde přitom slouží jako zdroj síry, která je významnou součástí chemické struktury linkosamidů. Ergothionein zde na druhou stranu figuruje jako účastník při kondenzaci dvou základních stavebních složek, aminokyselinové a aminooktosové jednotky, s níž tvoří ergothionein substrát pro enzym LmbD.

Cíle diplomové práce

Význam účasti ergothioneinu a mykothiolu v biosyntéze linkosamidů naznačuje, že metabolismus těchto thiolů by mohl být úzce provázán s metabolismem linkosamidů. Cílem práce je zjistit, zda je množství thiolů, a tím i jejich metabolismis, jakkoliv provázané s produkcí linkosamidů a zda je rozdíl v množství thiolů u bakterií, které linkosamidy produkují a neprodukují. Dalším cílem je najít kmen, který produkuje největší množství substrátu pro enzym LmbD a tento substrát purifikovat.

2 Teoretická část

2.1 Specializované metabolity

První kapitola teoretické části se věnuje specializovaným metabolitům (SM). Obecně jsou SM charakterizovány jako nízkomolekulární látky, které nejsou esenciální pro růst, vývoj nebo reprodukci svého producenta, a ačkoli se může zdát jejich role méně významná, opak je pravdou. Specializované metabolity hrají díky své strukturální rozmanitosti řadu významných rolí např. jako zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace, signální molekuly nebo jako látky s antimikrobiálním účinkem [1].

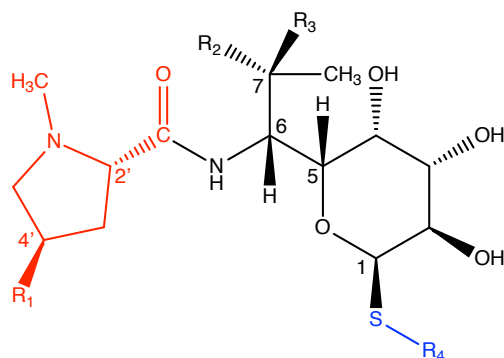
Tento typ látek lze najít u velmi širokého spektra organismů, ale významné jsou především bakterie a houby. Mezi nejdominantnější kmeny, co se týká klinického i průmyslového využití SM, patří bezesporu Aktinobakterie, které jsou původci mnoha bioaktivních látek. Především půdní bakterie rodu *Streptomyces*, spadající pod kmen Aktinobakterií, jsou velmi bohatým zdrojem SM využívaných např. jako antibiotika [2]. Ta byla ve streptomycetách objevena již cca v polovině minulého století a prvními z nich byly aktinomycin (*Streptomyces antibioticus*, 1940) [3], streptothricin (*Streptomyces lavendulae*, 1942) [4] a streptomycin (*Streptomyces griseus*, 1944) [5]. Mezi další antibiotika pocházející z Aktinobakterií patří mimo jiné látky ze skupiny aminoglykosidů, makrolidů, linkosamidů a mnoho jiných. Výčet těch nejvýznamnějších je přehledně shrnut v review [6].

2.1.1 Linkosamidy

V Laboratoři sekundárního metabolitu Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. se zabýváme biosyntézou a přípravou účinnějších linkosamidů, a proto je tato diplomová práce zaměřena pouze na tato antibiotika. Linkosamidy jsou skupina látek, která čítá oproti jiným antibiotikům poměrně malé množství zástupců. V přírodě se vyskytuje pouze linkomycin A, celesticetin, intervencin [7] a sloučenina Bu-2545, ale existuje i několik vedlejších produktů těchto drah, např. linkomycin B. Zároveň je známá i řada semisyntetických derivátů odvozených především od struktury linkomycinu, přičemž nejvýznamnějším z nich je klinicky využívaný klindamycin (7-chloro-7-deoxylinkomycin). Nově vytvořený derivát CELIN získaný kombinací biosyntézy linkomycinu a celesticetinu je v současné době v preklinických testech [8].

2.1.1.1 Chemická struktura linkosamidů

Chemická struktura linkosamidových antibiotik zahrnuje tři základní stavební kameny. Prvním z nich je unikátní aminooktosová jednotka, která vzniká kondenzací pentosové a tříuhlíkaté jednotky a je poskytovatelem prostoru pro řadu modifikací na C v pozici 7 (Obr. 1) [9]. Druhý stavební kámen, kterým je aminokyselinová jednotka, se může podle původu lišit délkou alkylového řetězce na C v pozici 4'.

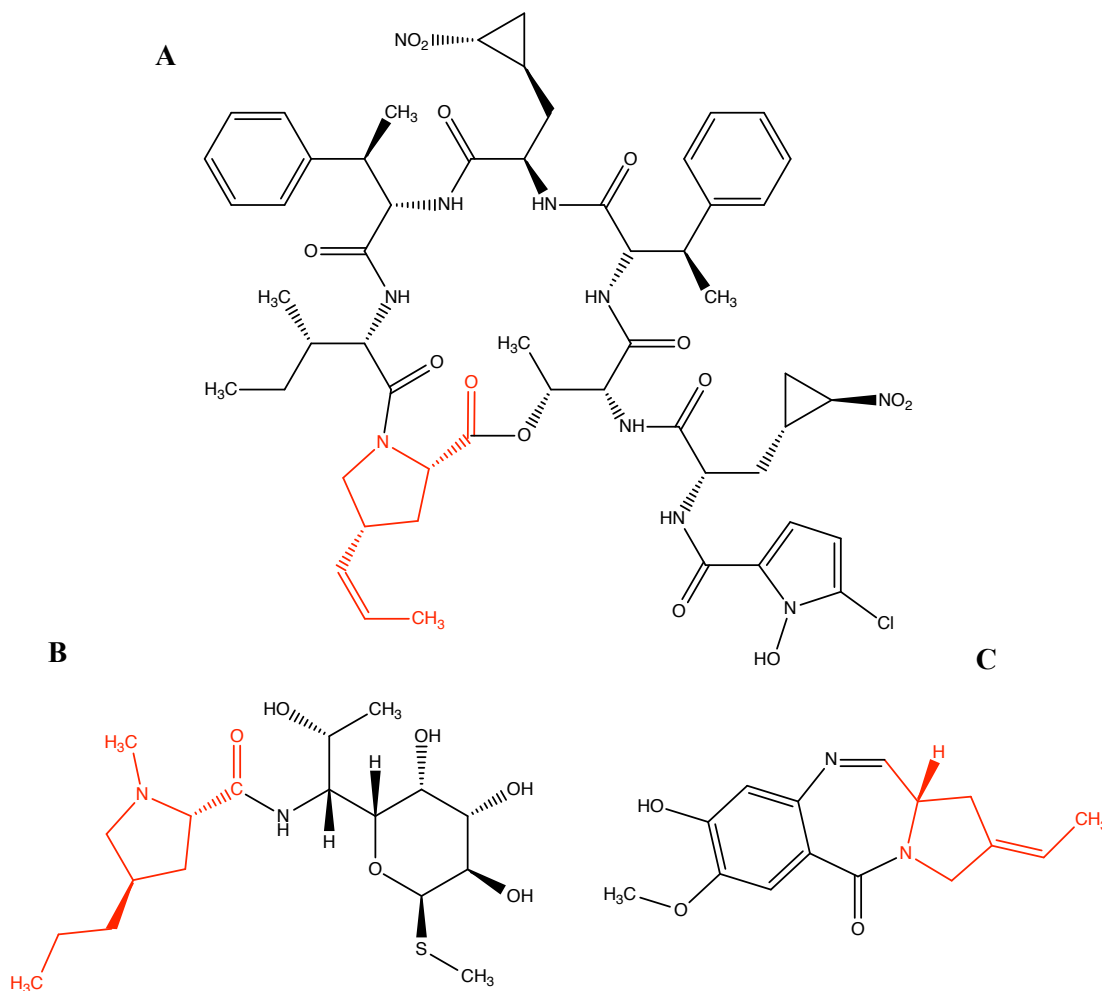


Obr. 1: Základní struktura linkosamidů. Aminokyselinová jednotka (červeně), aminocukerná jednotka (černě), thiolová síra (modře). R₁ je místo vazby alkylového zbytku, R₂-R₄ jsou místa možných modifikací.

Právě díky aminokyselinové jednotce pocházející z L-tyrosinu [10] jsou linkosamidy (konkrétně linkomycin a intervencin) zařazovány do skupiny APD látek, tedy látek obsahujících ve své struktuře 4-alkyl-L-prolinový derivát (APD), který obsahují také pyrrolobenzodiazepiny a hormaomycin (srovnání struktur na Obr. 2). Biosyntéza těchto látek je kódována geny uspořádanými v biosyntetických genových shlucích, které všechny APD látky sdílejí. Jedná se o sadu pěti až šesti homologních genů, které kódují jednotný základ 4-alkyl-L-prolinové jednotky (přehledně shrnuto v review [11]). Pyrrolobenzodiazepiny (PBD) jsou látky s protinádorovou aktivitou [12], která pramení z jejich schopnosti vázat se na specifické sekvence v malém žlábků DNA [13], a jsou rovněž jako linkosamidy produkovány převážně bakteriemi z rodu *Streptomyces*. Mezi zástupce PBD patří např. anthramycin, tomaymycin, sibiromycin a porothramycin. Na druhou stranu hormaomycin je signální molekula, jejímž producentem je *Streptomyces griseoflavus* W-384 [14], a je jediným významným zástupcem své skupiny APD látek. Kromě jiného tato látka efektivně stimuluje produkci antibiotik ve streptomycetách a i sama je velmi účinným antibiotikem s úzkým spektrem účinku proti kmenům jako

jsou *Corynebacteria* a *Arthrobacter*, které jsou taxonomicky blízké bakteriím z rodu *Streptomyces* [15].

Třetím stavebním kamenem struktury linkosamidů je síra, která pochází z mykothiolu, je navázána na aminooktosovou jednotku (Obr. 1) a opět funguje jako místo pro modifikaci struktury linkosamidů.



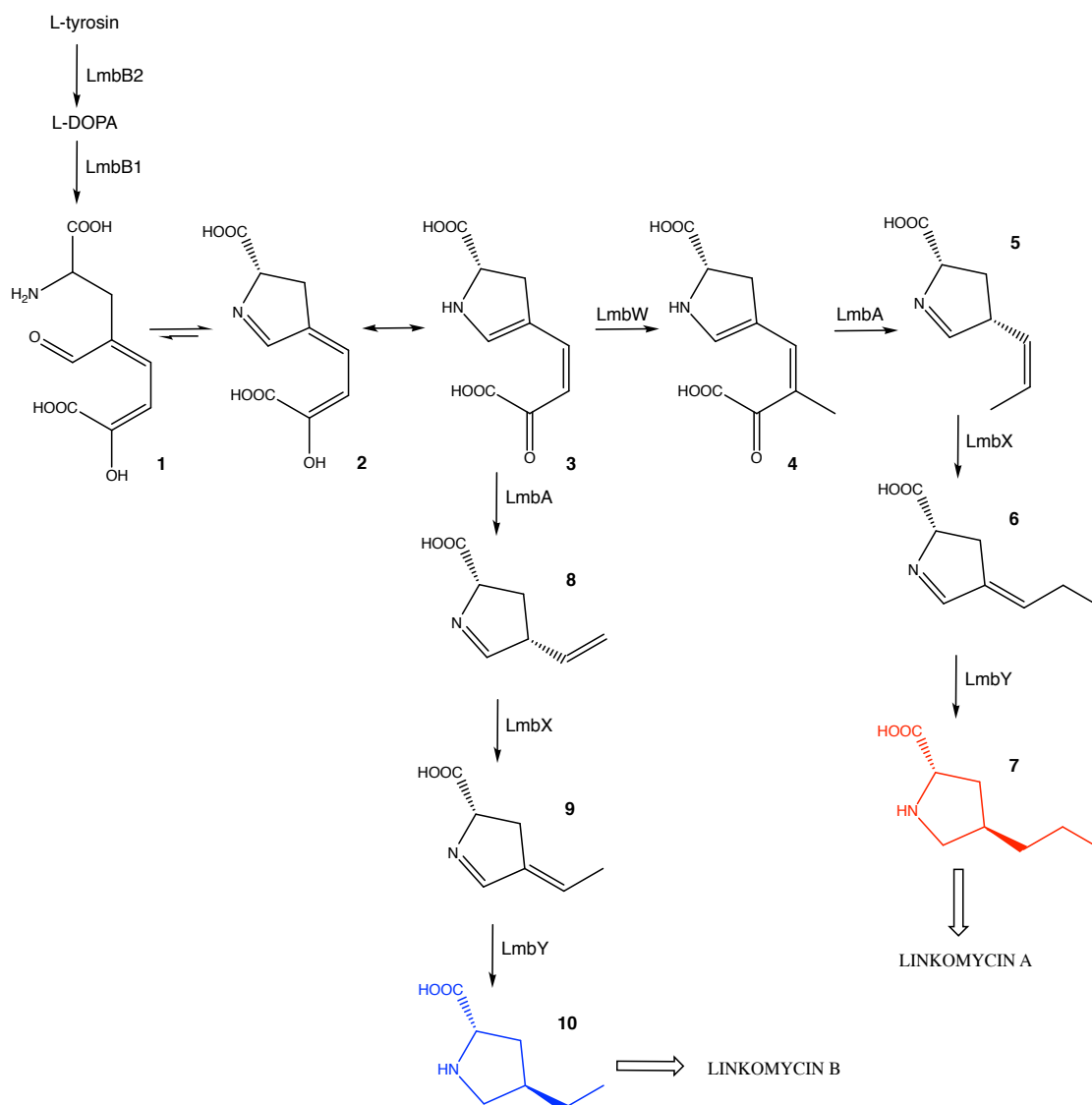
Obr. 2: Chemické struktury vybraných zástupců APD látek s červeně zvýrazněnou 4-alkyl-L-prolinovou jednotkou. A: hormaomycin, B: linkomycin A, C: tomaymycin.

2.1.1.2 Biosyntéza linkosamidů

Tento oddíl se blíže zabývá biosyntézou jednotlivých částí struktury linkosamidů, jejich kondenzací a následnými postkondenzačními kroky. Jak již bylo zmíněno výše, aminokyselinová podjednotka (APD), přestože je strukturně velmi podobná L-prolinu, pochází z L-tyrosinu a její syntéza probíhá za přítomnosti pěti nebo šesti enzymů (Obr. 3).

Prvním krokem je běžně se vyskytující reakce, hydroxylace L-tyrosinu na L-DOPA, která ale v tomto případě probíhá za přítomnosti neobvyklého enzymu LmbB2, jehož prostetickou skupinou je hem b [16], [17]. L-DOPA v následujícím kroku podléhá štěpení enzymem LmbB1 (L-DOPA-2,3-dioxygenasa) [17], čímž vzniká intermediát **1**, který se spontánně neenzymatickou cestou uzavře do kruhu a vytvoří sloučeninu **3**, charakteristickou svou žlutou barvou [18]. LmbB1 patří do skupiny extradiolových dioxygenas typu I, které používají chelátované nehemové Fe(II) k navázání a aktivaci molekuly kyslíku, díky níž dojde ke štěpení aromatického kruhu tím, že jednotlivé atomy kyslíku jsou vloženy do struktury [19]. Dalším krokem je methylace sloučeniny **3** za přítomnosti enzymu LmbW, SAM-dependentní C-methyltransferasy [20], následovaná reakcí katalyzovanou enzymem LmbA, který z intermediátu **4** odštěpuje oxalát, čímž vzniká hypotetický intermediát **5**. LmbA jako N-koncová nukleofilní hydrolasa (sekvenčně homologní k γ -glutamyltransferasam) má v tomto případě nezvyklou úlohu, a to rozštěpení vazby mezi dvěma uhlíky [20]. Mechanismus této reakce není zcela objasněn. Předpokládá se však, že v rámci aminokyselinové sekvence proteinu hraje důležitou roli residuum threoninu [21]. V tuto chvíli jsou navrženy dva mechanismy lišící se místem nukleofilního ataku alkoholátu vytvořeného odtržením protonu z hydroxylové skupiny uvedeného residua threoninu. Předpokládaným místem pro tuto reakci je buď oxo skupina [21], nebo heterocyklus intermediátu [11]. Dvojná vazba sloučeniny **5** pak musí být v následujícím kroku podrobena isomerizaci, aby mohl vzniknout intermediát **6**, který byl rozpoznán již během dřívějšího zkoumání [22]. Tato reakce je na základě experimentů katalyzována enzymem LmbX [20], který tak intermediát připraví na redukci dvojných vazeb. Ta probíhá za přítomnosti F₄₂₀H₂-dependentního enzymu LmbY [23], čímž vzniká finální produkt této dráhy, 4-propyl-L-prolin (PPL, **7**), z něhož vzniká linkomycin A produkovaný kmenem *Streptomyces lincolnensis* ATC 25466 (příp. 78-11).

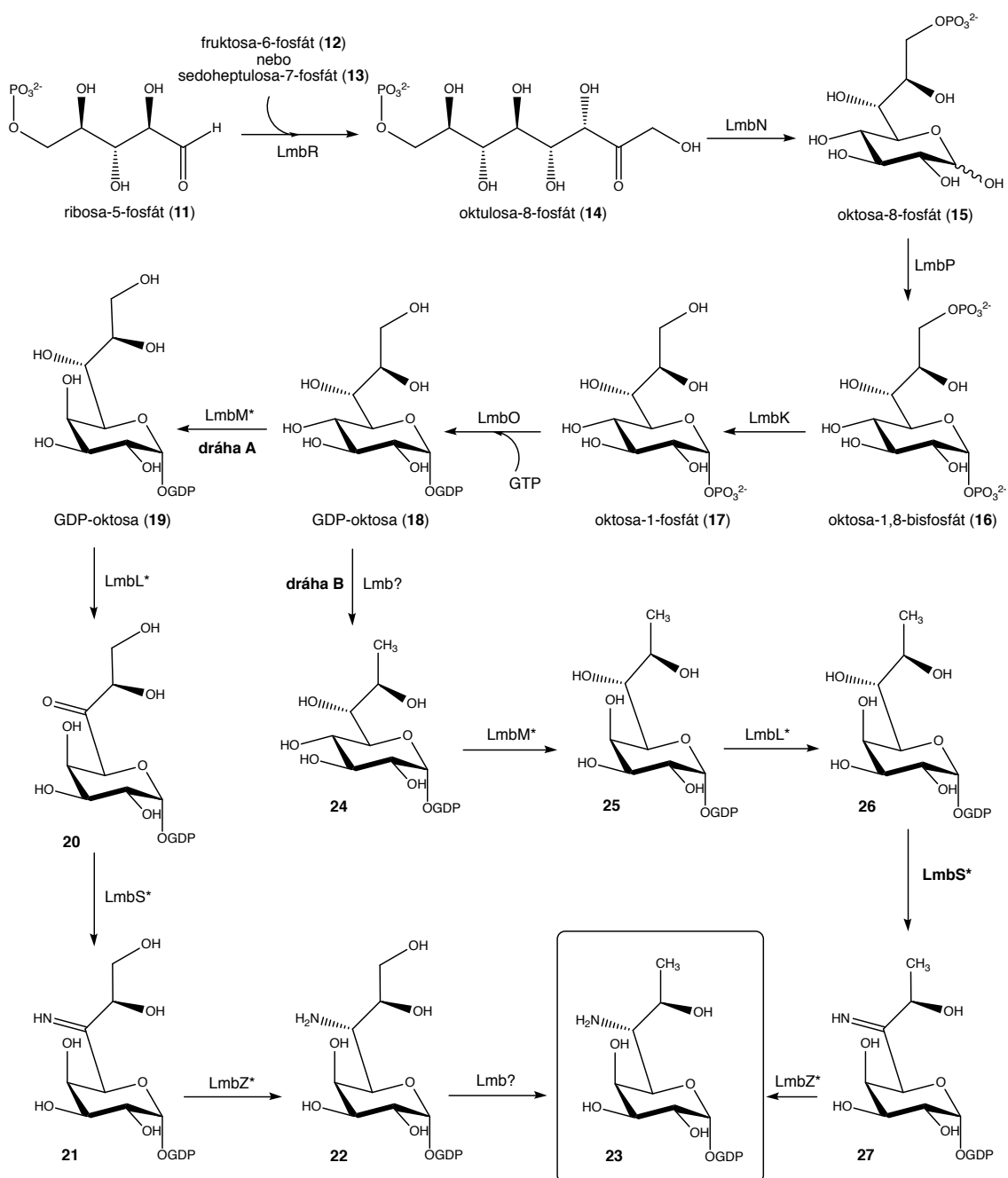
Vedlejším produktem této biosyntetické dráhy je 4-ethyl-L-prolin (EPL, **10**), jehož biosyntéza oproti biosyntéze PPL postrádá krok zahrnující enzym LmbW, který u hlavní cesty prodlužuje alkyl APD o jednu CH₂ skupinu (Obr. 3). Z EPL tak následně vzniká linkomycin B.



Obr. 3: Schéma biosyntézy precursoru aminokyselinové jednotky linkomycinu. Červeně zvýrazněný PPL, z něhož po kondenzaci s aminooktosovou jednotkou a N-methylaci vzniká linkomycin A, modře zvýrazněný EPL, ze kterého vzniká linkomycin B (vedlejší produkt biosyntézy linkomycinu A).

Jak již bylo nastíněno v oddílu 2.1.1, dalším krokem biosyntézy linkomycinu je vytvoření neobvyklé aminooktosové jednotky (Obr. 4). Prvním krokem této biosyntetické dráhy je kondenzace pětiuhlíkatého akceptoru, ribosa-5-fosfátu (**11**), a tříuhlíkatého donoru pocházejícího z pentosafosfátového cyklu, jímž může být buď fruktosa-6-fosfát (**12**), nebo sedoheptulosa-7-fosfát (**13**) [9]. Kondenzace je katalyzována transaldolasou LmbR [24] a vzniká tak oktulosa-8-fosfát (**14**). Následující reakce probíhající za katalýzy

enzymem LmbN je 1,2-isomerace, díky níž se dostáváme k prvnímu klíčovému intermediátu této biosyntetické dráhy, oktosa-8-fosfátu (**15**) [24]. V příštím kroku je **15** fosforylován kinasou LmbP, čímž vzniká oktosa-1,8-bisfosfát (**16**), ale tato reakce stále zůstává v hypotetické rovině, kvůli komplikacím s provedením experimentu *in vitro* [25]. Dalším postupem v biosyntéze je defosforylace **16** katalyzovaná fosfatasou LmbK na oktosa-1-fosfát (**17**) a následná aktivace enzymem LmbO, čímž vzniká GDP-oktosa (**18**) [25]. Nadcházejícími kroky jsou epimerace C4 hydroxylové skupiny, methylace primárního alkoholu v poloze C8 a konverze C6 hydroxylové skupiny na aminoskupinu, ale není zcela objasněno, v jakém pořadí tyto reakce probíhají. V Obr. 4 jsou uvedeny dvě možné cesty vzniku finálního produktu **23** (dráhy A a B).



Obr. 4: Schéma biosyntézy aminooktosové jednotky linkomycinu. Funkce enzymů označených hvězdičkou není experimentálně objasněna. (Převzato z [11], upraveno.)

Autoři schématu vycházejí z předpokladu, že by změna prostorové orientace C4 hydroxylové skupiny z ekvatoriální na axiální mohla vést k lepší sterické dostupnosti C6 hydroxylové skupiny pro enzymy účastnící se její transformace na amin, a proto by měla být prvním krokem ke změně hydroxylové skupiny na aminovou [11]. Počet genů nezbytných pro realizaci prvních tří kroků dráhy A a jejich odhadovaná funkce [26]

odpovídají následujícímu postupu. První reakcí je již zmiňovaná epimerace hydroxylové skupiny na C4 (hypotetická epimerasa LmbM) následovaná oxidací v pozici C6 hypotetickou dehydrogenasou LmbL na intermediát **20**. Pomocí hypotetické aminotransferasy LmbS dochází v téže pozici k náhradě ketonu za imin a vzniká intermediát **21**, který je v dalším kroku redukován hypotetickou oxidoreduktasou LmbZ na amin (**22**). Gen enzymu pro poslední reakci v dráze A, kde dochází k přeměně intermediátu **22** na finální produkt **23**, ovšem nebyl dohledán v biosyntetickém genetickém klastru linkomycinu, ani celesticetinu [11].

Druhou variantou finálního utvoření aminooktosové jednotky je dráha B, která začíná redukcí hydroxylové skupiny v pozici C8 (posledním krokem dráhy A), kde dochází k přeměně intermediátu **18** na intermediát **24**. Zbylé tři reakce jsou analogické k těm z dráhy A; epimerace na **25**, následná oxidace a vznik **26**, transaminace **26** na **27** a konečná redukce iminu na amin, finální produkt (**23**).

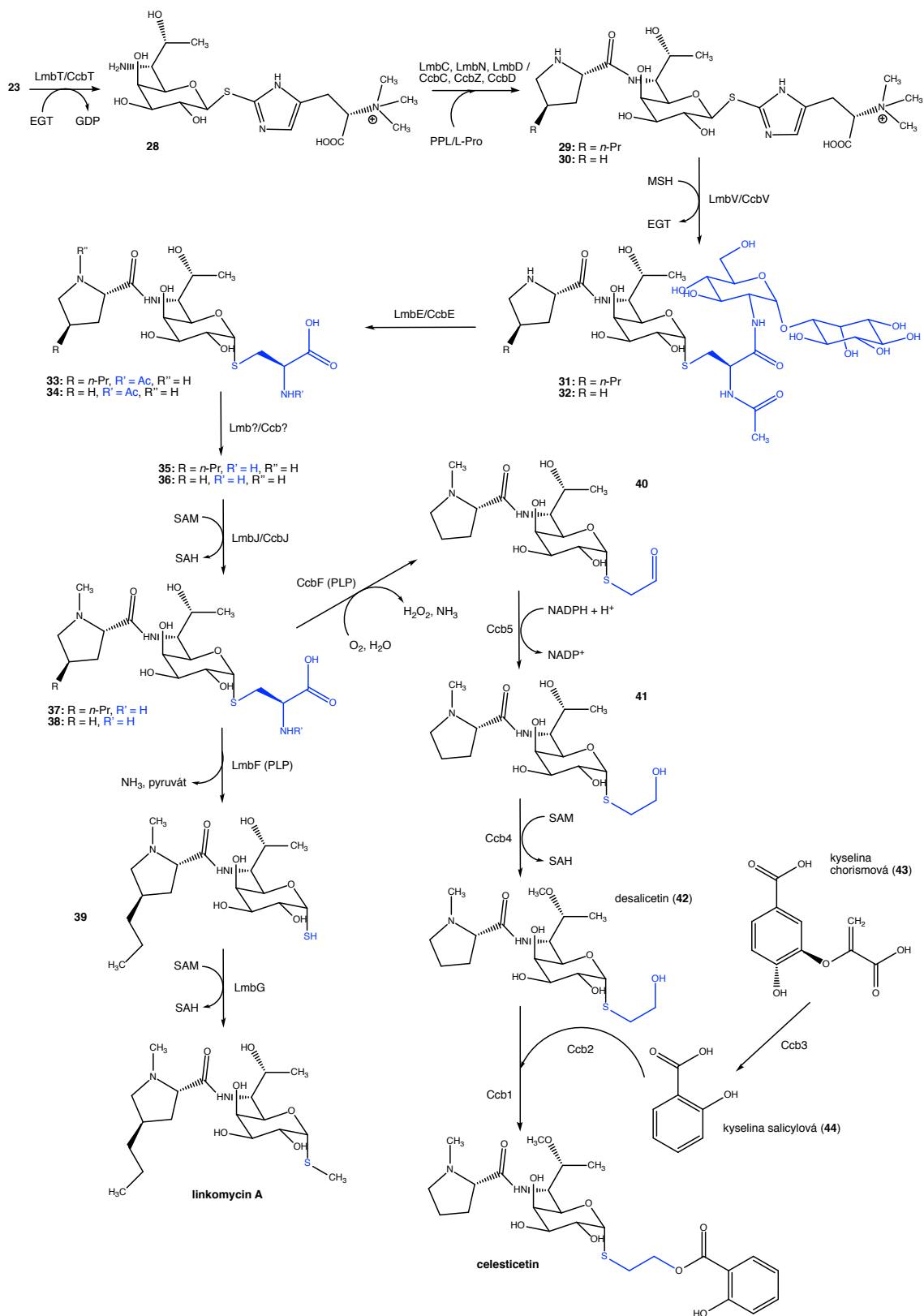
Na úvod další části biosyntézy linkosamidů je nutné zmínit, že následující kroky byly objasněny za použití linkomycinových nebo celesticetinových rekombinantních proteinů (Lmb# nebo Ccb#). Předpokládá se, že biosyntéza obou sloučenin probíhá stejným způsobem [11], [27], [28], rozdílným krokem je pouze inkorporace L-prolinu do celesticetinové struktury a PPL do té linkomycinové.

Na začátku kondenzace aminokyselinové (PPL/L-prolinu) a aminooktosové jednotky vstupuje do hry velmi významný účastník této biosyntetické dráhy, ergothionein (ESH), který pomocí enzymu LmbT/CcbT substituuje GDP na aminooktosové jednotce za vytvoření β -S-vazby (Obr. 5, intermediát **28**) [29]. Následuje reakce, při níž LmbC/CcbC jako tzv. A-domény specificky rozeznávají a aktivují APD (LmbC), případně L-prolin (CcbC) [30]. Takto aktivovaný APD (L-prolin) se naváže na tzv. CP doménu proteinu LmbN/CcbZ [26] a je připraven se navázat na aminooktosovou jednotku. Kondenzací těchto dvou struktur vytvořením amidové vazby katalyzuje výjimečný enzym LmbD/CcbD, který je odlišný od veškerých sekvencí dostupných v databázích, a jeví se tedy jako jedinečný produkt vzniklý specificky v rámci evoluce biosyntézy linkosamidů [26]. Ze vzniklého kondenzátu (**29**, **30**) je následně ESH substituován mykothiolem (MSH) za katalýzy enzymem LmbV/CcbV, a dochází tak ke změně konformace vazby thiolu na aminooktosovou jednotku z β -S na α -S-vazbu, která je zachována až do finální podoby struktury linkosamidů [29], [31]. Mykothiol je z intermediátu během dalších

kroků biosyntézy postupně odštěpován. Prvním eliminačním krokem je odstranění 1-*O*-glukosamin-D-myoinositolu amidasou LmbE/CcbE [29] následované deacetylací *N*-acetylcysteinového zbytku enzymem LmbIH-LmbQ/CcbIH-CcbQ (Vobruba, ACS Chemical Biology, v revizi). Výsledný intermediát (**35**, **36**) je hlavním přirozeným substrátem SAM-dependentní *N*-methyltransferasy LmbJ/CcbJ, která methyluje aminokyselinovou jednotku a vzniká intermediát **37** nebo **38** [31].

Od následujícího kroku se linkomycinová biosyntetická dráha začne odlišovat od té celesticetinové. Prvním krokem obou drah je reakce katalyzovaná homologními pyridoxal-5'-fosfát-dependentními enzymy LmbF a CcbF, které ale disponují odlišnými funkcemi. U intermediátu **37** dochází k β -eliminaci enzymem LmbF, díky níž vznikne intermediát **39** obsahující pouze sulfhydrylovou skupinu [31]. Tímto je zakončena eliminace MSH a dostáváme se k finálnímu kroku, methylaci *S*-methyltransferasou LmbG, čímž vzniká konečný produkt této biosyntetické dráhy, linkomycin A [26], [31].

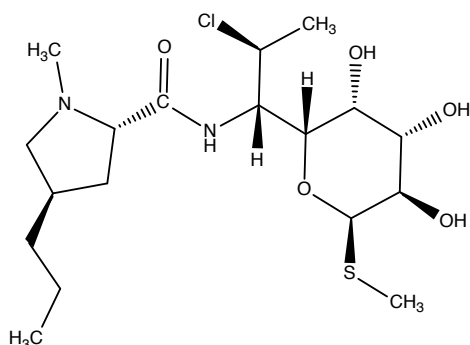
Enzym CcbF na druhou stranu katalyzuje neobvyklou dekarboxylaci **38** spojenou s oxidační deaminací, čímž vzniká dvouhlíkatý aldehyd navázaný na síru (**40**) [32]. Reaktivní aldehydová skupina je pak redukována enzymem Ccb5 (NADPH-dependentní reduktasa) na alkohol (**41**) [33]. Následuje reakce na hydroxylové skupině v pozici C7, která je vlivem SAM-dependentní *O*-methyltransferasy Ccb4 methylována a vzniká tak intermediát **42**, desalicetin [32]. Poté dochází k vytvoření esterové vazby mezi alkoholem navázaným na síru a kyselinou salicylovou (**44**). Zdrojem této kyseliny je pravděpodobně kyselina chorismová (**43**), která je transformována hypotetickou salicylát-synthasou Ccb3 [26]. Než ale dojde k vazbě mezi desalicetinem a kyselinou salicylovou, je nutné tuto kyselinu adenylvat a přenést na koenzym-A pomocí salicylyl-CoA ligasy Ccb2 [8]. Tento konjugát je pak spolu s desalicetinem (**42**) substrátem pro neobvyklý enzym Ccb1, což je celesticetin-specifická acyltransferasa, která katalyzuje kondenzaci aktivované kyseliny salicylové a intermediátu **42**, a tím získáme celesticetin, finální metabolit této biosyntetické dráhy Aktinobakterie *Streptomyces caelestis* ATC 15084 [8].



Obr. 5: Kondenzace aminokyselinové (PPL nebo L-prolinu) a aminooktosové jednotky a následné postkondenzační kroky. Modře je vyznačený MSH.

2.1.1.3 Biologická aktivita a klinické využití linkosamidů

Tento oddíl pojednává o biologické aktivitě a využití linkomycinu A (dále jen linkomycinu) a jeho semisyntetickém derivátu klindamycinu (struktura na Obr. 6). Obě tyto látky jsou klinicky hojně využívaná antibiotika s úzkým spektrem účinku, působící na grampozitivní bakterie především z rodu *Streptococcus* a *Staphylococcus* [34]–[36]. Gramnegativní bakterie jsou vůči těmto linkosamidům obecně považovány za rezistentní, nicméně klinicky velmi důležitá je účinnost klindamycinu proti některým anaerobům nejen ze skupiny grampozitivních bakterií [37].



Obr. 6: Chemická struktura klindamycinu.

Klindamycin je na základě experimentů obecně považován za účinnější antibiotikum než linkomycin a byla u něj dokázána vyšší efektivita při léčbě vážných infekcí způsobených kmeny *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*, než u jiných antibiotik [38]. Kromě jiného navíc klindamycin disponuje velmi významnou antiplasmodiální aktivitou [39], [40], cílí totiž na proteosyntézu probíhající v apikoplastu [41], specifické organele přítomné u většiny protozoárních parazitů z rodu *Apicomplexa*, do které patří kmeny *Plasmodium* nebo *Toxoplasma* [42]. Díky své nízké toxicitě je klindamycin doporučován v kombinaci s chininem pro léčbu malárie způsobené parazitem *Plasmodium falciparum*, a to pro pacienty z rizikových skupin a jako léčivo první volby pro léčbu žen nemocných v prvním trimestru těhotenství [43].

Mechanismem účinku linkosamidů je jejich vazba na 50S podjednotku bakteriálního ribosomu v místě pro peptidyl transferasu, čímž dochází k zamezení iniciace translace a zabránění proteosyntéze [44]. Dvě ze tří hydroxylových skupin na aminooktosové jednotce klindamycinu se účastní tvorby vodíkových můstků s 23S rRNA, kam se váže také atom síry, což dokazuje význam její i celé speciální aminooktosové jednotky ve

strukturu linkosamidů a jejich biologické aktivitě [45]. Mono-/dimethylace ribosomu v místě pro vytvoření vodíkových vazeb s hydroxylovými skupinami způsobuje rezistenci vůči linkosamidům [46]. V neposlední řadě je důležitým místem 4-alkyl-L-prolinová jednotka, která míří k A-místu tRNA a fyzicky tak brání prodlužování vznikajícího peptidového řetězce [45].

2.1.1.4 Význam syntézy nových antibiotik

Antibiotika jsou látky podávané k profylaxi nebo léčbě bakteriálních infekcí. Pokud ale u bakterie dojde ke změně odpovědi na danou látku, mluvíme o antibiotické rezistenci, která následně vede ke komplikacím souvisejícím s léčbou daného onemocnění, případně s úmrtností. Celosvětově dochází k rychlému nárůstu antibiotické rezistence, a přestože se jedná o velmi závažný problém dosahující stejné významnosti jako např. klimatické změny, povědomí o této antibiotické krizi není zdaleka tak široké. Proto byl na základě podnětu členských států Světové zdravotnické organizace (WHO) vytvořen seznam dvanácti kmenů, pro které je prioritně potřeba najít nová funkční antibiotika, aby tak byla podpořena snaha o jejich výzkum a vývoj [47]. Kromě multirezistentního patogenu *Mycobacterium tuberculosis*, jsou podle dat primárním problémem multirezistentní a rozsáhle rezistentní gramnegativní bakterie, které způsobují akutní infekce v nemocničním i v komunitním prostředí [47]. Příčinou může být mimo jiné i fakt, že za uplynulých dvacet let byly objeveny pouze dvě zcela nové skupiny antibiotik (lipopeptidy a oxazolidinony), které jsou ale účinné pouze proti grampozitivním bakteriím [48]. Poslední nová skupina léčiv efektivních proti gramnegativním bakteriím byly chinolony, objevené v roce 1962 [47]. Po nich následovalo pouze několik látek např. z řady tetracyklinů, které vykazují určitou aktivitu i vůči tomuto typu bakterií (omadacyklin [49], eravacyklin [50]) [47], ale zcela nová skupina antibiotik objevena nebyla.

Problém antibiotické rezistence ale nesouvisí pouze s nedostatečnou produkcí a vývojem nových látek. Nadužívání antibiotik, které jde ruku v ruce s jejich nesprávným předepisováním, ji rovněž prokazatelně umocňuje a komplikuje. Patogeny si mohou schopnost rezistence předávat mezi sebou horizontálním genetickým přenosem, který umožňuje její šíření i mezi různými bakteriálními druhy [51]. V mnoha zemích navíc neprobíhá žádná regulace antibiotik, jsou volně prodejná bez lékařského předpisu a tudíž velmi snadno dostupná a levná [52]. Nevhodně užívaná antibiotika rovněž podněcují

rozvoj rezistence u bakterií, protože subinhibiční a subterapeutické koncentrace antibiotik podporují změny genové exprese, horizontální genetický přenos a mutagenezi [53].

Další příčinou antibiotické rezistence je i velmi rozšířené používání antibiotik v zemědělství, a to jak v rozvojových, tak i ve vyspělých zemích [54]. Jedná se o přidávání těchto látek do potravy hospodářských zvířat, odkud se pak skrze ně rozšíří např. hnojivem do podzemní vody a povrchového odtoku, případně potravou do těla člověka, kde mohou selekčním tlakem přispět k rozvoji antibiotické rezistence nebo způsobit nežádoucí změnu střevní mikroflory.

V neposlední řadě je příčinou antibiotické krize také to, že vývoj nových antibiotik farmaceutickým průmyslem, ale i na akademickém poli, byl v podstatě zastaven vlivem ekonomických a regulačních komplikací [54].

Kroků ke zlepšení této situace je samozřejmě nespočet, chtěla bych zde ale zmínit jeden konkrétní, a tím je vývoj účinnějších antibiotik, pokud možno cenově méně náročnou cestou, kterým se v rámci linkosamidů zabývá naše laboratoř. Toho lze docílit např. produkcí v mikroorganismech, čímž je možné získat přírodní látky a případně je dále modifikovat. Touto cestou byla z Aktinobakterií získána již řada sloučenin, nejen antibiotického charakteru. Jednou z takových skupin jsou i linkosamidy, které stále nabízejí široké pole možností tvorby nových derivátů a hybridních látek. Bylo dokázáno, že aktivita těchto antibiotik je závislá na jejich struktuře, např. na délce alkylového řetězce navázaného na L-prolinovou jednotku – s delším alkylovým řetězcem roste i aktivita linkosamidu [55], [56], protože antibiotikum navázané na ribosom pak účinněji brání proteosyntéze. Stejně tak funguje i navázání salicylátu na dvouhlíkatý řetězec připojený přes atom síry k aminooktosové jednotce, což nebylo donedávna známo (Obr. 5) [11]. Na základě těchto poznatků byl vytvořen CELIN, enzymaticky připravený hybrid, který kombinuje dvouhlíkatý řetězec a salicylát celesticetinu a APD jednotku linkomycinu s tříhlíkatým postranním řetízkem [8]. Následně byla CELINu struktura za účelem zvýšení účinnosti modifikována a vytvořeny tak deriváty, z nichž některé již byly rozsáhle testovány. Ukázalo se, že jsou efektivnější vůči stafylokokům, streptokokům a dalším bakteriím, včetně některých z prioritního seznamu WHO [47]). Významná aktivita byla zaznamenána i vůči methicilin-rezistentním stafylokokům, zahrnující i methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a vůči makrolid-linkosamid-streptogramin B (MLS_B) rezistentním kmenům. Bohužel, ne

u všech testovaných kmenů bylo dosaženo tak dobrých výsledků, a přestože došlo k zesílení vazby mezi molekulou antibiotika a ribozomem, stále nebyla zcela překonána MLS_B zkřížená rezistence a je zde tedy nadále prostor pro další experimenty a zlepšování.

2.1.2 Nízkomolekulární thioly

Tato podkapitola se zabývá nízkomolekulárními látkami obsahujícími thiolovou skupinu. Většina živých organismů obsahuje vysokou koncentraci alespoň jednoho nízkomolekulárního thiolu, který obecně slouží jako redoxní pufr při ochraně buněk proti toxickým sloučeninám, jimiž jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), polokovy, reaktivní elektrofilní látky a některá antibiotika [57]. Nízkomolekulární thioly mohou být také využity k reverzibilní *S*-thiolaci cysteinových zbytků v proteinech, čímž slouží jako ochrana před nadměrnou oxidací na sulfonové kyseliny, a zároveň jsou schopné regulovat růst buněk, jejich diferenciaci a další významné mechanismy [58]. Skrývají ale i specifitější vlastnosti, mezi které patří např. účast v biosyntéze či součást struktury biologicky aktivních metabolitů. Výhodou nízkomolekulárních thiolů je navíc jejich schopnost vzájemné zastupitelnosti, tudíž pokud nedochází k syntéze jednoho thiolu, je jiný schopen ho nahradit [59], [60]. Nejrozšířenějším nízkomolekulárním thiolem je bezesporu glutathion, ale velká řada organismů produkuje i jiné látky jako své hlavní thioly. K takovým je řazen např. ergothionein, mykothiol, bacillithiol, cystein a γ -glutamylcystein, které budou rozebrány v následujících oddílech.

2.1.2.1 Ergothionein (ESH)

Ergothionein (ESH) je nízkomolekulární látka, neobvyklý derivát L-histidinu (Obr. 7), vyskytující se u velkého množství organismů, čítající i rostliny, živočichy a lidské tělo [61]. K jeho biosyntéze ale dochází pouze u některých hub, Cyanobakterií (sinic) a Aktinobakterií (včetně *Mycobacterium tuberculosis* [62], u něhož ovlivňuje např. citlivost vůči antituberkulotikům [63]), ostatní organismy ho získávají z vnějšího prostředí, např. potravou [64] nebo z půdy [65]. ESH se nejčastěji vyskytuje ve formě thionu [66] a jeho speciální vlastností je, že jeho redoxní potenciál thiol-disulfid je oproti ostatním thiolům podstatně vyšší [67]. Kombinace těchto dvou vlastností zajišťuje schopnost ESH nepodléhat tak snadno auto-oxidaci, jako ostatní thioly (např. glutathion), a neprodukovat tak nebezpečné volné radikály [68]. V prostředí iontů těžkých kovů, kdy běžně dochází k oxidaci thiolů, dokáže ESH tyto kovy chelatovat a tvořit s nimi

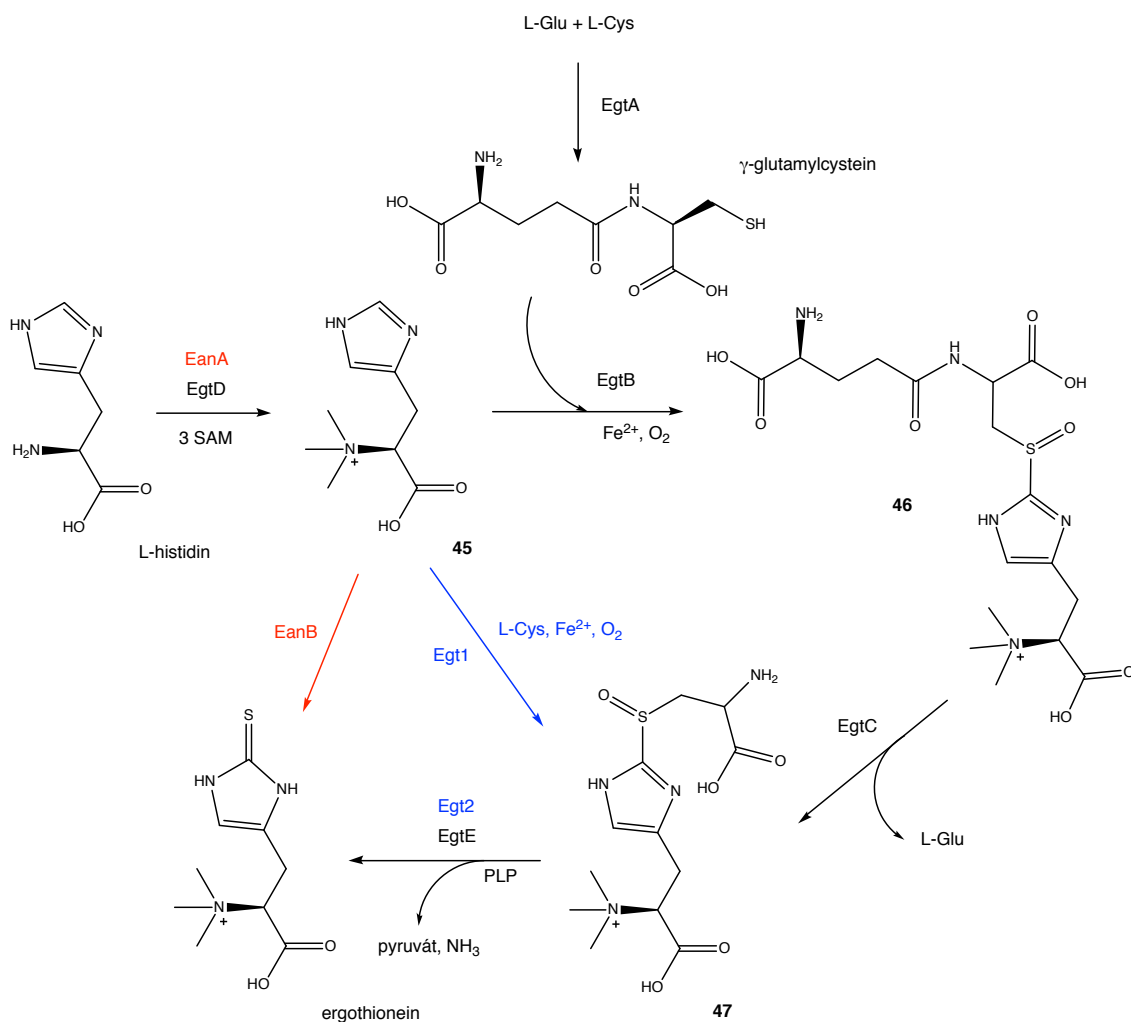
komplexy [69]. Tvorba disulfidu ESSE může probíhat pouze za velmi nízkého pH a přítomnosti mědi nebo peroxidu vodíku, ale ne v neutrálních či alkalických podmínkách [70].

Funkce ESH spočívá především v jeho ochraně organismů proti oxidativnímu stresu [71], např. vyhledáváním hydroxylových radikálů nebo inhibicí jejich tvorby z peroxidu vodíku, která je závislá na iontech železa nebo mědi [72]. Byla potvrzena i kooperativní interakce mezi ESH a kyselinou askorbovou, které by měli hrát důležitou roli v ochraně biologických systémů proti ROS [73]. Další funkcí ESH je účast v drahách vedoucích ke vzniku specializovaných metabolitů, jako například biosyntéza linkomycinu A (*Streptomyces lincolnensis* ATC 25466) [29], kde ESH figuruje jako důležitá složka pro kondenzaci aminooktosové a aminokyselinové jednotky. V neposlední řadě může být rovněž součástí struktury biologicky aktivních látek, mezi něž patří spithionein A a B [74], benzastatin JBIR-73 [75], clithionein [76] a gastrolathionein [77]; struktury těchto metabolitů jsou uvedeny v příloze této práce a shrnutí všech dosud rozpoznaných funkcí ESH u mikroorganismů lze najít v review [78].

Biosyntéza ESH byla poprvé kompletně popsána v roce 2010 [79], kdy byl identifikován biosyntetický genetický klastř ESH u kmene *Mycobacterium avium* a charakterizováno pět enzymů (EgtA-E) (Obr. 7, černě). Prvním krokem je trojnásobná SAM-dependentní methylace α -aminoskupiny L-histidinu katalyzovaná enzymem EgtD, čímž vzniká intermediát **45**. Následně dochází k napojení této látky na γ -glutamylcystein, který vzniká reakcí L-glutamové kyseliny a L-cysteinu za přítomnosti enzymu EgtA [79]. Enzym EgtB, který dává vzniknout intermediátu **46** vytvořením C-S vazby, je zajímavý svou vysokou substrátovou specifitou, reaguje totiž pouze s těmito dvěma intermediáty, **45** a γ -glutamylcysteinem [80]. Dalším krokem dochází k hydrolýze intermediátu **46** glutamin amidohydrolasou EgtC, kdy se odštěpuje se L-glutamová kyselina a vzniká intermediát **47** [79], [81]. Posledním krokem biosyntézy ESH je eliminace pyruvátu a amoniaku za katalýzy PLP-dependentní β -lyasou EgtE, pro níž je intermediát **47** (sulfoxid) přirozeným substrátem [79], [82].

K produkci ESH ale dochází také u hub a anaerobních bakterií, jejichž biosyntetická dráha je v obou případech mírně odlišná. Zatímco za aerobních podmínek je u bakterií biosyntéza čtyřkroková, u hub má kroky pouze tři (Obr. 7, modře) [83]. Liší se v druhé

reakci, kdy dochází ke kondenzaci intermediátu **45** a L-cysteinu katalyzované enzymem Egt1, čímž je oproti první variantě z dráhy zcela vynechán glutamát. Poslední reakce, probíhající za přítomnosti enzymu Egt2, je opět totožná s biosyntézou za aerobních podmínek [83].



Obr. 7: Biosyntéza ESH. Biosyntéza u aerobních bakterií (černě), biosyntéza u hub (odlišné kroky modře), biosyntéza u anaerobních bakterií (odlišné kroky červeně).

K produkci ESH ale dochází také u hub a anaerobních bakterií, jejichž biosyntetická dráha je v obou případech částečně odlišná. Zatímco za aerobních podmínek je u bakterií biosyntéza čtyřkroková, u hub má kroky pouze tři (Obr. 7, modře) [83]. Liší se v druhé reakci, kdy dochází ke kondenzaci intermediátu **45** a L-cysteinu katalyzované enzymem Egt1, čímž je oproti první variantě z dráhy zcela vynechán glutamát. Poslední reakce,

probíhající za přítomnosti enzymu Egt2, je opět totožná s biosyntézou za aerobních podmínek [83].

Varianta této biosyntetické dráhy u anaerobních bakterií je nečekaná vzhledem k tomu, že enzymy EgtB a Egt1 vyžadují přítomnost kyslíku. Další způsob biosyntézy ESH je kódován v genomu anaerobní zelené sirmé bakterie *Chlorobium limicola*, kde byl nalezen homolog genu *egtD*, gen *eanA*. Enzym EanA má schopnost katalyzovat methylaci L-histidinu za vzniku intermediátu **45**, stejně tak jako EgtD [84]. Speciálním enzymem je sulfotransferasa EanB, u níž byl jako u prvního enzymu tohoto typu prokázán přenos síry bez aktivace uhlíku a která katalyzuje vznik ESH přímo z intermediátu **45** (Obr. 7, červeně) [84]. Zjištění, že biosyntéza ESH může probíhat i u anaerobních organismů, není v souladu s obecným předpokladem, že tato látka figuruje jako antioxidant, který odstraňuje reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), jež jsou produkovány za aerobních podmínek, a vyvolává tedy otázky o jeho další funkci u anaerobních organismů.

2.1.2.2 Mykothiol (MSH)

Mykothiol (MSH) je hlavním thiolem u většiny Aktinobakterií (např. u kmenů *Mycobacterium*, *Corynebacterium* a *Streptomyces*), kde slouží jako náhrada za glutathion (GSH), který těmito bakteriemi produkován není [85]. Jeho chemická struktura se skládá z *N*-acetyl-L-cysteinového zbytku navázaného přes karboxylovou skupinu amidovou vazbou na D-glukosamin, který je propojen s *myo*-inositem (Obr. 8). Tato amidová vazba je pak velmi speciální součástí struktury MSH, protože může být rozštěpena pouze specifickým enzymem, jakým je například MSH *S*-konjugát amidasa [86], což je enzym zodpovědný za konverzi konjugátu MSH-toxin na kyselinu merkapturovou [87].

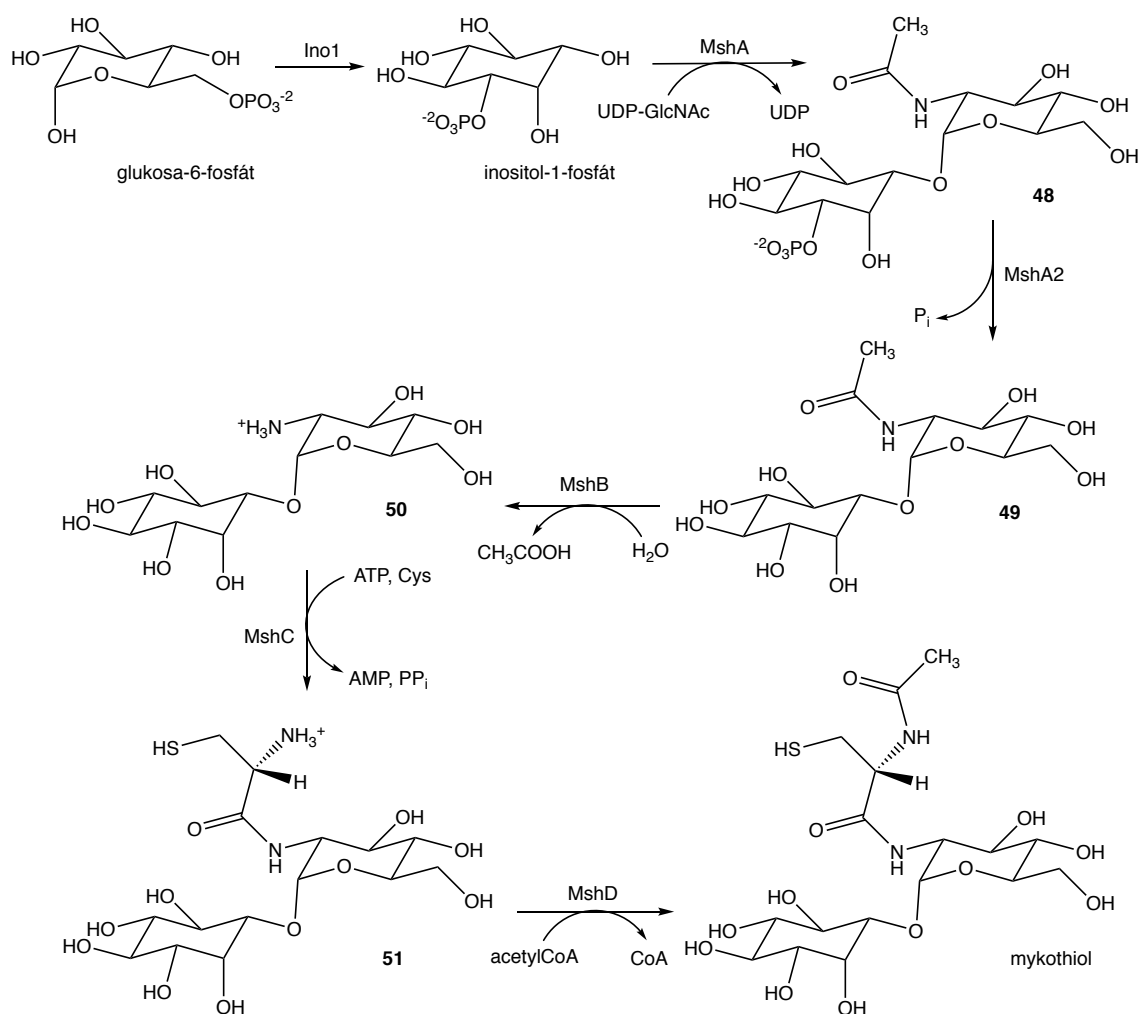
Vlastností MSH, podobně jako ESH, je jeho schopnost rezistence k auto-oxidaci v prostředí kyslíku a iontů těžkých kovů, která probíhá několikanásobně pomaleji než u cysteinu nebo GSH [88]. U Aktinobakterií se také vyskytuje enzym MSH-disulfid reduktasa, která redukuje disulfid MSSM zpět na MSH v rámci zachování intracelulární redoxní homeostázy potřebné pro správný průběh řady biologických funkcí [89]. MSH slouží jako kofaktor u řady dalších enzymů. Mezi ně patří např. NAD/MSH-dependentní formaldehyd dehydrogenasa, která detoxifikuje nebezpečný formaldehyd vytvořením thioesterové vazby s MSH a následnou produkcí kyseliny mravenčí zároveň s regenerací thiolu [90]. V neposlední řadě existuje MSH-dependentní maleinylpyruvát isomerasa, jež

katalyzuje přeměnu maleinylpyruvátu na fumarylpyruvát. Tato reakce je součástí důležité dráhy štěpící aromatické sloučeniny [91].

Kromě antioxidačního účinku patří mezi významné funkce MSH také vliv na rezistenci vůči dvěma antituberkulotikům první volby [92] a na detoxifikaci toxinů a antibiotik, např. alkylačního činidla monobromobimanu (mBBr), které se snadno dostává do buňky pasivní difúzí [93]. MSH velmi rychle reaguje s mBBr za vzniku derivátu MSmB, čehož lze využít při analýze thiolů [94]. Role MSH spočívá rovněž v ochraně *Mycobacterium tuberculosis* proti oxidantům a MSH je také stejně jako ESH zapojen do biosyntézy linkosamidů, do níž vstupuje po kondenzaci aminooktosové a aminokyselinové podjednotky a jeho thiolová síra zůstává součástí finální struktury jak linkomycinu, tak celesticetinu. MSH nebo některá z jeho částí se zároveň mohou objevovat jako součást struktury i dalších látek. Mezi takové patří nanaomycin H [95], I a J [96], analogy geldanamycinu [97], cyslabdan A [98], lucensimycin D-G [99] a cysrabelomycin [100]. Struktury těchto látek jsou uvedeny v příloze této práce. V neposlední řadě zastává funkci zásobárny cysteinu u Aktinobakterií a nahrazuje tak funkci chybějícího glutathionu [101]. Obecně je ale kvůli složité stereochemii molekuly MSH odhalování jeho vlastností silně omezeno. Velmi náročná chemická syntéza zatím nedosáhla uspokojivých výtěžků, a proto je efektivnější cestou biosyntéza a izolace z mikroorganismů, což má za následek nedostupnost komerčního standardu [86].

Biosyntéza MSH byla poprvé objasněna u Mykobakterií a sestává z pěti kroků, kterým předchází vznik inositol-1-fosfátu z glukosa-6-fosfátu za katalýzy inositolfosfát synthasou Ino1 (Obr. 8) [86]. V prvním kroku biosyntézy dochází ke vzniku intermediátu **48** reakcí inositol-1-fosfátu s UDP-*N*-glukosaminem katalyzovanou glykosyltransferasou MshA [102]. Následující krok zahrnuje defosforylaci intermediátu **48** potenciálním enzymem MshA2 za vzniku intermediátu **49**, přičemž gen pro tuto fosfatasu nebyl dosud objeven. Guo a kol. se ale podařilo u *Corynebacterium glutamicum* objevit a biochemicky charakterizovat novou inositolmonofosfát fosfatasu (IMPasu) Cg0911, která vykazuje selektivitu vůči intermediátu **48** a mohla by tak být hledaným enzymem MshA2, přestože je vzhledem k ostatním homologním IMPasám vyskytujícím se u *Mycobacterium tuberculosis* [86] velmi odlišná a unikátní [103]. Třetím krokem biosyntézy je deacetylace intermediátu katalyzovaná enzymem MshB, který byl objeven jako homolog MSH *S*-konjugát amidasy [104], s níž sdílí amidasovou aktivitu [105]. Touto deacetylací

vzniká významný intermediát **50**, který se často vyskytuje v extraktech Mykobakterií [92]. Další reakcí je ATP-dependentní ligace cysteinu s intermediátem **50** katalyzovaná enzymem MshC [106]. Finálním krokem je pak acetylace aminoskupiny cysteinu na intermediátu **51** N-acetyltransferasou MshD [107], čímž vzniká konečný produkt, MSH.



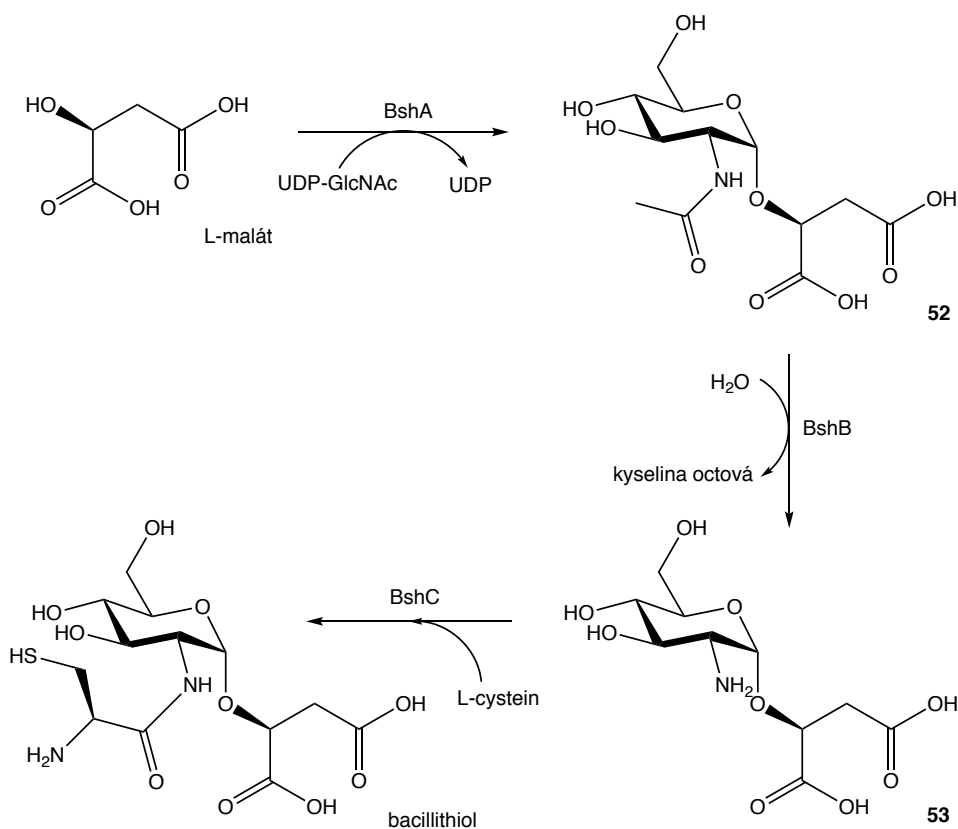
Obr. 8: Biosyntéza mykothioli (MSH).

2.1.2.3 Bacillithiol (BSH)

Bacillithiol (BSH) je thiol, který je spolu s cysteinem a koenzymem A hlavním nízkomolekulárním thiolem grampozitivních bakterií *Firmicutes*, které neprodukují ani GSH, ani MSH [108]. Mezi takové patří většina bakterií z rodu *Bacillus* a několik z rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus* [109]. BSH je velmi podobný MSH, s nímž sdílí stejnou základní strukturu, cysteinový zbytek navázaný amidovou vazbou na D-glukosamin. Na rozdíl od MSH ale není tento cysteinový zbytek acetylovaný a inositolová část je

nahrazena L-malátem (Obr. 9). Oproti MSH je tedy jeho struktura o něco více speciální. Blízkost karboxylové skupiny malátu, thiolové skupiny a aminu zajišťuje podporu tvorby chelátů s dvoumocnými kovy [109] a je zodpovědná i za vyšší reaktivitu s peroxidem vodíku, různými xenobiotiky a léčivými. BSH se tedy podílí např. na ochraně mikroorganismu proti oxidativnímu stresu [108], na udržování homeostáze zinečnatých iontů v cytoplasmě, pravděpodobně pro účely jejich využití jako kofaktorů některých enzymů [110], nebo na detoxifikaci fosfomycinu, kde figuruje jako ko-substrát enzymu FosB, který je zodpovědný za rezistenci vůči fosfomycinu u bakterií *Firmicutes* [111]. Jakýkoliv thiol, který slouží jako redoxní pufr, pak musí mít také schopnost regenerovat svou redukovanou formu poté, co došlo k jeho oxidaci na disulfid [108]. Proto i BSH vyskytující se převážně v redukované formě [109] má enzym BSSB reduktasu, která ji udržuje. Zajímavou vlastností je i to, že BSH často tvoří smíšené disulfidy s proteinovými thioley [61].

Díky strukturní podobnosti BSH a MSH byla identifikace prvních dvou enzymů biosyntézy BSH relativně snadná, protože se jedná o homology již dříve objevených biosyntetických enzymů MSH [112]. Třetí z nich ale není homologem MshC a gen pro jeho produkci byl dohledáván u kmenů produkujících BSH, které mají geny chybějící v jiných genomech [112]. Biosyntéza BSH tedy na rozdíl od MSH probíhá pouze ve třech krocích, z nichž prvním je reakce L-malátu a UDP-*N*-glukosaminu katalyzovaná glykosyltransferasou BshA, čímž vzniká intermediát **52** [112]. *N*-acetylhydrolasa BshB pak v dalším kroku odstraňuje kyselinu octovou za vzniku intermediátu **53** [112]. Tento enzym má ale stejně jako MshB další funkci jako BSH *S*-konjugát amidasa, která štěpí BSH během detoxifikačních reakcí [108]. Ve finální reakci této biosyntetické dráhy vstupuje do hry L-cystein, který za přispění enzymu BshC kondenzuje s intermediátem **53** a dostáváme tak konečný produkt, BSH [112].



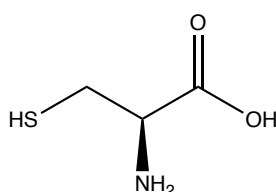
Obr. 9: Biosyntéza bacillithiolu (BSH).

2.1.2.4 Cystein (Cys)

Cystein (Obr. 10) se jako proteinogenní aminokyselina nachází u všech organismů, často ve funkčně a strukturně důležitých pozicích proteinů, kde se účastní široké škály biologických funkcí, jakými je katalýza, stabilizace struktury, přenos signálu, vazba kovů, posttranslační modifikace, detoxifikace xenobiotik apod. [61]. Volný Cys je kvůli své volné amino- a karboxyskupině velmi náchylný k auto-oxidaci katalyzované ionty těžkých kovů. Disulfid cystin se tvoří mnohem snadněji a rychleji než např. u koenzymu A nebo GSH a produkty této reakce zahrnují toxické ROS [101]. Kvůli bezpečnosti je potřeba minimalizovat auto-oxidaci Cys, což může být zajištěno nižší dostupností volných iontů těžkých kovů nebo snížením koncentrace Cys v buňce vytvořením takové formy, v níž je méně náchylný k oxidaci, např. vytvořením GSH nebo jiných thiolů [101]. Na druhou stranu právě díky své reaktivitě a tvorbě thiolátového aniontu může Cys zastávat tolik významných rolí [113], ale jako intracelulární redoxní pufr si většina organismů volí jiný nízkomolekulární thiol [61]. Kromě řady funkcí v peptidech může

být Cys také součástí struktury nebo biosyntézy dalších látek. Mezi ně patří některé zde uvedené thioly, ale také např. thiaplakorton A-C [114].

Cys je zároveň jedním z komponentů *S*-thiolace, což je reversibilní posttranslační modifikace mezi nízkomolekulárním thiolem a proteinovým cysteinem, která předchází nadbytečné oxidaci thiolu na sulfinovou, případně sulfonovou kyselinu [61]. *S*-thiolace může probíhat buď neenzymatickou cestou reakcí thiolátu s disulfidem nízkomolekulárního thiolu, nebo enzymaticky přenosem přes thiolový redoxin (mykoredoxin, bacilliredoxin apod.), případně za přítomnosti thiol *S*-transferasy, která katalyzuje vznik smíšených disulfidových thiolů. Bližší popis reakcí včetně schématu je dostupný v review [61].



Obr. 10: Chemická struktura L-cysteinu.

2.1.2.5 γ -glutamylcystein (γ GC)

γ -glutamylcystein (γ GC) je biosyntetickým intermediátem GSH (Obr. 11) a součástí biosyntézy ESH (Obr. 7), ale některé halobakterie [115] a bakterie mléčného kvašení [116] jsou schopné jeho produkce jako hlavního nízkomolekulárního thiolu, aniž by produkovaly GSH. Podobně i některé kmeny, které ztratily schopnost produkce ESH a MSH, jsou schopné vytvářet vyšší množství γ GC, ale jinak jsou jeho fyziologické hodnoty díky rychlému obratu během biosyntéz a vysoké reaktivitě velmi nízké [60], [61], [117]. Bakterie rodu *Leuconostoc* jsou ale schopné kvůli případnému vyššímu oxidativnímu stresu zvýšit expresi genu *gshA* účastnícího se biosyntézy GSH [116] a stejně tak *Mycobacterium tuberculosis* dokáže zvýšit produkci γ GC k odstranění látek, které způsobují oxidativní stres [118].

Vysokou reaktivitu γ GC je samozřejmě možné řešit enzymaticky. Z kmene *Halobacterium halobium* byla již dříve izolována NADPH-dependentní disulfid reduktasa, která redukuje γ GC disulfid, ale ne GSH disulfid. To také podporuje myšlenku, že γ GC slouží u těchto mikroorganismů jako redoxní pufr, přestože volná karboxy skupina cysteinu je velmi náchylná k auto-oxidaci vlivem iontů těžkých kovů.

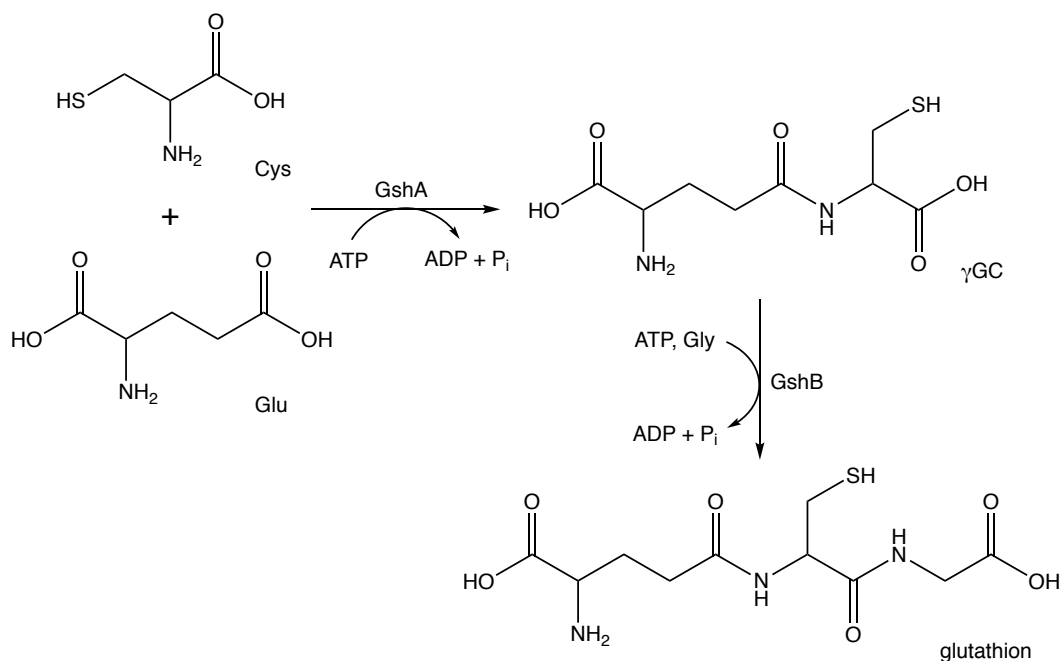
V přítomnosti vysoké koncentrace soli, která je typická pro prostředí halobakterií, je ale rezistence γ GC vůči oxidaci srovnatelná s GSH [119].

2.1.2.6 Glutathion (GSH)

Glutathion (GSH) je převládajícím nízkomolekulárním thiolem mezi eukaryotními buňkami, u většiny gramnegativních a několika grampozitivních bakterií [61], [120]. Jedná se o látku složenou ze tří aminokyselin (glycinu (Gly), cysteinu (Cys) a kyseliny glutamové (Glu), Obr. 11), jejíž vnitrobuněčná stabilita a související funkce jsou dány právě její charakteristickou strukturou – γ -vazbou s Glu a thiolovou skupinou [121]. Za fyziologických podmínek se v buňce poměr redukované formy GSH ku oxidované spíše přiklání na stranu jednoduchého thiolu, přičemž správný poměr je udržován glutathion reduktasou, flavoenzymem, který využívá redukční síly NADPH k redukci disulfidu zpět na GSH [120].

GSH stejně jako ostatní thioly chrání buňky proti toxicitě ROS, účastní se reakcí zahrnujících syntézu proteinů a nukleových kyselin a detoxifikuje volné radikály a peroxidy. Zároveň může tvořit konjugáty s řadou sloučenin endogenního i exogenního původu a je kofaktorem různých enzymů [121]. GSH je také schopný účinkovat jako klíčová signální molekula, která aktivuje expresi virulenčního genu bakteriálního patogenu *Listeria monocytogenes* [122] a v neposlední řadě figuruje spolu s koenzymem A jako zdroj při biosyntéze přírodních produktů obsahujících síru [123] nebo jako zásobárna a transportní forma Cys [121]. GSH je zároveň schopný kovalentně modifikovat cysteinové zbytky v proteinech reversibilním procesem S-glutathionylace, který chrání Cys zbytky před ireversibilní oxidací či reguluje specifické proteiny, jejichž Cys zbytky jsou nezbytné pro regulaci buněčné homeostázy [61]. Mechanismus tohoto procesu může být buď ROS-dependentní nebo ROS-independentní, avšak výsledek obou cest je totožný [124]. GSH je zároveň donorem síry v biosyntéze gliotoxinu, což je toxin produkovaný některými houbami (např. druhem *Aspergillus fumigatus*) [125]. Tato konkrétní role GSH byla potvrzena před relativně krátkou dobou, kdy byl objeven nový typ glutathion-S-transferasy (GliG) odpovědné právě za vytvoření C-S vazby mezi GSH a intermediátem biosyntézy gliotoxinu [126]. Je zajímavé, že tento mechanismus inkorporace síry je podobný glutathion-dependentnímu detoxifikačnímu procesu [127]. Pro účely této diplomové práce byly vynechány některé funkce GSH u savčích a rostlinných buněk, které jsou shrnuty v jiných review [128], [129].

Biosyntéza GSH probíhá ve dvou krocích (Obr. 11). Prvním krokem je vazba cysteinu na kyselinu glutamovou za katalýzy γ -glutamylcystein ligasou GshA, čímž vzniká již výše zmíněný intermediát γ -glutamylcystein. Ten je následně navázán amidovou vazbou na glycin enzymem glutathion synthetasou (GshB) a vzniká tak finální produkt, GSH [130].



Obr. 11: Biosyntéza glutathionu (GSH).

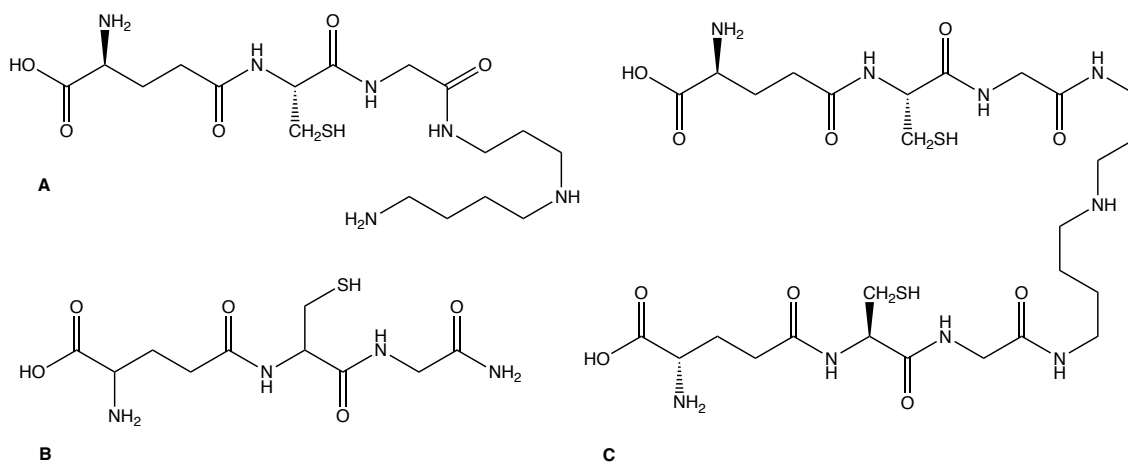
2.1.2.7 Deriváty glutathionu

Prvním uvedeným derivátem je glutathionamid (GASH, Obr. 12) produkovaný γ -proteobakteriemi *Allochromatium vinosum*, *Marichromatium gracile* a *Isochromatium buderi* za fotoheterotrofních podmínek a v prostředí s nízkou koncentrací sulfidů. Za dostatečného přístupu H₂S jako vodíkového donoru jsou tyto bakterie schopné vytvářet z GASH glutathionamid perthiol (GASSH) [131], díky čemuž je možné, že GASH je zapojen do metabolismu sulfidů vedoucího k tvorbě zásobních globulí se sírou [101]. Ta může být následně redukována na sulfid během transportu do cytoplazmy, kde slouží jako redukční činidlo pro fixaci oxidu uhličitého, a podle hypotézy by měla konverze GASH na GASSH být do tohoto transportu zapojena [131]. Redukci perthiolu na thiol katalyzuje enzym glutathionamid reduktasa [132].

Dalším derivátem je glutathionspermidin (GSP, Obr. 12), který je produkován bakterií *Escherichia coli* na začátku stacionární fáze růstu [133], a to především za anaerobních

podmínek [134]. GSP vzniká vazbou spermidinu na GSH katalyzovanou ATP-dependentní GSP syntetasou [135]. Bylo prokázáno, že tento enzym obsahuje C-terminální syntetasu a N-terminální amidasu, která dokáže vzniklý GSP zase rozštěpit na spermidin a GSH, a hraje tedy významnou roli v regulaci v množství GSP, GSH a spermidinu v buňce [136]. Za fyziologických podmínek má GSP kladný náboj, díky kterému by mohl mít také schopnost odstraňovat DNA radikály produkované radiací, obzvlášť, když k jeho produkci dochází během stacionární fáze bakteriálního růstu, která je spojena se zvýšenou potřebou ochrany DNA u nereplikujících se buněk [137].

Trypanothion je posledním uvedeným derivátem vytvořeným spojením GSH a GSP a jedná se tedy o dithiol, který je produkován protozoárními parazity *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* a *Leishmania spp.* [138]. Jeho přítomnost ale nebyla prokázána u prokaryot, dokonce ani u *E. coli*, která produkuje GSP [134]. Obvykle se vyskytuje v redukované formě (Obr. 12), která je udržována NADPH-dependentní trypanothion-disulfid reduktasou [139], u níž bylo prokázáno, že je nezbytným enzymem pro růst a přežití parazitů produkujících trypanothion [140]. Díky tomuto může být metabolismus trypanothionu a jeho reduktasa cílem pro léčiva proti trypanozomám, avšak pouze u některých látek bylo dosaženo kýženého efektu (např. klomipramin [141] nebo analogy febrifuginu [142]).



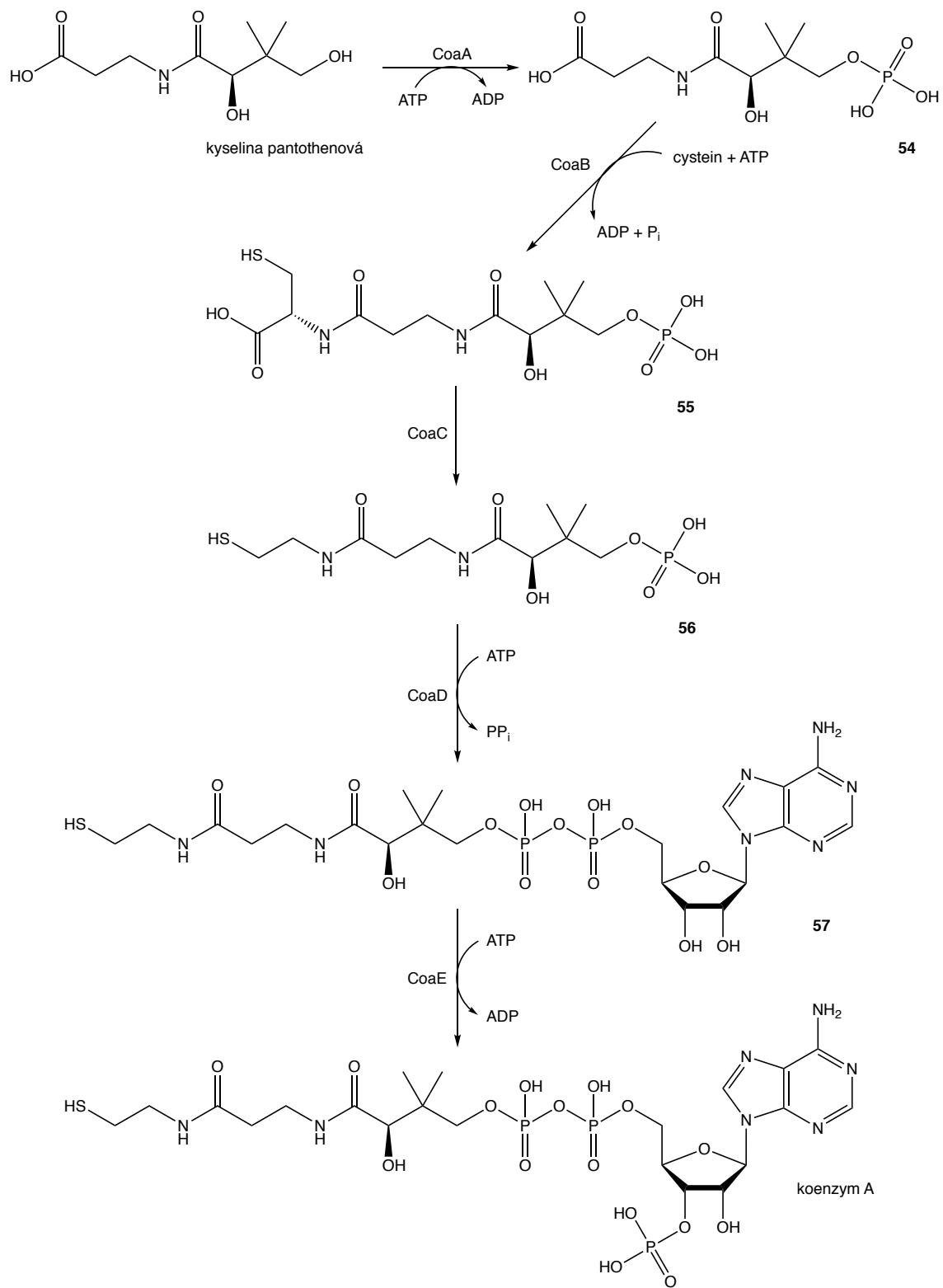
Obr. 12: Chemické struktury derivátů glutathionu. A – glutathionspermidin, B – glutathionamid, C – trypanothion.

2.1.2.8 Koenzym A (CoA)

Koenzym A (CoA) je esenciálním thiolem, který se jako významný kofaktor vyskytuje u všech živých organismů a který je zapojen do centrálních metabolických cest, jakými jsou např. citrátový cyklus a metabolismus mastných kyselin. Za fyziologických podmínek se nachází ve své méně reaktivní thiolové formě [61] a k auto-oxidaci v prostředí iontů těžkých kovů u něj dochází pomaleji, než u GSH [143]. Za redukci CoA-disulfidu je zodpovědná NAD(P)H-dependentní CoA-disulfid reduktasa, která byla izolována a charakterizována z bakterie *Staphylococcus aureus* [144], *Bacillus anthracis* [145], *Borrelia burgdorferi* [146] a *Pyrococcus horikoshii* [147], což naznačuje, že CoA by mohl disponovat vnitrobuněčnou redoxní funkcí u bakterií, které neprodukují GSH nebo MSH [61]. Bioinformatické analýzy odhalily přítomnost CoA-disulfid reduktasy u mnoha kmenů, mimo jiné i z domény Archea a také bylo zjištěno, že tyto enzymy redukují CoA-disulfid formací smíšeného disulfidu s proteinovým cysteinem [148].

Některé bakterie, které využívají CoA-disulfid reduktasu a CoA (např. *Bacillus anthracis* a *Staphylococcus aureus*), zároveň produkují i BSH, a to ve stejném či větším množství než CoA [109]. Nadbytek způsobený přítomností obou redoxních pufrů může poskytovat výhodu pro virulenci a/nebo přežití těchto patogenů i za nepříznivých oxidačních podmínek způsobených hostitelem [149]. Podobně bylo také u bakterie *Borrelia burgdorferi* prokázáno, že CoA a jeho disulfid reduktasa hrají roli v ochraně buňky a virulenci [150]. Podobně jako u některých dalších thiolů byla i u CoA prokázána jistá biosyntetická funkce. Tento thiol je postupně ve třech krocích štěpen na menší části, z nichž finální cysteamin (dekarboxylovaný cystein) je pak přímo zapojen do biosyntézy β -laktamového antibiotika thienamycinu [151].

Biosyntéza CoA vychází z kyseliny pantothenové (vitamin B₅) a probíhá v pěti krocích. Prvním z nich je fosforylace CoaA kinasou, čímž vzniká intermediát **54**, který je následně kondenzován s L-cysteinem a dochází k vytvoření amidové vazby za využití enzymu CoaB a ATP. V další reakci je vzniklý intermediát **55** dekarboxylován enzymem CoaC, čímž vzniká intermediát **56**, u něžž poté dochází ke konverzi na intermediát **57** enzymem CoaD, Mg²⁺-dependentní transferasou, která připojuje AMP jednotku k intermediátu **56**. Finálním krokem je fosforylace enzymem CoaE za vzniku CoA [152].



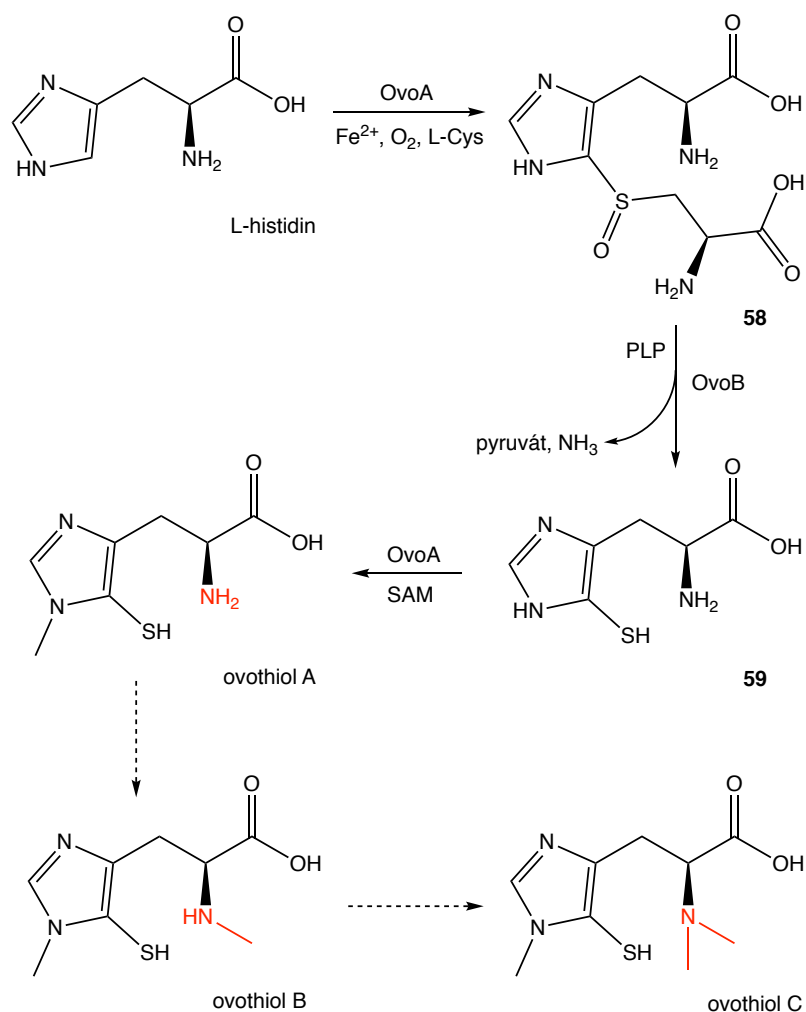
Obr. 13: Biosyntéza koenzymu A vycházející z kyseliny pantothenové.

2.1.2.9 Ovothioly

Ovothioly jsou skupina tří látek, které jsou stejně jako ESH deriváty L-histidinu, lišící se od sebe stupněm *N*-methylace (ovothiol A-C) [61]. Vyskytují se především v prostředí moří a oceánů, konkrétně u ostnokožců [153], různých bezobratlých živočichů [154], halotolerantních Cyanobakterií [155] a také, podobně jako trypanothion, u parazitů *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma cruzi* a *Leishmania spp.* [138]. Ovothioly mají podobně jako ESH vysoký redoxní potenciál, tudíž jsou jako disulfidy velmi nestabilní a rychle se regenerují thiol-disulfidovou výměnou s jinými thioley, např. GSH [156]. Znamená to tedy, že za fyziologických podmínek se vyskytují jako thiolátové anionty [61].

Ovothioly slouží podobně jako ostatní thioley především k ochraně proti oxidativnímu stresu, ale jsou schopné fungovat i jako signální molekuly nebo jako prekurzory komplexnějších molekul [157]. Ovothiol A je součástí struktury např. adenochromu, fialového pigmentu získávaného z chobotnice pobřežní [158], nebo imbricatinu, což je cytotoxický alkaloid produkovaný hvězdicí *Dermasterias imbricata* [159]. Přítomnost ovothiolu A jako hlavního nízkomolekulárního thiolu protozoárního parazita *Crithidia fasciculata* byla prvním náznakem, že ovothioly nejsou součástí pouze mořských druhů organismů, a položila tak otázku, zda tyto thioley mohou mít vliv na onemocnění způsobená výše uvedenými prvky, případně určitý terapeutický účinek [157].

Biosyntéza ovothiolu A (Obr. 14) je stejně jako jeho struktura podobná biosyntéze ESH. Významný enzym této dráhy, OvoA, byl navíc objeven při hledání EgtB homologů [160] a je katalyzátorem hned prvního kroku biosyntézy. Stejně jako C-S oxidasy u ESH, využívá železnaté ionty a kyslík ke katalýze tvorby C-S vazby a L-cystein jako zdroj síry ke vzniku intermediátu **58** [160]. Tento intermediát je pak rozštěpen PLP-dependentní sulfoxid lyasou OvoB, což je reakce analogická k reakcím katalyzovaným enzymy EgtE (případně Egt2) v biosyntéze ESH, přičemž tak vzniká intermediát **59** a odstupuje pyruvát a amoniak [161]. Poslední reakci biosyntézy ovothiolu A katalyzuje opět enzym OvoA, který tak uplatňuje svou methyltransferasovou aktivitu v přítomnosti intermediátu **59** a SAM [161]. Enzym, který by katalyzoval přenos methylové skupiny na α -aminoskupinu ovothiolu A a vytvořil tak ovothiol B, případně C, nebyl doposud objeven [157].

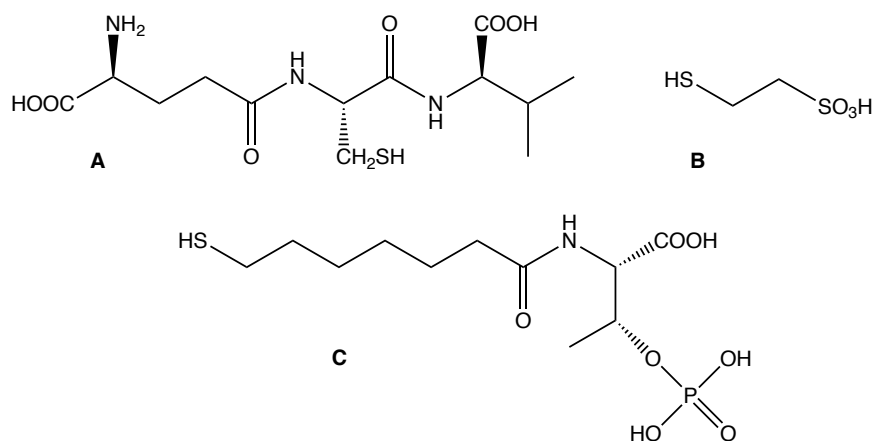


Obr. 14: Biosyntéza ovothiolu A a následující kroky biosyntézy ovothiolu B a C. Červeně vyznačený amin je místem rozdílu mezi jednotlivými thioley.

2.1.2.10 Ostatní thioley

Koenzym B (CoB) a koenzym M (CoM) jsou thiolové kofaktory účastnící se finálních kroků produkce methanu u methanogenních bakterií [162], [163], ale přítomnost CoM byla také potvrzena u gramnegativní bakterie *Xanthobacter* (kmen Py2), kde hraje roli jako koenzym v metabolismu krátkých alkenů [164].

Posledním uvedeným thiolem je δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyln-D-valin (ACV), který je svou chemickou strukturou velmi podobný GSH a je produkován některými streptomycetami jako intermediát biosyntézy β -laktamových antibiotik [101]. Jeho role jako antioxidantu ale nebyla potvrzena, protože jeho produkce oproti MSH je velmi nízká a dochází k ní až na konci exponenciálního růstu buňky [94].



Obr. 15: Chemické struktury ostatních thiolů. A – δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin, B - koenzym M, C - koenzym B.

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato kapitola se zabývá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), jejími vybranými módy a detekcí. HPLC je jednou z nejznámějších a nejvyspělejších instrumentálních analytických metod široce využívaných k separaci, kvantifikaci a identifikaci látek. Charakteristickým rysem této metody je její spolehlivost, zajištěná plnou automatizací a tlakem kontrolovaným průtokem mobilní fáze (MF), a všestrannost, která spočívá v možnosti výběru stacionární a mobilní fáze. Metoda HPLC je běžně používána ve farmaceutickém průmyslu, environmentálních a toxikologických analýzách či při analýze potravin [165].

Pro HPLC jsou typické chromatografické kolony s délkou 30-300 mm, vnitřním průměrem 2,1-4,6 mm a velikostí částic stacionární fáze (SF) 3-10 μ m. Základním uspořádáním HPLC je použití polární SF a nepolární MF, poté se jedná o chromatografii na normálních fázích (NP-HPLC), nebo použití nepolární SF a polární MF, což je chromatografie na reverzích fázích (RP-HPLC) [166]. U NP-HPLC je typickou MF směs nepolárních a méně polárních organických rozpouštědel (např. hexan) a jako SF je nejčastěji používán silikagel, případně alumina [167]. Pro RP-HPLC je využívána kombinace vodné složky a organického modifikátoru (acetonitril, methanol) jako MF a pro SF jsou modifikované silikagelové sorbenty s vazbou na různé ligandy (alkylové, arylové), přičemž nejběžnějším z nich je oktadecylová skupina (C18) [166].

2.2.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Snaha o zvýšení separační účinnosti HPLC metod vedla k vývoji nové, účinnější metody ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), která využívá kratší a užší kolony naplněné částicemi menšími než 2 μm (sub-2 μm částice). Takovými typem hybridní SF jsou např. BEH částice, jejichž zvýšená mechanická a chemická stabilita spočívají v zesíťování ethylenovými můstky [168]. Na BEH sorbent je navázán ligand rozhodující o selektivitě, např. oktylová a oktadecylová skupina, fenyl nebo amidová skupina [169]. Alternativou k celoporézním sub-2 μm částicím jsou povrchově porézní částice (core-shell), které se skládají z pevného jádra a tenké porézní vrstvy modifikovaného silikagelu. Tyto částice nezpůsobují tak vysoký zpětný tlak v koloně, tudíž jsou na rozdíl od BEH kompatibilní s HPLC systémem, a to i se zachováním vysoké účinnosti a citlivosti [170].

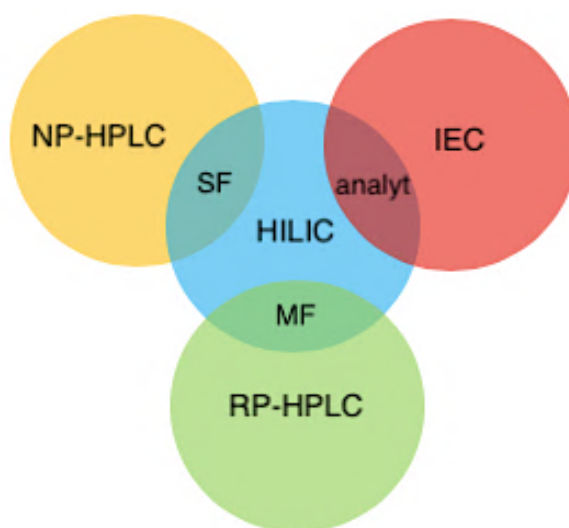
2.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je jednou z moderních variant kapalinové chromatografie. V podstatě se jedná o kombinaci tří módů, HPLC na normálních a reverzních fázích a iontově výměnnou chromatografií (Obr. 16), které nabízejí alternativní přístup k efektivní separaci malých polárních molekul [171]. K tomu jsou využívány polární SF, které jsou běžné pro NP-HPLC, a MF, které jsou velmi podobné těm, používaným v RP-HPLC módu. HILIC mód navíc umožňuje separovat nabitě analyty, stejně jako iontově výměnná chromatografie (IEC) [171].

HILIC má ale oproti normálnímu a reverznímu módu řadu výhod. Např. je vhodný pro analýzu látek v komplexních systémech, které často eluují blízko mrtvého času při použití reverzní fáze. Polární látky se vždy dobře rozpouštějí ve vodné mobilní fázi, která se používá u HILIC, což je výhoda oproti NP-HPLC, kde je špatná rozpustnost častým problémem. Zároveň není potřeba používat ion-párová činidla, tudíž je tato metoda vhodná pro použití v kombinaci s MS, obzvláště s elektrosprejovým ionizátorem [171].

SF pro HILIC je podobného charakteru jako u NP-HPLC a nejčastěji se jedná o běžnou silikagelovou kolonu nebo silikagelovou kolonu modifikovanou polárními funkčními skupinami. Speciálním příkladem HILIC kolony je HILIC-Diol, jejíž SF obsahuje silikagel modifikovaný dihydroxypropylovými skupinami poskytujícími vysokou polaritu, možnost tvorby vodíkových můstků a vysokou reprodukovatelnost. Tento typ

SF je ideální pro polární sloučeniny, které nejsou zadržovány na RP-HPLC, a pro široký rozsah pH MF. Jiným speciálním případem je kolona HILIC-Z (nebo ZIC-HILIC), která obsahuje zwitterionickou sulfoalkylbetainovou SF. Ta obsahuje silně kyselou i silně bazickou funkční skupinu (sulfonová kyselina a kvartérní amin), jež na sebe vodíkovými můstky vážou molekuly vody, přičemž výsledná vodná vrstva je zapojována do kontroly retenční mechanismy. Tato kolona je vhodná pro široké rozmezí pH a díky použití organických MF je ideální pro spojení s MS detekcí, poskytující vysokou citlivost měření [171].



Obr. 16: Schéma komponent společných pro HILIC a ostatní módy.

2.2.3 Detekce v kapalinové chromatografii

Mezi běžné detektory používané ve spojení s HPLC patří např. UV/VIS absorpční detektor, fluorescenční detektor, detektor s diodovým polem (DAD), různé elektrochemické detektory nebo hmotnostní spektrometr (MS) [167]. Pro účely této diplomové práce se budu zabývat pouze UV/VIS (DAD) a MS detektory.

Zaručeně jedním z nejpoužívanějších detektorů je UV/VIS absorpční detektor, jehož odpověď je přímo závislá na koncentraci analytu a je tak pomocí Lambert-Beerova zákona získávána kvantitativní informace o zkoumané látce. Tento typ detektoru pracuje vždy pro určitou vybranou vlnovou délku, je citlivý a nedestruktivní. Naopak detektor s diodovým polem (DAD), který funguje na stejném principu, měří v rozsahu celého spektra. Detekce za použití těchto detektorů je určena především pro analyty se systémem

konjugovaných dvojných vazeb, který je zodpovědný za absorpci v určité oblasti světa [167].

Jiným velmi využívaným detektorem je hmotnostní spektrometr (MS), který se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Analyt je nejprve převeden v iontovém zdroji na ionty v plynné fázi, které jsou unášeny do analyzátoru, v němž jsou rozděleny podle poměru hmotnosti ku náboji (m/z), a na závěr prochází do detektoru. MS je tedy schopen podávat informace kvalitativního i kvantitativního charakteru a hodí se pro stanovení elementárního složení vzorku či pro objasnění chemické struktury malých i velkých molekul. Pro spojení HPLC s MS je vhodné použití reverzního módu, pro jehož MF jsou typická těkavá rozpouštědla usnadňující odpařování a ionizaci analytů [172].

Nejčastěji používanými iontovými zdroji ve spojení s HPLC jsou elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Jako analyzátor se většinou vybírá analyzátor doby letu (TOF), který má široký hmotnostní rozsah, případně také kvadrupólový analyzátor, iontová past nebo orbitrap [167], [173]. Moderní hmotnostní spektrometry ale mohou také být sestaveny z více než jednoho analyzátoru, a poté mluvíme o tandemové či vícerozměrné hmotnostní spektrometrii MS/MS, která nabízí další módy v měření. Mezi typické příklady patří trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól-TOF (Q-TOF) nebo TOF/TOF [173].

2.3 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi (SPE) je technika používaná k oddělení rozpuštěných látek od matrice vzorku selektivními interakcemi a retencí na pevné fázi. Mechanismem SPE je rozdíl v afinitách jednotlivých komponent vzorku k sorbentu, který může být založen na odlišné adsorpci, velikosti části či náboji. Odlišná selektivita pak může být dosažena změnou pH, složením rozpouštědla a použitím odlišného sorbentu. SPE je hojně využívána k přečištění vzorku před samotnou chromatografickou analýzou anebo jako prekoncentrační krok pro stopová množství analytů [167].

Sorbenty pro SPE jsou obvykle silikagely nebo chemicky modifikované silikagely s alkylovými řetězci (C_8 a C_{18}), fenylem, amino nebo iontově výměnnými skupinami. Podle sorbentu jsou pak rozlišovány interakční mechanismy, kterými jsou analyty zachycovány. Mezi nejběžnější patří adsorpce, vodíkové vazby, van der Waalsovy a π - π interakce, výměna iontů, případně jejich kombinace [167].

3 Experimentální část

3.1 Bakteriální kmeny

Tab. 1: Přehled použitých bakteriálních kmenů s uvedeným kódem laboratorní databáze, produkovaným linkosamidem a sbírkovým kódem.

Kmen	Linkosamid	Kód
<i>Streptomyces lincolnensis</i> $\Delta lmbC$ kC 1	-	M0030
<i>Streptomyces lincolnensis</i> $\Delta lmbD$ kD 1	-	M0033
<i>Streptomyces lincolnensis</i> $\Delta lmbN$ jN	-	M0054
<i>Streptomyces lincolnensis</i> $\Delta lmbN$ jN ac	-	M0055
<hr/>		
<i>Streptomyces lincolnensis</i> DSM 40355	linkomycin	C0020
<i>Streptomyces caelestis</i> DSM 40084	celesticetin	C0021
<i>Rhodococcus</i> sp. 06-235-1A	intervencin	C0071
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) DSM 40783	-	C0016

3.2 Chemikálie

- Acetonitril LC-MS grade, 99,95 % (Biosolve, Nizozemsko)
- Monobromobiman, ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda Milli-Q (HPLC/UHPLC), (Millipore, USA)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, ≥ 99 % (Lach-Ner, Česká republika)
- Ergothionein, ≥ 98 % (Cayman Chemical, USA)
- Glukosa, ≥ 99 % (Lach-Ner, Česká republika)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, 99,5 % (Merck, Německo)
- Heptahydrát síranu manganatého, 99–101 % (Merck, Německo)
- Heptahydrát síranu zinečnatého, 99 % (Lachema, Česká republika)
- Heptahydrát síranu železnatého, ≥ 99 % (Penta, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan draselný, 99 % (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný, $\geq 98,5$ % (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid amonný, 28-30 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný, 99,5 % (Lachema, Česká republika)
- Kukuřičný příkrm (Sigma-Aldrich, USA)

- Kvasničný extrakt, $\geq 99\%$ (Oxoid, Velká Británie)
- Kyselina mravenčí, $\geq 99\%$ (VWR, USA)
- Kyselina octová, 99% (VWR, USA)
- Kyselina *p*-toluensulfonová, 95% (Sigma-Aldrich, USA)
- Leucin-enkefalin acetát, $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol LC-MS grade, $99,95\%$ (Biosolve, Nizozemsko)
- Pepton (VWR, USA)
- Sacharosa, $\geq 99,8\%$ (Lach-Ner, Česká republika)
- Síran amonný, $\geq 99\%$ (Lachema, Česká republika)
- Sladový extrakt, $\geq 99\%$ (Oxoid, Česká republika)
- Sójová moučka (Paleta, Česká republika)
- TRIS, biotechnology grade (VWR, USA)
- Uhličitan vápenatý, $\geq 95\%$ (Lachema, Česká republika)

3.3 Kultivační média

Tab. 2: Příprava tekutého AVM média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
CaCO ₃	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
kvasničný extrakt	2
NaCl	2
K ₂ HPO ₄	0,5
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05
deionizovaná voda*	do objemu 880 ml
25% roztok glukosy**	120 ml

* Po přidání deionizované vody bylo pH média upraveno na hodnotu 7,4.

** Roztok glukosy byl přidán až po sterilizaci média.

Tab. 3: Příprava tekutého GYM média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
kvasničný extrakt	4
sladový extrakt	10
glukosa	10
deionizovaná voda*	do objemu 1000 ml

* Po přidání deionizované vody bylo pH média upraveno na hodnotu 7,2.

Tab. 4: Příprava tekutého YEME média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
kvasničný extrakt	3
pepton	5
sladový extrakt	3
sacharosa	100
glukosa	10
deionizovaná voda*	do objemu 1000 ml
2,5M roztok MgCl ₂ **	2 ml

* Po přidání deionizované vody bylo pH média upraveno na hodnotu 7,2.

** Roztok MgCl₂ byl přidán až po sterilizaci média.

Tab. 5: Příprava tekutého FM média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
glukosa	100
sójová moučka	25
kukuřičný příkrm	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	8
KH ₂ PO ₄	0,2
NaNO ₃	8
NaCl	5
CaCO ₃	8
deionizovaná voda*	do 1000 ml

* Po přidání deionizované vody bylo pH média upraveno na hodnotu 7,0.

Tab. 6: Příprava tekutého BG média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
kvasničný extrakt	4
sladový extrakt	10
glukosa	4
CaCO ₃	2
deionizovaná voda*	doplněno do 1000 ml

* Po přidání deionizované vody bylo pH média upraveno na hodnotu 7,2.

3.4 Pufry

- Octan amonný – titrace kyseliny octové o požadované koncentraci 32% vodným roztokem hydroxidu amonného
- Mravenčan amonný – titrace kyseliny mravenčí o požadované koncentraci 32% vodným roztokem hydroxidu amonného
- Tris-HCl – připraven Mgr. Lucií Steiningerovou
- Fosfátový pufir pH 8 – připraven smícháním 47,35 ml 0,2M roztoku hydrogenfosforečnanu sodného a 2,65 ml 0,2M roztoku dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, doplněno do 100 ml deionizovanou vodou

3.5 Instrumentace

- Acquity UHPLC (Waters, USA), detektor s diodovým polem DAD eλ (rozsah vlnových délek: 190-800 nm) a hmotnostní detektor LCT Premier XE (ESI iontový zdroj, TOF analyzátor)
- HPLC Alliance (Waters, USA), PDA detektor 2998 (rozsah vlnových délek: 194-600 nm)
- Sběrač frakcí Fraction Collector III (Waters, USA)
- pH metr Hanna (Hanna instruments, USA)
- Sonikátor Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer Instruments, USA)
- Rotační inkubační třepačka (Infors, Švýcarsko)
- Centrifuga miniSpin (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer PX124 (OHAUS, USA)

- Vakuový evaporátor Concentrator plus (Eppendorf, Německo)
- Rotační vakuová odparka R-215 (Büchi Labortechnik AG, Švýcarsko)
- Peristaltická pumpa P-1 (Pharmacia, Švédsko)
- Chlazená centrifuga Jouan MR23i (Thermo Scientific, USA)

3.6 Zpracování dat a software

- Empower 3 (Waters)
- ChemDraw Professional 16.0
- Mass Lynx™ V4.1 (Waters)

3.7 Metody použité k produkci a purifikaci intermediátu 28

3.7.1 Kultivace kmenů pro produkci intermediátu 28

Zkoumané mutantní kmeny, u nichž je deletován vždy jeden gen kódující enzym LmbD nebo některý z enzymů aktivující aminokyselinu před jejím vstupem do kondenzace, jsou uvedeny v první části Tab. 1. První generace těchto kmenů byla z předem připravených agarových misek inokulována do tekutého YEME nebo GYM média, v nichž byla kultivována v rotační inkubační třepačce (180 RPM, 28 °C) po dobu čtyř dnů. Poté byl 1 ml od každé kultury použit pro inokulaci druhé generace do AVM, FM nebo BG média, přičemž kmeny byly kultivovány za stejných podmínek po dobu devíti dnů.

3.7.2 Extrakce médií obsahujících intermediát 28

Po kultivaci byly buňky sklizeny centrifugací (4000 RPM, 4 °C, 15 min) a médium bylo extrahováno na pevné fázi s využitím kolonek Oasis MCX 3cc (60 mg) a Oasis WCX 3cc (60 mg) (postup v Tab. 7 a 8) a poté na koloně naplněné sorbentem Alfa Aesar™ Amberlit XAD-4 (Thermo Fisher Scientific, Německo), kde byl průtok korigován peristaltickou pumpou P-1 (Pharmacia, Švédsko) (postup v Tab. 9). Takto upravené médium bylo odpařováno na rotační vakuové odparce (200 RPM, 40 °C) do objemu 2 ml a intermediát **28** následně purifikován metodou HPLC s PDA detektorem.

Tab. 7: Postup extrakce na pevné fázi za použití Oasis MCX 3cc sorbentu.

Název látky	Objem [ml]
methanol	3,0
2% vodný roztok kyseliny mravenčí	3,0
vzorek	3,0
2% vodný roztok kyseliny mravenčí	3,0
methanol	1,5
methanol:29% NH ₄ OH (95:5 v/v)	1,5

Tab. 8: Postup extrakce na pevné fázi za použití Oasis WCX 3cc sorbentu.

Název látky	Objem [ml]
methanol	3,0
100mM fosfátový pufr, pH 8	3,0
vzorek	3,0
100mM fosfátový pufr, pH 8	3,0
methanol	1,5
2% vodný roztok kyseliny mravenčí	1,5

Tab. 9: Postup extrakce na pevné fázi se sorbentem Amberlit XAD-4 (výška sloupce 10 cm, průměr 5 cm), průtok 5 ml · min⁻¹.

Název látky	Objem [ml]
methanol	300
0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí	300
kultivační médium obsahující intermediát 28 *	450
0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí	300
methanol:0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (50:50 v/v)	300
methanol	300

* Médium bylo před extrakcí upraveno kyselinou mravenčí na pH 3.

3.7.3 Preparativní HPLC metody pro izolaci intermediátu 28

Testované preparativní metody HPLC s UV/VIS detekcí pro izolaci intermediátu **28** za použití Triart Diol-HILIC kolony 250×20 mm, 5µm částice (YMC, Japonsko) a lineární

gradientové eluce: 0/95; 5,0/95; 28,6/30; 32,0/95 ([min]/obj. % složky B), dávkovaný objem vzorku 100-150 μl :

- dvousložková mobilní fáze 50mM octan amonný pH 4,7 (složka A) a acetonitril (složka B), průtok mobilní fáze $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- třísložková mobilní fáze 50mM octan amonný pH 8,0 (složka A), acetonitril (složka B) a methanol (složka C, izokraticky 5 obj. %), průtok mobilní fáze $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Pro stejnou chromatografickou kolonu a dvousložkovou mobilní fázi ve složení 50mM octan amonný pH 4,7 (složka A) a acetonitril (složka B) byly testovány také izokratické podmínky, A:B 55:45 (v/v) a 45:55 (v/v), průtok mobilní fáze $7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Testována byla také chromatografická kolona Luna 5u C18(2) kolona $250 \times 15 \text{ mm}$ $5 \mu\text{m}$ částice (Phenomenex, USA), s následujícími podmínkami: dvousložková mobilní fáze 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (složka A) a methanol (složka B), lineární gradientová eluce: 0/95; 5/95; 25/45; 30/0; 35/95 ([min]/obj. % složky A), průtok mobilní fáze $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.7.4 UHPLC-DAD-MS analýzy intermediátu 28

Podmínky analýzy intermediátu **28**: Acquity UHPLC CSH™ C18 chromatografická kolona $50 \times 2,1 \text{ mm}$, velikost částic $1,7 \mu\text{m}$ (Waters, USA), teplota na koloně $40 \text{ }^\circ\text{C}$, dvousložková mobilní fáze 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (složka A), methanol (složka B), lineární gradientová eluce: 0/5; 1,5/5; 4,0/17; 5,5/99; 7,0/5 ([min]/obj. % složky B), průtok mobilní fáze $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $5 \mu\text{l}$. Nastavení parametrů MS je uvedeno v Tab. 10.

Tab. 10: Nastavení parametrů na MS v režimu ESI+.

Parametr	Hodnota
Rozsah měřených hodnot m/z	50-1000
Referenční látka (leucin-enkefalin)	2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Průtok referenční látky	5 $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$
Napětí vložené na kapiláru	+2800 V
Napětí vložené na vstup do analyzátoru	+40 V
Doba skenu	0,15 s
Doba mezi skeny	0,01 s
Průtok desolvatačního plynu (dusík)	800 $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
Průtok dusíku při vstupu do analyzátoru	50 $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
Teplota dusíku	350 °C
Teplota bloku iontového zdroje	120 °C

Pro fragmentační analýzu byla použita chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z kolona 2,1×100 mm, velikost částic 2,7 μm (Agilent Technologies, USA), teplota na koloně 30 °C, dvousložková mobilní fáze 100mM mravenčan amonný pH 4,7 (složka A), ACN:100mM mravenčan amonný pH 4,7 9:1 (v/v) (složka B), lineární gradientová eluce: 0/99; 1/99; 10/60; 12/60; 15/99 ([min]/obj. % složky B), průtok mobilní fáze 0,4 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný objem 5 μl . Parametry nastavené na MS při měření fragmentační analýzy byly shodné s hodnotami uvedenými v Tab. 10, pouze s tím rozdílem, že zde bylo navíc vloženo napětí 50 V (aperture voltage).

3.8 Postup stanovení ESH a MSH u různých bakteriálních kmenů rodu *Streptomyces*

3.8.1 Kultivace bakteriálních kmenů

Bakteriální kmeny (druhá část Tab. 1) byly inokulovány z agarových misek do GYM médií a poté byly odebírány vždy 2 ml těchto médií s buňkami v různých časových intervalech. Kmen C0016, který není producentem žádného linkosamidu, sloužil jako referenční kmen. Kultivace probíhala v rotační inkubační třepačce (180 RPM, 28 °C).

3.8.2 Extrakce médií s linkosamidy

Média odebíraná v různých časových intervalech byla pro analýzu linkosamidů nejprve centrifugována (13400 RPM, 5 min), následně extrahována pomocí SPE na Oasis HLB 3cc (60 mg) sorbentu (postup v Tab. 11) a analyzována na UHPLC-DAD-MS.

Tab. 11: Postup extrakce na pevné fázi za použití Oasis HLB 3cc sorbentu.

Název látky	Objem [ml]
methanol	1,0
deionizovaná voda	1,0
kultivační médium	1,0
deionizovaná voda	1,0
methanol	0,5

3.8.3 Derivatizace thiolů pomocí monobromobimanu

Při požadovaném množství linkosamidů v kultivačním médiu byly následujícím způsobem analyzovány thioly. Přebytečné kultivační médium bylo odstraněno ze zkumavek, odebrané buňky byly desintegrovány a v nich obsažené thioly derivatizovány metodou založenou na postupu z článku [94]. Do zkumavek s buňkami bylo přidáno 0,5 ml derivatizačního činidla o teplotě 60 °C (50% vodný acetonitril s 20mM Tris-HCl pufrém pH 8, monobromobimán o koncentraci 2 mM), poté byla tato směs sonikována 20 s a zahřívána 15 min ve tmě v 60°C vodní lázni. Výsledný vzorek byl okyselen 50 µl 5M roztoku *p*-toluensulfonové kyseliny rozpuštěné v 50% vodném acetonitrilu s 20mM Tris-HCl pufrém o pH 8. Vzorek byl opět centrifugován (13400 RPM, 5 min) a následně analyzován metodou UHPLC-DAD-MS. Zároveň byl připraven i vzorek derivatizovaného standardu ESH: ke 100 µl standardního roztoku ESH o koncentraci 0,5 mg · ml⁻¹ bylo přidáno 10 µl horkého (60 °C) derivatizačního činidla. Směs byla následně zahřívána 15 min v 60°C vodní lázni ve tmě.

3.8.4 UHPLC-DAD-MS analýza linkosamidů a derivatizovaných thiolů

Linkosamidy v extraktech médií C0020, C0071 byly analyzovány na UHPLC-DAD-MS za těchto podmínek: Acquity UHPLC CSH™ C18 separační kolona 50×2,1 mm, velikost částic 1,7 µm (Waters, USA), teplota na koloně 30 °C, dvousložková mobilní váze 1mM

mravenčan amonný pH 9 (složka A) a acetonitril (složka B), lineární gradient: 0/5,0; 1,5/5,0; 8,0/36,3; 9,5/99,0; 11,0/5,0 ([min]/obj. % složky B), průtok mobilní fáze 0,4 ml · min⁻¹ a dávkovaný objem 5 µl. Pro analýzu celesticetinu v extraktu média C0021 byly použity stejné podmínky, pouze byla změněna teplota na koloně na 40 °C a složení mobilní fáze: 0,1% mravenčí kyselina (složka A), acetonitril (složka B). Za těchto podmínek probíhala i analýza derivatizovaných thiolů. Nastavení parametrů na MS odpovídalo hodnotám uvedeným v Tab. 10.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Purifikace intermediátu 28

Prvním krokem k úspěšné purifikaci substrátu pro enzym LmbD (dále jen intermediátu **28**, struktura v Obr. 5) bylo testování vhodného sorbentu pro extrakci na pevné fázi, Oasis MCX 3cc (60 mg) a Oasis WCX 3cc (60 mg). Zároveň s touto první kultivací byly hledány vhodné podmínky pro analýzu intermediátu na UHPLC-DAD-MS, aby bylo možné sledovat jeho množství během celého procesu purifikace. Jako vhodnější sorbent pro extrakci se osvědčil Oasis MCX, kdy bylo možné v eluátu detekovat pomocí UHPLC-DAD-MS s C₁₈ kolonou relativně vysoké množství intermediátu **28**, zatímco po extrakci s Oasis WCX 3cc bylo množství hledaného intermediátu pouze stopové.

Po nalezení úspěšné extrakční a analytické metody pro intermediát **28** bylo cílem najít vhodný mutantní kmen bakterie *Streptomyces lincolnensis*, který bude produkovat nejvyšší množství intermediátu **28**, poté optimální kultivační médium pro produkci této látky a metody pro její purifikaci.

Z bakteriálních kmenů uvedených v první části Tab. 1 se jako ideální producent osvědčil kmen *Streptomyces lincolnensis* $\Delta lmbN$ jN ac (M0055), kdy v druhé generaci kultivované v médiu AVM a FM bylo po devíti dnech kultivace naměřeno vzhledem k ostatním kmenům nejvyšší množství intermediátu **28** (Tab. 13). K analýzám byla použita metoda UHPLC-DAD-MS za podmínek uvedených v oddílu 3.7.4.

Tab. 12: Přehled detekovaných pseudomolekulárních iontů intermediátu **28** ($m/z = 435,19$) v AVM a FM médiu.

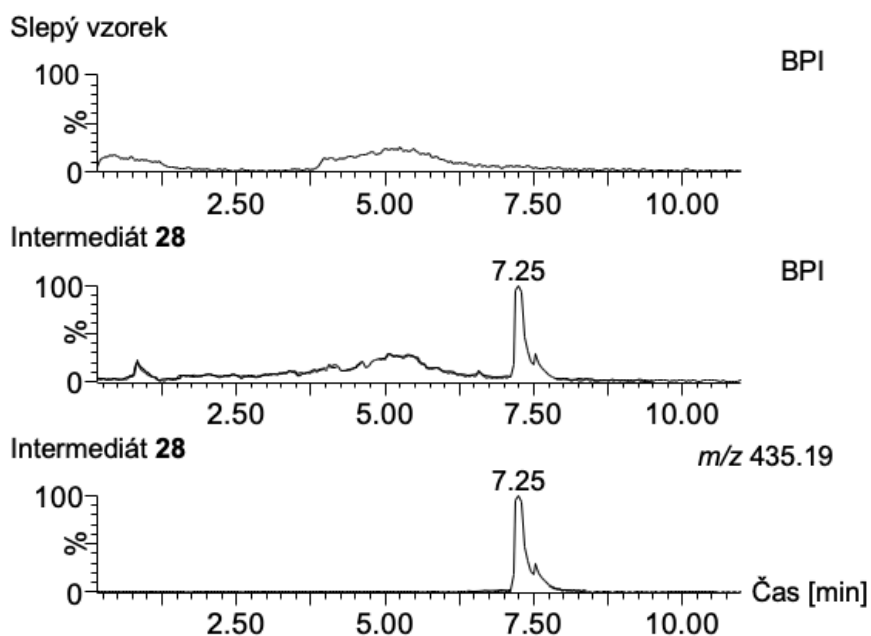
Počet detekovaných iontů $[M+H]^+$ ve vrcholu elučního píku		
Kmen	médium AVM	médium FM
M0030	$1,9 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^2$
M0033	$1,6 \cdot 10^2$	67
M0054	30	65
M0055	$1,6 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^2$

S kmenem M0055 byla testována další dvě kultivační média, GYM pro první generaci a BG pro druhou generaci, z nichž se ale ani jedno neprokázalo jako optimální. Jako

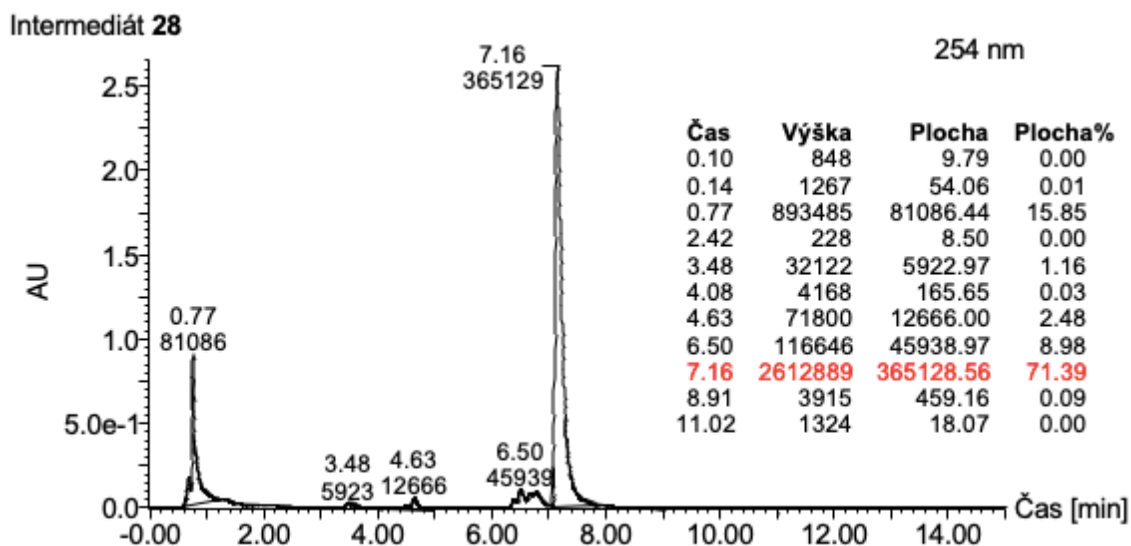
nejvhodnější kultivační médium se osvědčilo původně zvolené médium AVM, v němž docházelo k nejvyšší produkci intermediátu **28**.

Po otestování všech podstatných parametrů a metod bylo přistoupeno ke kultivaci ve větším měřítku. Kmen M0055 byl kultivován v AVM médiu (druhá generace) po dobu šesti dní, přičemž z kultivace bylo získáno 1800 ml čistého média bez buněk, z něhož byla požadovaná látka následně purifikována. Prvním purifikačním krokem byla extrakce na pevné fázi se sorbentem Amberlit, který funguje na mechanismu reverzní fáze a zachytává relativně nepolární nenabitě látky. Polární intermediát **28** s tímto sorbentem neinteragoval, procházel rovnou do eluátu a byl tak oddělen od řady látek nacházející se v matrici kultivačního média. Druhým krokem byla již otestovaná extrakce na pevné fázi s Oasis MCX 20 cc sorbentem, který je silným měničem kationtů a liší se od Oasis MCX 3cc pouze větším množstvím tohoto sorbentu. Během této extrakce jsou zadržovány kladně nabitě látky, např. látky s bazickými skupinami v kyselém prostředí. Díky kladnému náboji by se sorbentem MCX měl interagovat také intermediát **28**. K eluci substrátu byla použita směs methanolu a hydroxidu amonného, čímž došlo k uvolnění vazeb kladně nabitých látek se sorbentem. Takto upravený vzorek stále představoval velmi složitou matrici a bylo tedy potřeba přistoupit k řádově účinnějšímu separačnímu kroku. Vzhledem k náboji a polaritě intermediátu **28** byla pro první preparativní metodu zvolena Actus Triart Diol-HILIC separační kolona s dvousložkovou mobilní fází, 50mM octan amonný pH 4,7 (složka A) a acetonitril (složka B), a lineární gradientovou eluci. Retence analytu byla dostatečná (29 min), aby byl vzorek očištěn od významné části matrice. Analyt ale stále nedosahoval kýžené čistoty, a proto byly testovány i další podmínky pro preparaci metodou HPLC. První variantou byla Luna 5u C18(2) separační kolona, kde nebyla očekávána výrazná interakce s intermediátem **28**, ale naopak právě s látkami z matrice vzorku. Metoda bohužel nebyla úspěšná, protože se nepodařilo hledaný analyt vůbec detekovat v žádné ze získaných frakcí eluátu. Do testování se tedy vrátila separační kolona Actus Triart Diol-HILIC, která v prvním purifikačním kroku poskytla dobré výsledky, avšak tentokrát s použitím izokratického módu, jehož výsledky ale nebyly z důvodu posunu retenčních časů za těchto podmínek reprodukovatelné. Poslední variantou tedy byla změna mobilní fáze, která v tomto kroku čítala tři složky, 50mM octan amonný pH 8,0 (složka A), acetonitril (složka B) a methanol (složka C). Tyto podmínky se ukázaly pro preparaci intermediátu **28** jako vyhovující. Finální

metodou purifikace byla znovu extrakce se sorbentem Oasis MCX 3cc, která očistila vzorek od solí a pufrů použitých během předchozích purifikačních kroků. Pro závěrečnou kontrolu čistoty intermediátu **28** byla použita metoda UHPLC-DAD-MS s HILIC-Z chromatografickou kolonou, která s intermediátem **28** interaguje mnohem silněji než kolona s C₁₈ sorbetem. U C₁₈ eluuje hledaný intermediát téměř s mrtvým časem, zatímco s použitím kolony HILIC-Z se retenční čas intermediátu posouvá až na sedmou minutu. Na Obr. 17 je chromatogram extrahovaný pro pseudomolekulární ion intermediátu **28** (m/z 435,19 ± 0,04), BPI chromatogram intermediátu **28** a slepého vzorku. Z těchto chromatogramů je vidět, že signál okolo páté minuty není nečistotou ve vzorku purifikovaného intermediátu **28**, protože je patrný i ve slepém vzorku, a jedná se tedy o systémový signál způsobený pravděpodobně nečistotami v mobilní fázi. Čistota purifikovaného intermediátu **28** byla vypočítána z plochy píku při vlnové délce $\lambda = 254$ nm (Obr. 18). Podle výpočtu provedeného pomocí MassLynx V4.1 je čistota intermediátu 71,4 %. Pro srovnání je zobrazen i chromatogram slepého vzorku při stejné vlnové délce. Čistota získaného intermediátu by mohla být ještě navýšena provedením dalšího kroku purifikace metodou preparativní HPLC s jinou mobilní fází a experimentálními podmínkami, než které byly uvedené v této diplomové práci. Vzhledem k účelu, ke kterému bude získaná látka využita je však docílená čistota považována za dostatečnou.

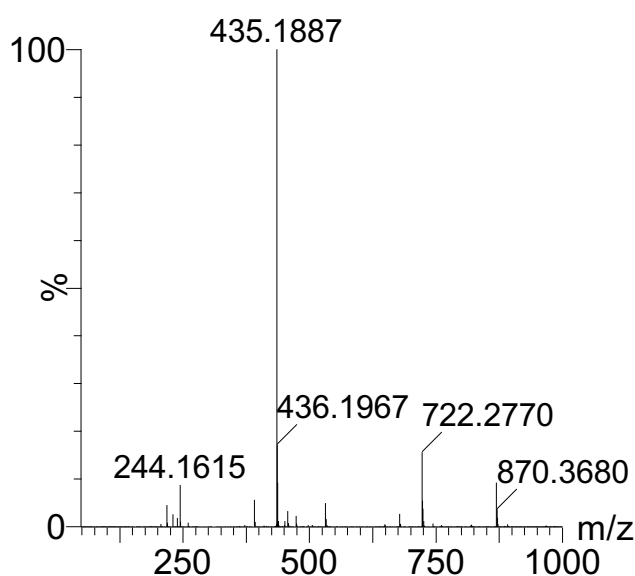


Obr. 17: MS chromatogramy intermediátu **28** ($t_R = 7,2$ min) analyzovaného na HILIC-Z koloně a srovnání pomocí BPI chromatogramů se slepým vzorkem.



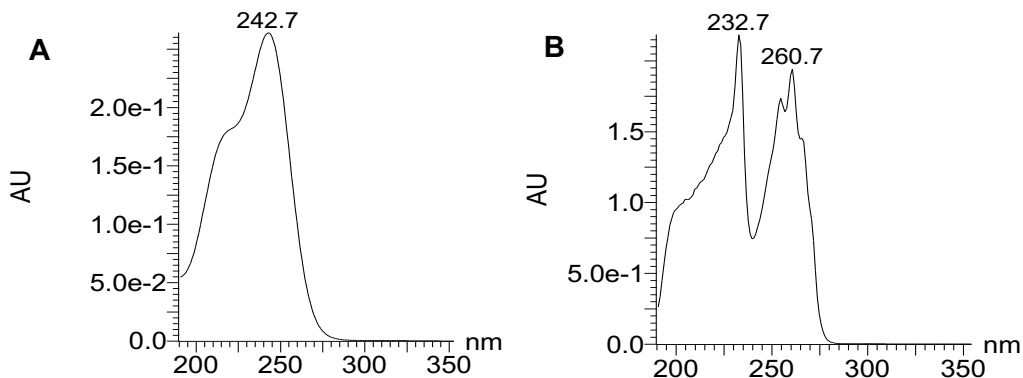
Obr. 18: UV chromatogram intermediátu 28 ($t_R = 7,2$ min) pro $\lambda = 254$ nm spolu s vypočítanou čistotou intermediátu z plochy píku.

Závěrem bylo nutné ověřit identitu purifikované látky. Na Obr. 19 je znázorněné hmotnostní spektrum intermediátu 28, kde je patrný molekulární $[M]^+$ ion ($m/z = 435,1887$) a dále ion $[2M-H]^+$ ($m/z = 869,3755$). Teoretické hodnoty pro tyto ionty jsou 435,1913 a 869,3749, čemuž odpovídají chyby měření $-6,0$ ppm a $-4,5$ ppm, jejichž hodnoty jsou v souladu s použitou instrumentací, která díky analyzátoru doby letu (TOF) dosahuje vysoce přesného měření s chybou do 10 ppm.



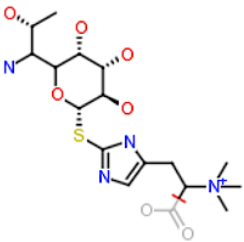
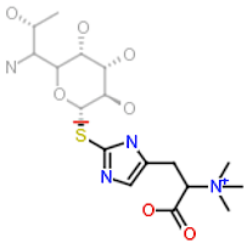
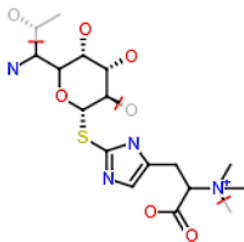
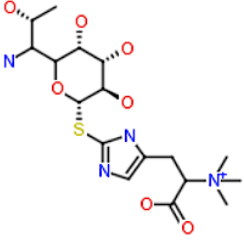
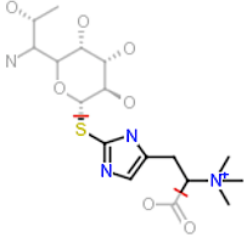
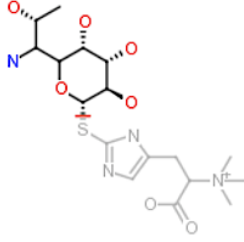
Obr. 19: Hmotnostní spektrum intermediátu 28.

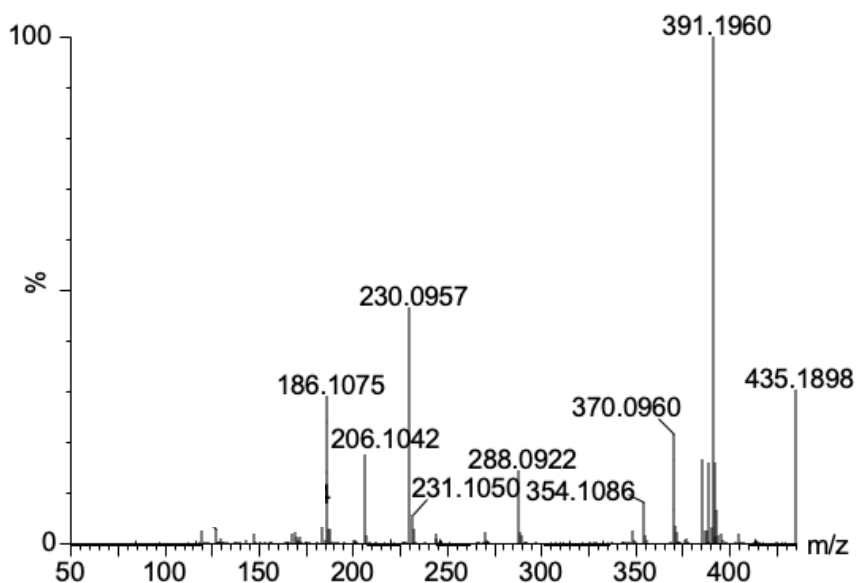
Pro srovnání jsou na Obr. 20 uvedena UV spektra intermediátu **28** (A) a nederivatizovaného ergothioneinu (B), která se od sebe výrazně liší pravděpodobně v důsledku vazby ESH na aminooktosovou jednotku linkosamidů, čímž je znemožněna izomerie ESH mezi tiholem a thionem.



Obr. 20: UV spektrum intermediátu **28** (A) a nederivatizovaného ergothioneinu (B).

K dalšímu potvrzení identity látky **28** byl tento analyzován s využitím kolizně indukované disociace, při které dojde k fragmentaci molekuly. Fragmentační hmotnostní spektrum je zobrazeno na Obr. 21. Většina majoritních píků ve fragmentačním spektru (ionty o nominálních hodnotách 391, 230, 354, 186, 206) odpovídá logickým fragmentům molekuly intermediátu **28**, které jsou zobrazeny v horní části Obr. 21. Nejvyšší intenzity dosahuje fragment o $m/z = 391,1960$, který odpovídá intermediátu **28**, z něhož byla odštěpena karboxylová skupina, a poté fragment odpovídající volnému ESH ($m/z = 230,0957$).

<p>391.1960 \rightarrow (+1H)</p>  <p>391.2015 (-5.5.mDa) (S:1.0, B:1) C₁₆H₃₁N₄O₅S (-CHO₂)</p>	<p>230.0957 \rightarrow (+1H)</p>  <p>230.0963 (-0.6.mDa) (S:0.5, B:1) C₉H₁₆N₃O₂S (-C₈H₁₆NO₅)</p>	<p>354.1086 \rightarrow (-4H)</p>  <p>354.0998 (+8.8.mDa) (S:2.0, B:3) C₁₄H₁₈N₄O₅S (-C₃H₁₄O₂)</p>
<p>435.1898 \rightarrow (+0H)</p>  <p>435.1913 (-1.5.mDa) (S:1.0, B:0) C₁₇H₃₁N₄O₇S (-H)</p>	<p>186.1075 \rightarrow (+2H)</p>  <p>186.1065 (+1.0.mDa) (S:1.5, B:2) C₈H₁₆N₃S (-C₉H₁₆NO₇)</p>	<p>206.1042 \rightarrow (+0H)</p>  <p>206.1028 (+1.4.mDa) (S:0.5, B:1) C₈H₁₆NO₅ (-C₉H₁₆N₃O₂S)</p>



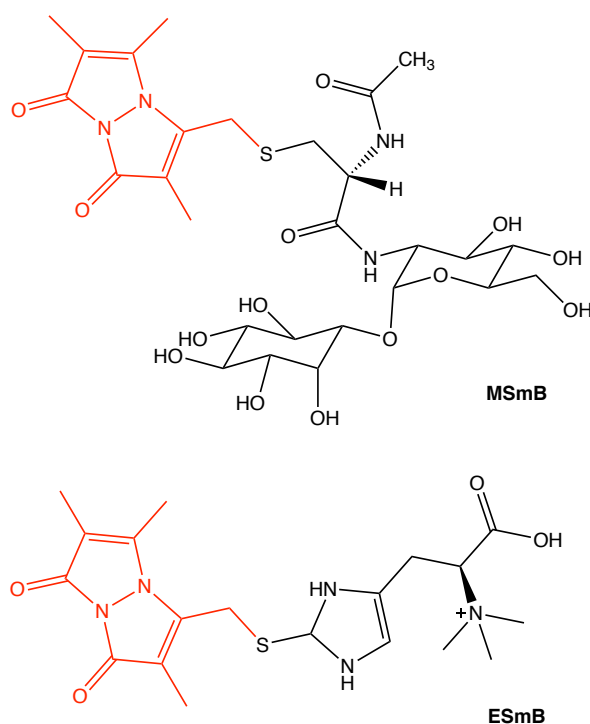
Obr. 21: Fragmentační spektrum intermediátu **28** se strukturami fragmentů. Relativní intenzita 100 % odpovídá $9,70 \cdot 10^3$ detekovaných iontů.

Vzorek vysušený ve vakuovém evaporátoru byl poté zvážen na analytických vahách a jeho hmotnost činila 1,39 mg. Takto purifikovaný intermediát **28** bude dále využit pro výzkum týkající se enzymů LmbD a CcbD, které se účastní tvorby amidové vazby v biosyntéze linkomycinu a celesticetinu. Konkrétně bude využit ke krystalizaci proteinu

CcbD s intermediátem **28** jako substrátem za účelem objasnění detailního mechanismu reakce katalyzované tímto proteinem.

4.2 Stanovení ESH a MSH

V druhé části diplomové práce jsem se věnovala stanovení ergothioneinu (ESH) a mykothiolu (MSH) u různých bakteriálních kmenů převážně rodu *Streptomyces* (druhá část Tab. 1) a hledáním závislosti mezi obsahem těchto thiolů a produkcí linkosamidů. (chemické struktury derivatizovaných thiolů jsou v Obr. 22). Cílem bylo porovnat množství thiolů v buňkách v různých stádiích produkce linkosamidů, tedy před jejím začátkem, v době zahájení, během produkce a po ukončení produkce.



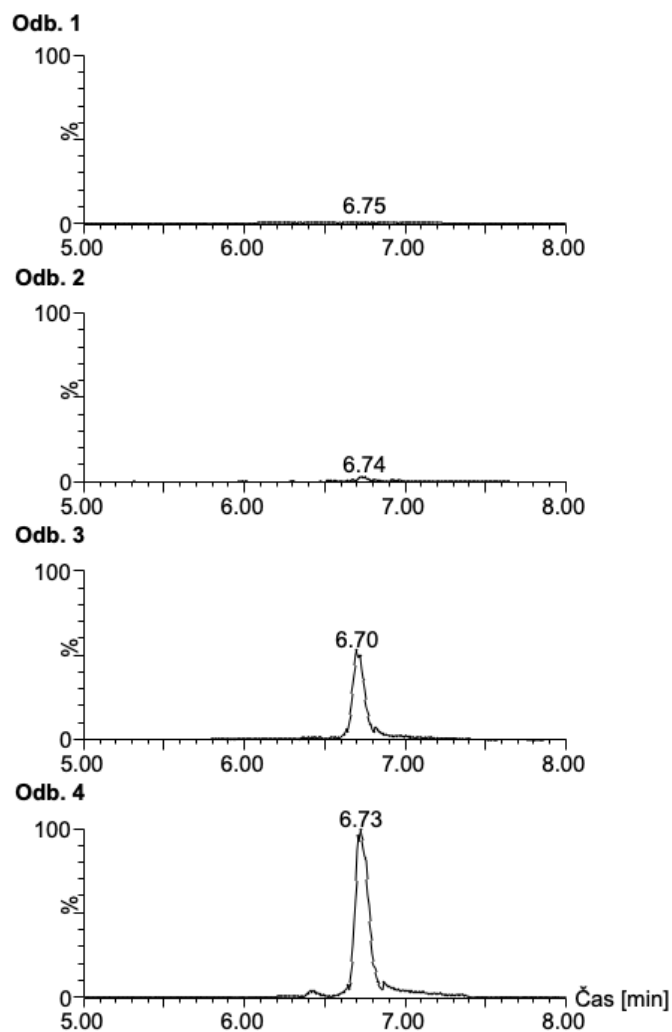
Obr. 22: Chemické struktury derivatizovaných thiolů. Červeně zvýrazněný monobromobiman (*mBBr*).

Nejprve byly vzorky médií odebírány v pravidelných intervalech a v nich detekovány linkosamidy, které jsou do média vylučovány. U odběrů s různou úrovní množství linkosamidů byly následně analyzovány derivatizované thioly v buňkách jednotlivých kmenů (Tab. 13).

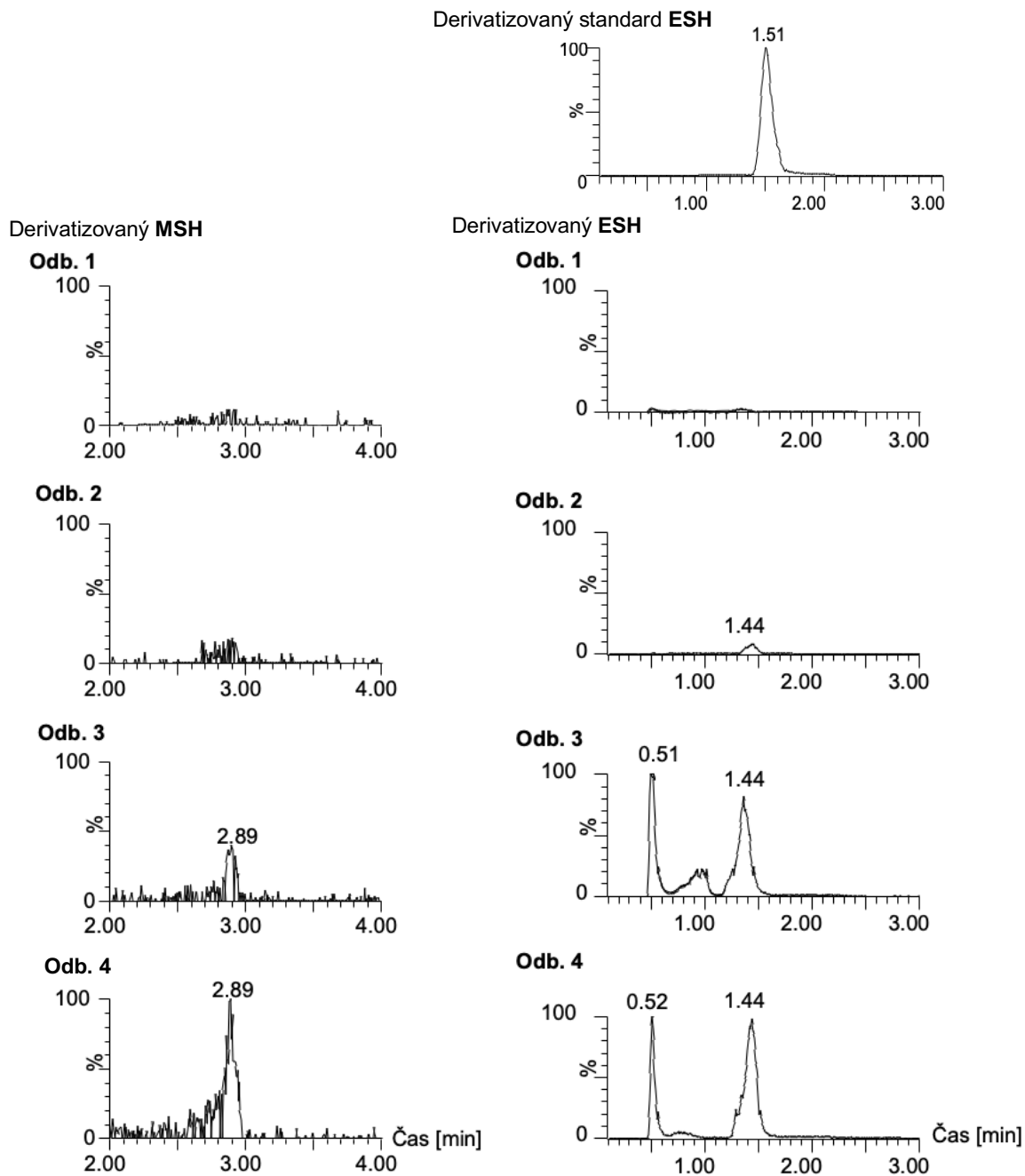
Tab. 13: Přehled vzorků médií odebíraných v čase a poté použitých pro derivatizaci ESH a MSH. Odb. 1 = odběr 1, Odb. 2 = odběr 2 apod. (Uvedený čas je počítán od začátku kultivace.)

Kmen	Odb. 1	Odb. 2	Odb. 3	Odb. 4	Odb. 5	Odb. 6
C0020	76,5 h	80 h	96 h	100,5 h	-	-
C0021	52,5 h	56 h	72 h	-	-	-
C0071	28,5 h	32 h	48 h	52,5 h	56 h	72 h
C0016	32 h	48 h	52,5 h	56 h	-	-

Pro kmen *Streptomyces lincolnensis* (C0020) byly zjištěny čtyři odběry (Obr. 23), které zachytily křivku nárůstu množství linkomycinu v médiu a jejichž thioly v buňkách byly poté derivatizovány pomocí monobromobimanu. Z analýz provedených na UHPLC-DAD-MS vyplývá, že s rostoucím množstvím linkomycinu ve vzorku zároveň roste i množství obou thiolů v buňkách. Před zahájením produkce linkosamidů nebyly thioly ve vzorcích detekovány, naopak v odběrech s vysokým množstvím linkomycinu byly detekovány i oba. Množství MSH je celkově ve všech odběrech pouze stopové, ale vzrůstající tendence je zaznamenatelná. U ESH byl při srovnání s derivatizovaným standardem ESH je retenční čas v reálném vzorku posunutý. Pravděpodobným vysvětlením by mohl být vliv složité matrice buněčných metabolitů. Tento předpoklad byl ověřen metodou přidavku standardu do reálného vzorku, který vliv matrice potvrdil.

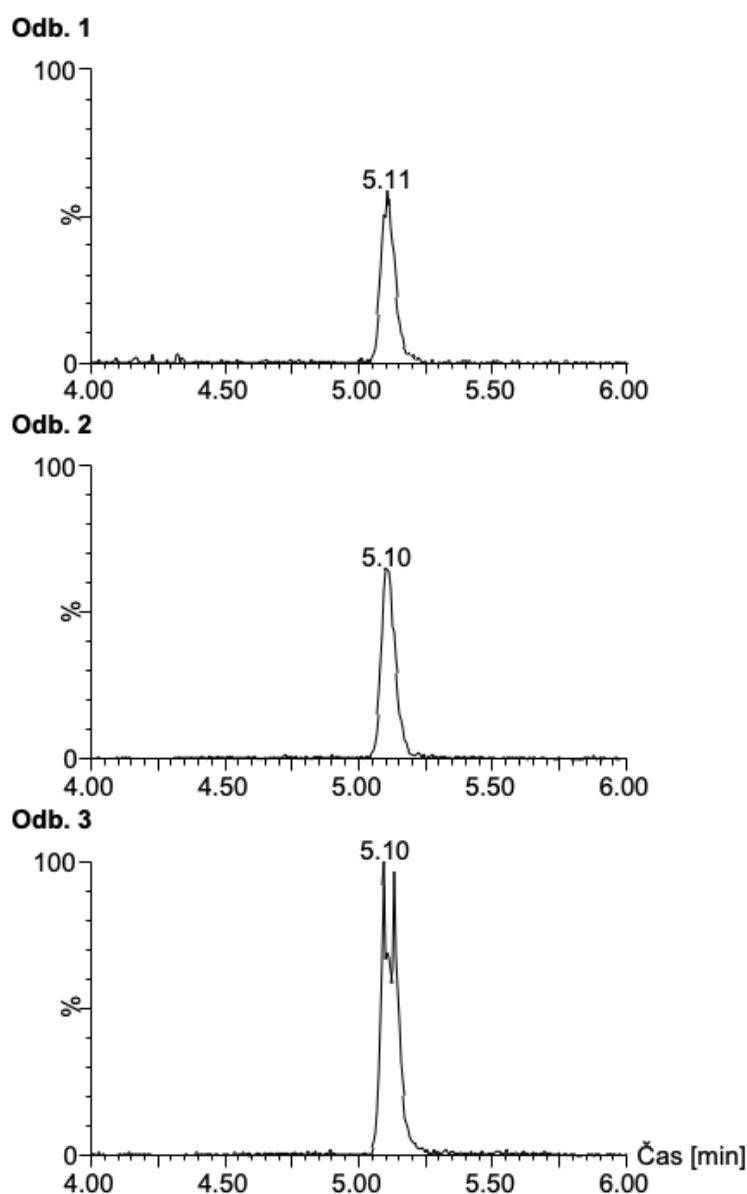


Obr. 23: MS chromatogramy kultivačního média *Streptomyces lincolnensis* (C0020) produkujícího linkomycin ($t_R = 6,7$ min). Extrahováno pro $[M+H]^+$ ion linkomycinu ($m/z = 407,222$). Odb. 1 = 76,5 h, Odb. 2 = 80 h, Odb. 3 = 96 h, Odb. 4 = 100,5 h od začátku kultivace. Relativní intenzita 100 % odpovídá $1,80 \cdot 10^4$ detekovaných iontů.



Obr. 24: MS chromatogramy derivatizovaného MSH a ESH produkovaných kmenem C0020, extrahované pro $[M+H]^+$ molekulový ion o $m/z = 677,235$ (derivatizovaný MSH) a $[M]^+$ molekulový ion o $m/z = 420,171$ (derivatizovaný ESH). Relativní intenzita 100 % je pro derivatizovaný MSH 77, pro derivatizovaný ESH $6,37 \cdot 10^3$ a pro derivatizovaný ESH standard $3,56 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Časy odběrů odpovídají časům uvedeným pod Obr. 23 nebo v Tab. 13.

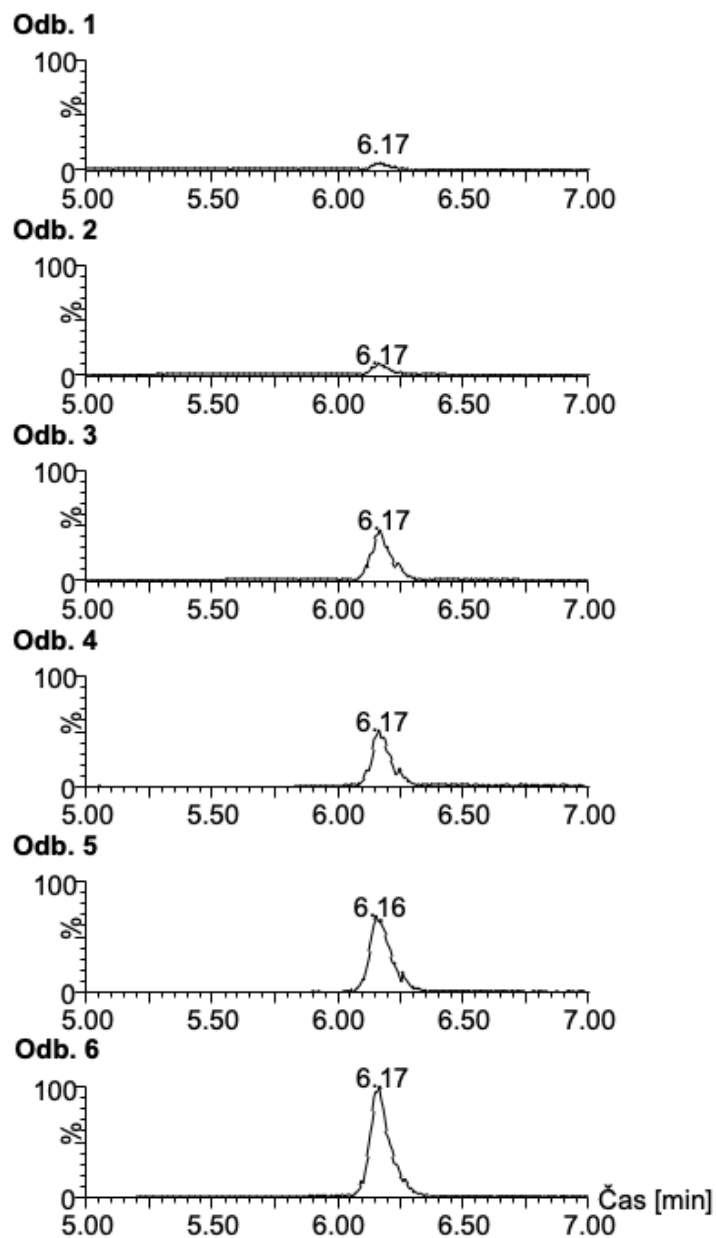
U kmene *Streptomyces caelestis* (C0021) produkujícího celesticetin se zcela nepodařilo odebrat média v takových časech, aby se hladina thiolů od sebe výrazně lišila (Obr. 25). Analýzou na UHPLC-DAD-MS ale nebylo zaznamenáno téměř žádné, či úplně minimální množství obou derivatizovaných thiolů. Možnou příčinou by mohla být vysoká produkce celesticetinu, a tedy využití MSH pro jeho biosyntézu, či zapojení thiolů do jiných metabolických funkcí probíhajících v buňce.



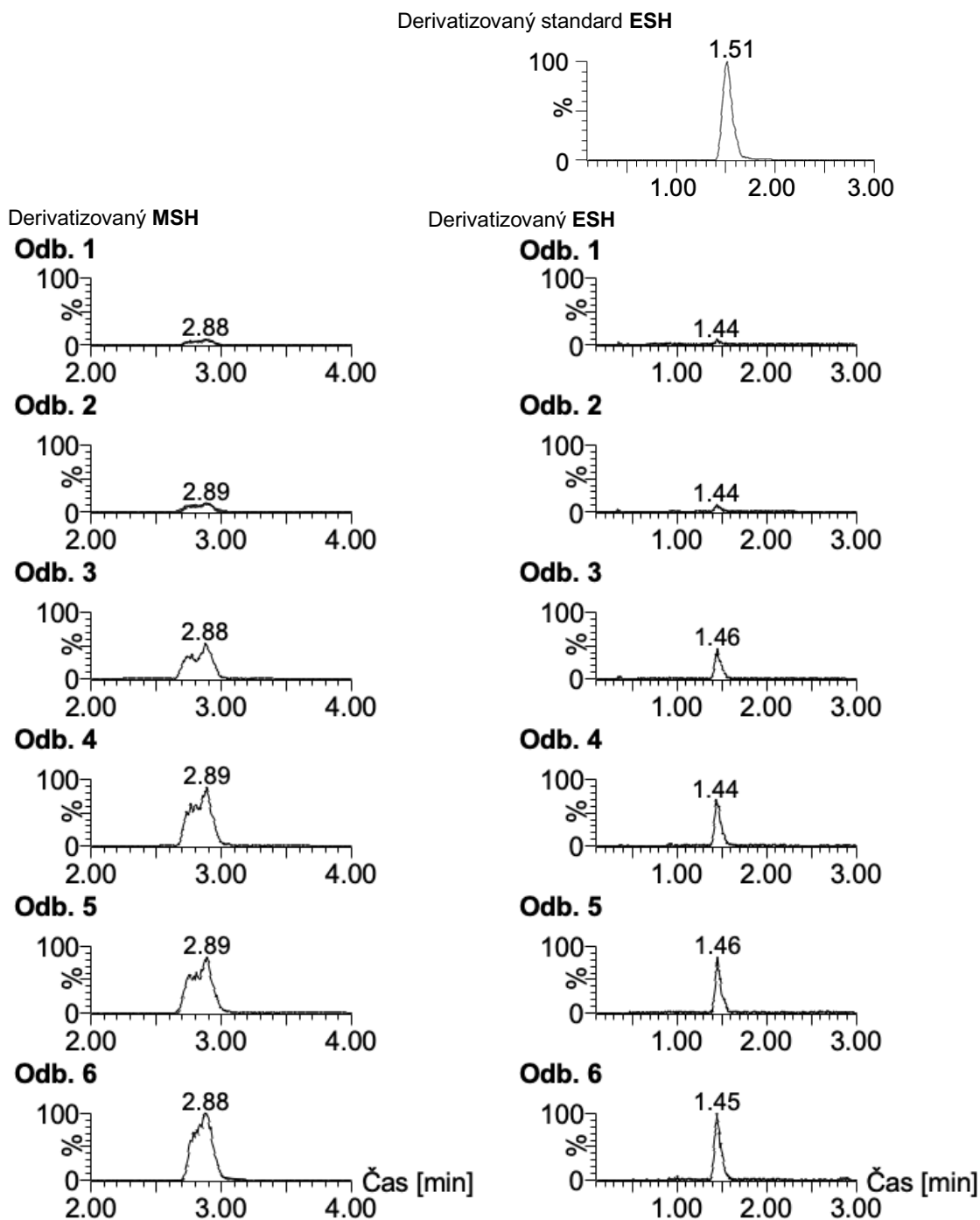
Obr. 25: MS chromatogramy celesticetinu produkovaného kmenem *Streptomyces caelestis* (C0021) ($t_R = 5,1$ min). Extrahováno pro $[M+H]^+$ ion celesticetinu ($m/z = 529,222$). Odb. 1 = 52,5 h, Odb. 2 = 56 h, Odb. 3 = 72 h. Relativní intenzita 100 % odpovídá $1,48 \cdot 10^3$ detekovaných iontů.

Posledním zkoumaným linkosamidem byl intervencin produkovaný kmenem *Rhodococcus sp.* (C0071) (Obr. 26). Zde bylo vybráno sedm odběrů, pro něž byla provedena derivatizace thiolů (Obr. 27), a stejně jako u kmene C0020 byl potvrzen trend v nárůstu množství thiolů spolu s nárůstem produkce linkosamidu, v tomto případě intervencinu. Na rozdíl ale od kmene C0020 bylo u kmene C0071 detekováno výraznější množství derivatizovaného MSH, které spolu s derivatizovaným ESH koreluje s množstvím intervencinu. Zajímavé je, že u chromatogramu pro ESH chybí pík s retenčním časem 0,5 min, který se objevuje u kmene *Streptomyces lincolnensis*. Tento rozdíl by mohl být způsoben tím, že producent intervencinu není bakteriálním kmenem rodu *Streptomyces*, ale *Rhodococcus* a domnělý isomer ESH se u něj nevyskytuje.

Podobně je i v chromatogramu derivatizovaného MSH možné postřehnout náznak druhého píku reprezentující látku, která s derivatizovaným MSH koeluuje. Domnívám se, že by mohlo jít o dva isomery derivatizovaného MSH.

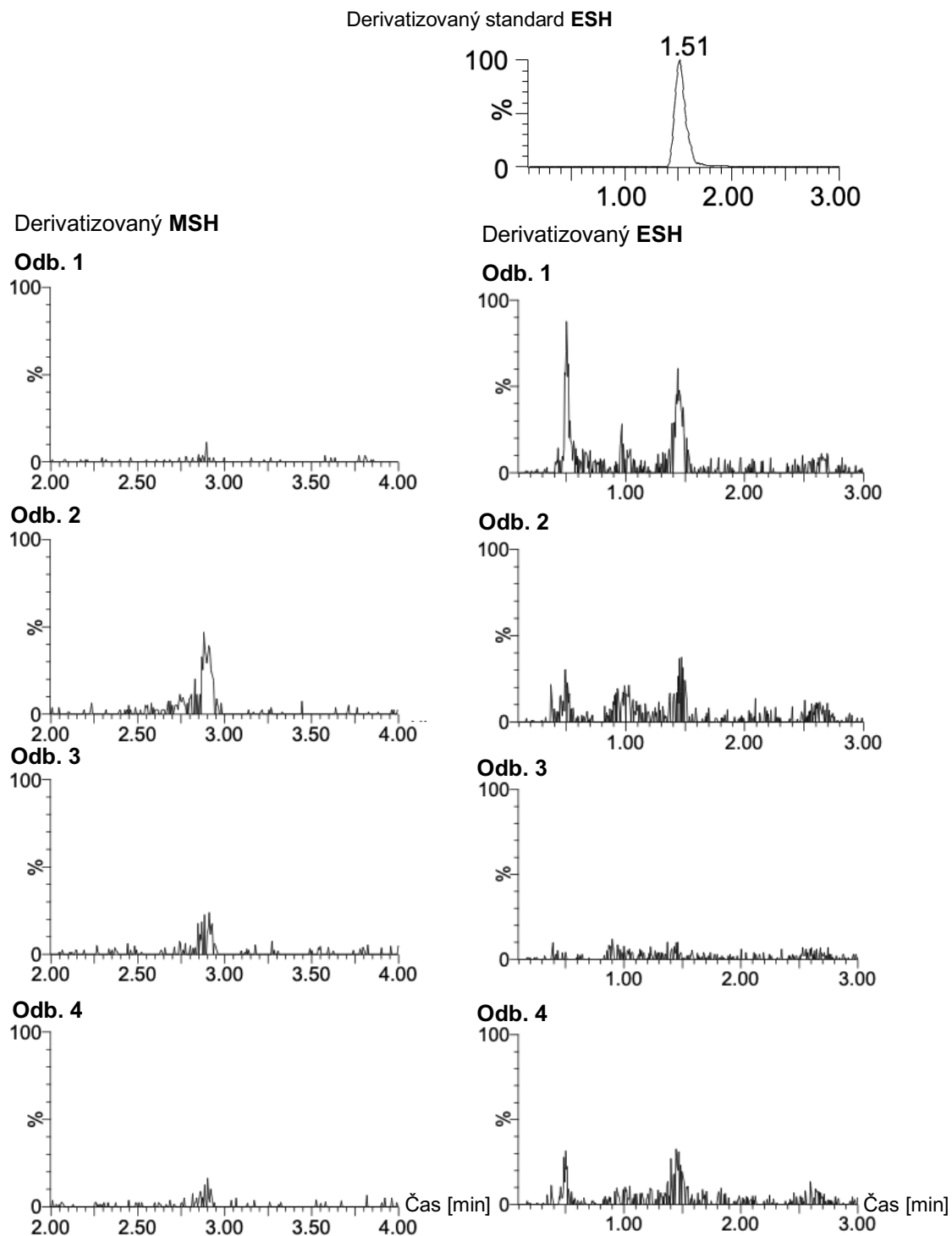


Obr. 26: MS chromatogramy kultivačního média kmene *Rhodococcus sp.* (C0071) produkujícího intervencin ($t_R = 6,2$ min). Extrahováno pro $[M+H]^+$ ion intervencinu ($m/z = 393,206$). Odb. 1 = 28,5 h, Odb. 2 = 32 h, Odb. 3 = 48 h, Odb. 4 = 52,5 h, Odb. 5 = 52,5 h, Odb. 6 = 72 h. Relativní intenzita 100 % odpovídá $8,83 \cdot 10^3$ detekovaných iontů.



Obr. 27: MS chromatogramy derivatizovaného MSH a ESH produkované kmenem C0071, extrahované pro $[M+H]^+$ molekulový ion s $m/z = 677,235$ (derivatizovaný MSH) a $[M]^+$ molekulový ion o $m/z = 420,171$ (derivatizovaný ESH). Relativní intenzita 100 % pro derivatizovaný MSH je $5,85 \cdot 10^3$, pro derivatizovaný ESH je to 390 a pro derivatizovaný ESH standard $3,56 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Časy odběrů odpovídají časům uvedeným pod Obr. 26 nebo v Tab. 13.

U kmene *Streptomyces coelicolor* (C0016) byly rovněž odebírány vzorky médií v různých časových intervalech, ale vzhledem k tomu, že tento kmen není producentem žádného linkosamidu, byly analyzovány pouze derivatizované thioly (Obr. 28). Analýzou bylo zjištěno, že tento kmen produkuje pouze stopové množství obou thiolů, které s časem kolísá, ale není zde zachytitelný lineární nárůst, či pokles. Je pravděpodobné, že jsou tyto thioly zapojené do jiných biosyntetických drah či detoxifikačních procesů a jsou tedy spotřebovávány, nebo je hlavním thiolem pro tento kmen jiný nízkomolekulární thiol, což by bylo možné zjistit např. hledáním genů pro biosyntézu jednotlivých thiolů v genomu tohoto kmene. Podstatné je, že u tohoto kmene, kde nejsou thioly využity pro biosyntézu žádného specializovaného metabolit, není na rozdíl od producentů linkomycinu a intervencinu pozorován žádný trend ve změně množství detekovaných thiolů v buňkách.

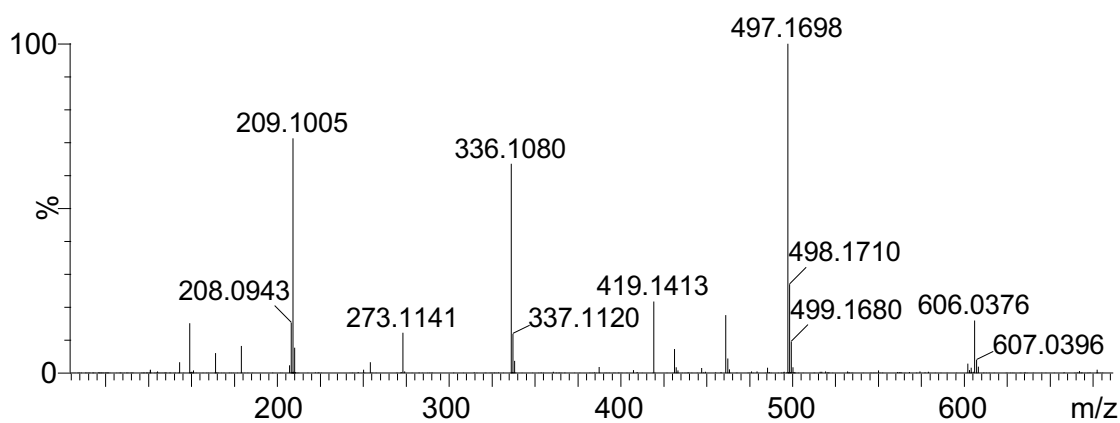
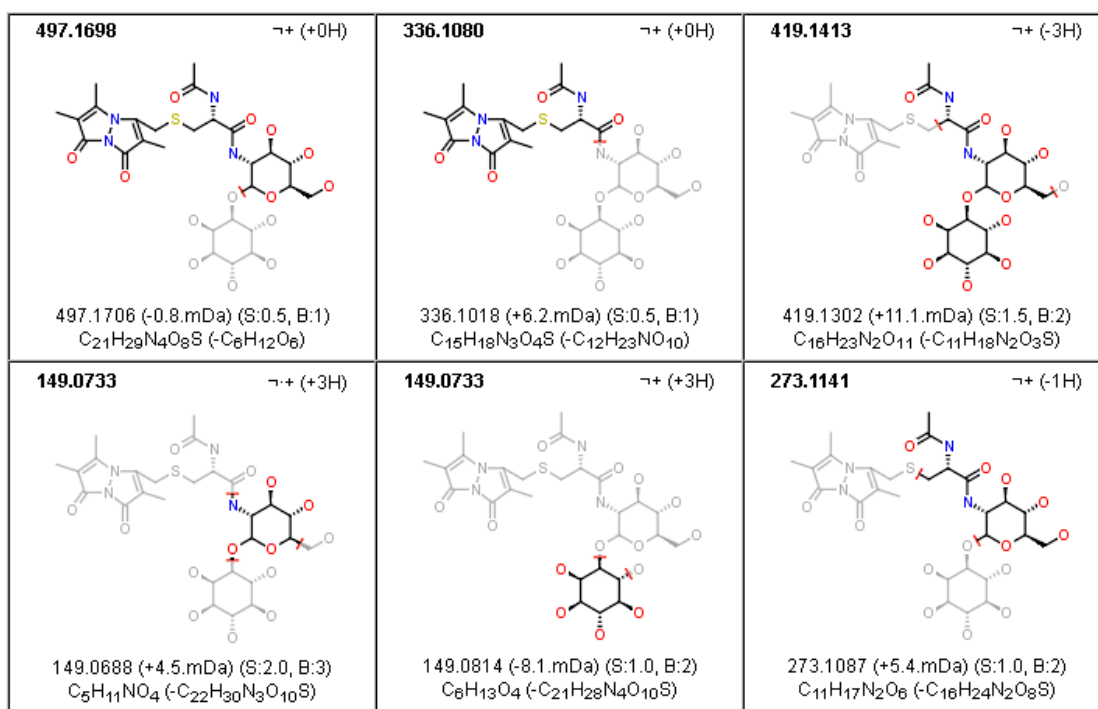


Obr. 28: Chromatogramy derivatizovaného MSH a ESH produkované kmenem *Streptomyces coelicolor* (C0016), extrahované pro $[M+H]^+$ molekulový ion s $m/z = 677,235$ (derivatizovaný MSH) a $[M]^+$ molekulový ion o $m/z = 420,171$ (derivatizovaný ESH). Relativní intenzita 100 % pro derivatizovaný MSH je 80, pro derivatizovaný ESH 100 a pro derivatizovaný standard ESH $3,56 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Odb. 1 = 32 h, Odb. 2 = 48 h, Odb. 3 = 52,5 h, Odb. 4 = 56 h.

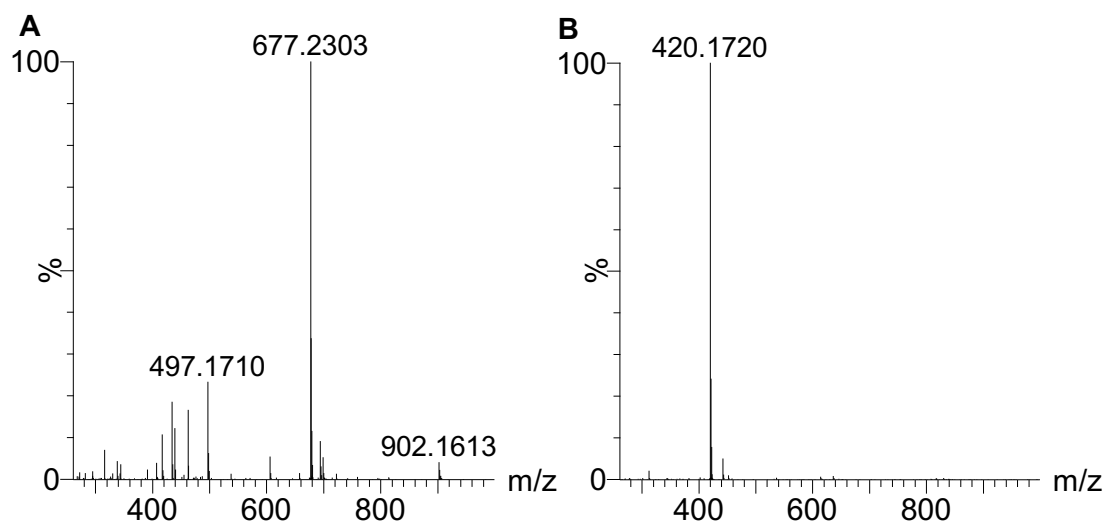
Výše popsaná studie ukázala, že stejně jak se mění množství jednotlivých linkosamidů v čase kultivace, je i množství thiolů potřebných k jejich biosyntéze u jednotlivých kmenů odlišné. Shodným bodem alespoň pro kmen *Streptomyces lincolnensis* a *Rhodococcus sp.* je nárůst produkce obou thiolů spolu s nárůstem množství linkosamidů. Kmen C0020, v jehož kultivačním médiu bylo zjištěno nejvyšší množství linkosamidu, obsahoval v buňkách nejnižší množství MSH, který byl pravděpodobně využit právě na biosyntézu. Množství ESH bylo na druhou stranu relativně vysoké, nejspíš z toho důvodu, že během biosyntézy není spotřebováván. V médiu kmene C0071 bylo rovněž detekováno vysoké množství linkosamidu a stejně tak MSH. Naopak množství ESH bylo oproti kmenu C0020 výrazně nižší. Jak již bylo uvedeno výše, tento rozdíl by mohl být zapříčiněn odlišným rodem bakterie, u níž by ESH mohl hrát kromě účasti v biosyntéze intervencinu i jinou roli.

U analýz derivatizovaného MSH nebylo možné srovnání retenčního času pomocí standardu MSH, který není kvůli nákladné chemické syntéze prozatím komerčně dostupný. Jeho identita byla ovšem ověřena na základě kolizně indukované disociační MS analýzy (Obr. 29). Většina majoritních píků ve fragmentačním spektru (ionty o nominálních hodnotách 273, 336, 419 a 497) odpovídá logickým fragmentům molekuly derivatizovaného MSH. Fragment s nejvyšší intenzitou signálu ($m/z = 497,1698$) odpovídá molekule MSH s odštěpenou inositolovou částí. Druhý nejvíce zastoupený fragment o $m/z = 336,1080$ pak odpovídá molekule monobromobimanu s navázaným zbytkem *N*-acetylovaného cysteinu.

Na Obr. 30 je znázorněné hmotnostní spektrum derivatizovaného mykothiolu a derivatizovaného ergothioneinu z reálného vzorku kmene *Streptomyces lincolnensis*, kde je v části **A** patrný molekulární $[M+H]^+$ ion derivatizovaného MSH ($m/z = 677,2303$) a v části **B** molekulární $[M]^+$ ion derivatizovaného ESH ($m/z = 420,1720$). Teoretické hodnoty pro tyto ionty jsou 677,2346 a 420,1706, čemuž odpovídají chyby měření $-6,3$ ppm a 3,3 ppm. Tyto hodnoty jsou stejně jako u intermediátu **28** v souladu s použitou instrumentací, která díky analyzátoru doby letu (TOF) poskytuje velmi citlivé měření s chybou do 10 ppm.



Obr. 29: Fragmentační spektrum derivatizovaného mycothiolu se strukturami jednotlivých fragmentů.



Obr. 30: MS spektra derivatizovaného mykothiolu (A) a derivatizovaného ergothioneinu (B) produkovaných kmenem *Streptomyces lincolnensis* (C0020).

5 Závěr

Cíle první části této diplomové práce byly splněny následujícím způsobem. Pro produkci intermediátu **28** byl nalezen optimální bakteriální kmen a vhodné kultivační podmínky: *Streptomyces lincolnensis* $\Delta lmbN_{ac}$, AVM médium. Byl vyvinut postup extrakce a chromatografické analýzy s UV a/nebo MS detekcí pro analytické i preparativní účely, převážně s využitím chromatografie na bázi HILIC. Výsledkem tohoto úsilí byla purifikace 1,39 mg intermediátu **28** z 1800 ml kultivačního média. Čistota látky byla dle chromatografické analýzy při 254 nm 71,4 % a nebyly detekovány žádné další významné nečistoty pomocí MS. Připravený biosyntetický intermediát **28** bude dále využit k výzkumu týkající se enzymů LmbD/CcbD.

V druhé části diplomové práce bylo cílem objasnit závislost mezi produkcí nízkomolekulárních thiolů a produkcí linkosamidů. Bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem linkosamidů v médiu roste zároveň množství obou thiolů v buňkách, a to u kmene *Streptomyces lincolnensis* (C0020) a *Rhodococcus sp.* (C0071), u kmene *Streptomyces caelestis* (C0021) nebyly žádné thioly detekovány. I u prvních dvou zmíněných kmenů je ale rozdíl v poměru MSH produkovaného těmito kmeny značně odlišný – na rozdíl od kmene C0071 bylo u kmene C0021 detekováno pouze stopové množství MSH. U referenčního kmene *Streptomyces coelicolor* (C0016) bylo detekováno rovněž pouze stopové množství obou thiolů, které se v čase nijak neměnilo. Z výsledků je tedy možné usoudit, že metabolismus thiolů přímo souvisí s produkcí linkosamidů minimálně v případě kmenů *Streptomyces lincolnensis* (C0020) produkující linkomycin a *Rhodococcus sp.* (C0071) produkující intervencin.

Příloha

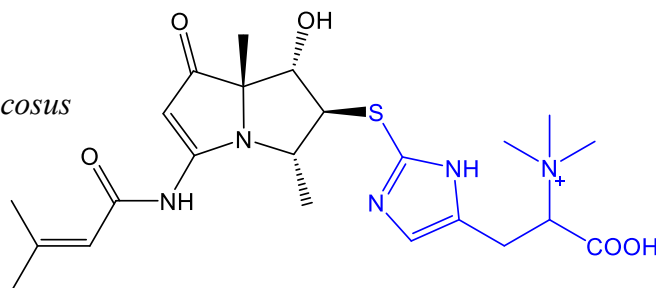
Metabolity obsahující ve své struktuře ESH (zvýrazněn modře)

Spithionein A

Producent: *Streptomyces spinoverrucosus*

Zdroj: moře

Bioaktivita: neznámá

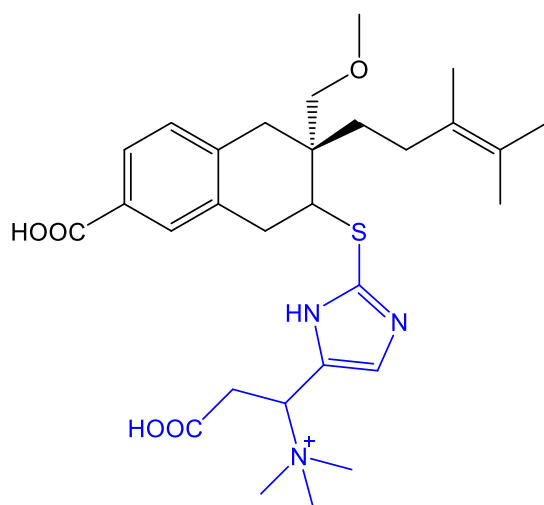


Benzastatin JBIR-73

Producent: *Streptomyces sp.* RI18

Zdroj: půda, Japonsko

Bioaktivita: neznámá

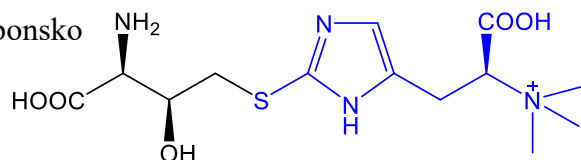


Clithionein

Producent: neznámý

Zdroj: houby – *Clytocybe acromealga*, Japonsko

Bioaktivita: neznámá

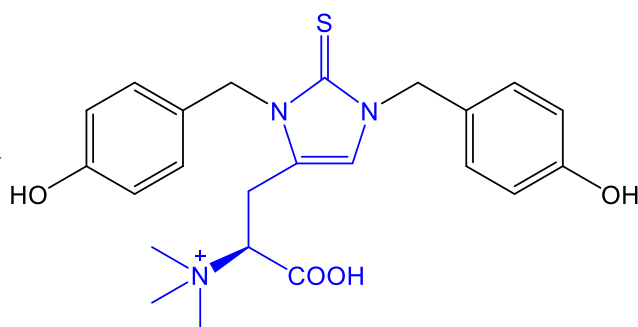


Gastrolatathionein

Producent: neznámý

Zdroj: *Gastrodia elata* (tian ma), Čína

Bioaktivita: neznámá



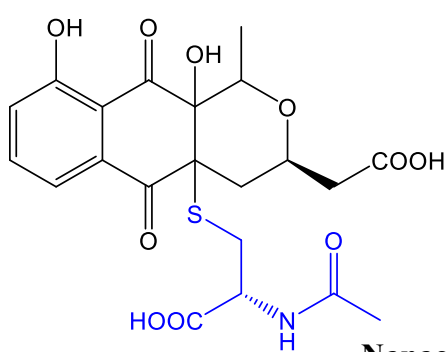
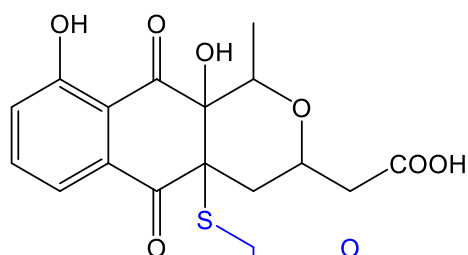
**Metabolity obsahující ve své struktuře mykothiol nebo jeho část
(zvýrazněno modře)**

Nanaomyciny

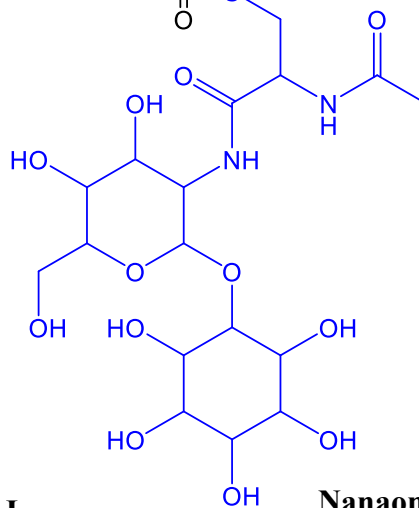
Producent: *Streptomyces rosa* subsp.
notoensis OS-3966

Zdroj: Japonsko

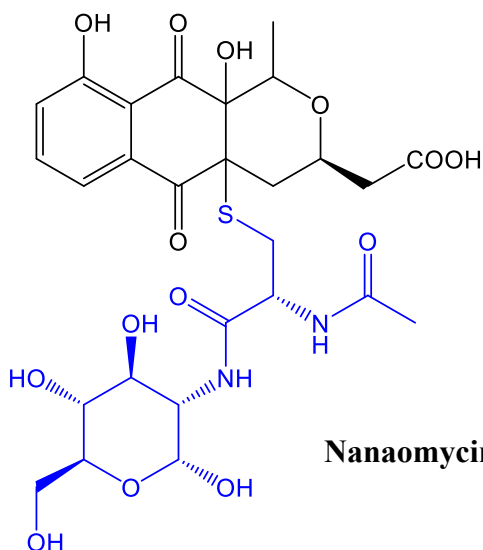
Bioaktivita: protinádorová



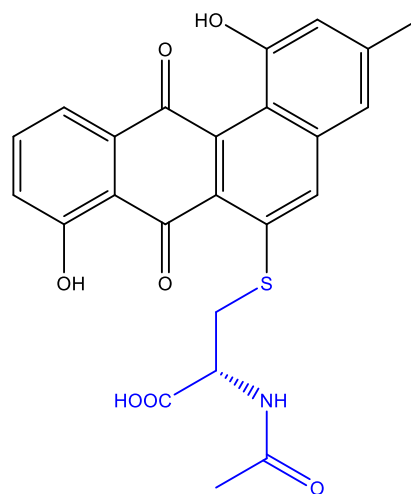
Nanaomycin I



Nanaomycin H



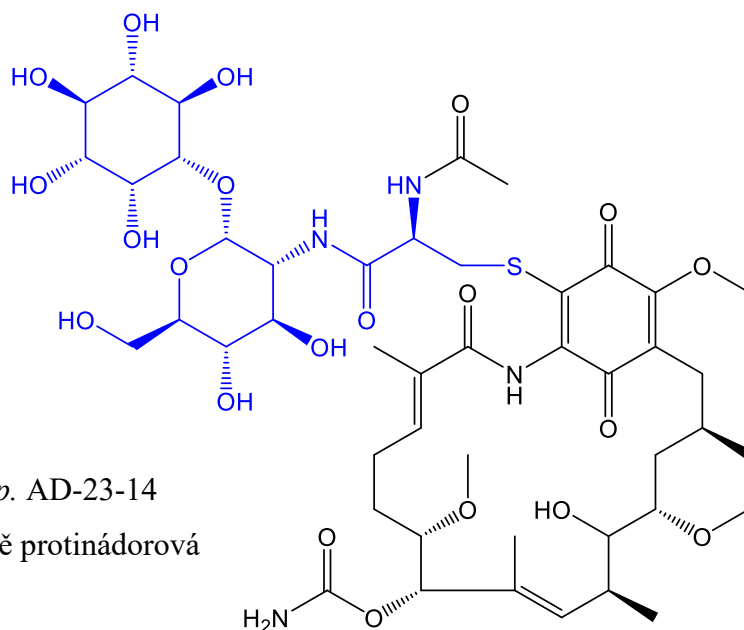
Nanaomycin J



Cysrabelomycin

Producent: *Streptomyces* sp. HN-A124

Bioaktivita: protinádorová



Geldanamycin C

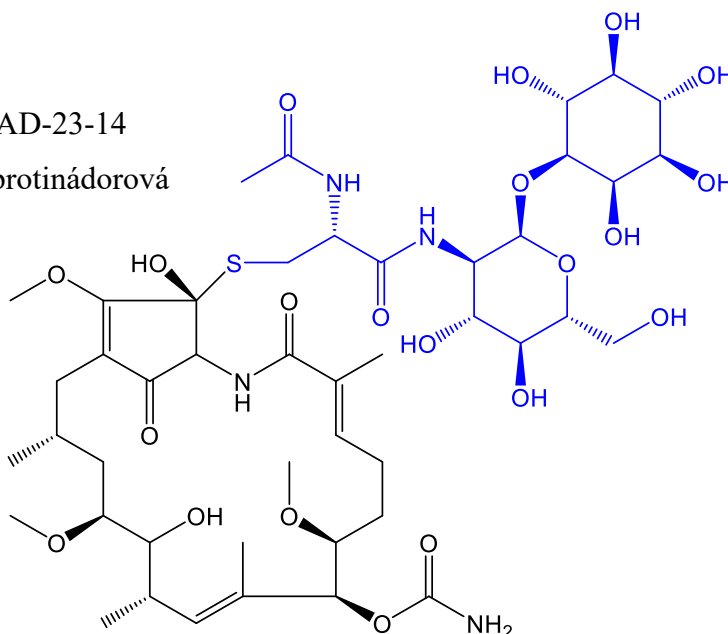
Producent: *Streptomyces sp.* AD-23-14

Bioaktivita: pravděpodobně protinádorová

Mccrearamycin A

Producent: *Streptomyces sp.* AD-23-14

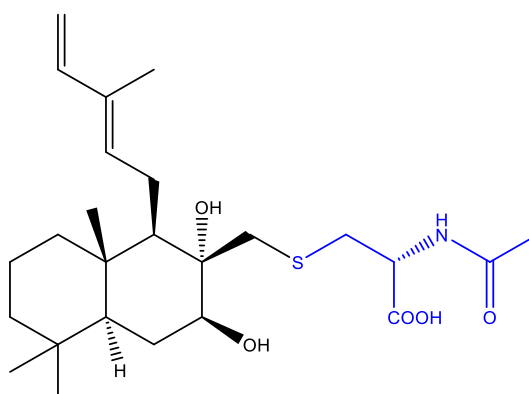
Bioaktivita: pravděpodobně protinádorová



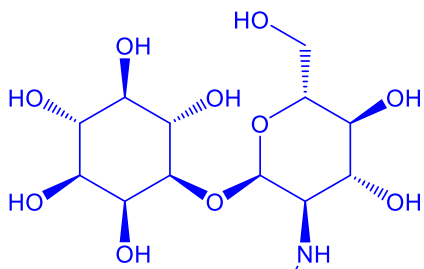
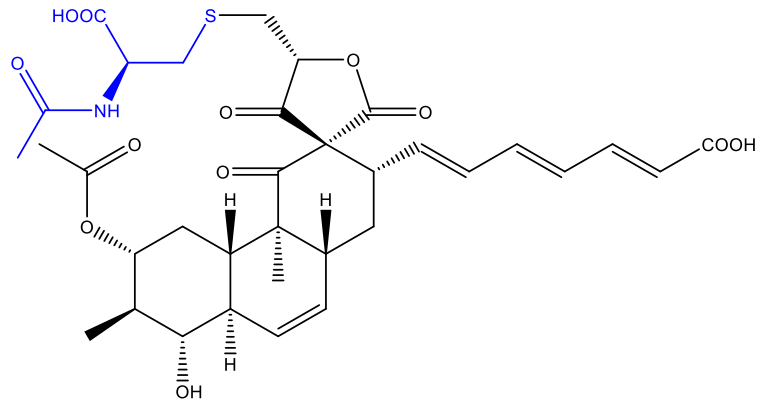
Cyslabdan

Producent: *Streptomyces sp.* K04-0144. II

Bioaktivita: synergický účinek zvyšující antimikrobiální vlastnost imipenemů



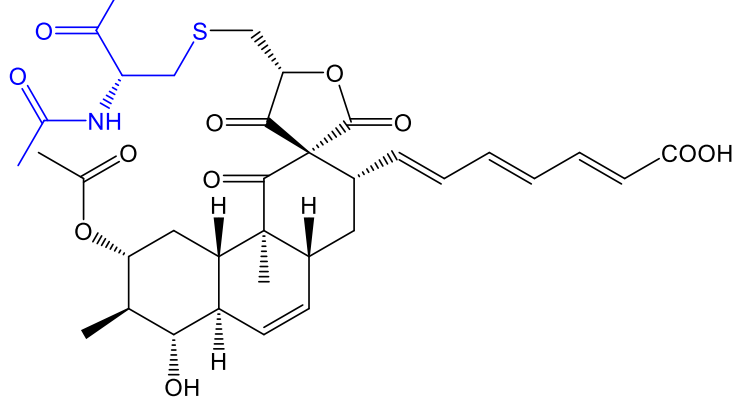
Lucensimycin D



Lucentamycin F (lucentamyciny)

Producent: *Streptomyces lucensis* MA7349

Bioaktivita: antimikrobiální



Seznam použité literatury

- [1] N. J. Tobias a H. B. Bode, „Heterogeneity in Bacterial Specialized Metabolism“, *Journal of Molecular Biology*, roč. 431, č. 23, s. 4589–4598, lis. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.042.
- [2] M. Watve, R. Tickoo, M. Jog, a B. Bhole, „How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?“, *Archives of Microbiology*, roč. 176, č. 5, s. 386–390, 2001, doi: 10.1007/s002030100345.
- [3] S. A. Waksman a H. B. Woodruff, „Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomycetes.“, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, roč. 45, č. 2, s. 609–614, lis. 1940, doi: 10.3181/00379727-45-11768.
- [4] S. A. Waksman a H. B. Woodruff, „Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin1“, *J Bacteriol*, roč. 44, č. 3, s. 373–384, zář. 1942.
- [5] A. Schatz a S. A. Waksman, „Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms.“, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, roč. 57, č. 2, s. 244–248, lis. 1944, doi: 10.3181/00379727-57-14769.
- [6] E. A. Barka *et al.*, „CD Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, roč. 80, č. 1, s. 1–43, bř. 2016, doi: 10.1128/MMBR.00019-15.
- [7] J. Guzman *et al.*, „Intervencin, a lincosamide antibiotic mined from *Rhodococcus* genome“, *předloženo Frontiers in Microbiology*.
- [8] S. Kadlcik, Z. Kamenik, D. Vasek, M. Nedved, a J. Janata, „Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics“, *Chem. Sci.*, roč. 8, č. 5, s. 3349–3355, kvě. 2017, doi: 10.1039/c6sc04235j.
- [9] N. M. Brahme, J. E. Gonzalez, S. Mizensak, J. R. Rolls, E. J. Hessler, a L. H. Hurley, „Biosynthesis of the Lincomycins. 2. Studies Using Stable Isotopes on the Biosynthesis of Methylthiolincosaminide Moiety of Lincomycin A“, *Journal of the American Chemical Society*, roč. 106, č. 25, s. 7878–7883, 1984, doi: 10.1021/ja00337a039.
- [10] D. F. Witz, E. J. Hessler, a T. L. Miller, „Bioconversion of tyrosine into the

- propylhygric acid moiety of lincomycin", *Biochemistry*, roč. 10, č. 7, s. 1128–1133, bře. 1971, doi: 10.1021/bi00783a005.
- [11] J. Janata, Z. Kamenik, R. Gazak, S. Kadlcik, a L. Najmanova, „Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products", *Nat Prod Rep*, roč. 35, č. 3, s. 257–289, 01 2018, doi: 10.1039/c7np00047b.
- [12] P. G. Baraldi *et al.*, „DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents", *Med Res Rev*, roč. 24, č. 4, s. 475–528, čvc. 2004, doi: 10.1002/med.20000.
- [13] J. Mantaj, P. J. M. Jackson, K. M. Rahman, a D. E. Thurston, „From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD)-Containing Antibody–Drug Conjugates (ADCs)", *Angewandte Chemie International Edition*, roč. 56, č. 2, s. 462–488, 2017, doi: 10.1002/anie.201510610.
- [14] I. Höfer *et al.*, „Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite", *Chem. Biol.*, roč. 18, č. 3, s. 381–391, bře. 2011, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.12.018.
- [15] N. Andres, H. Wolf, a H. Zähler, „Hormaomycin, a New Peptide Lactone Antibiotic Effective in Inducing Cytodifferentiation and Antibiotic Biosynthesis in Some Streptomyces Species", *Zeitschrift für Naturforschung C*, roč. 45, č. 7–8, s. 851–855, srp. 1990, doi: 10.1515/znc-1990-7-817.
- [16] J. Novotna *et al.*, „Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 12, s. e79974, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0079974.
- [17] D. Neusser *et al.*, „The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of l-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A", *Arch Microbiol*, roč. 169, č. 4, s. 322–332, dub. 1998, doi: 10.1007/s002030050578.
- [18] J. Novotná, A. Honzátko, P. Bednář, J. Kopecký, J. Janata, a J. Spížek, „l-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis", *European Journal of Biochemistry*, roč. 271, č. 18, s. 3678–3683, 2004, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04308.x.
- [19] K. L. Colabroy, W. T. Hackett, A. J. Markham, J. Rosenberg, D. E. Cohen, a A.

- Jacobson, „Biochemical characterization of l-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, roč. 479, č. 2, s. 131–138, lis. 2008, doi: 10.1016/j.abb.2008.08.022.
- [20] P. Jiraskova *et al.*, „New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a γ -Glutamyltransferase Cleave the C–C Bond?", *Front. Microbiol.*, roč. 7, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00276.
- [21] G. Zhong, Q. Zhao, Q. Zhang, a W. Liu, „4-alkyl-L-(Dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of γ -glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage", *Nature Communications*, roč. 8, č. 1, s. 1–10, čvc. 2017, doi: 10.1038/ncomms16109.
- [22] M. S. Kuo, D. A. Yurek, J. H. Coats, S. T. Chung, a G. P. Li, „ISOLATION AND IDENTIFICATION OF S-PROPYLIDENE- Δ 1-PYRROLINE-S-CARBOXYLIC ACID, A BIOSYNTHETIC PRECURSOR OF LINCOMYCIN", *J. Antibiot.*, roč. 45, č. 11, s. 1773–1777, lis. 1992, doi: 10.7164/antibiotics.45.1773.
- [23] L. Steiningerova *et al.*, „Different Reaction Specificities of F420H2-Dependent Reductases Facilitate Pyrrolobenzodiazepines and Lincomycin To Fit Their Biological Targets", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 142, č. 7, s. 3440–3448, úno. 2020, doi: 10.1021/jacs.9b11234.
- [24] E. Sasaki, C.-I. Lin, K.-Y. Lin, a H. Liu, „Construction of the Octose 8-Phosphate Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis: Characterization of the Reactions Catalyzed by LmbR and LmbN", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 134, č. 42, s. 17432–17435, říj. 2012, doi: 10.1021/ja308221z.
- [25] C.-I. Lin, E. Sasaki, A. Zhong, a H. Liu, „In Vitro Characterization of LmbK and LmbO: Identification of GDP-D-erythro-alpha-D-gluco-octose as a Key Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 136, č. 3, s. 906–909, led. 2014, doi: 10.1021/ja412194w.
- [26] J. Janata *et al.*, „Lincosamide Synthetase—A Unique Condensation System Combining Elements of Nonribosomal Peptide Synthetase and Mycothiol Metabolism", *PLOS ONE*, roč. 10, č. 3, s. e0118850, bře. 2015, doi:

- 10.1371/journal.pone.0118850.
- [27] L. Cermak, J. Novotna, M. Sagova-Mareckova, J. Kopecky, L. Najmanova, a J. Janata, „Hybridization analysis and mapping of the celesticetin gene cluster revealed genes shared with lincomycin biosynthesis", *Folia Microbiol.*, roč. 52, č. 5, s. 457–462, 2007, doi: 10.1007/BF02932104.
- [28] D. Zhang, Z. Tang, a W. Liu, „Biosynthesis of Lincosamide Antibiotics: Reactions Associated with Degradation and Detoxification Pathways Play a Constructive Role", *Acc. Chem. Res.*, roč. 51, č. 6, s. 1496–1506, čer. 2018, doi: 10.1021/acs.accounts.8b00135.
- [29] Q. Zhao, M. Wang, D. Xu, Q. Zhang, a W. Liu, „Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A", *Nature*, roč. 518, č. 7537, s. 115–119, úno. 2015, doi: 10.1038/nature14137.
- [30] S. Kadlčík *et al.*, „Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 12, s. e84902, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0084902.
- [31] Z. Kamenik *et al.*, „Deacetylation of mycothiol-derived ‚waste product‘ triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics", *Chem. Sci.*, roč. 7, č. 1, s. 430–435, 2016, doi: 10.1039/c5sc03327f.
- [32] R. Ushimaru, C.-I. Lin, E. Sasaki, a H. Liu, „Characterization of Enzymes Catalyzing Transformations of Cysteine S-Conjugated Intermediates in the Lincosamide Biosynthetic Pathway", *ChemBioChem*, roč. 17, č. 17, s. 1606–1611, zář. 2016, doi: 10.1002/cbic.201600223.
- [33] M. Wang, Q. Zhao, Q. Zhang, a W. Liu, „Differences in PLP-Dependent Cysteinylation Processing Lead to Diverse S-Functionalization of Lincosamide Antibiotics", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 138, č. 20, s. 6348–6351, kvě. 2016, doi: 10.1021/jacs.6b01751.
- [34] K. Loewen, Y. Schreiber, M. Kirlew, N. Bocking, a L. Kelly, „Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection", *Can Fam Physician*, roč. 63, č. 7, s. 512–520, čvc. 2017.
- [35] M. Z. David a R. S. Daum, „Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic", *Clin Microbiol Rev*, roč. 23, č. 3, s. 616–687, čvc. 2010, doi:

- 10.1128/CMR.00081-09.
- [36] A. C. Steer, T. Lamagni, N. Curtis, a J. R. Carapetis, „Invasive Group A Streptococcal Disease", *Drugs*, roč. 72, č. 9, s. 1213–1227, 2012, doi: 10.2165/11634180-000000000-00000.
- [37] I. Brook, „Spectrum and treatment of anaerobic infections", *Journal of Infection and Chemotherapy*, roč. 22, č. 1, s. 1–13, led. 2016, doi: 10.1016/j.jiac.2015.10.010.
- [38] E. A. Coyle a Society of Infectious Diseases Pharmacists, „Targeting bacterial virulence: the role of protein synthesis inhibitors in severe infections. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists", *Pharmacotherapy*, roč. 23, č. 5, s. 638–642, kvě. 2003, doi: 10.1592/phco.23.5.638.32191.
- [39] C. Lewis, „Antiplasmodial Activity of 7-Halogenated Lincomycins", *The Journal of Parasitology*, roč. 54, č. 1, s. 169–170, 1968, doi: 10.2307/3276898.
- [40] E. R. Pfefferkorn, R. F. Nothnagel, a S. E. Borotz, „Parasiticidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, roč. 36, č. 5, s. 1091–1096, kvě. 1992, doi: 10.1128/AAC.36.5.1091.
- [41] M. E. Fichera, M. K. Bhopale, a D. S. Roos, „In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, roč. 39, č. 7, s. 1530–1537, čvc. 1995, doi: 10.1128/AAC.39.7.1530.
- [42] E. Maréchal a M.-F. Cesbron-Delauw, „The apicoplast: a new member of the plastid family", *Trends in Plant Science*, roč. 6, č. 5, s. 200–205, kvě. 2001, doi: 10.1016/S1360-1385(01)01921-5.
- [43] World Health Organization, *Guidelines for the treatment of malaria*, 3. World Health Organization, 2015.
- [44] T. Tenson a M. Ehrenberg, „Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel", *Cell*, roč. 108, č. 5, s. 591–594, bře. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00669-4.
- [45] F. Schlünzen *et al.*, „Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria", *Nature*, roč. 413, č. 6858, s. 814–821, říj. 2001, doi: 10.1038/35101544.

- [46] J. I. Ross *et al.*, „Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, roč. 41, č. 5, s. 1162–1165, kvě. 1997, doi: 10.1128/AAC.41.5.1162.
- [47] E. Tacconelli *et al.*, „Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis", *The Lancet Infectious Diseases*, roč. 18, č. 3, s. 318–327, bře. 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- [48] K. H. Luepke *et al.*, „Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications", *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, roč. 37, č. 1, s. 71–84, 2017, doi: 10.1002/phar.1868.
- [49] J. C. Gallagher, „Omadacycline: A Modernized Tetracycline", *Clin Infect Dis*, roč. 69, č. Suppl 1, s. S1–S5, srp. 2019, doi: 10.1093/cid/ciz394.
- [50] Y. R. Lee a C. E. Burton, „Eravacycline, a newly approved fluorocycline", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, roč. 38, č. 10, s. 1787–1794, říj. 2019, doi: 10.1007/s10096-019-03590-3.
- [51] A. F. Read a R. J. Woods, „Antibiotic resistance management", *Evol Med Public Health*, roč. 2014, č. 1, s. 147–147, led. 2014, doi: 10.1093/emph/eou024.
- [52] C. A. Michael, D. Dominey-Howes, a M. Labbate, „The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management", *Front. Public Health*, roč. 2, 2014, doi: 10.3389/fpubh.2014.00145.
- [53] V. Viswanathan, „Off-label abuse of antibiotics by bacteria", *Gut Microbes*, roč. 5, č. 1, s. 3–4, led. 2014, doi: 10.4161/gmic.28027.
- [54] J. G. Bartlett, D. N. Gilbert, a B. Spellberg, „Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics", *Clin Infect Dis*, roč. 56, č. 10, s. 1445–1450, kvě. 2013, doi: 10.1093/cid/cit070.
- [55] B. J. Magerlein, „Modification of lincomycin", *Adv. Appl. Microbiol.*, roč. 14, s. 185–229, 1971, doi: 10.1016/s0065-2164(08)70544-6.
- [56] A.-P. Pang, L. Du, C.-Y. Lin, J. Qiao, a G.-R. Zhao, „Co-overexpression of *lmbW* and *metK* led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*",

- Journal of Applied Microbiology*, roč. 119, č. 4, s. 1064–1074, 2015, doi: 10.1111/jam.12919.
- [57] G. Roos a J. Messens, „Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation“, *Free Radical Biology and Medicine*, roč. 51, č. 2, s. 314–326, čvc. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031.
- [58] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo, a A. Milzani, „S-glutathionylation in protein redox regulation“, *Free Radical Biology and Medicine*, roč. 43, č. 6, s. 883–898, zář. 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014.
- [59] C. Sao Emani *et al.*, „Ergothioneine is a secreted antioxidant in Mycobacterium smegmatis“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, roč. 57, č. 7, s. 3202–3207, čvc. 2013, doi: 10.1128/AAC.02572-12.
- [60] C. Sao Emani, M. J. Williams, P. D. Van Helden, M. J. C. Taylor, I. J. Wiid, a B. Baker, „Gamma-glutamylcysteine protects ergothioneine-deficient Mycobacterium tuberculosis mutants against oxidative and nitrosative stress“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 495, č. 1, s. 174–178, led. 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.163.
- [61] K. Van Laer, C. J. Hamilton, a J. Messens, „Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange“, *Antioxid. Redox Signal.*, roč. 18, č. 13, s. 1642–1653, kvě. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4964.
- [62] D. S. Genghof a O. V. Damme, „Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Mycobacteria“, *Journal of Bacteriology*, roč. 87, č. 4, s. 852–862, dub. 1964.
- [63] V. Saini *et al.*, „Ergothioneine maintains redox and bioenergetic homeostasis essential for drug susceptibility and virulence of Mycobacterium tuberculosis“, *Cell Rep*, roč. 14, č. 3, s. 572–585, led. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.056.
- [64] J. Ey, E. Schömig, a D. Taubert, „Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine“, *J. Agric. Food Chem.*, roč. 55, č. 16, s. 6466–6474, srp. 2007, doi: 10.1021/jf071328f.
- [65] B. G. Audley a C. H. Tan, „The uptake of ergothioneine from the soil into the latex of *Hevea brasiliensis*“, *Phytochemistry*, roč. 7, č. 11, s. 1999–2000, lis. 1968, doi: 10.1016/S0031-9422(00)90759-3.
- [66] N. Motohashi, I. Mori, a Y. Sugiura, „¹³C-Nuclear Magnetic Resonance and

- Raman Spectroscopic Studies on Ionization and Mercury Complex of Ergothioneine", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, roč. 24, č. 8, s. 1737–1741, 1976, doi: 10.1248/cpb.24.1737.
- [67] P. C. Jocelyn, *Biochemistry of the SH group; the occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides*. London, New York: Academic Press, 1972.
- [68] H. P. Misra, „Generation of Superoxide Free Radical during the Autoxidation of Thiols", *J. Biol. Chem.*, roč. 249, č. 7, s. 2151–2155, říj. 1974.
- [69] N. Motohashi, I. Mori, Y. Sugiura, a H. Tanaka, „Metal-Complexes of Ergothioneine", *Chem. Pharm. Bull.*, roč. 22, č. 3, s. 654–657, 1974.
- [70] H. Heath a G. Toennies, „The preparation and properties of ergothioneine disulphide", *Biochem J*, roč. 68, č. 2, s. 204–210, úno. 1958, doi: 10.1042/bj0680204.
- [71] Steven I. Baskin a Harry Salem, *Oxidants, Antioxidants And Free Radicals*, 1 edition. Washington, D.C: CRC Press, 1997.
- [72] D. Akanmu, R. Cecchini, O. I. Aruoma, a B. Halliwell, „The antioxidant action of ergothioneine", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, roč. 288, č. 1, s. 10–16, čvc. 1991, doi: 10.1016/0003-9861(91)90158-F.
- [73] K. D. Asmus, R. V. Bensasson, J. L. Bernier, R. Houssin, a E. J. Land, „One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C.", *Biochem J*, roč. 315, č. Pt 2, s. 625–629, dub. 1996.
- [74] P. Fu a J. B. MacMillan, „Spithioneines A and B, Two New Bohemamine Derivatives Possessing Ergothioneine Moiety from a Marine-Derived *Streptomyces spinoverrucosus*", *Org. Lett.*, roč. 17, č. 12, s. 3046–3049, čer. 2015, doi: 10.1021/acs.orglett.5b01328.
- [75] K. Motohashi, A. Nagai, M. Takagi, a K. Shin-ya, „Two novel benzastatin derivatives, JBIR-67 and JBIR-73, isolated from *Streptomyces* sp. RI18", *The Journal of Antibiotics*, roč. 64, č. 3, s. 281–283, bře. 2011, doi: 10.1038/ja.2010.169.
- [76] K. Konno, H. Shirahama, a T. Matsumoto, „Isolation and structure of clithioneine, a new amino acid betaine from *Clitocybe acromelalga*.", *Tetrahedron Letters*, roč.

- 22, č. 17, s. 1617–1618, led. 1981, doi: 10.1016/S0040-4039(01)90392-2.
- [77] Q.-L. Guo, S. Lin, Y.-N. Wang, C.-G. Zhu, C.-B. Xu, a J.-G. Shi, „Gastrolatathioneine, an unusual ergothioneine derivative from an aqueous extract of “tian ma”: A natural product co-produced by plant and symbiotic fungus”, *Chinese Chemical Letters*, roč. 27, č. 10, s. 1577–1581, říj. 2016, doi: 10.1016/j.cclet.2016.06.040.
- [78] B. M. Cumming, K. C. Chinta, V. P. Reddy, a A. J. C. Steyn, „Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis”, *Antioxid Redox Signal*, roč. 28, č. 6, s. 431–444, úno. 2018, doi: 10.1089/ars.2017.7300.
- [79] F. P. Seebeck, „In Vitro Reconstitution of Mycobacterial Ergothioneine Biosynthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 132, č. 19, s. 6632–6633, kvě. 2010, doi: 10.1021/ja101721e.
- [80] H. Song, M. Leninger, N. Lee, a P. Liu, „Regio-selectivity of the Oxidative C-S Bond Formation in Ergothioneine and Ovoidiol Biosyntheses”, *Org Lett*, roč. 15, č. 18, s. 4854–4857, zář. 2013, doi: 10.1021/ol402275t.
- [81] A. Vit, G. T. Mashabela, W. Blankenfeldt, a F. P. Seebeck, „Structure of the Ergothioneine-Biosynthesis Amidohydrolase EgtC”, *ChemBioChem*, roč. 16, č. 10, s. 1490–1496, čvc. 2015, doi: 10.1002/cbic.201500168.
- [82] H. Song *et al.*, „Mechanistic studies of a novel C-S lyase in ergothioneine biosynthesis: the involvement of a sulfenic acid intermediate”, *Sci Rep*, roč. 5, čvc. 2015, doi: 10.1038/srep11870.
- [83] W. Hu *et al.*, „Bioinformatic and biochemical characterizations of C-S bond formation and cleavage enzymes in the fungus *Neurospora crassa* ergothioneine biosynthetic pathway”, *Org. Lett.*, roč. 16, č. 20, s. 5382–5385, říj. 2014, doi: 10.1021/ol502596z.
- [84] R. Burn, L. Misson, M. Meury, a F. P. Seebeck, „Anaerobic Origin of Ergothioneine”, *Angewandte Chemie International Edition*, roč. 56, č. 41, s. 12508–12511, 2017, doi: 10.1002/anie.201705932.
- [85] V. K. Jothivasan a C. J. Hamilton, „Mycothioli: synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes”, *Nat. Prod. Rep.*, roč. 25, č. 6, s. 1091–1117, lis. 2008, doi: 10.1039/B616489G.
- [86] G. L. Newton, N. Buchmeier, a R. C. Fahey, „Biosynthesis and Functions of

- Mycothioli, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria", *Microbiol Mol Biol Rev*, roč. 72, č. 3, s. 471–494, zář. 2008, doi: 10.1128/MMBR.00008-08.
- [87] M. Rawat a Y. Av-Gay, „Mycothioli-dependent proteins in actinomycetes", *Fems Microbiol. Rev.*, roč. 31, č. 3, s. 278–292, dub. 2007, doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00062.x.
- [88] G. L. Newton *et al.*, „The Structure of U17 Isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its Properties as an Antioxidant Thiol", *European Journal of Biochemistry*, roč. 230, č. 2, s. 821–825, 1995, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0821h.x.
- [89] M. P. Patel a J. S. Blanchard, „Mycobacterium tuberculosis Mycothione Reductase: pH Dependence of the Kinetic Parameters and Kinetic Isotope Effects", *Biochemistry*, roč. 40, č. 17, s. 5119–5126, kvě. 2001, doi: 10.1021/bi0029144.
- [90] M. Misset-Smits, P. W. van Ophem, S. Sakuda, a J. A. Duine, „Mycothioli, 1-O-(2'-[N-acetyl-L-cysteinyl]amido-2'-deoxy-alpha-D-glucopyranosyl)-D- myo-inositol, is the factor of NAD/factor-dependent formaldehyde dehydrogenase", *FEBS Lett.*, roč. 409, č. 2, s. 221–222, čer. 1997, doi: 10.1016/s0014-5793(97)00510-3.
- [91] J. Feng *et al.*, „The Gene *ncgl2918* Encodes a Novel Maleylpyruvate Isomerase That Needs Mycothiol as Cofactor and Links Mycothiol Biosynthesis and Gentsate Assimilation in *Corynebacterium glutamicum*", *J. Biol. Chem.*, roč. 281, č. 16, s. 10778–10785, dub. 2006, doi: 10.1074/jbc.M513192200.
- [92] N. A. Buchmeier, G. L. Newton, T. Koledin, a R. C. Fahey, „Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics", *Molecular Microbiology*, roč. 47, č. 6, s. 1723–1732, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03416.x.
- [93] G. L. Newton, Y. Av-Gay, a R. C. Fahey, „A Novel Mycothiol-Dependent Detoxification Pathway in Mycobacteria Involving Mycothiol S-Conjugate Amidase", *Biochemistry*, roč. 39, č. 35, s. 10739–10746, zář. 2000, doi: 10.1021/bi000356n.
- [94] G. L. Newton, R. C. Fahey, G. Cohen, a Y. Aharonowitz, „Low-molecular-weight thiols in streptomyces and their potential role as antioxidants.", *J Bacteriol*, roč.

- 175, č. 9, s. 2734–2742, kvě. 1993.
- [95] T. Nakashima *et al.*, „Nanaomycin H: A new nanaomycin analog", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, roč. 123, č. 6, s. 765–770, čer. 2017, doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.011.
- [96] H. Matsuo *et al.*, „Nanaomycin I and J: New nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from “*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*” OS-3966", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, roč. 127, č. 5, s. 549–553, kvě. 2019, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.10.013.
- [97] X. Wang *et al.*, „Mccreamycins A–D, Geldanamycin-Derived Cyclopentenone Macrolactams from an Eastern Kentucky Abandoned Coal Mine Microbe", *Angewandte Chemie International Edition*, roč. 56, č. 11, s. 2994–2998, bře. 2017, doi: 10.1002/anie.201612447.
- [98] H. Ikeda, K. Shin-ya, T. Nagamitsu, a H. Tomoda, „Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification", *J Ind Microbiol Biotechnol*, roč. 43, č. 2, s. 325–342, bře. 2016, doi: 10.1007/s10295-015-1694-6.
- [99] S. B. Singh *et al.*, „Isolation, Structure, and Antibacterial Activities of Lucensimycins D–G, Discovered from *Streptomyces lucensis* MA7349 Using an Antisense Strategy", *J. Nat. Prod.*, roč. 72, č. 3, s. 345–352, bře. 2009, doi: 10.1021/np8005106.
- [100] B. Zhou, Y.-Y. Ji, H.-J. Zhang, a L. Shen, „Gephyyamycin and cysrabelomycin, two new angucyclinone derivatives from the *Streptomyces* sp. HN-A124", *Natural Product Research*, roč. 0, č. 0, s. 1–6, zář. 2019, doi: 10.1080/14786419.2019.1660336.
- [101] R. C. Fahey, „Glutathione analogs in prokaryotes", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, roč. 1830, č. 5, s. 3182–3198, kvě. 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.006.
- [102] G. L. Newton, T. Koledin, B. Gorovitz, M. Rawat, R. C. Fahey, a Y. Av-Gay, „The Glycosyltransferase Gene Encoding the Enzyme Catalyzing the First Step of Mycothiol Biosynthesis (*mshA*)", *J Bacteriol*, roč. 185, č. 11, s. 3476–3479, čer. 2003, doi: 10.1128/JB.185.11.3476-3479.2003.

- [103] Y. Guo *et al.*, „Characterization and biochemical investigation of the potential inositol monophosphate phosphatase involved in bacterial mycothiol biosynthesis", *Journal of Carbohydrate Chemistry*, roč. 37, č. 9, s. 507–521, říj. 2018, doi: 10.1080/07328303.2018.1559326.
- [104] G. L. Newton, Y. Av-gay, a R. C. Fahey, „N-Acetyl-1-d-myo-Inosityl-2-Amino-2-Deoxy- α -d-Glucopyranoside Deacetylase (MshB) Is a Key Enzyme in Mycothiol Biosynthesis", *J Bacteriol*, roč. 182, č. 24, s. 6958–6963, pro. 2000.
- [105] G. L. Newton, M. Ko, P. Ta, Y. Av-Gay, a R. C. Fahey, „Purification and characterization of Mycobacterium tuberculosis 1d-myo-inosityl-2-acetamido-2-deoxy- α -d-glucopyranoside deacetylase, MshB, a mycothiol biosynthetic enzyme", *Protein Expression and Purification*, roč. 47, č. 2, s. 542–550, čer. 2006, doi: 10.1016/j.pep.2006.03.003.
- [106] D. Sareen, M. Steffek, G. L. Newton, a R. C. Fahey, „ATP-Dependent L-Cysteine:1d-myo-Inosityl 2-Amino-2-deoxy- α -d-glucopyranoside Ligase, Mycothiol Biosynthesis Enzyme MshC, Is Related to Class I Cysteinyl-tRNA Synthetases", *Biochemistry*, roč. 41, č. 22, s. 6885–6890, čer. 2002, doi: 10.1021/bi012212u.
- [107] T. Koledin, G. L. Newton, a R. C. Fahey, „Identification of the mycothiol synthase gene (mshD) encoding the acetyltransferase producing mycothiol in actinomycetes", *Arch. Microbiol.*, roč. 178, č. 5, s. 331–337, lis. 2002, doi: 10.1007/s00203-002-0462-y.
- [108] V. R. Perera, G. L. Newton, a K. Pogliano, „Bacillithiol: a key protective thiol in Staphylococcus aureus", *Expert review of anti-infective therapy*, roč. 13, č. 9, s. 1089, 2015, doi: 10.1586/14787210.2015.1064309.
- [109] G. L. Newton *et al.*, „Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli", *Nat. Chem. Biol.*, roč. 5, č. 9, s. 625–627, zář. 2009, doi: 10.1038/nchembio.189.
- [110] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, a A. Rosato, „Zinc through the Three Domains of Life", *J. Proteome Res.*, roč. 5, č. 11, s. 3173–3178, lis. 2006, doi: 10.1021/pr0603699.
- [111] A. A. Roberts, S. V. Sharma, A. W. Strankman, S. R. Duran, M. Rawat, a C. J. Hamilton, „Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomycin resistance in Staphylococcus aureus",

- Biochem J*, roč. 451, č. 1, s. 69–79, dub. 2013, doi: 10.1042/BJ20121541.
- [112] A. Gaballa *et al.*, „Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli", *Proc Natl Acad Sci U S A*, roč. 107, č. 14, s. 6482–6486, dub. 2010, doi: 10.1073/pnas.1000928107.
- [113] K. G. Reddie a K. S. Carroll, „Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation", *Current Opinion in Chemical Biology*, roč. 12, č. 6, s. 746–754, pro. 2008, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.028.
- [114] R. A. Davis, S. Duffy, S. Fletcher, V. M. Avery, a R. J. Quinn, „Thioplakortones A–D: Antimalarial Thiazine Alkaloids from the Australian Marine Sponge *Plakortis lita*", *J. Org. Chem.*, roč. 78, č. 19, s. 9608–9613, říj. 2013, doi: 10.1021/jo400988y.
- [115] G. L. Newton a B. Javor, „gamma-Glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria.", *J Bacteriol*, roč. 161, č. 1, s. 438–441, led. 1985.
- [116] E.-K. Kim, C.-J. Cha, Y.-J. Cho, Y.-B. Cho, a J.-H. Roe, „Synthesis of γ -glutamylcysteine as a major low-molecular-weight thiol in lactic acid bacteria *Leuconostoc* spp.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 369, č. 4, s. 1047–1051, kvě. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.139.
- [117] C. Sao Emani *et al.*, „Generation and characterization of thiol-deficient *Mycobacterium tuberculosis* mutants", *Scientific Data*, roč. 5, č. 1, s. 180184, zář. 2018, doi: 10.1038/sdata.2018.184.
- [118] C. S. Emani, M. J. Williams, I. J. Wiid, B. Baker, a C. Carolis, „Compounds with Potential Activity against *Mycobacterium tuberculosis*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, roč. 62, č. 4, dub. 2018, doi: 10.1128/AAC.02236-17.
- [119] A. R. Sundquist a R. C. Fahey, „The function of gamma-glutamylcysteine and bis-gamma-glutamylcystine reductase in *Halobacterium halobium*", *J. Biol. Chem.*, roč. 264, č. 2, s. 719–725, led. 1989.
- [120] R. C. Fahey, W. C. Brown, W. B. Adams, a M. B. Worsham, „Occurrence of glutathione in bacteria.", *J Bacteriol*, roč. 133, č. 3, s. 1126–1129, bře. 1978.
- [121] A. Meister, „Glutathione metabolism and its selective modification", *J. Biol. Chem.*, roč. 263, č. 33, s. 17205–17208, lis. 1988.
- [122] M. L. Reniere *et al.*, „Glutathione activates virulence gene expression of an

- intracellular pathogen", *Nature*, roč. 517, č. 7533, s. 170–173, led. 2015, doi: 10.1038/nature14029.
- [123] M. Wang, Q. Zhao, a W. Liu, „The versatile low-molecular-weight thiols: Beyond cell protection", *BioEssays*, roč. 37, č. 12, s. 1262–1267, 2015, doi: 10.1002/bies.201500067.
- [124] P. Ghezzi a P. Di Simplicio, „Glutathionylation pathways in drug response", *Current Opinion in Pharmacology*, roč. 7, č. 4, s. 398–403, srp. 2007, doi: 10.1016/j.coph.2007.04.006.
- [125] D. H. Scharf, T. Heinekamp, N. Remme, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, a C. Hertweck, „Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 93, č. 2, s. 467–472, led. 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3689-1.
- [126] D. H. Scharf *et al.*, „A Dedicated Glutathione S-Transferase Mediates Carbon–Sulfur Bond Formation in Gliotoxin Biosynthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 133, č. 32, s. 12322–12325, srp. 2011, doi: 10.1021/ja201311d.
- [127] Anna E. Salinas a Margaret G. Wong, „Glutathione S-Transferases - A Review", *Current Medicinal Chemistry*, roč. 6, č. 4, s. 279–309, 1996.
- [128] N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, a C. L. Hammond, „Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases", *Biol. Chem.*, roč. 390, č. 3, s. 191–214, bř. 2009, doi: 10.1515/BC.2009.033.
- [129] G. Noctor *et al.*, „Glutathione in plants: an integrated overview", *Plant Cell Environ.*, roč. 35, č. 2, s. 454–484, úno. 2012, doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x.
- [130] S. D. Copley a J. K. Dhillon, „Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes", *Genome Biol*, roč. 3, č. 5, s. research0025.1, dub. 2002, doi: 10.1186/gb-2002-3-5-research0025.
- [131] R. G. Bartsch, G. L. Newton, C. Sherrill, a R. C. Fahey, „Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria", *J. Bacteriol.*, roč. 178, č. 15, s. 4742–4746, srp. 1996, doi: 10.1128/jb.178.15.4742-4746.1996.
- [132] B. Vergauwen *et al.*, „Characterization of Glutathione Amide Reductase from *Chromatium gracile* IDENTIFICATION OF A NOVEL THIOL PEROXIDASE (Prx/Grx) FUELED BY GLUTATHIONE AMIDE REDOX CYCLING", *J. Biol.*

- Chem.*, roč. 276, č. 24, s. 20890–20897, čer. 2001, doi: 10.1074/jbc.M102026200.
- [133] C. W. Tabor a H. Tabor, „The complete conversion of spermidine to a peptide derivative in *Escherichia coli*“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 41, č. 1, s. 232–238, říj. 1970, doi: 10.1016/0006-291X(70)90493-6.
- [134] K. Smith, A. Borges, M. R. Ariyanayagam, a A. H. Fairlamb, „Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*“, *Biochem J*, roč. 312, č. 2, s. 465–469, pro. 1995, doi: 10.1042/bj3120465.
- [135] J. M. Bollinger, D. S. Kwon, G. W. Huisman, R. Kolter, a C. T. Walsh, „Glutathionylspermidine Metabolism in *Escherichia coli*. PURIFICATION, CLONING, OVERPRODUCTION, AND CHARACTERIZATION OF A BIFUNCTIONAL GLUTATHIONYLSPERMIDINE SYNTHETASE/AMIDASE“, *J. Biol. Chem.*, roč. 270, č. 23, s. 14031–14041, zář. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.23.14031.
- [136] H. Tabor a C. W. Tabor, „Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*.“, *J. Biol. Chem.*, roč. 250, č. 7, s. 2648–2654, říj. 1975.
- [137] K. M. Prise, N. E. Gillies, A. Whelan, G. L. Newton, R. C. Fahey, a B. D. Michael, „Role of Charge in the Radioprotection of *E. Coli* by Thiols“, *International Journal of Radiation Biology*, roč. 67, č. 4, s. 393–401, čvc. 2009, doi: 10.1080/09553009514550451.
- [138] M. R. Ariyanayagam a A. H. Fairlamb, „Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids“, *Molecular and Biochemical Parasitology*, roč. 115, č. 2, s. 189–198, čvc. 2001, doi: 10.1016/S0166-6851(01)00285-7.
- [139] C. S. Bond, Y. Zhang, M. Berriman, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb, a W. N. Hunter, „Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors“, *Structure*, roč. 7, č. 1, s. 81–89, led. 1999, doi: 10.1016/S0969-2126(99)80011-2.
- [140] C. Dumas *et al.*, „Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages“, *The EMBO Journal*, roč. 16, č. 10, s. 2590–2598, kvě. 1997, doi: 10.1093/emboj/16.10.2590.

- [141] R. K. Pandey, D. Sharma, T. K. Bhatt, S. Sundar, a V. K. Prajapati, „Developing imidazole analogues as potential inhibitor for Leishmania donovani trypanothione reductase: virtual screening, molecular docking, dynamics and ADMET approach", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, roč. 33, č. 12, s. 2541–2553, pro. 2015, doi: 10.1080/07391102.2015.1085904.
- [142] R. K. Pandey *et al.*, „Febrifugine analogues as Leishmania donovani trypanothione reductase inhibitors: binding energy analysis assisted by molecular docking, ADMET and molecular dynamics simulation", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, roč. 35, č. 1, s. 141–158, led. 2017, doi: 10.1080/07391102.2015.1135298.
- [143] S. B. delCardayré, K. P. Stock, G. L. Newton, R. C. Fahey, a J. E. Davies, „Coenzyme A Disulfide Reductase, the Primary Low Molecular Weight Disulfide Reductase from Staphylococcus aureus PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE NATIVE ENZYME", *J. Biol. Chem.*, roč. 273, č. 10, s. 5744–5751, čer. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5744.
- [144] J. Luba, V. Charrier, a A. Claiborne, „Coenzyme A-Disulfide Reductase from Staphylococcus aureus: Evidence for Asymmetric Behavior on Interaction with Pyridine Nucleotides", *Biochemistry*, roč. 38, č. 9, s. 2725–2737, bře. 1999, doi: 10.1021/bi9825899.
- [145] J. R. Wallen, C. Paige, T. C. Mallett, P. A. Karplus, a A. Claiborne, „PYRIDINE NUCLEOTIDE COMPLEXES WITH Bacillus anthracis COENZYME A-DISULFIDE REDUCTASE: A STRUCTURAL ANALYSIS OF DUAL NAD(P)H SPECIFICITY", *Biochemistry*, roč. 47, č. 18, s. 5182–5193, kvě. 2008, doi: 10.1021/bi8002204.
- [146] J. A. Boylan *et al.*, „Borrelia burgdorferi bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response", *Molecular Microbiology*, roč. 59, č. 2, s. 475–486, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04963.x.
- [147] D. R. Harris *et al.*, „Discovery and characterization of a Coenzyme A disulfide reductase from Pyrococcus horikoshii", *The FEBS Journal*, roč. 272, č. 5, s. 1189–1200, 2005, doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04555.x.
- [148] T. C. Mallett, J. R. Wallen, P. A. Karplus, H. Sakai, T. Tsukihara, a A. Claiborne,

- „STRUCTURE OF COENZYME A-DISULFIDE REDUCTASE FROM *Staphylococcus aureus* AT 1.54 Å RESOLUTION", *Biochemistry*, roč. 45, č. 38, s. 11278–11289, zář. 2006, doi: 10.1021/bi061139a.
- [149] D. Parsonage *et al.*, „CHARACTERIZATION OF THE N-ACETYL- α -D-GLUCOSAMINYL L-MALATE SYNTHASE (BshA) AND DEACETYLASE (BshB) FUNCTIONS FOR BACILLITHIOL BIOSYNTHESIS IN *Bacillus anthracis*", *Biochemistry*, roč. 49, č. 38, s. 8398–8414, zář. 2010, doi: 10.1021/bi100698n.
- [150] C. H. Eggers *et al.*, „The coenzyme A disulphide reductase of *Borrelia burgdorferi* is important for rapid growth throughout the enzootic cycle and essential for infection of the mammalian host", *Molecular Microbiology*, roč. 82, č. 3, s. 679–697, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07845.x.
- [151] M. F. Freeman, K. A. Moshos, M. J. Bodner, R. Li, a C. A. Townsend, „Four enzymes define the incorporation of coenzyme A in thienamycin biosynthesis", *PNAS*, roč. 105, č. 32, s. 11128–11133, srp. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804500105.
- [152] R. LEONARDI a S. JACKOWSKI, „Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A", *EcoSal Plus*, roč. 2, č. 2, dub. 2007, doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.4.
- [153] E. Turner, R. Klevit, P. B. Hopkins, a B. M. Shapiro, „Ovothiol: a novel thiohistidine compound from sea urchin eggs that confers NAD(P)H-O₂ oxidoreductase activity on ovoperoxidase", *J. Biol. Chem.*, roč. 261, č. 28, s. 13056–13063, říj. 1986.
- [154] F. Rossi, G. Nardi, A. Palumbo, a G. Prota, „5-thiolhistidine, a new amino acid from eggs of *Octopus vulgaris*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, roč. 80, č. 4, s. 843–845, led. 1985, doi: 10.1016/0305-0491(85)90472-9.
- [155] S. Selman-Reimer, R. J. Duhe, B. J. Stockman, a B. R. Selman, „L-1-N-methyl-4-mercaptohistidine disulfide, a potential endogenous regulator in the redox control of chloroplast coupling factor 1 in *Dunaliella*", *J. Biol. Chem.*, roč. 266, č. 1, s. 182–188, led. 1991.
- [156] K. H. Weaver a D. L. Rabenstein, „Thiol/Disulfide Exchange Reactions of Ovothiol A with Glutathione", *J. Org. Chem.*, roč. 60, č. 6, s. 1904–1907, bř.

- 1995, doi: 10.1021/jo00111a065.
- [157] I. Castellano a F. P. Seebeck, „On ovothiol biosynthesis and biological roles: from life in the ocean to therapeutic potential", *Nat. Prod. Rep.*, roč. 35, č. 12, s. 1241–1250, pro. 2018, doi: 10.1039/C8NP00045J.
- [158] S. Ito, G. Nardi, A. Palumbo, a G. Prota, „Isolation and characterization of adenochrome, a unique iron(III)-binding peptide from *Octopus vulgaris*", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, č. 0, s. 2617–2623, led. 1979, doi: 10.1039/P19790002617.
- [159] Charles. Pathirana a R. J. Andersen, „Imbricatine, an unusual benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid isolated from the starfish *Dermasterias imbricata*", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 108, č. 26, s. 8288–8289, pro. 1986, doi: 10.1021/ja00286a041.
- [160] A. Braunshausen a F. P. Seebeck, „Identification and Characterization of the First Ovothiol Biosynthetic Enzyme", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 133, č. 6, s. 1757–1759, úno. 2011, doi: 10.1021/ja109378e.
- [161] N. Naowarajna *et al.*, „In Vitro Reconstitution of the Remaining Steps in Ovothiol A Biosynthesis: C–S Lyase and Methyltransferase Reactions", *Org. Lett.*, roč. 20, č. 17, s. 5427–5430, zář. 2018, doi: 10.1021/acs.orglett.8b02332.
- [162] U. Deppenmeier, „The unique biochemistry of methanogenesis", in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, roč. 71, Academic Press, 2002, s. 223–283.
- [163] A. M. Krishnakumar, D. Sliwa, J. A. Endrizzi, E. S. Boyd, S. A. Ensign, a J. W. Peters, „Getting a Handle on the Role of Coenzyme M in Alkene Metabolism", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, roč. 72, č. 3, s. 445–456, zář. 2008, doi: 10.1128/MMBR.00005-08.
- [164] J. R. Allen, D. D. Clark, J. G. Krum, a S. A. Ensign, „A role for coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation", *PNAS*, roč. 96, č. 15, s. 8432–8437, čvc. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.15.8432.
- [165] A. Zotou, „An overview of recent advances in HPLC instrumentation", *cent.eur.j.chem.*, roč. 10, č. 3, s. 554–569, čer. 2012, doi: 10.2478/s11532-011-0161-0.

- [166] D. T. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, 1 edition. Boston: McGraw-Hill, 1999.
- [167] F. W. Fifield a D. Kealey, *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, 5th edition. Blackwell Science Ltd, 2000.
- [168] M. E. Swartz, „UPLC™: An Introduction and Review", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, roč. 28, č. 7–8, s. 1253–1263, dub. 2005, doi: 10.1081/JLC-200053046.
- [169] Eric S Grumbach, Thomas E Wheat, Marianna Kele, a Jeffrey R Mazzeo, „Developing columns for UPLC: design considerations and recent developments", *LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists*, č. 22, s. 40–44, kvě. 2005.
- [170] T. Tylová, Z. Kameník, M. Flieger, a J. Olšovská, „Comparison of LC Columns Packed with 2.6 μm Core-Shell and Sub-2 μm Porous Particles for Gradient Separation of Antibiotics", *Chromatographia*, roč. 74, č. 1, s. 19–27, čvc. 2011, doi: 10.1007/s10337-011-2021-7.
- [171] B. Buszewski a S. Noga, „Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique", *Anal Bioanal Chem*, roč. 402, č. 1, s. 231–247, led. 2012, doi: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [172] Y. V. Kazakevich a R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, 2007.
- [173] F. Di Girolamo, I. Lante, M. Muraca, a L. Putignani, „The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era", *Curr Org Chem*, roč. 17, č. 23, s. 2891–2905, pro. 2013, doi: 10.2174/1385272817888131118162725.