

Svoluji k zapůjčení své dizertační práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Šimon Vobruba

Studium klíčových bodů biosyntézy linkomycinu a celesticetinu

Study of the key points of lincomycin and celesticetin biosynthesis

Dizertační práce

Vedoucí práce: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

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

V Praze dne

.....  
Mgr. Šimon Vobruba

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Jiřímu Janatovi za cenné odborné rady a komentáře i za vedení během přípravy dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat Zdeňkovi Kameníkovi a Stanislavu Kadlčíkovi za pomoc při návrhu experimentů, odborný dohled i konzultace výsledků. Poděkování patří také ostatním členům laboratoře za pomoc i vytvoření přátelského prostředí. Děkuji také Pavlovi Talackovi a Karlovi Harantovi za spolupráci při proteomických analýzách. Stejně tak bych chtěl poděkovat celé své rodině a manželce Báře za podporu během celého studia.

Tato práce byla vypracována v letech 2015–2020 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu. Práce je založena na publikacích, jejichž kopie tvoří přílohu této práce.

Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky projekty 20-09811Y a 17-13436Y, Akademií věd České republiky projektem LQ200202002, Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy projektem BIOCEV-FAR LQ1604 a Evropským fondem pro regionální rozvoj projektem BIOCEV-CZ.1.05/1.1.00/02.0109.

Za finanční podpory Nadání Josefa, Marie a Zdenky Hlávkových, Nadace Českého literárního fondu a Federation of European Microbiological Societies mi bylo umožněno zúčastnit se zahraničních vědeckých konferencí a prezentovat zde dílčí části této práce.

# Abstrakt

Linkosamidy tvoří malou, ale důležitou skupinu specializovaných bakteriálních metabolitů s antimikrobiálními účinky, mezi jejíž nejvýznamnější zástupce patří linkomycin a celesticetin. Strukturně se linkosamidy skládají z aminocukru a aminokyseliny, navzájem propojených amidovou vazbou. Aminokyselinové prekurzory linkosamidů se od sebe nicméně významně liší. Prekurzorem celesticetinu je proteinogenní L-prolin, zatímco u významně účinnějšího linkomycinu je jím neobvyklá aminokyselina (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin (PPL). Přesto jsou tyto prekurzory rozpoznávány a aktivovány homologními adenylačními doménami CcbC, resp. LmbC. A právě tento, pro biologickou aktivitu výsledné látky klíčový mechanismus rozpoznání a aktivace aminokyselinového prekurzoru, je předmětem této práce. Nejprve byly za využití cílené mutagenese a biochemické charakterizace mutant identifikovány aminokyselinové zbytky v adenylační doméně LmbC, nezbytné pro aktivaci PPL. Na základě těchto dat byla následně experimentálně napodobena molekulární evoluce substrátové specifity adenylační domény směrem od L-prolinu (jako u CcbC) k PPL (LmbC), kdy bylo dosaženo změny substrátové specifity mutací pouhých tří aminokyselinových zbytků ve vazebném místě pro substrát.

Aktivované aminokyselinové prekurzory jsou v biosyntézách linkosamidů dále kondenzovány s aminocukerným prekurzorem za využití unikátního kondenzačního systému, spřaženého s metabolismem mykothiolu, který slouží také jako donor atomu síry. Součástí následujících postkondenzačních kroků je *N*-deacetylace linkosamidového meziprojektu odvozeného od mykothiolu, katalyzovaná dříve nepopsaným enzymem, která je nezbytnou podmínkou pro závěrečné maturační kroky umožňující ve výsledku buď metylaci síry v případě biosyntézy linkomycinu nebo připojení salicylátu u celesticetinu. V rámci dizertační práce bylo prokázáno, že je tato *N*-deacetylace katalyzována enzymy CcbIH/CcbQ v biosyntéze celesticetinu, resp. LmbIH/LmbQ v biosyntéze linkomycinu. Tyto proteiny jsou prvními funkčně charakterizovanými *N*-deacetylázami z široce rozšířené, avšak málo prozkoumané proteinové rodiny TldD/PmbA. Dopusud se předpokládalo, že TldD/PmbA rodina zahrnuje výhradně endopeptidázy. Unikátnost linkosamidových proteinů v rámci této rodiny byla prokázána i za využití bioinformatické analýzy.

Studium klíčových kroků v biosyntézách linkosamidů poskytlo významné informace o inkorporaci prekurzorů do struktur linkosamidů, případně o reakcích inkorporacím těsně předcházejících. Tato zjištění jsou důležitá jak z hlediska pochopení molekulární evoluce těchto unikátních specializovaných metabolitů, tak i z důvodů potenciální *in vivo* přípravy účinnějších hybridních linkosamidů.

Klíčová slova: Linkosamidy, adenylační domény, *N*-deacetylace, proteinová rodina TldD/PmbA

# Abstract

Lincosamides form a small but important group of specialized microbial metabolites with antibiotic activity. The most important members of this group are celesticetin and clinically used lincomycin. Structurally, lincosamides are composed of an amino sugar and an amino acid connected by an amide bond. The amino acid precursors of both lincosamides remarkably differ. Proteinogenic L-proline is the precursor of celesticetin, while an unusual amino acid (2*S*,4*R*)-4-propyl- L-proline (PPL) is incorporated in the more efficient compound lincomycin. Surprisingly, both these precursors are recognized and activated for further biosynthetic steps by homologous adenylation domains CcbC and LmbC, respectively. The detailed description of this amino acid recognition and activation step, which is critical for the biological activity of the resulting compound, was the aim of the first part of this thesis. The site-directed mutagenesis of the LmbC substrate binding pocket and biochemical characterization of resulting mutants were employed to identify the residues crucial for the activation of PPL. Subsequently, we experimentally simulated the molecular evolution leading from L-proline-specific substrate binding pocket (like in CcbC) to the PPL-specific enzyme (LmbC). The substitution of only three amino acid residues in the substrate binding pocket was sufficient for this significant change of substrate specificity.

Once activated, the amino acid precursor is subsequently condensed with the amino sugar moiety by a unique condensation system, coupled with the metabolism of mycothiol, which acts also as a donor of the sulphur atom. The mycothiol-derived lincosamide intermediate must be further *N*-deacetylated. This reaction is a prerequisite for subsequent maturation steps, which allow the methylation of sulphur in the lincomycin biosynthesis or the attachment of salicylate in the celesticetin biosynthesis. In the second part of the thesis we elucidated the post-condensational *N*-deacetylation step and characterized previously unknown enzyme catalysing this reaction. Specifically, we showed that the *N*-deacetylation is catalysed by CcbIH/CcbQ in celesticetin biosynthesis and homologous protein pair LmbIH/LmbQ in biosynthesis of lincomycin. These are the first *N*-deacetylases belonging to a widely distributed, but poorly studied TldD/PmbA protein family, which was up to date known to comprise only endopeptidases. The uniqueness of lincosamide proteins within the TldD/PmbA protein family was also supported by the bioinformatic analysis.

Our findings concerning the key steps of lincosamide biosynthesis provided important information for understanding the molecular evolution of these unique metabolites as well as for possible *in vivo* preparation of more potent hybrid lincosamide-based compounds.

Key words: Lincosamides, adenylation domains, *N*-deacetylation, TldD/PmbA protein family

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Literární přehled .....	12
2.1	Specializované metabolity .....	12
2.2	Mechanismy biosyntézy specializovaných metabolitů .....	12
2.3	Ribozomálně syntetizované specializované metabolity .....	13
2.3.1	Biosyntéza RiPPs .....	14
2.3.2	Odštěpení vedoucího peptidu .....	15
2.4	Neribozomální peptidy .....	16
2.4.1	Biosyntéza neribozomálních peptidů .....	16
2.4.2	Adenylační domény .....	18
2.4.2.1	Struktura adenylačních domén .....	18
2.4.2.2	Vazebné místo pro substrát .....	20
2.4.2.3	Predikce substrátové specifity .....	21
2.4.2.4	Modifikace substrátové specifity adenylačních domén .....	21
2.4.2.5	Modulární a samostatně stojící adenylační domény .....	22
2.4.2.6	Aktivátory adenylačních domén .....	22
2.5	Linkosamidy .....	23
2.5.1	Biologická aktivita linkosamidů .....	24
2.5.2	Biosyntetické genové shluky linkosamidů .....	25
2.5.2.1	Evoluční historie linkosamidových genových shluků .....	26
2.5.3	Biosyntéza linkosamidových prekurzorů .....	29
2.5.3.1	Biosyntéza aminocukerného prekurzoru linkosamidů .....	29
2.5.3.2	Biosyntéza aminokyselinového prekurzoru linkomycinu .....	30
2.5.4	Kondenzace a postkondenzační kroky v biosyntéze linkosamidů .....	31
2.5.4.1	Aktivace aminokyselinového prekurzoru .....	31
2.5.4.2	Zapojení ergothioneinu a mykothiolu do biosyntézy linkosamidů .....	38
2.5.4.3	Kondenzace aminokyselinového a aminocukerného prekurzoru .....	40
2.5.4.4	Závěrečné postkondenzační kroky v linkosamidových biosyntetických drahách ...	43
2.5.4.5	Příprava hybridních linkosamidů .....	44
3	Cíle práce .....	46
4	Výsledky .....	47
4.1	Název práce: Evolution-guided adaptation of an adenylation domain substrate specificity to an unusual amino acid .....	47
4.2	Název práce: Diversity of alkylproline moieties in pyrrolobenzodiazepines arises from postcondensation modifications of a unified building block .....	49
4.3	Název práce: <i>N</i> -deacetylation in lincosamide biosynthesis is catalyzed by a TldD/PmbA family protein .....	51
5	Diskuze .....	53
6	Seznam literatury .....	63
7	Přílohy .....	75

## Abecední seznam zkratk

2C řetězec	dvouhlíkatý řetězec
3C řetězec	tříhlíkatý řetězec
4C řetězec	čtyřhlíkatý řetězec
5C řetězec	pětiuhlíkatý řetězec
ADA	aktivátor adenylační domény
APD	4-alkyl-L-prolinový derivát
<i>apd1-apd6</i>	geny kódující enzymy účastníci se APD biosyntetické dráhy
BuPL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-4-butyl-L-prolin
<i>ccb</i>	gen pro biosyntézu celesticetinu
CoA	koenzym A
DH-EPL	4-ethyliden-L-prolin
DH-PPL	4-propyliden-L-prolin
(5 <i>d</i> <sub>1</sub> )-DH-PPL	4-propyliden-L-prolin značený deuteriem
EPL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-4-ethyl-L-prolin
ESH	ergothioneine
GlcN-Ins	1- <i>O</i> -glukosamin-D-myoinositol
HGT	horizontální genový transfer
LAP	lineární peptidy obsahující azol
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
<i>lmb</i>	gen pro biosyntézu linkomcinu
MccB17	mikrocin B17
MccC <sup>Yps</sup>	peptid příbuzný mikrocinu C produkovaný v <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
MSH	mykothiol
NRPS	neribozomálními peptidová syntetáza
PBD	pyrrolo[2,1- <i>c</i> ][1,4]benzodiazepiny
PCP	peptidyl přenášejší protein
PePL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-4-pentyl-L-prolin
PPL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-4-propyl-L-prolin
RiPPs	ribozomálně syntetizované a posttranslačně modifikované peptidy

# 1 Úvod

Přes významné pokroky ve vývoji medicíny zůstávají bakteriální infekce hrozbou pro lidské zdraví i v těch nejvyspělejších zemích světa (Martens & Demain, 2017). V populaci navíc stále stoupá množství pacientů infikovaných bakteriemi rezistentními k běžně používaným léčivům (Sprenger & Fukuda, 2016) a v některých zemích podíl pacientů infikovaných rezistentními bakteriemi dosahuje až 35% (World Health Organization, 2019). V současnosti není znám přesný počet osob, které těmito infekcím podlehnou, ale odhaduje se na nejméně 700 000 ročně s tím, že pokud nebudou podniknuta žádná opatření, mohl by tento počet do roku 2050 stoupnout až k 10 000 000 úmrtím ročně, čímž by překonal počet úmrtí na rakovinu (8 200 000) či diabetes (1 500 000) (O'Neill, 2016; World Health Organization, 2019). Vývoj nových antibiotik je proto oblastí, které je nutné věnovat stále větší pozornost (Brown & Wright, 2016).

Většina v současnosti klinicky používaných antibiotik má svůj původ v bakteriálních metabolitech (Newman & Cragg, 2016). Patří mezi ně antibiotika ze známých skupin, jako jsou beta-laktamy, tetracykliny, makrolidy nebo glykopeptidy, z nichž většina byla uvedena do klinické praxe již kolem poloviny dvacátého století (Chevrette & Currie, 2019). S šířící se rezistencí k těmto dlouhodobě používaným antibiotikům je však třeba uvádět do klinické praxe nové látky, které by měly vyšší antibakteriální účinnost nebo nové mechanismy působení (Fischbach & Walsh, 2009; Brown & Wright, 2016).

Vzhledem k tomu, že v posledních třiceti letech stále klesá počet nově objevených antibiotik (Wright, 2017), se jako jedna z možných cest jeví modifikace v současnosti využívaných látek, vedoucí ke zvýšení jejich antibakteriálního účinku či rozšíření aktivity i proti doposud rezistentním kmenům patogenů. Při využití antibiotik vycházejících z bakteriálních specializovaných metabolitů je ovšem tato cesta podmíněna detailními znalostmi biosyntézy těchto látek, stejně tak jako identifikací genů kódujících jednotlivé biosyntetické enzymy. Jednou ze skupin antibiotik, u které byl tento postup použit, jsou linkosamidy, mezi které patří i klinicky využívaný klindamycin (Brook, 2016). Nedávné významné pokroky ve studiu jejich biosyntetických drah (Zhao *et al.*, 2015; Kameník *et al.*, 2016; Janata *et al.*, 2018a) umožnily přípravu modifikovaných linkosamidů s velmi zajímavými antibakteriálními vlastnostmi oproti původním přírodním linkosamidům (Kadlčík *et al.*, 2017; Janata *et al.*, 2018b; Myers & Mitcheltree, 2019).

Kromě potenciálních přímých aplikací však detailní studium biosyntetických enzymů bakteriálního specializovaného metabolismu přináší významné poznatky i z pohledu základního výzkumu. Velmi často se totiž tyto enzymy vyznačují neobvyklými nebo dokonce unikátními

strukturními motivy (Miyanaga *et al.*, 2014; Ghilarov *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2019) či reakčními specifitami (Zhao *et al.*, 2015; Kameník *et al.*, 2016; Ushimaru *et al.*, 2016; Steiningerová *et al.*, 2020).

## 2 Literární přehled

### 2.1 Specializované metabolity

Specializované metabolity jsou látky, které nejsou nezbytné pro růst produkčního organismu v bohatém médiu, ale poskytují mu určité selekční výhody. Mohou hrát roli v mikrobiální ekologii či ovlivňovat přežití producenta v nepříznivých podmínkách. Patří mezi ně například antimikrobiální, antiprotozoální, imunosupresivní a protinádorové látky, insekticidy, herbicidy, pigmenty, siderofory, feromony a další (Osbourn, 2010). Díky těmto vlastnostem jsou specializované metabolity široce využívané mimo jiné v medicíně, veterinárním lékařství nebo zemědělství (Salwan & Sharma, 2020). Jedním z nejvýznamnějších bakteriálních producentů specializovaných metabolitů jsou Gram pozitivní Actinobacteria, produkující téměř polovinu z celkového množství známých antibiotik bakteriálního původu (Bérdy, 2012). V rámci Actinobacteria pak jde především o rod *Streptomyces*, ale i o rodiny *Nocardiaceae* či *Pseudonocardiaceae* (Mukherjee *et al.*, 2017).

### 2.2 Mechanismy biosyntézy specializovaných metabolitů

Většina specializovaných metabolitů jsou komplexní látky skládající se z několika stavebních jednotek. Těmito jednotkami mohou být běžně se vyskytující monomery pocházející z primárního metabolismu (například proteinogenní aminokyseliny nebo acetyl-CoA), ale i neobvyklé monomery, vznikající ve specializovaných biosyntetických drahách (Walsh & Fischbach, 2010).

Strukturní bohatství specializovaných metabolitů je ovšem dáno nejen variabilitou těchto monomerů, ale i jejich propojením do složitějších struktur (Pickens, Tang & Chooi, 2011). Většina monomerů může být kombinována s různými dalšími stavebními jednotkami za vzniku strukturně i funkčně odlišných látek. Klíčovým bodem biosyntéz specializovaných metabolitů jsou tedy kondenzační reakce, umožňující vznik metabolitu přesně se vážícího do cílového místa. Tak je tomu i u antimikrobiálních látek ze skupiny linkosamidů, jejichž studiu jsem se věnoval ve významné části své práce. Díky unikátnímu kondenzačnímu systému spojujícímu aminocukernou a aminokyselinovou stavební jednotku vzniká meziproduct, který je dále modifikován do finální molekuly linkosamidu přesně se vážící do peptidyltransferázového místa 50S ribozomální podjednotky a inhibující translaci (Zhao *et al.*, 2015; Matzov *et al.*, 2017).

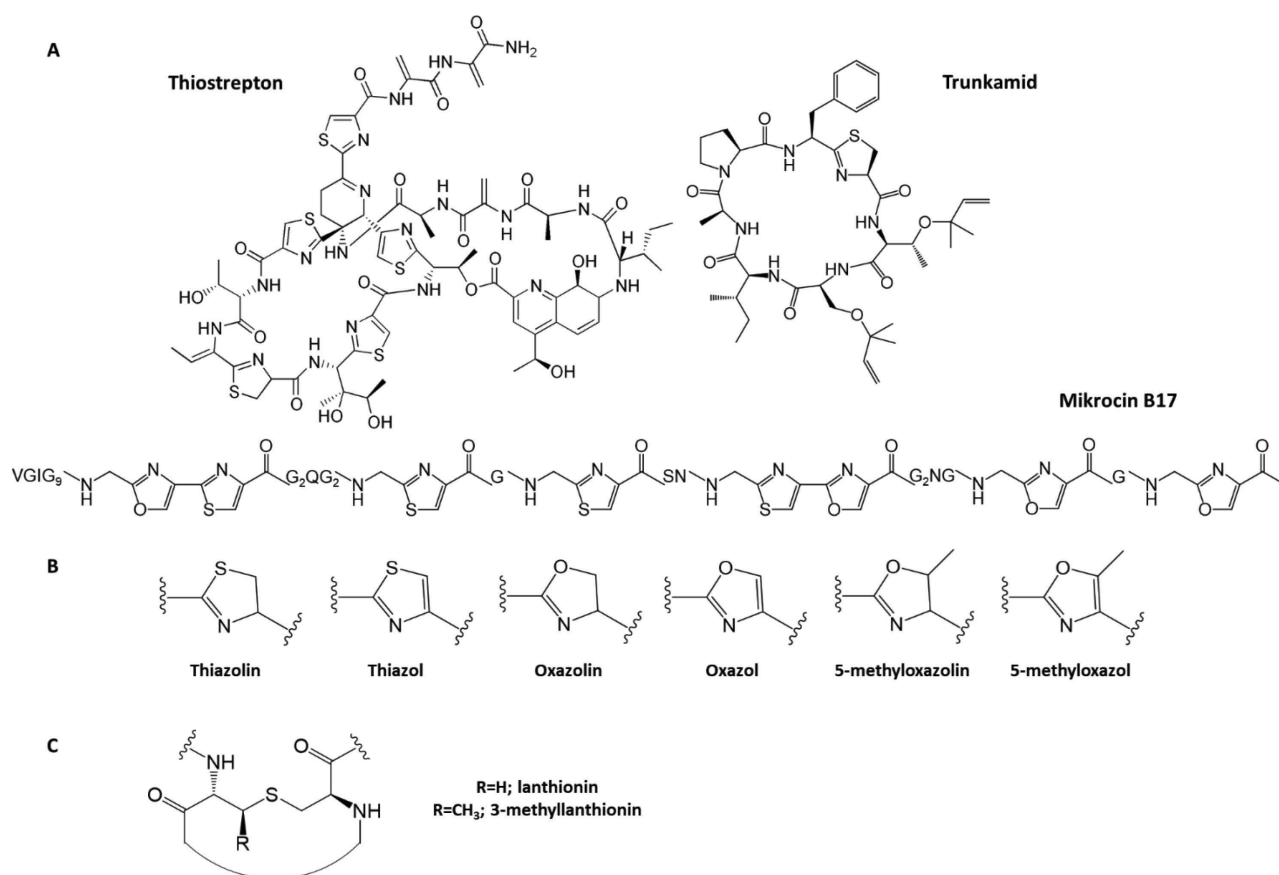
Ve zjednodušeném modelu mohou být kondenzační reakce v biosyntézách specializovaných metabolitů katalyzovány třemi možnými způsoby. První z nich se týká pouze specializovaných metabolitů využívajících jako monomery proteinogenní aminokyseliny. Nejprve dochází k běžné ribozomální syntéze peptidů, které jsou však následně výrazně posttranslačně modifikovány za vzniku

specializovaných metabolitů nazývaných „ribozomálně syntetizované a posttranslačně modifikované peptidy“ (RiPPs; Kapitola 2.3) (Ortega & Van Der Donk, 2016). Druhou cestou, umožňující inkorporaci širšího spektra monomerů, je využití modulárních kondenzačních enzymů, jako je tomu v biosyntézách neribozomálních peptidů (Kapitola 2.4) nebo polyketidů (Fischbach & Walsh, 2006). Posledním způsobem, využívaným v biosyntézách nejvíce skupin specializovaných metabolitů (Walsh & Fischbach, 2010), je kondenzace monomerů specializovanými nedomulárními kondenzačními enzymy. Právě ta byla popsána mimo jiné v biosyntézách linkosamidů (Kapitola 2.5) (Zhao *et al.*, 2015), ale i isoprenoidních látek (Li & Wang, 2016) nebo oligosacharidů (Lairson *et al.*, 2008; Thibodeaux, Melançon & Liu, 2008).

### 2.3 Ribozomálně syntetizované specializované metabolity

Ačkoli nejsou specializované metabolity běžně spojovány s ribozomální syntézou, díky široké řadě posttranslačních modifikací jsou RiPPs (Obrázek 2.1) schopné dosáhnout podobné chemické diverzity jako neribozomálně syntetizované peptidy (Kapitola 2.4) (McIntosh, Donia & Schmidt, 2009).

Díky této diverzitě byla již u RiPPs popsána například antifungální (Mohr *et al.*, 2015), antibakteriální (Essig *et al.*, 2014) či antivirotická aktivita (Ferir *et al.*, 2013). U thiostreptonu ze skupiny thiopeptidů byla dokonce kromě antibakteriální aktivity popsána i schopnost ovlivnění imunitní odpovědi na bakteriální infekci (Zheng *et al.*, 2015). Mezi další významné skupiny RiPPs patří kromě thiopeptidů (Bagley *et al.*, 2005) například také cyanobaktiny (Sivonen *et al.*, 2010), lanthipeptidy (McAuliffe, Ross & Hill, 2001) či skupina označovaná jako „lineární peptidy obsahující azol“ (LAP) (Melby, Nard & Mitchell, 2011).



Obrázek 2.1. **Struktury RiPPs**

A – Struktury vybraných RiPPs ze skupin thiopeptidů (thiostrepton), cyanobaktinů (trunkamid) a LAP (mikrocin B17).

B – Azolové cykly přítomné v cyanobaktinech.

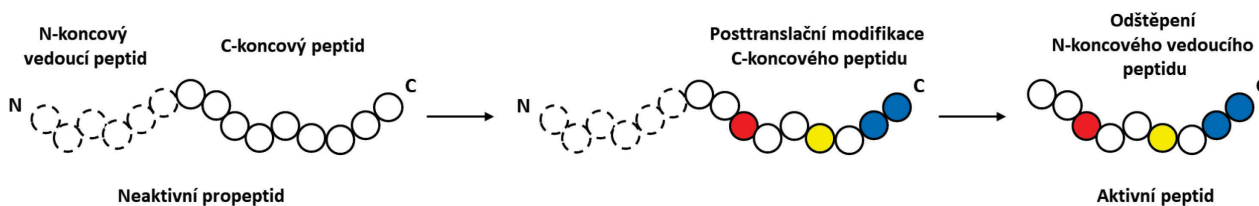
C – Posttranslačně modifikované aminokyselinové zbytky lanthionin a 3-methylanthionin přítomné v lanthipeptidech.

### 2.3.1 Biosyntéza RiPPs

Biosyntéza RiPPs začíná ribozomální syntézou neaktivního propeptidu, který obvykle obsahuje N-koncový vedoucí peptid a C-koncový peptid tvořící základ struktury budoucího RiPPs. Vedoucí peptid je následně rozpoznáván modifikačními enzymy, katalyzujícími posttranslační modifikace v C-koncové oblasti (Obrázek 2.2). Mezi jednu z typických posttranslačních modifikací RiPPs patří tvorba azolových cyklů (Obrázek 2.1) vznikajících cyklodehydratací serinových, cysteinových nebo threoninových aminokyselinových zbytků například u cyanobaktinů (McIntosh & Schmidt, 2010; Koehnke *et al.*, 2015). Lanthipeptidy jsou typické přítomností specifických thioetherových aminokyselin lanthioninu nebo 3-methylanthioninu (Obrázek 2.1), které vznikají dvoukrokovým biosyntetickým procesem ze serinu

nebo threoninu (Knerr & van der Donk, 2012). V metabolitech ze skupiny LAP je většina cysteinových a některé serinové zbytky převedených na thiazolové nebo oxazolové heterocykly (Li *et al.*, 1996).

Na závěr biosyntézy je vedoucí peptid odštěpen specifickými peptidázami za vzniku aktivního RiPPs. Toto štěpení může být doprovázeno cyklizací, která zvyšuje odolnost proti proteolýze a snižuje možnost tvorby nežádoucích konformací. V některých případech poté ještě dochází k závěrečným posttranslačním modifikacím nezávislým na vedoucím peptidu (Ortega & Van Der Donk, 2016).



Obrázek 2.2. Schéma biosyntézy RiPPs.

Přerušovaná čára označuje aminokyseliny N-koncového peptidu a plná čára C-koncového peptidu. Barevné zvýraznění označuje posttranslačně modifikované aminokyseliny. Převzato a upraveno z Ortega & Van Der Donk, 2016.

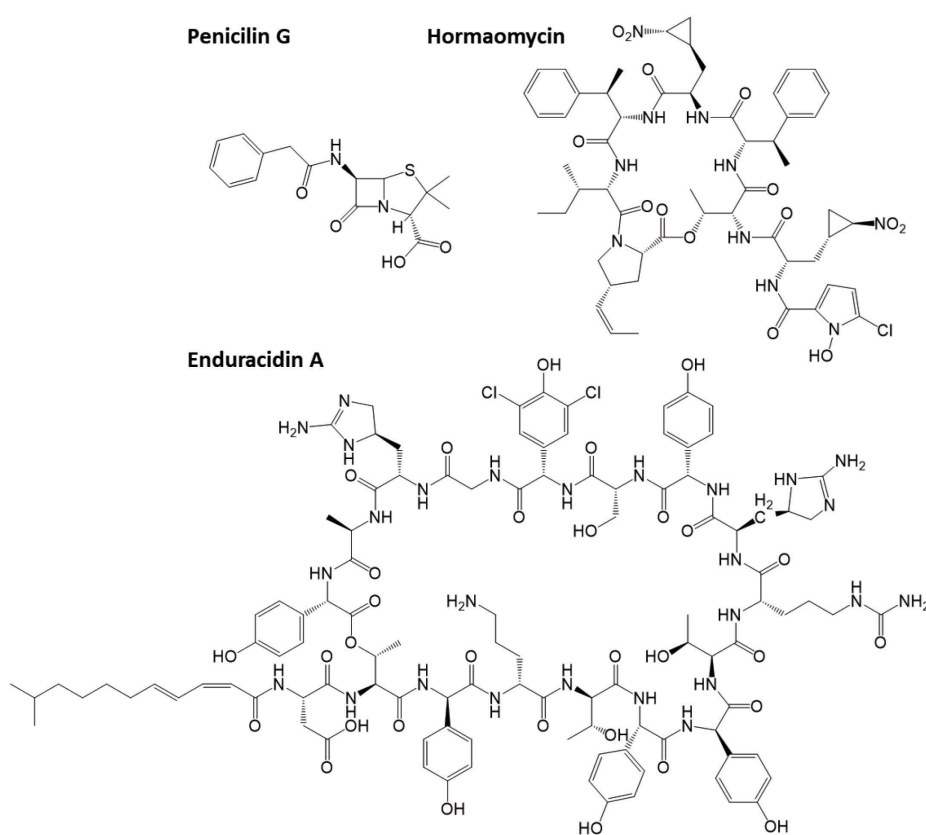
### 2.3.2 Odštěpení vedoucího peptidu

Jedním z klíčových kroků biosyntézy RiPPs je odštěpení vedoucího peptidu, nezbytné pro vznik aktivní formy RiPPs. Ve větší části případů je tato reakce katalyzována peptidázou obsahující transportér s ATP-vazebnou kasetou (Havarstein, Diep & Nes, 1995). Tento multidoménný protein se skládá z centrální transmembránové domény, C-koncové domény vážící ATP a N-koncové peptidázové domény odštěpující vedoucí peptid za dvěma konzervovanými glycinovými zbytky. Po odštěpení vedoucího peptidu je navázaný aktivní RiPPs přímo translokován ven z buňky (Lin, Huang & Chen, 2015).

V některých případech je však odštěpení katalyzováno sekvenčně i strukturně nepříbuznou peptidázou TldD/TldE z proteinové rodiny TldD/PmbA. Tento způsob odštěpení vedoucího peptidu byl popsán například v biosyntéze mikrocinu B17 (Ghilarov *et al.*, 2017), peptidu příbuzného mikrocinu C (Tsibulskaya *et al.*, 2017) nebo klebsazolicinu (Travin *et al.*, 2018). Aktivní formy těchto RiPPs jsou následně exportovány z buněk nezávislým transportním systémem (Garrido *et al.*, 1988; Van De Vijver *et al.*, 2009; Travin *et al.*, 2018).

## 2.4 Neribozomální peptidy

Jednou z velkých skupin specializovaných metabolitů jsou neribozomální peptidy rozšířené přes všechny tři domény organismů (archea, bakterie i eukaryota), ačkoli i mezi jejich producenty patří k nejvýznamnějším zástupcům bakterie a to především skupiny Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes a Cyanobacteria (Wang *et al.*, 2014). I v rámci neribozomálních peptidů můžeme najít látky strukturně jednodušší i výrazně komplikovanější, jak lze vidět na obrázku 2.3 na příkladu penicilinu G (Aharonowitz & Cohen, 1992), hormaomycinu (Höfer *et al.*, 2011) a enduracidinu A (Iwasaki *et al.*, 1973).

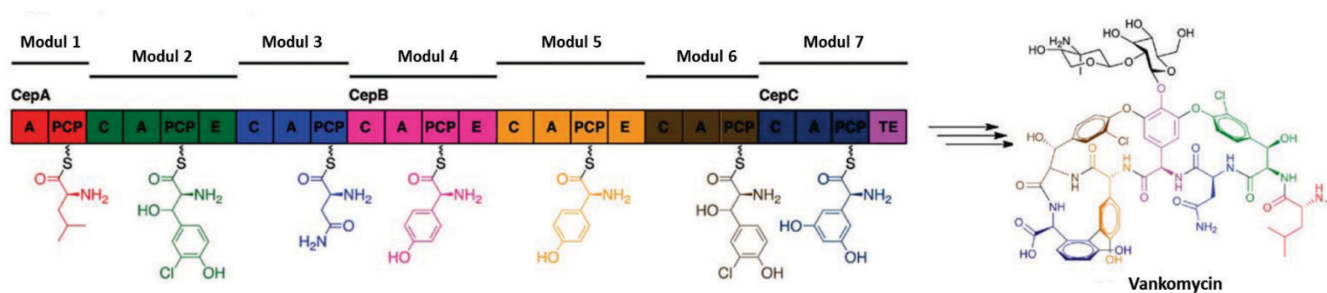


Obrázek 2.3. Struktury vybraných neribozomální peptidů.

### 2.4.1 Biosyntéza neribozomálních peptidů

Strukturní diverzita neribozomálních peptidů, která výrazně převyšuje diverzitu známých ribozomálně syntetizovaných peptidů, je možná díky syntéze za využití multimodulárních enzymů nazývaných neribozomální peptidové syntetázy (NRPS). Ty mají velikost 200-2000 kDa a skládají se z jednoho nebo více modulů, zodpovědných za začlenění monomerů do rostoucího řetězce. Počet, typ a pořadí modulů stanovuje, které monomery a v jakém pořadí budou inkorporovány (Obrázek 2.4)

(Cane & Walsh, 1999). Každý modul může být v biosyntéze použit pouze jednou u NRPS typu I (lineární NRPS), které budou dále popisovány, nebo vícekrát u méně obvyklého NRPS typu II (iterativní NRPS) (Hur, Vickery & Burkart, 2012). Moduly se skládají z domén, které katalyzují jednotlivé reakční kroky při zařazování monomeru, jakými jsou aktivace, vazba monomeru či kondenzace (Mootz, Schwarzer & Marahiel, 2002).



Obrázek 2.4. **Syntéza neribozomálního peptidu vankomycinu.**

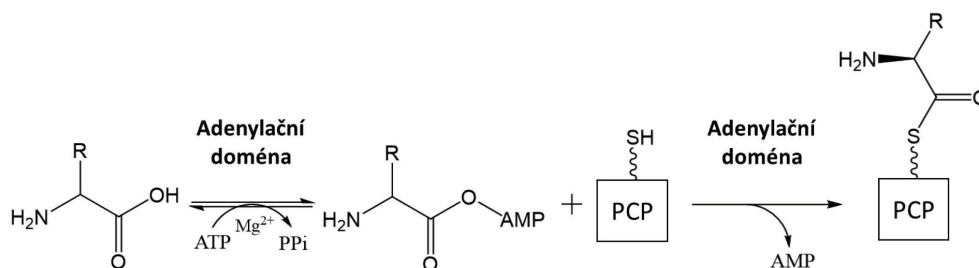
Sedm modulů vankomycinové NRPS je rozděleno na tři proteiny CepA, CepB a CepC. Monomer zařazený do výsledné molekuly každým modulem je označen odpovídající barvou. Označení domén – adenylační (A), „peptidyl přenášející protein“ (PCP), kondenzační (C), epimerizační (E), thioesterázová (TE). Převzato a upraveno z Hur *et al.*, 2012.

Jako monomery jsou v případě biosyntézy neribozomálních peptidů využívány jak proteinogenní aminokyseliny běžně dostupné v buňkách, tak neproteinogenní aminokyseliny (včetně D-aminokyselin), a výjimečně i některé karboxylové kyseliny (například salicylát) (Watts, Mijts & Schmidt-Dannert, 2005; Fischbach & Walsh, 2006). Celkem je nyní známých 543 monomerů inkorporovaných do struktur neribozomálních peptidů (dle databáze Norine <https://bioinfo.lifl.fr/norine/listAmino.jsp>). Monomer je nejprve rozpoznán a aktivován adenylační doménou a následně kovalentně připojen k fosfopantetheinovému ramenu sousedící domény označované „peptidyl přenášející protein“ (PCP). Flexibilní fosfopantetheinové rameno, původem z koenzymu A (CoA), je k PCP kovalentně připojeno specifickou fosfopantetheinyl transferázou a umožňuje pohyb navázaného substrátu mezi jednotlivými katalytickými centry. Kondenzační doména nakonec odštěpí monomer nebo meziprodukt z PCP předchozího modulu a katalyzuje jeho připojení peptidovou vazbou na monomer vázaný na PCP vlastního modulu. Tyto tři domény tak tvoří dohromady minimální prodlužovací modul NRPS. Jeho dalšími nepovinnými součástmi mohou být domény modifikující zařazovaný monomer – methyltransferázová, cyklizační, epimerizační nebo oxidační. Iniciační modul se od prodlužovacího odlišuje absencí kondenzační domény, terminační modul naopak obsahuje navíc thioesterázovou doménu. Ta uvolňuje vzniklý neribozomální peptid z PCP terminačního modulu hydrolyticky za vzniku lineárního produktu nebo makrocyclizací za vzniku

makrocyclického produktu (Hur *et al.*, 2012). Po ukončení syntézy a uvolnění řetězce může dojít k závěrečným modifikacím neribozomálního peptidu (Walsh *et al.*, 2001). Podrobnější popis adenylačních domén, jejichž studiem jsem se zabýval ve své práci, následuje v další kapitole.

## 2.4.2 Adenylační domény

Adenylační domény mají nepostradatelnou úlohu v rozpoznávání stavebních jednotek při biosyntézách neribozomálních peptidů a rozhodují tak o substrátové specifitě celé NRPS. Adenylační doména nejprve selektivně váže substrátovou aminokyselinu a aktivuje ji za spotřeby ATP a vzniku aminoacyl-AMP. Následně katalyzuje připojení aminoacyl-AMP thioesterovou vazbou k 4'-fosfopantetheinovému ramenu PCP za vzniku aminoacyl-S-PCP (Obrázek 2.5) (Kleinkauf, Gevers & Lipmann, 1969; Lee & Lipmann, 1977).



Obrázek 2.5. **Mechanismus aktivity adenylační domény.**

Adenylační doména aktivuje substrátovou aminokyselinu adenylací a následně katalyzuje její připojení k PCP.

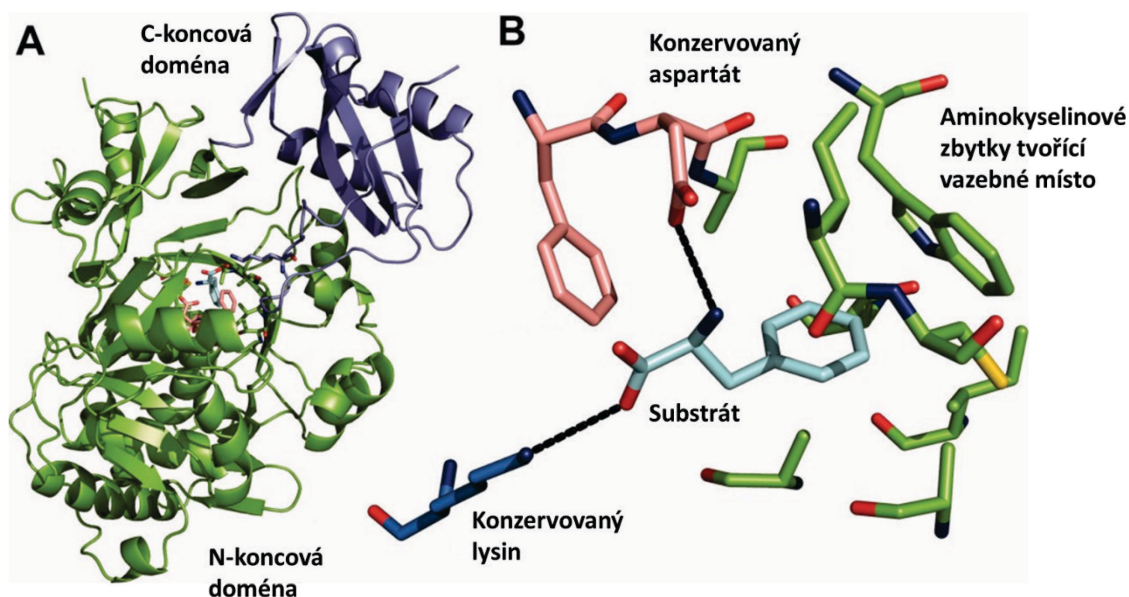
### 2.4.2.1 Struktura adenylačních domén

Adenylační domény patří do rodiny enzymů tvořících adenylát, která zahrnuje také acyl-CoA a aryl-CoA syntetázy (Gulick, Lu & Dunaway-Mariano, 2004; Jogl & Tong, 2004) a luciferázy světlušek (Conti, Franks & Brick, 1996). Tyto proteiny sdílí terciární strukturu, a ačkoli katalyzují odlišné reakce s odlišnými substráty, jejich první krok, aktivace karboxylové skupiny adenylací, je shodný (Gulick, 2009). Existují však i další enzymy katalyzující adenylaci, které ovšem nejsou s proteiny z této rodiny nijak sekvenčně ani strukturně příbuzné – například aminoacyl-tRNA syntetázy (Francklyn, 2008) nebo NRPS-nezávislé enzymy adenylující siderofory (Challis, 2005).

První adenylační doménou s vyřešenou krystalovou strukturou je doména PheA, aktivující fenylalanin v biosyntéze antibiotika gramicidinu S (Conti *et al.*, 1997). Od této doby byla publikována řada krystalových struktur adenylačních domén aktivujících aminokyselinové substráty z různých skupin. Mezi nimi jsou adenylační domény aktivující proteinogenní aminokyseliny arginin i tyrosin

(Kaljunen *et al.*, 2015), leucin (Tanovic *et al.*, 2008), valin (Reimer *et al.*, 2016), glycin (Drake *et al.*, 2016), serin (Miller *et al.*, 2016) a threonin (Scaglione *et al.*, 2017); neproteinogenní aminokyselinu D-alanin (Du, He & Luo, 2008; Yonus *et al.*, 2008); modifikované  $\alpha$ -aminokyseliny *N-cis*-anhydromevalonyl-*N*-hydroxy-L-ornithin (Lee *et al.*, 2010), (2*S*,3*S*)- $\beta$ -methyl-L-aspartát (Herbst *et al.*, 2013) a norcoronamovou kyselinu (Mori *et al.*, 2018) nebo  $\beta$ -aminokyseliny (2*S*,3*S*)- $\beta$ -methyl-L-aspartát (Miyanaga *et al.*, 2014), (3*S*)-3-aminobutyrate (Cieslak *et al.*, 2017), 3-aminononanoovou kyselinu (Cieslak *et al.*, 2017) a (*S*)- $\beta$ -fenylalanin (Niquille *et al.*, 2018).

Celková struktura adenylačních domén se sestává z velké N-koncové domény (zhruba 450 aminokyselinových zbytků) a malé C-koncové domény (zhruba 100 aminokyselinových zbytků) spojených flexibilní smyčkou (Obrázek 2.6) (Conti *et al.*, 1997). Krystalizace adenylačních domén i dalších proteinů ze stejné rodiny prokázala, že v průběhu reakce dochází ke změnám ve struktuře adenylačních domén. Po adenylaci substrátu a uvolnění pyrofosfátu dojde k rotaci C-koncové domény o zhruba 140°, což zpřístupní aminokyselinové zbytky nezbytné pro thioesterifikační reakci. Tyto strukturní změny jsou označovány jako střídání domén (domain alternation) a celý protein tak má dvě strukturní orientace pro dvě části reakce (Reger *et al.*, 2008; Kochan *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2014).



Obrázek 2.6. **Struktura adenylační domény PheA a vazebného místa pro substrát.**

A – Struktura adenylační domény PheA účastnící se biosyntézy gramicidinu S v *Bacillus brevis*. C-koncová doména je označena modře a N-koncová doména zeleně. Na rozhraní domén je vyznačeno vazebné místo pro substrát a navázaný fenylalanin.

B – Detailní pohled na vazebné místo pro substrát v adenylační doméně PheA. Karboxylová a  $\alpha$ -amino skupina substrátu jsou koordinované konzervovaným lysinem a aspartátem. Konzervovaný lysin je součástí C-koncové domény, zatímco ostatní aminokyselinové zbytky tvořící vazebné místo pro substrát jsou součástí N-koncové domény. Převzato a upraveno z Lee *et al.*, 2015.

#### 2.4.2.2 Vazebné místo pro substrát

Vazebné místo pro substrát se v adenylačních doménách nachází v místě styku N- a C-koncové domény, a to především v N-koncové doméně (Conti *et al.*, 1997). Vazebné místo je tvořeno 10 aminokyselinovými zbytky (Obrázek 2.6), nazývanými neribozomální kód, jejichž postranní řetězce jsou v kontaktu se substrátem. Osm z těchto aminokyselinových zbytků je variabilních a určují substrátovou specifitu adenylační domény. Zbylé dva aminokyselinové zbytky lysin a aspartát jsou vysoce konzervované (Stachelhaus, Mootz & Marahiel, 1999; Challis, Ravel & Townsend, 2000). Lysin je v kontaktu s karboxylovou skupinou substrátové aminokyseliny a s  $\alpha$ -fosfátovou skupinou ATP, zatímco aspartát je v kontaktu  $\alpha$ -aminoskupinou (nebo  $\beta$ -aminoskupinou) substrátové aminokyseliny (Stachelhaus *et al.*, 1999; Cieslak *et al.*, 2017). Oba konzervované zbytky tak určují orientaci substrátové aminokyseliny ve vazebném místě. U adenylačních domén aktivujících jiný substrát než  $\alpha$ -aminokyselinu (některé  $\beta$ -aminokyseliny,  $\alpha$ -hydroxykyseliny,  $\alpha$ -ketokyseliny nebo aminobenzoové

kyseliny) může být aspartát přemístěn nebo nahrazen jiným zbytkem (Challis *et al.*, 2000; Süßmuth & Mainz, 2017).

Menší substrátové aminokyseliny však nemusí být v kontaktu se všemi deseti aminokyselinovými zbytky neribozomálního kódu. Je tomu tak například u adenylačních domén aktivujících prolin (Kadlčík *et al.*, 2013) nebo glycin (Drake *et al.*, 2016), ve kterých je substrát v přímém kontaktu jen s konzervovaným lysinem a aspartátem a třemi dalšími zbytky (Kapitola 2.5.4.1). U některých adenylačních domén byla detekována rozvolněná substrátová specifita, jejímž důsledkem je zvýšení diverzity neribozomálních peptidů produkovaných jednou NRPS (Meyer *et al.*, 2016). Tato rozvolněná specifita je způsobena hlavně degenerací samotného neribozomálního kódu, kdy určité kombinace aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu umožňují aktivaci více strukturně podobných (arginin/lysin) (Müller *et al.*, 2014) i odlišnějších (arginin/tyrosin) (Kaljunen *et al.*, 2015) substrátů.

#### 2.4.2.3 *Predikce substrátové specifity*

U dosud experimentálně necharakterizovaných adenylačních domén se sekvence aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu spolu s aminokyselinovými zbytky v okolí vazebného místa pro substrát používají k *in silico* predikcím substrátové specifity za využití aplikací jakými jsou například NRPSsp, NRSPredictor2, PKS/NRPS Analysis nebo PRISM (Rausch *et al.*, 2005; Röttig *et al.*, 2011; Khayatt *et al.*, 2013; Skinnider *et al.*, 2015). Vzhledem tomu, že počítačové modely vycházejí z velké části z první krystalizované adenylační domény PheA, aktivující fenylalanin, jsou výsledné predikce stále přesnější u adenylačních domén aktivujících proteinogenní aminokyseliny, oproti těm aktivujícím neobvyklé neproteinogenní aminokyseliny (Kudo, Miyanaga & Eguchi, 2018).

#### 2.4.2.4 *Modifikace substrátové specifity adenylačních domén*

Znalost neribozomálního kódu adenylačních domén se také využívá k modifikacím jejich substrátové specifity. Jedním ze způsobů přípravy adenylačních domén aktivujících nepřírodní substrát jsou náhodné mutace variabilních aminokyselin neribozomálního kódu (Evans *et al.*, 2011; Villiers & Hollfelder, 2011). Druhou využívanou možností jsou cílené mutace aminokyselinových zbytků klíčových pro rozpoznání substrátu, které byly vybrány nejčastěji na základě krystalové struktury nebo homologního modelu adenylační domény (Eppelmann, Stachelhaus & Marahiel, 2002; Cheng-Yu *et al.*, 2009; Thirlway *et al.*, 2012; Kadlčík *et al.*, 2013; Kries *et al.*, 2014; Kaljunen *et al.*, 2015; Niquille *et al.*, 2018). Posledním způsobem využitým v publikovaných studiích je příprava chimérických proteinů (označovaná také jako záměna subdomén). Tyto proteiny obsahují okrajové části původní adenylační

domény a středovou část (zahrnující většinu nebo všechny aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu) adenylační domény s cílovou substrátovou specifitou (Crüsemann *et al.*, 2013; Kries, Niquille & Hilvert, 2015).

#### 2.4.2.5 Modulární a samostatně stojící adenylační domény

Stejně jako další NRPS domény (Keating *et al.*, 2002; Thomas, Burkart & Walsh, 2002) se i adenylační domény vyskytují v biosyntézách specializovaných metabolitů ve dvou typech. Většina adenylačních domén je součástí NRPS modulu (označovány jako modulární) a přenáší aktivovaný substrát na sousedící PCP v rámci modulu (Kessler *et al.*, 2004; Gonsior *et al.*, 2015). Existují však i samostatně stojící adenylační domény přenášející substrát *in trans* na oddělený PCP. Tyto izolované adenylační domény nejčastěji aktivují první monomer v biosyntéze neribozomálních peptidů (Thomas *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2012; Pakarian & Pawelek, 2016), ale mohou také být součástí biosyntetických drah jiných specializovaných metabolitů, než jsou neribozomální peptidy, ve kterých je aktivovaný substrát navázaný na PCP dále zpracován zcela odlišným způsobem (Kapitola 2.5.4) (Kadlčík *et al.*, 2013).

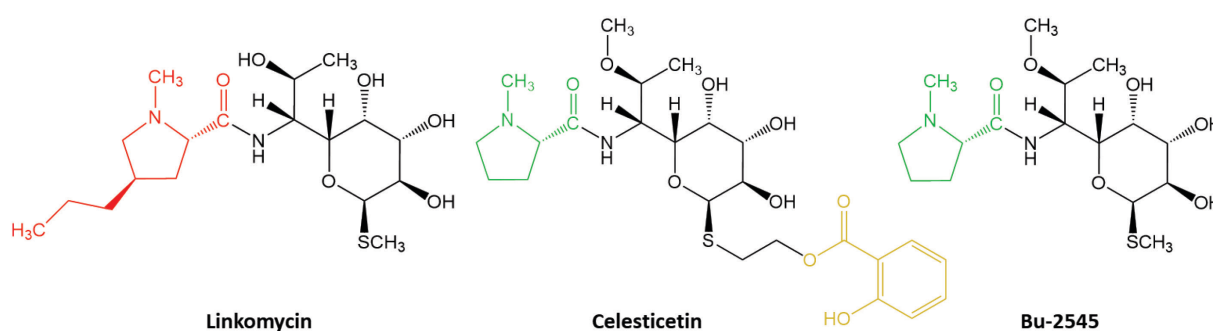
#### 2.4.2.6 Aktivátory adenylačních domén

Pro efektivní aktivaci substrátové aminokyseliny některými adenylačními doménami je třeba přítomnost malého proteinu nazývaného aktivátor adenylační domény (ADA) (Baltz, 2011, 2014). V některých případech nebylo dokonce možné připravit celé NRPS moduly v rozpustné formě bez koexprese s odpovídajícím ADA (Imker *et al.*, 2010; McMahon, Rush & Thomas, 2012; Hiratsuka *et al.*, 2013; Zolova & Garneau-Tsodikova, 2014).

První popsáné ADA sdílely Pfam doménu PF03621 a byly homologní s proteinem MbtH, podle kterého byly pojmenovány jako „MbtH-like“ proteiny (Drake *et al.*, 2007). V poslední době však byly objeveny tři další, strukturně odlišné skupiny ADA (Boll & Heide, 2013; Kalb *et al.*, 2015; Saha & Rokita, 2016), z nichž zástupci dvou skupin jsou dokonce součástí jednoho proteinu s odpovídajícími adenylačními doménami (Boll & Heide, 2013; Kalb *et al.*, 2015). Tato fúze do jednoho proteinu kontrastuje s většinou ostatních ADA, vyskytujících se jako nezávislé proteiny, které však mohou být kódovány geny nacházejícími se nejen v blízkosti genů kódujících NRPS (Felnagle *et al.*, 2010; Imker *et al.*, 2010; Hiratsuka *et al.*, 2013; Zolova & Garneau-Tsodikova, 2014) ale i ve zcela jiné části genomu (Wolpert *et al.*, 2007; Tatham *et al.*, 2012; Bosello *et al.*, 2013; Davidsen, Bartley & Townsend, 2013). To může výrazně komplikovat vyhledávání genů kódujících ADA v případě, že u studovaného organismu není dostupná kompletní sekvence genomové DNA (Saha & Rokita, 2016).

## 2.5 Linkosamidy

Linkosamidy tvoří malou, ale významnou skupinu specializovaných metabolitů s antimikrobiálními účinky. Dosud byly detekovány pouze tři přirozeně se vyskytující linkosamidy – linkomycin produkovaný *Streptomyces lincolnensis* (Bergy & Herr, 1963), celesticetin produkovaný *S. caelestis* (De Boer & Dietz, 1960) a Bu-2545 produkovaný blíže nespecifikovaným kmenem bakterie z rodu *Streptomyces* (Toda *et al.*, 1981). Strukturně se všechny linkosamidy skládají z aminocukru (aminothiooktózy) spojeného amidovou vazbou s karboxylovou skupinou aminokyseliny. Zatímco aminocukerné složky se od sebe liší jen jednou methylační modifikací, nejpodstatnější rozdíly mezi linkosamidy jsou v aminokyselinových složkách a salicylátu, připojeném k thio skupině celesticetinu přes dvouuhlíkatý alifatický řetězec, jak můžete vidět zvýrazněné na Obrázku 2.7.



Obrázek 2.7. **Struktury linkosamidů.**

Aminokyselinová složka linkomycinu vycházející z (2S,4R)-4-propyl-L-prolinu (PPL) je vyznačena červeně. Aminokyselinová složka celesticetinu a Bu-2545 vycházející z L-prolinu je vyznačena zeleně. Salicylátová složka celesticetinu je vyznačena žlutě.

Aminokyselinové prekurzory linkosamidů se od sebe významně liší svým biosyntetickým původem. Zatímco prekurzorem celesticetinu a Bu-2545 je L-prolin, proteinogenní aminokyselina volně dostupná v buňce, u linkomycinu je jím neobvyklá aminokyselina (2S,4R)-4-propyl-L-prolin (PPL) (Kadlčík *et al.*, 2013) syntetizovaná specifickou drahou z L-tyrosinu (Jirásková *et al.*, 2016). Rozpoznání a aktivace těchto strukturně odlišných prekurzorů je prvním z klíčových bodů biosyntéz linkosamidů, kterým se budu zabývat ve své dizertační práci.

Aktivované aminokyselinové prekurzory jsou dále kondenzovány s aminocukerným prekurzorem unikátním kondenzačním systémem spřaženým s metabolismem bakteriálních thiolů (Zhao *et al.*, 2015). Další specializované enzymy následně katalyzují postkondenzační zabudování atomu síry do linkosamidové molekuly, jehož součástí je i deacetylace linkosamidového meziproductu (Zhao *et al.*, 2015; Kameník *et al.*, 2016). Tato klíčová reakce, jejíž charakterizace tvoří druhou část mé

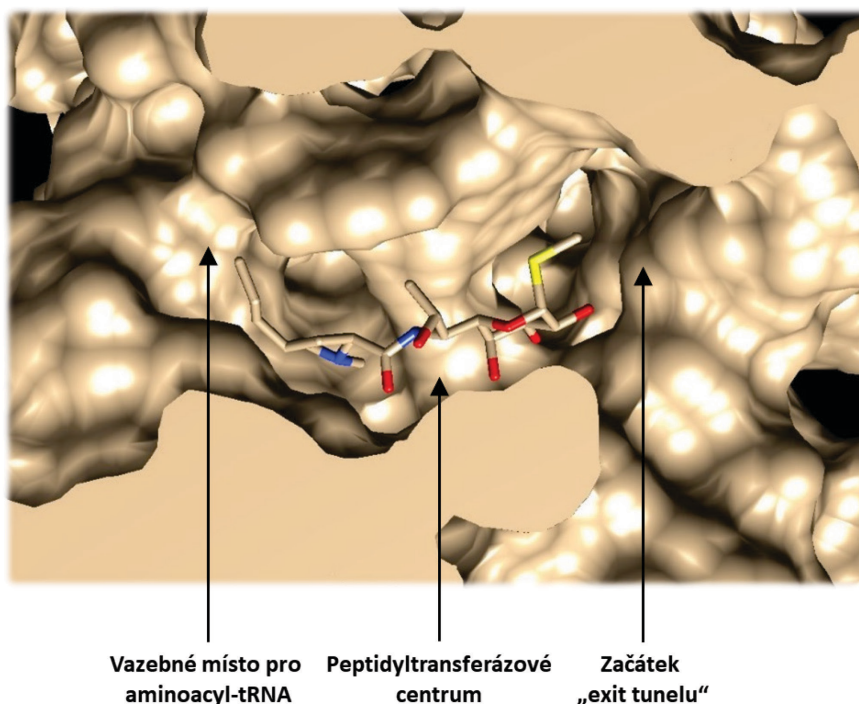
dizertační práce, zůstávala dosud jednou z posledních reakcí v linkosamidových biosyntézách, u které nebyl znám katalytický enzym. Deacetylace linkosamidového meziprojektu je také nezbytnou podmínkou pro závěrečné maturační kroky umožňující ve výsledku buď metylaci síry v případě biosyntézy linkomycinu a Bu-2545, nebo připojení salicylátu přes dvouuhlíkatý řetězec u celesticetinu (Kameník *et al.*, 2016; Kadlčík *et al.*, 2017).

### 2.5.1 Biologická aktivita linkosamidů

V rámci skupiny linkosamidových antibiotik je v klinické praxi využíván linkomycin, a především jeho chlorovaný derivát klindamycin (7-chlor-7-deoxylinkomycin), který je lékem první nebo druhé volby proti grampozitivním patogenům a anaerobním bakteriím (Brook, 2016). Klindamycin má také významnou antiplazmodiální aktivitu, kdy působí v apikoplastu, specifické organele vyskytující se u původce malárie, prvoka *Plasmodium falciparum* (Fichera & Roos, 1997). V kombinaci s chininem se proto používá k léčbě malárie u žen v prvním trimestru těhotenství (World Health Organization, 2015).

Linkomycin i klindamycin inhibují bakteriální proteosyntézu vazbou do peptidyltransferázového centra 50S ribozomální podjednotky (Obrázek 2.8). Vazby se účastní tři hydroxylové skupiny aminocukerné složky antibiotik, kdy dvě z nich (2-OH a 3-OH) interagují s N6 nukleotidu A2058 v 23S rRNA (Schlünzen *et al.*, 2001; Dunkle *et al.*, 2010). Dimethylace N6 skupiny, která znemožňuje vznik vodíkových vazeb, tak způsobuje rezistenci k linkosamidům (Ross *et al.*, 1997), stejně jako k makrolidům a streptograminu B, které se váží do částečně se překrývajících místa na ribozomu (Le Bouter, Leclercq & Cattoir, 2011; Wilson, 2014). Stejně tak může být rezistence u některých bakterií způsobena mutacemi A2058G či A2058U (Prunier *et al.*, 2002). S 23S rRNA interaguje také atom síry aminocukerné složky linkosamidů, který je v ribozomu orientovaný směrem k „exit tunelu“ (Schlünzen *et al.*, 2001).

Boční řetězec aminokyselinové složky linkomycinu či klindamycinu prodlužuje molekulu směrem k A místu, do něhož se váže aminoacyl-tRNA, a díky interferenci s vazbou aminoacyl-tRNA na ribozom zvyšuje antimikrobiální aktivitu (Matzov *et al.*, 2017). Tomu odpovídají i výsledky inhibice proteosyntézy linkomycinem a samotným linkomycinovým aminocukrem ( $\alpha$ -methylthiolinkosamidem) v *in vitro* translačních systémech. Ačkoli je na základě analýzy krystalových struktur zřejmé, že většina interakcí mezi ribozomem a linkomycinem je v jeho aminocukerné složce,  $\alpha$ -methylthiolinkosamid má oproti kompletní molekule linkomycinu výrazně nižší inhibiční schopnosti (Matzov *et al.*, 2017).



Obrázek 2.8. Krystalová struktura linkomycinu v 50S podjednotce ribozomu *Staphylococcus aureus*.

Boční řetězec aminokyselinové složky linkomycinu směřuje do místa vazby aminoacyl-tRNA, zatímco aminocukerná složka je orientována směrem k začátku „exit tunelu“. Atomy dusíku vyznačeny modře, kyslíku červeně a síry žlutě. Převzato a upraveno z Matzov *et al.*, 2017.

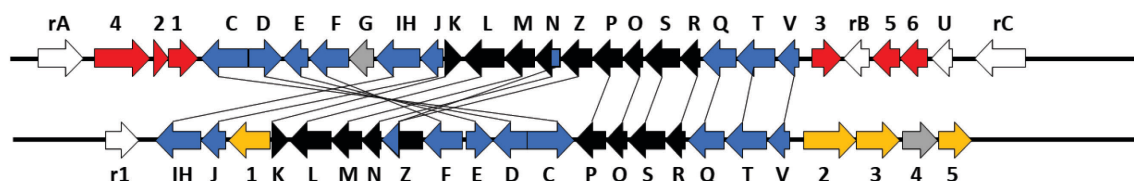
### 2.5.2 Biosyntetické genové shluky linkosamidů

Geny kódující enzymy biosyntetických drah linkosamidů i mnoha dalších specializovaných metabolitů se v genomech mikrobiálních produkčních organismů vyskytují v těsné blízkosti a tvoří takzvané genové shluky. Kromě genů kódujících biosyntetické enzymy mohou být součástí genových shluků i regulační geny nebo geny kódující rezistenci k produktu biosyntetické dráhy (Osborn, 2010). Uspořádání genů ve shlucích usnadňuje společnou regulaci genů kontrolujících následné biosyntetické kroky a zároveň umožňuje přenos celého shluku či jeho části horizontálním genovým transferem (HGT) mezi různými organismy (Igarashi *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2009).

V případě linkosamidů byly dosud publikovány pouze genové shluky linkomycinu a celesticetinu. Linkomycinový genový shluk má velikost 32 kbp a obsahuje 26 biosyntetických genů (označeny *lmb*) a tři rezistenční geny (Peschke *et al.*, 1995; Koběřská *et al.*, 2008). Oproti tomu je celesticetinový shluk menší a při velikosti 27 kbp obsahuje jen 23 biosyntetických genů (označeny *ccb*) a jediný rezistenční gen (Obrázek 2.9) (Janata *et al.*, 2015). Oba shluky obsahují 18 párů homologních genů kódujících enzymy biosyntézy aminocukerného prekurzoru, kondenzační enzymy a některé enzymy katalyzující postkondenzační reakce. Z genů kódujících biosyntetické proteiny jsou pouze pro

linkomycinový shluk specifické geny kódující enzymy biosyntézy aminokyselinového prekursoru PPL a methyltransferázu LmbG. Pouze v celesticetinovém shluku se oproti tomu vyskytují geny kódující enzymy biosyntézy a připojení salicylátu a methyltransferázu Ccb4.

Linkomycinový biosyntetický genový shluk (geny *lmb*)



Celesticetinový biosyntetický genový shluk (geny *ccb*)

Obrázek 2.9. Biosyntetické genové shluky linkomycinu a celesticetinu.

Červeně jsou zobrazeny geny kódující biosyntézu PPL (označované *apd1-apd6*), černě geny kódující biosyntézu aminocukerného prekursoru, modře geny kódující kondenzační a postkondenzační kroky, žlutě geny kódující biosyntézu a připojení salicylátu, šedivě methyltransferázy specifické pouze pro biosyntézu linkomycinu, resp. celesticetinu, bíle rezistenční (označované *lmr* resp. *ccr*) a regulační (*lmbU*) geny. Modře zvýrazněné části genů značí sekvence kódující PCP (Kapitola 2.5.4.1). Převzato a upraveno z Janata *et al.*, 2015.

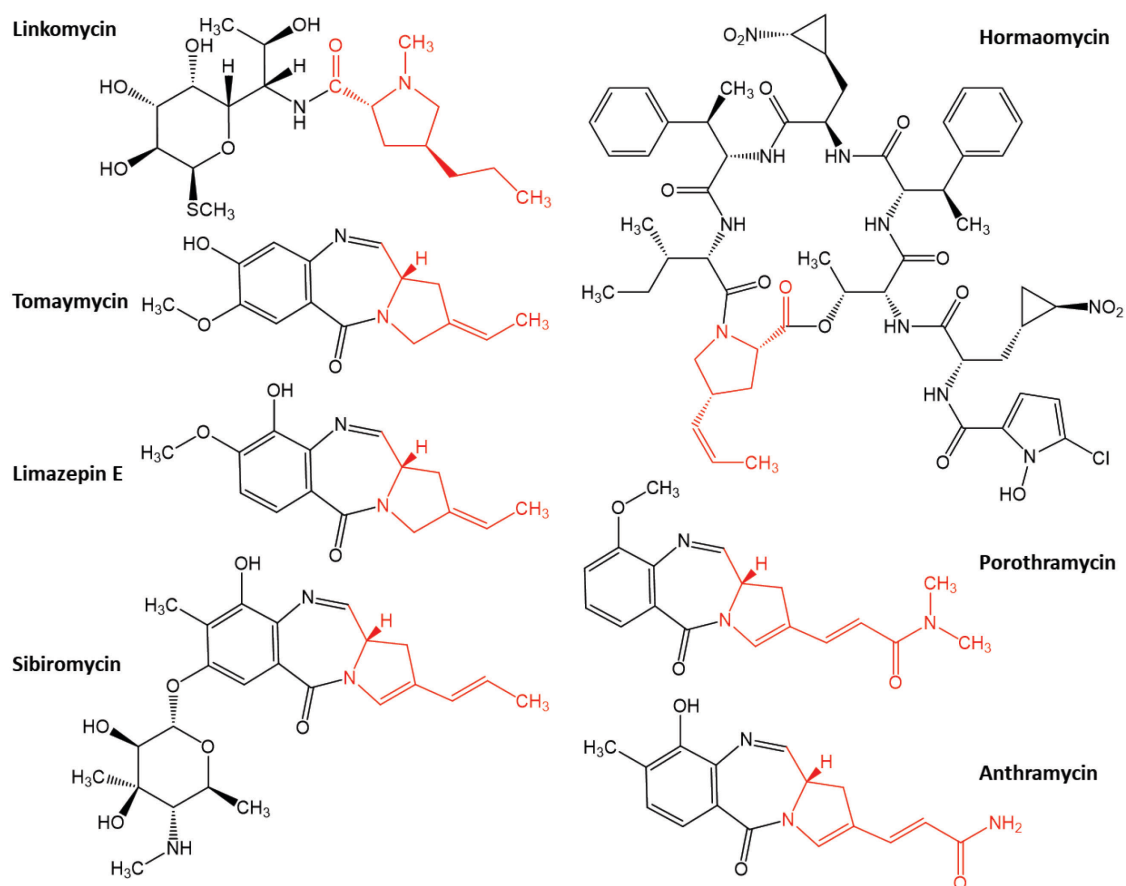
### 2.5.2.1 Evoluční historie linkosamidových genových shluků

Na předpokládané evoluční historii genů specifických jen pro jeden ze shluků lze popsat příklady HGT jednotlivých genů i skupin funkčně propojených genů označovaných jako podshluky. HGT jednotlivých genů můžeme v historii linkomycinového i celesticetinového shluku pozorovat u rezistenčních genů. Žádný z linkomycinových rezistenčních genů *lmrA*, *lmrB* ani *lmrC* není příbuzný s jediným celesticetinovým rezistenčním genem *ccr1* (Janata *et al.*, 2015). Tyto geny tedy byly pravděpodobně přeneseny HGT a začlenily se do linkosamidových shluků. Stejně tak tomu pravděpodobně bylo i u linkomycinového regulačního genu *lmbU* (Lin *et al.*, 2020), který nemá homolog v celesticetinovém shluku (Janata *et al.*, 2015).

Jednou z nejvýznamnějších událostí v evoluční historii linkomycinu byl ovšem přenos genů kódujících enzymy biosyntézy aminokyselinového prekursoru PPL. Zabudování PPL do struktury linkomycinu zlepšuje biologické vlastnosti látky v porovnání s linkosamidy se zabudovaným L-prolinem. Strukturně nejjednodušší linkosamid Bu-2545 má o 1-2 řády nižší antibakteriální účinek v porovnání s linkomycinem s inkorporovaným PPL (Hanada *et al.*, 1980). Význam délky bočního řetězce aminokyselinové složky je také zřejmý při porovnání linkomycinu a linkomycinu B, vedlejšího produktu linkomycinové biosyntézy, do kterého se inkorporuje derivát prolinu s dvouuhlíkatým (2C) bočním řetězcem (2*S*,4*R*)-4-ethyl-L-prolin (EPL). Linkomycin B dosahuje pouze 25% aktivity linkomycinu (Pang

*et al.*, 2015). Naopak u syntetických derivátů linkomycinu s prodlouženým bočním řetězcem byla detekována zvyšující se aktivita s maximem při zabudování prekurzorů s 5C nebo 6C bočními řetězci (Magerlein, 1971).

PPL patří do skupiny vzácně se vyskytujících speciálních stavebních bloků označovaných jako 4-alkyl-L-prolinové deriváty (APD), které sdílí specifickou biosyntetickou dráhu (Jirásková *et al.*, 2016; Janata *et al.*, 2018a). Ačkoli jsou APD strukturně podobné L-prolinu, jejich biosyntéza vychází z jiné proteinogenní aminokyseliny, L-tyrosinu (Jirásková *et al.*, 2016). APD prekurzory mohou být inkorporované do struktur specializovaných metabolitů nejméně tří odlišných skupin (Obrázek 2.10) – linkomycinu (Jirásková *et al.*, 2016), hormaomycinu (Höfer *et al.*, 2011) a některých látek ze skupiny pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinů (PBD) (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009b, 2009a; Najmanová *et al.*, 2014; Pavlíková *et al.*, 2018). Bakteriální signální molekula hormaomycin je neribozomální peptid složený z osmi aminokyselinových prekurzorů, mezi kterými je i APD (2*S*,4*R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolin (Höfer *et al.*, 2011). Cytotoxické a protinádorové PBD se skládají ze dvou prekurzorů (aromatické a *N*-heterocyklické aminokyseliny), které jsou kondenzovány NRPS a dále modifikovány za vzniku výsledné tricyklické struktury. U části PBD je *N*-heterocyklickým aminokyselinovým prekurzorem jedna ze dvou látek ze skupiny APD (4-propyliden-L-prolin nebo 4-ethyliden-L-prolin), která je aktivována adenylační doménou a poté vstupuje do kondenzace (Kameník *et al.*, 2017).



Obrázek 2.10. **Struktury linkomycinu, hormaomycinu a vybraných PBD inkorporujících APD.**

APD jednotky jsou ve strukturách vyznačeny červeně.

Linkomycinový genový shluk obsahuje šest genů kódujících enzymy biosyntézy APD, které jsou označovány *apd1-apd6* (Janata *et al.*, 2018a). Homology alespoň některých z těchto genů byly nalezeny i v genových shlucích všech ostatních látek inkorporujících APD prekurzor. Celou sadu šesti genů obsahují genové shluky porothramycinu (Najmanová *et al.*, 2014), anthramycinu (Hu *et al.*, 2007) a sibiromycinu (Li *et al.*, 2009b), ve kterých jsou navíc přítomny i geny kódující proteiny postkondenzačně modifikující APD jednotku. Oproti tomu v genových shlucích tomaymycinu (Li *et al.*, 2009a) a limazepinu (Pavlíková *et al.*, 2018) chybí gen *apd3* kódující methyltransferázu, a proto je v jejich struktuře zabudován APD s dvouuhlíkatým bočním řetězcem. V genovém shluku hormaomycinu bylo také nalezeno pět genů, zde však chybí *apd5* zřejmě kódující izomerázu dvojných vazeb (Höfer *et al.*, 2011; Jirásková *et al.*, 2016).

Struktura linkosamidových genových shluků a rozšíření genů kódujících biosyntézu APD naznačuje, že linkomycinový genový shluk pravděpodobně vznikl začleněním genů kódujících biosyntézu PPL do shluku původního linkosamidu, který předtím inkorporoval L-prolin volně dostupný v buňce. Geny kódující biosyntézu PPL byly do producenta původního linkosamidu pravděpodobně

přeneseny společně z organismu, který již obsahoval plnou sadu šesti genů *apd1-apd6* (Janata *et al.*, 2018a).

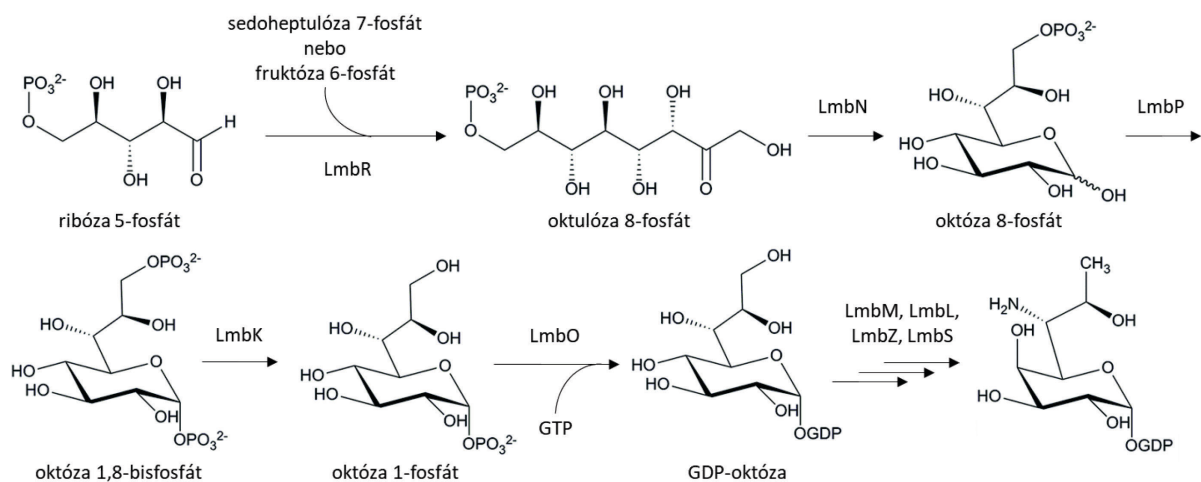
### 2.5.3 Biosyntéza linkosamidových prekurzorů

Linkosamidy jsou definované minimální strukturou skládající se z neobvyklého aminocukru spojeného amidovou vazbou s aminokyselinou. Významnou částí jejich biosyntézy je tedy syntéza aminocukerného prekurzoru, kódovaná devíti geny a v případě linkomycinu také syntéza PPL, kódovaná šesti geny. Enzymy katalyzující biosyntézu obou linkomycinových prekurzorů jsou tak kódovány více než polovinou genů linkomycinového shluku. Detailní popis těchto drah ovšem není cílem této dizertační práce, proto zde zmíním pouze základní biosyntetické principy.

#### 2.5.3.1 Biosyntéza aminocukerného prekurzoru linkosamidů

Vzhledem ke shodné struktuře aminocukerné složky u všech linkosamidů probíhá její biosyntéza pravděpodobně shodně (Obrázek 2.11), což podporuje i srovnání linkomycinového a celesticetinového shluku (Obrázek 2.9). Experimentálně byla ovšem tato biosyntéza ověřena z většiny na linkomycinovém modelu.

Prvním krokem biosyntézy je vznik oktulóza 8-fosfátu kondenzací ribóza 5-fosfátu a molekuly odvozené z pentózo fosfátové dráhy (fruktóza 6-fosfátu nebo sedoheptulóza 7-fosfátu). Poté dojde k 1,2-izomerizaci oktulóza 8-fosfátu na októza 8-fosfát (Sasaki *et al.*, 2012). Októza 8-fosfát je v následných krocích převeden na októza 1-fosfát, který je aktivován vazbou GDP (Lin *et al.*, 2014). Závěrečné kroky biosyntézy aminocukerného prekurzoru zahrnují epimerizaci C-6 hydroxylové skupiny katalyzovanou LmbM, dehydrataci katalyzovanou LmbL/LmbZ, epimerizaci C-4 hydroxylové skupiny znovu katalyzovanou LmbM a na závěr transaminaci katalyzovanou LmbS (Wang *et al.*, 2020).

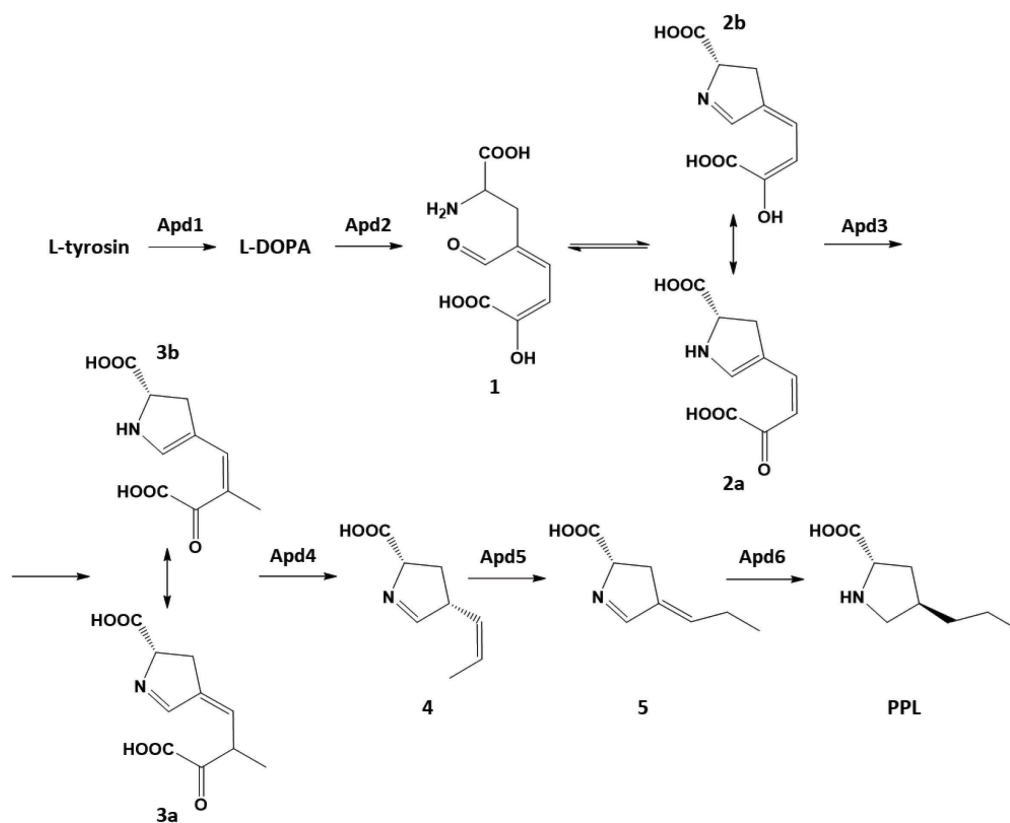


Obrázek 2.11. **Biosyntéza aminocukerného prekurzoru linkomycinu.**

Převzato a upraveno z Janata *et al.*, 2018a.

### 2.5.3.2 Biosyntéza aminokyselinového prekurzoru linkomycinu

Biosyntéza PPL vychází stejně jako u ostatních APD z proteinogenní aminokyseliny L-tyrosinu (Obrázek 2.12) (Witz, Hessler & Miller, 1971). První dvě reakce katalyzované Apd1 a Apd2 přeměňují L-tyrosin přes L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a intermediát **1** na dikarboxylovou kyselinu **2** (Novotná *et al.*, 2004, 2013; Colabroy *et al.*, 2008, 2019). Methyltransferáza Apd3 následně methyluje **2** za vzniku intermediátu **3** (Pang *et al.*, 2015; Kameník *et al.*, 2018), ze kterého odštěpením oxalátu hydrolázou Apd4 vzniká **4**. Pořadí reakcí katalyzovaných Apd3 a Apd4 však ještě není zcela ověřeno (Zhong *et al.*, 2017; Zhong, Chen & Liu, 2018; Kameník *et al.*, 2018). Intermediát **4** je hypotetickou izomerázou Apd5 zřejmě přeměňován na **5** (Jirásková *et al.*, 2016). Posledním krokem je redukce **5** na PPL katalyzovaná Apd6 (Steiningerová *et al.*, 2020).



Obrázek 2.12. Biosyntéza aminokyselinového prekursoru linkomycinu.

## 2.5.4 Kondenzace a postkondenzační kroky v biosyntéze linkosamidů

Neobvyklé spojení aminocukru a aminokyseliny pomocí amidové vazby je v biosyntéze linkosamidů katalyzováno unikátním hybridním kondenzačním systémem. Ten kombinuje proteiny homologní s doménami NRPS, které jsou využity k aktivaci aminokyselinového prekursoru, se systémem závislým na bakteriálních thiolech. Tento systém je zodpovědný za aktivaci aminocukru a tvorbu amidové vazby (Kadlčík *et al.*, 2013; Janata *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Nicméně i bezprostředně následující linkosamidové postkondenzační modifikace využívají bakteriální thiol, tentokrát ovšem pro zabudování atomu síry do struktury linkosamidů, a jsou tak nezbytným předpokladem pro finální úpravy struktur, jakou je například připojení salicylátu v biosyntéze celesticetinu (Zhao *et al.*, 2015; Kameník *et al.*, 2016; Ushimaru *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a).

### 2.5.4.1 Aktivace aminokyselinového prekursoru

Aminokyselinové prekurzory linkosamidů jsou aktivovány samostatně stojícími adenylačními doménami (Kadlčík *et al.*, 2013), stejně jako je tomu u prekursorů některých neribozomální peptidů

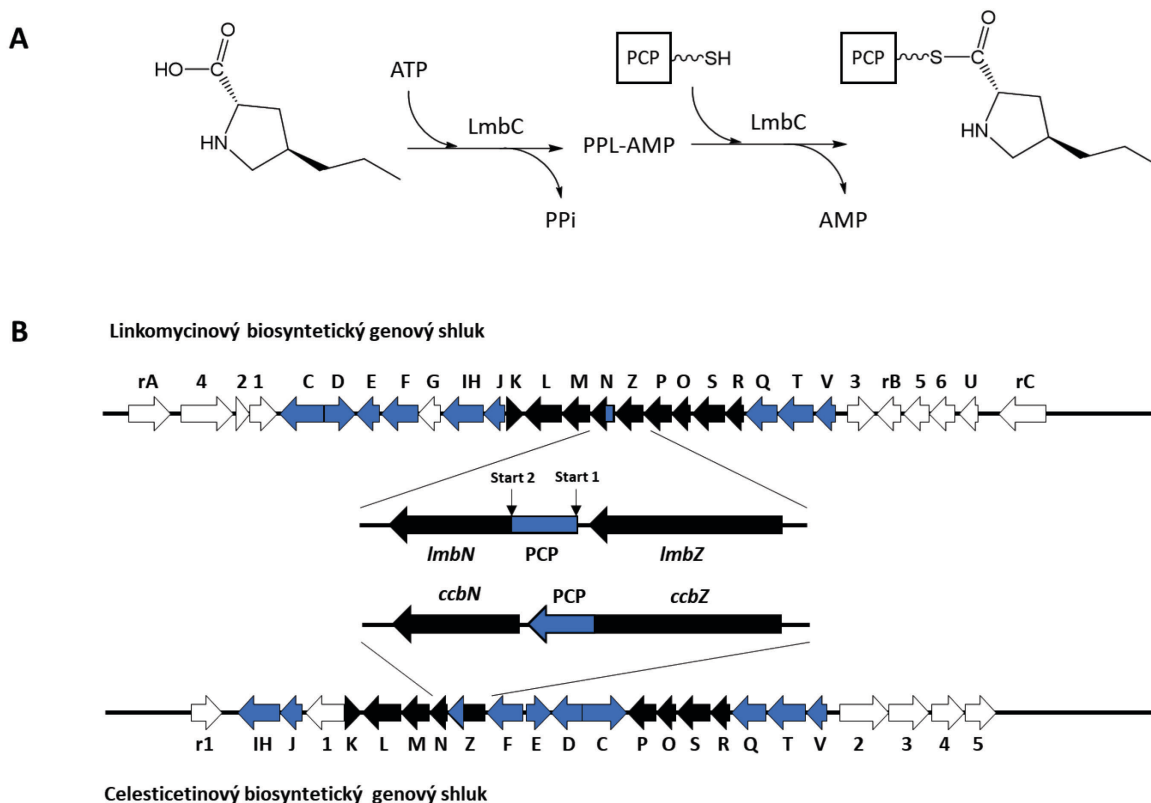
(Hur *et al.*, 2012). PPL je v biosyntéze linkomycinu aktivován adenylační doménou LmbC, oproti tomu L-prolin aktivuje celesticetinová adenylační doména CcbC (Kadlčík *et al.*, 2013). Substrátová specifita adenylační domény tak určuje, který aminokyselinový prekurzor bude zabudován do struktury výsledného linkosamidu.

Aktivované aminokyselinové substráty jsou ve druhé části reakce katalyzované adenylační doménou připojeny thioesterovou vazbou k PCP (Obrázek 2.13). Vzhledem k jejich funkčnímu propojení bývá PCP často součástí jednoho fúzního proteinu s adenylační doménou (Fischbach & Walsh, 2006). V případě adenylačních domén LmbC i CcbC tomu tak ovšem není (Kadlčík *et al.*, 2013). V linkosamidových genových shlucích však není ani sekvence kódující samostatně stojící PCP. Překvapivě však byla sekvence kódující zhruba 80 aminokyselin dlouhý PCP nalezena jako součást dvou nehomologních biosyntetických genů. Tato sekvence tvoří 5'-koncovou část genu *lmbN* v linkomycinovém shluku a 3'-koncovou část genu *ccbZ* v celesticetinovém shluku (Obrázek 2.13) (Janata *et al.*, 2015).

U proteinu LmbN byla jeho dvojitá funkce experimentálně ověřena, když C-koncová doména katalyzuje izomeraci v biosyntéze aminocukerného prekurzoru, zatímco N-koncová doména slouží jako PCP při aktivaci aminokyseliny (Obrázek 2.13) (Sasaki *et al.*, 2012; Janata *et al.*, 2015). U hypotetické oxidoreduktázy CcbZ je její zapojení v biosyntéze aminocukerné podjednotky přepokládáno (Janata *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že ani jeden z proteinů nemá přímé napojení na kondenzaci linkosamidů, je spojení genů *lmbN* a *ccbZ* se sekvencí kódující PCP pravděpodobně náhodné.

V genu *lmbN* byl dalšími analýzami objeven druhý nezávislý translační počátek před sekvencí kódující izomerázovou doménou (Obrázek 2.13). Díky tomu mohou vznikat dvě formy proteinu LmbN – bifunkční protein a samostatná izomerázová doména (Janata *et al.*, 2015). V genu *ccbZ* ovšem druhý translační počátek není přítomen. Pravděpodobně je tedy organizace genů v celesticetinovém shluku evolučně původnější a k připojení sekvence kódující PCP ke genu *lmbN* nejspíše došlo pozdějšími rekombinačními přestavbami genového shluku (Janata *et al.*, 2015).

Obecně je fúze PCP s funkčně nepříbuznými proteiny vzácná, několik takových případů již však bylo v literatuře popsáno. V biosyntéze sideroforu enterobaktinu tvoří PCP C-koncovou část izochorismát lyázy EntB (Gehring, Bradley & Walsh, 1997) a v biosyntéze antibiotika nouseothricinu je součástí proteinu NpsB s neznámou funkcí (Grammel *et al.*, 2002).



Obrázek 2.13. Aktivace aminokyselinového prekurzoru v biosyntéze linkosamidů.

A – Schéma aktivace aminokyselinového prekurzoru linkomycinu PPL samostatně stojící adenylační doménou LmbC a následné připojení aktivovaného prekurzoru k PCP, který je součástí proteinu LmbN.

B – Biosyntetické genové shluky linkomycinu a celesticetinu s detailním zobrazením genů *lmbN* a *ccbZ* kódujících proteiny se dvěma funkcemi. Start 1 a 2 vyznačují translační počátky v genu *lmbN*. Modře jsou znázorněny geny kódující kondenzační a postkondenzační kroky, černě geny kódující biosyntézu aminocukerného prekurzoru. Převzato a upraveno z Janata *et al.*, 2015.

#### 2.5.4.1.1 Fylogenetická analýza adenylačních domén

V molekulární evoluci linkomycinové biosyntetické dráhy došlo nejen k přijetí genů kódujících biosyntézu PPL pomocí HGT, ale také musela být umožněna aktivace a inkorporace PPL namísto původního L-prolinu. Tato změna mohla proběhnout buď přenosem adenylační domény aktivující PPL pomocí HGT spolu s geny kódujícími biosyntézu PPL, nebo mutacemi měnícími substrátovou specifitu původní adenylační domény z L-prolinu na PPL.

Pravděpodobnou evoluční historii adenylačních domén nám ukáže jejich fylogenetická analýza. Ta byla provedena na všech samostatně stojících a vybraných modulárních adenylačních doménách aktivujících L-prolin a APD. Všechny dosud publikované adenylační domény aktivující APD jsou v rámci fylogenetického stromu rozprostřené mezi doménami aktivujícími L-prolin. Výsledky tak ukazují, že

adaptace substrátové specifity adenylačních domén z L-prolinu k APD proběhla nezávisle na sobě v evoluční historii každé ze tří skupin látek aktivujících APD (linkomycinu, hormaomycinu i PBD) a pravděpodobně nedošlo k HGT genů kódujících adenylační domény mezi těmito skupinami (Kadlčík *et al.*, 2013; Janata *et al.*, 2018a).

Fylogenetická analýza dále jasně oddělila samostatně stojící a modulární adenylační domény do dvou vývojových linií. Adenylační doména LmbC tak spadá mezi samostatně stojící domény, které ovšem jinak aktivují výhradně L-prolin. Jejím nejbližším příbuzným je doména CcbC, se kterou má vysokou sekvenční identitu 55,7 %. To je výrazný rozdíl oproti ostatním samostatně stojícím adenylačním doménám, se kterými má LmbC sekvenční identitu maximálně 40 %. Navíc mají LmbC a CcbC i velmi podobné průměrné sekvenční identity s ostatními samostatně stojícími doménami (35,1 % a 35,6 %). Tato data, společně s faktem, že žádná jiná samostatně stojící doména kromě LmbC neaktivuje APD, ukazují, že LmbC i CcbC pocházejí ze společného předka, který s největší pravděpodobností aktivoval L-prolin. Nedá se nicméně vyloučit, že společný předek obou adenylačních domén neaktivoval pouze L-prolin, ale měl širší substrátovou specifitu (Kadlčík *et al.*, 2013).

Odlišným aktivovaným substrátům odpovídají výrazné rozdíly v neribozomálních kódech adenylačních domén LmbC a CcbC. Podobně jako u fylogenetické analýzy celých sekvencí adenylačních domén, také analýza neribozomálních kódů jasně oddělí samostatně stojící a modulární adenylační domény. Konsenzuální neribozomální kód samostatně stojících domén aktivujících L-prolin je L(L/F)YLALVC (není zde uváděn lysin a aspartát, konzervované ve všech adenylačních doménách aktivujících  $\alpha$ -aminokyselinový substrát). Neribozomální kód CcbC **VFYCALVC** (aminokyselinové zbytky shodné s konsenzem jsou podtržené) je mu logicky velmi podobný, kdy se shoduje 6 z 8 aminokyselinových zbytků (Obrázek 2.14). Oproti tomu neribozomální kód LmbC (VALVAIGC) se výrazně liší, pravděpodobně jako důsledek adaptace vazebného místa na jinou substrátovou aminokyselinu (Kadlčík *et al.*, 2013).

Analogickou situaci nalezneme i u modulárních adenylačních domén, kde jsou také domény aktivující APD blíže příbuzné doménám aktivujícím L-prolin. Neribozomální kód domén aktivujících APD se ovšem i zde výrazně odlišuje od konsenzuálního kódu domén aktivujících L-prolin, což umožnilo změnu jejich substrátové specifity (Kadlčík *et al.*, 2013).

#### 2.5.4.1.2 Homologní modely vazebných míst pro substrát

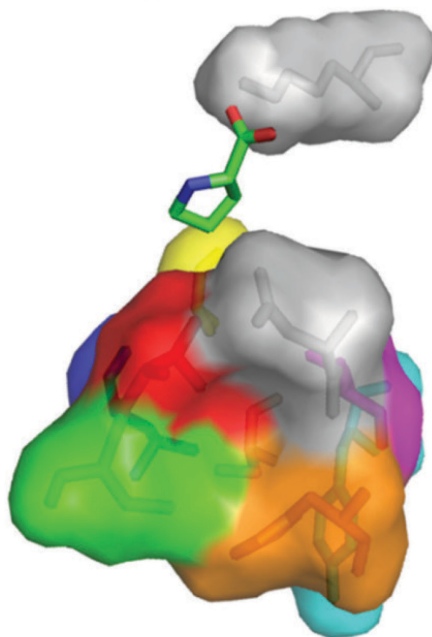
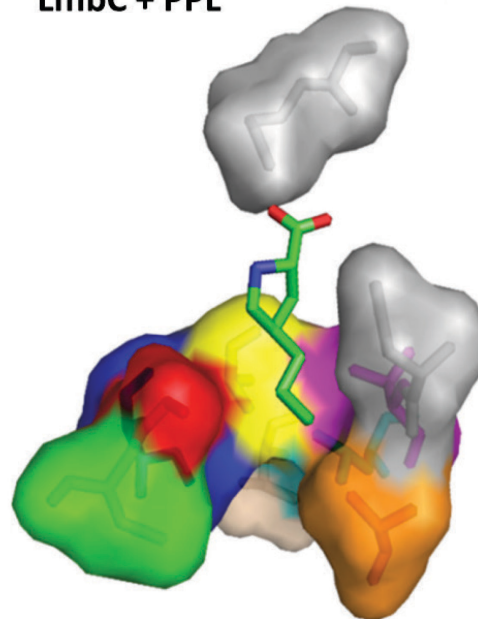
Významná přestavba vazebného místa pro substrát v evoluční historii LmbC se dá pozorovat při přímém porovnání homologních modelů vazebných míst LmbC a CcbC. Tyto modely byly vytvořeny na základě krystalové struktury PheA (Kadlčík *et al.*, 2013), adenylační domény vážící fenylalanin (Conti *et al.*, 1997).

Na obou modelech (Obrázek 2.14) jsou jasně viditelné konzervované aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu (v modelech zobrazeny šedivě), lysin interagující s karboxylovou skupinou a aspartát interagující s  $\alpha$ -aminoskupinou substrátové aminokyseliny. Zbýlých 8 aminokyselinových zbytků určuje specifitu vazebného místa. To je v případě CcbC jednoznačně prostorově menší, kdy kromě konzervovaných aminokyselinových zbytků je L-prolin v CcbC v kontaktu jen se třemi dalšími aminokyselinovými zbytky – V202 (růžově), A274 (žlutě) a V306 (červeně). Zbýlých pět aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu je stericky stíněno těmito třemi a pravděpodobně napomáhají udržovat tvar vazebného místa. Celkově model ukazuje, že není možné, aby adenylační doména CcbC aktivovala APD s bočním řetězcem v pozici 4, protože její vazebné místo je příliš malé a nemá vhodný tvar (Kadlčík *et al.*, 2013).

Neribozomální kód LmbC se od kódu CcbC liší v pěti aminokyselinových zbytcích určujících substrátovou specifitu (Obrázek 2.14). Důsledkem těchto změn je přítomnost kanálu, do kterého se zanořuje boční řetězec PPL. Je zajímavé, že přesto se u domény LmbC odlišuje pouze jeden z aminokyselinových zbytků, které byly ve vazebném místě CcbC v kontaktu se substrátem – V306 (červeně) v CcbC byl zaměněn za G308 v LmbC. Tato změna byla ovšem pravděpodobně zásadní, protože právě větší postranní řetězec valinu blokuje ve vazebném místě CcbC přístup do kanálu a brání tak zanoření bočního řetězce PPL. Ostatní čtyři odlišné aminokyselinové zbytky ve vazebném místě LmbC pravděpodobně přispívají k vytvoření kanálu o správné velikosti, tvaru a hydrofobicitě. Podle analýzy homologních modelů aminokyselinový zbytek A207 (oranžově) vytváří v LmbC prostornější kanál oproti F205 v CcbC. Hydrofobicita kanálu je pravděpodobně ovlivněna zbytky L246 (tyrkysově) a V274 (krémově) v LmbC, které umožňují lepší zanoření hydrofobního řetězce PPL, oproti hydrofilnějším zbytkům Y244 a C272, které jsou na jejich pozici v CcbC. Význam posledního odlišného zbytku I300 (modře) v LmbC oproti L298 v CcbC není z porovnání homologních modelů zřejmý (Kadlčík *et al.*, 2013).

**A**

Adenylační doména	Substrát	202	205	244	272	274	298	306	307
<b>CcbC</b>	L-prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C
Konsenzus samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin	L-prolin	L	L/F	Y	L	A	L	V	C
<b>LmbC</b>	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C
		204	207	246	274	276	300	308	309

**B****CcbC + L-prolin****LmbC + PPL**Obrázek 2.14. **Adenylační domény LmbC a CcbC.**

A – Neribozomální kód adenylačních domén CcbC a LmbC v porovnání s konsenzuální kódem samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin. Aminokyselinové zbytky odpovídající konsenzu jsou podtrženy. Konzervované aminokyselinové zbytky lysin a aspartát jsou vynechány. Číslování aminokyselinových zbytků v horním řádku odpovídá adenylační doméně CcbC a ve spodním řádku doméně LmbC. Barevné značení odpovídá aminokyselinovým zbytkům v homologních modelech (B).

B – Homologní modely vazebných míst adenylačních domén CcbC a LmbC s jejich přirozenými substráty L-prolinem a PPL. Převzato a upraveno z Kadlčík *et al.*, 2013.

Podobný princip jako při adaptaci LmbC se pravděpodobně uplatnil také v evoluční historii modulární adenylační domény HrmP(3)<sub>A</sub> aktivující APD (2*S*,4*R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolin v biosyntéze hormaomycinu (Crüsemann *et al.*, 2013). Oproti konsenzuálnímu neribozomálnímu kódu modulárních adenylačních domén aktivujících L-prolin (VQ(Y/F)IAHVV) se neribozomální kód HrmP(3)<sub>A</sub> (VQFSAHGA) liší ve třech aminokyselinových zbytcích. Ve všech případech jde o záměnu aminokyselinových zbytků s větším postranním řetězcem za zbytky s menším postranním řetězcem. Stejně jako v LmbC zde v pozici odpovídající aminokyselinovému zbytku 308 došlo k záměně konsenzuálního valinu za glycin

s menším postranním řetězcem. Záměny aminokyselinových zbytků ve vazebném místě HrmP(3)<sub>A</sub> tak pravděpodobně umožňují zanoření bočního řetězce APD, podobně jako je tomu ve vazebném místě LmbC (Crüsemann *et al.*, 2013; Kadlčík *et al.*, 2013).

#### 2.5.4.1.3 Biochemická charakterizace adenylačních domén

Předpokládané substrátové specifity adenylačních domén LmbC a CcbC byly ověřeny jejich biochemickou charakterizací v reakcích s různými aminokyselinovými substráty (Tabulka 2.1). Doména CcbC aktivuje svůj přirozený substrát L-prolin s kinetickými parametry srovnatelnými s ostatními samostatně stojícími doménami aktivujícími L-prolin (Thomas *et al.*, 2002; Garneau *et al.*, 2005; Méjean *et al.*, 2010; Kopp *et al.*, 2011; Kadlčík *et al.*, 2013). Podle předpokladů byla u CcbC také zjištěna velmi úzká substrátová specifita. Tato adenylační doména vůbec neaktivuje APD vyskytující se v biosyntéze linkomycinu – PPL ani EPL. To potvrzuje, že vazebné místo domény CcbC má nevhodný tvar a velikost pro aktivaci substrátů s bočním řetězcem. LmbC má oproti CcbC širší substrátovou specifitu (Kadlčík *et al.*, 2013), což je v souladu s předchozími studiemi, které ukázaly, že adenylační domény aktivující hydrofobní aminokyseliny jsou obecně méně selektivní než ty aktivující polární aminokyseliny (Challis *et al.*, 2000; Kurmayer *et al.*, 2005).

Tabulka 2.1. Kinetické parametry adenylačních domén CcbC a LmbC v reakcích s odlišnými substráty.

Adenylační doména	Substrát	K <sub>m</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [min <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]
CcbC	L-prolin	0,5 ± 0,03	45 ± 0,9	91,7
CcbC	EPL	ND	ND	ND
CcbC	PPL	ND	ND	ND
LmbC	L-prolin	470 ± 60	20 ± 1	0,043
LmbC	EPL	6,4 ± 0,3	22,1 ± 0,3	3,46
LmbC	PPL	0,29 ± 0,03	34,8 ± 1	121
LmbC	BuPL	0,118 ± 0,008	42 ± 0,8	359
LmbC	PePL	0,0596 ± 0,003	55,2 ± 0,8	926

ND – aktivita nebyla detekována. K<sub>m</sub> – Michaelisova konstanta. k<sub>cat</sub> – katalytická konstanta. k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> – katalytická účinnost. Odchytky odpovídají směrodatné chybě. Převzato a upraveno z Kadlčík *et al.*, 2013.

Svůj přirozený substrát PPL aktivuje LmbC s podobnými kinetickými parametry jako byly naměřeny pro CcbC v reakci s L-prolinem (Tabulka 2.1). Doména LmbC dále aktivuje i EPL, ovšem její afinita k tomuto prekurzoru linkomycinu B je podstatně nižší než k PPL. Díky tomu dochází k preferenční aktivaci PPL, jehož zabudování vede k tvorbě účinnějšího finálního metabolitu. LmbC je kromě PPL a EPL schopna aktivovat i proteinogenní L-prolin, nicméně má k tomuto substrátu zhruba

1000× nižší afinitu než k PPL. Díky tomu nedochází k inkorporaci L-prolinu, běžně se vyskytujícího v buňkách, do struktury linkomycinu (Kadlčík *et al.*, 2013). Širší substrátová specifita LmbC umožňuje efektivně aktivovat nejen PPL, ale i syntetické APD s delšími bočními řetězci. Kinetické parametry LmbC v reakci s (2*S*,4*R*)-4-butyl-L-prolinem (BuPL) a (2*S*,4*R*)-4-pentyl-L-prolinem (PePL) jsou dokonce ještě lepší než s PPL (Kadlčík *et al.*, 2013). Díky tomu byla možná mutasyntetická příprava biologicky účinnějších derivátů linkomycinu s prodlouženými bočními řetězci v pozici C-4'. Producent linkomycinu se zablokovanou biosyntézou PPL (delecí genu *apd5*) byl kultivován v médiu s dodanými syntetickými prekurzory BuPL a PePL, které byly inkorporovány do výsledných derivátů 4'-depropyl-4'-butyl-linkomycinu a 4'-depropyl-4'-pentyl-linkomycinu (Ulanová *et al.*, 2010).

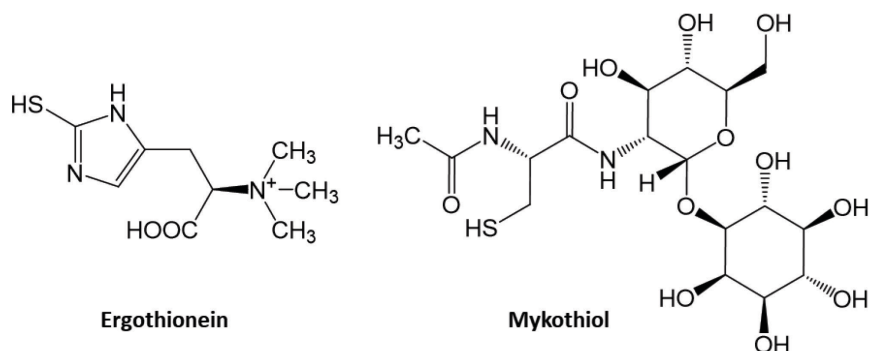
#### 2.5.4.1.4 Modifikace vazebných míst pro substrát

Homologní modely vazebných míst LmbC a CcbC napověděly, které aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu by mohly umožňovat širší substrátovou specifitu LmbC. Jako klíčový se v LmbC jeví aminokyselinový zbytek G308, na jehož pozici se ve vazebném místě CcbC nachází V306. Pro ověření této hypotézy byly připraveny dvě mutované adenylační domény LmbC G308V a CcbC V306G, ve kterých byly tyto aminokyselinové zbytky zaměněny. Následná biochemická charakterizace mutovaných domén ukázala, že samotná záměna valinu za glycin v doméně CcbC V306G nestačí k vytvoření kanálu o správné velikosti a tvaru pro zanoření bočního řetězce PPL. Na druhou stranu záměna glycinu za valin v doméně LmbC G308V významně blokovala kanál ve vazebném místě. Glycin v testované pozici je tedy pravděpodobně nezbytný, ale ne dostatečný pro aktivaci substrátů s bočním řetězcem (Kadlčík *et al.*, 2013).

Jeden z cílů této práce navazoval na popsané studie adenylačních domén LmbC a CcbC. Jeho součástí bylo experimentálně otestovat vliv dalších aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu na substrátové specifity LmbC a CcbC a následně vytvořit mutované adenylační domény se změněnými specifitami. Tyto experimenty mohou sloužit také k napodobení procesu molekulární evoluce substrátové specifity adenylačních domén směrem od L-prolinu k APD.

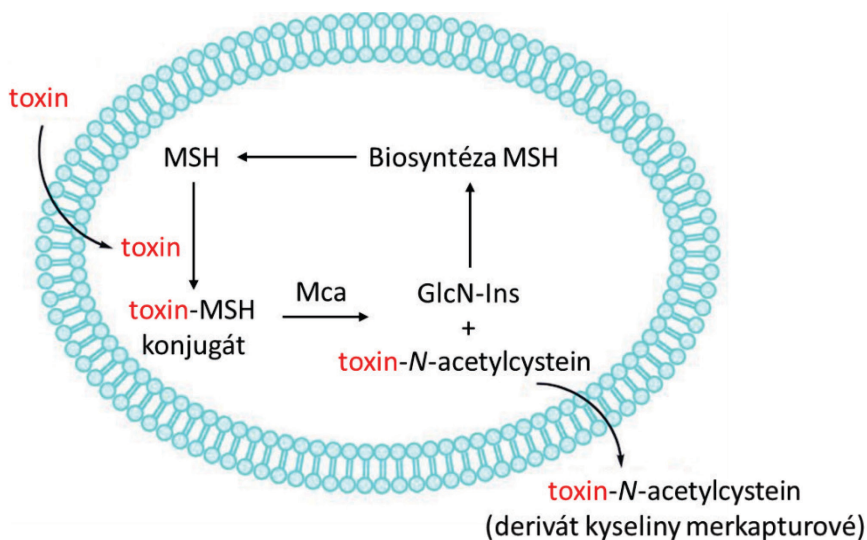
#### 2.5.4.2 Zapojení ergothioneinu a mykothiolu do biosyntézy linkosamidů

Zbývající proteiny účastníci se kondenzace a těsně jí předcházející nemají již žádnou homologii s doménami NRPS. Některé z nich jsou ovšem homologní s proteiny metabolismu bakteriálních thiolů ergothioneinu (ESH; Obrázek 2.15) a mykothiolu (MSH) (Zhao *et al.*, 2015). ESH a MSH jsou nízkomolekulární thiole účastníci se zejména detoxifikačních procesů ve většině aktinobakterií (Genghof & Vandamme, 1964; Newton *et al.*, 1996).



Obrázek 2.15. **Struktura ergothioneinu a mykothiolu.**

MSH je funkčním ekvivalentem glutathionu, který je hlavním thiolem u eukaryot a většiny Gram negativních bakterií (Jothivasan & Hamilton, 2008). Jeho primární funkcí je vazba elektrofilní molekuly (například toxinu nebo antibiotika) za vzniku „toxin-MSH konjugátu“ (Obrázek 2.16), který je následně štěpen Mca amidázou na derivát kyseliny merkapturové a pseudodisacharid 1-*O*-glukosamin-D-myoinositol (GlcN-Ins). GlcN-Ins je následně znovu využit v biosyntéze MSH, zatímco derivát kyseliny merkapturové je transportován ven z buněk. Derivát kyseliny merkapturové, složený z *N*-acetyl-L-cysteinového zbytku s navázanou elektrofilní molekulou, by se tak dal označit také jako „odpadní produkt“ (Newton, Buchmeier & Fahey, 2008). ESH je v buňkách schopen zachytávat reaktivní kyslíkové radikály nebo redukovat ferrylmyoglobin, který může vznikat při oxidativním stresu (Laer, Hamilton & Messens, 2013).



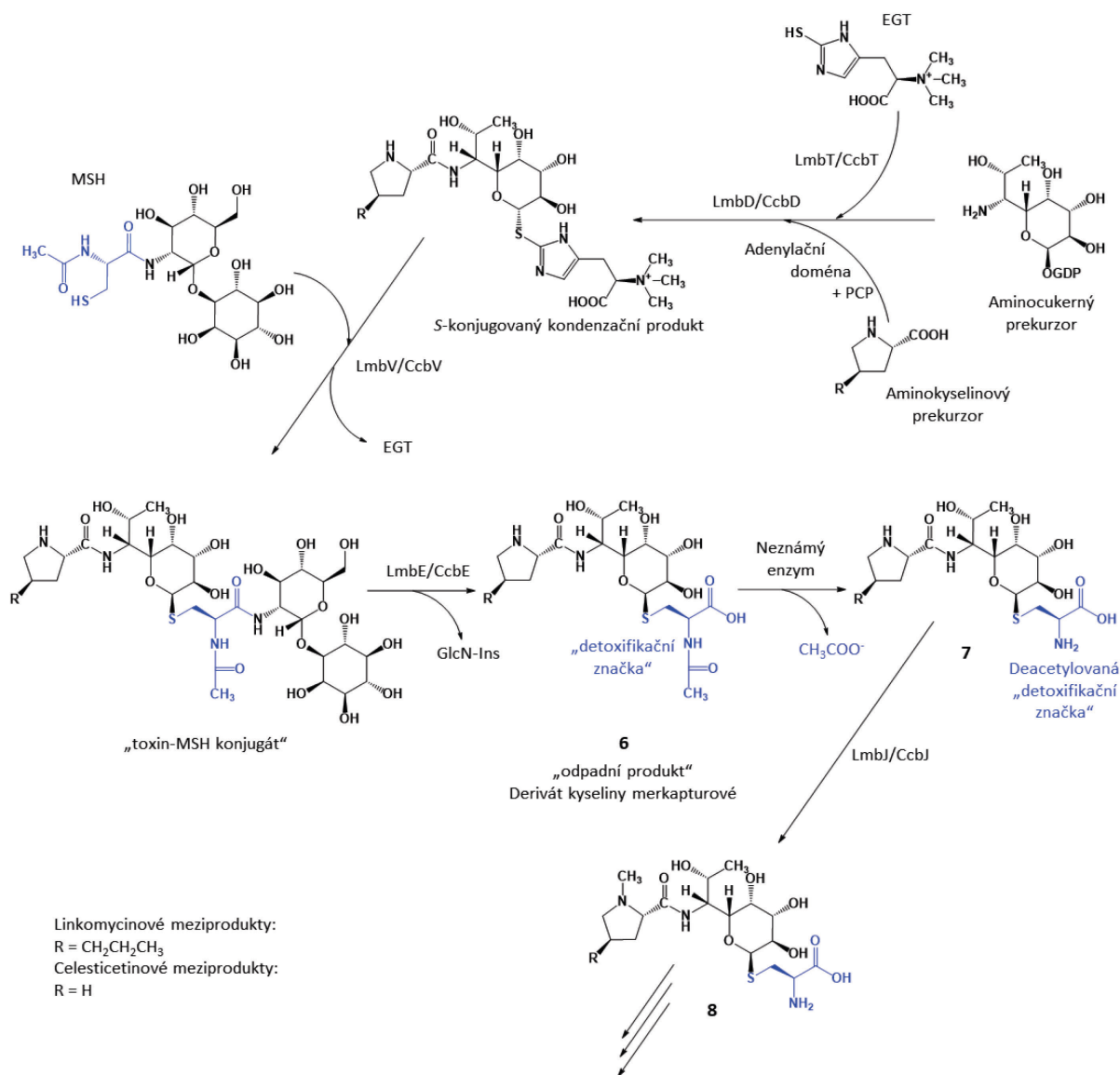
Obrázek 2.16. **Schéma detoxifikace využívající MSH.**

Převzato a upraveno z Newton *et al.*, 2008.

V biosyntézách linkosamidů však mají ESH i MSH jinou funkci. ESH je navázán na aminocukerný prekurzor během jeho aktivace a slouží tedy pravděpodobně jako nosič při kondenzaci, podobně jako PCP pro aminokyselinový prekurzor (Wang, Zhao & Liu, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Po kondenzaci je ve struktuře linkosamidového meziprojektu ESH nahrazen MSH, který slouží jako donor atomu síry (Zhao *et al.*, 2015).

#### *2.5.4.3 Kondenzace aminokyselinového a aminocukerného prekurzoru*

Kondenzace a úvodní postkondenzační modifikace probíhají v linkosamidových biosyntézách analogicky a jsou katalyzovány homologními enzymy v biosyntéze linkomycinu i celesticetinu. Prvním krokem kondenzace, který není homologní s biosyntézou neribozomálních peptidů, je aktivace aminocukerného prekurzoru (Obrázek 2.17). Glykosyltransferáza LmbT/CcbT katalyzuje vznik  $\beta$ -S-vazby mezi aminooktózovým prekurzorem a ESH za uvolnění GDP (Zhao *et al.*, 2015). Výsledný S-konjugát vstupuje do kondenzační reakce s L-prolinem nebo PPL navázanými na PCP doméne bifunkčních proteinů LmbN nebo CcbZ (Janata *et al.*, 2015). Vznik amidové vazby je katalyzován unikátními enzymy LmbD/CcbD, které nejsou homologní s žádnými dalšími proteiny v databázích a vyvinuly se pravděpodobně specificky jako součást biosyntézy linkosamidů.

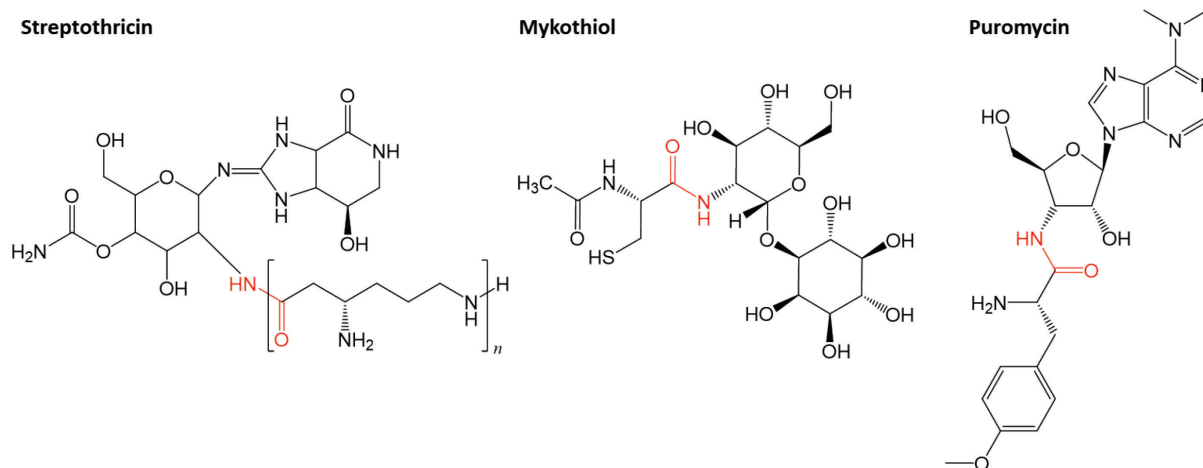


Obrázek 2.17. Kondenzace a úvodní postkondenzační kroky v biosyntézách linkosamidů.

*N*-acetyl-L-cysteinový zbytek odvozený z MSH a jeho zpracování jsou zvýrazněny modře.

Obecně je vznik amidové vazby mezi aminocukrem a  $\alpha$ -karboxylovou skupinou aminokyseliny relativně vzácný. Kromě linkosamidů byl popsán například v biosyntéze streptothricinu (Obrázek 2.18) (Maruyama *et al.*, 2012), mykothiolu (Sareen *et al.*, 2002) nebo puromycinu (Ángel Rubio *et al.*, 2004). V případě streptothricinu dochází ke kondenzaci aminocukerného prekurzoru streptothrisaminu a L- $\beta$ -lysinu nebo oligopeptidu složeného z 2-7 L- $\beta$ -lysinů. Při reakci je využíván neobvyklý NRPS modul obsahující PCP, který váže L- $\beta$ -lysin, a kondenzační doménu katalyzující vznik amidové vazby (Maruyama *et al.*, 2012). V biosyntéze mykothiolu dochází ke kondenzaci GlcN-Ins a cysteinu, katalyzované specializovanou MSH ligázou, homologní s cysteinyl-tRNA syntetázami (Sareen *et al.*, 2002). Stejně tak v biosyntéze puromycinu je pro kondenzaci využíván systém nezávislý na NRPS

proteinech. Vznik amidové vazby mezi L-tyrosinem a 3'-amino-3'-deoxyadenosinem je zde katalyzován tyrosinyl-aminonukleosid syntetázou (Ángel Rubio *et al.*, 2004). Ani jeden z kondenzačních systémů tedy není homologní s tím linkosamidovým.



Obrázek 2.18. **Struktura streptothricinu, mykothiolu a puromycinu.**

Červeně vyznačena amidová vazba. Strukturální varianty streptothricinu se liší délkou oligopeptidového řetězce ( $n = 1-7$ ).

Další unikátní vlastností linkosamidových biosyntéz je alespoň formální podobnost následujících postkondenzačních kroků s MSH detoxifikačním systémem aktinobakterií. S-konjugovaný kondenzační produkt vstupuje do reakce katalyzované druhou glykosyltransferázou LmbV/CcbV, při níž dochází k záměně ESH za MSH. MSH je při této nukleofilní substituci připojen  $\alpha$ -S-vazbou, která zůstane zachována i ve finální molekule linkosamidů (Zhao *et al.*, 2015). Výsledný produkt připomíná „toxin-MSH konjugát“, kde struktura linkosamidu reprezentuje „toxin“ (Kameník *et al.*, 2016). Následným krokem je i v biosyntéze linkosamidů odštěpení pseudodisacharidu GlcN-Ins amidázou LmbE/CcbE, která je homologní s Mca amidázou účastnící se MSH detoxifikačního systému. Produktem je derivát kyseliny merkapturové (látko 6), charakteristický N-acetyl-L-cysteinovým zbytkem (Obrázek 2.17, modře) (Zhao *et al.*, 2015). Struktura tohoto meziprojektu odpovídá „odpadnímu produktu“ MSH detoxifikačního systému, ve kterém jsou deriváty kyseliny merkapturové běžně transportovány ven z buňky (Obrázek 2.16). N-acetyl-L-cysteinový zbytek by se tak dal označit jako „detoxifikační značka“ (Newton *et al.*, 2008; Kameník *et al.*, 2016). Zdánlivý „odpadní produkt“ ovšem není transportován ven z buňky, ale je substrátem v následné biosyntetické reakci. Deacetylace N-acetyl-L-cysteinového zbytku umožňuje pokračování linkosamidové biosyntézy v buňce tím, že poskytuje volnou primární aminoskupinu, která je nezbytná pro pozdější postkondenzační reakce katalyzované homologními, ale funkčně odlišnými enzymy LmbF/CcbF (Kameník *et al.*, 2016). Protože

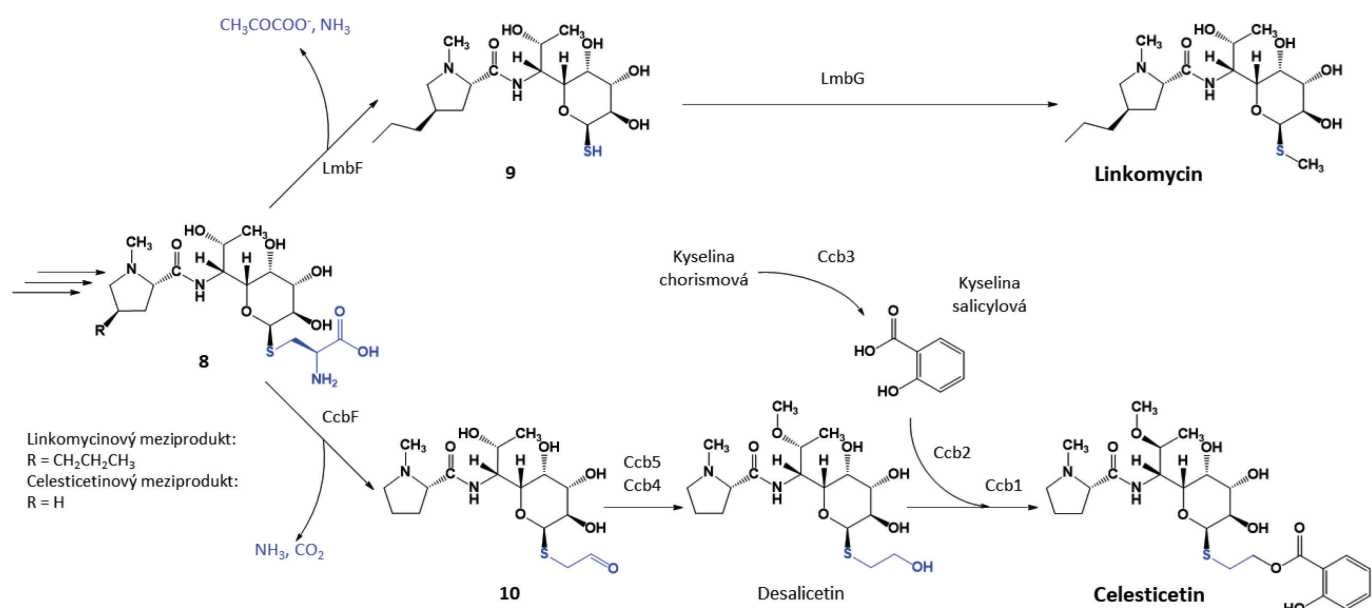
však enzymy katalyzující tuto klíčovou *N*-deacetylaci byly dosud neznámé, věnoval jsem se ve své práci jejich odhalení a následnému podrobnému studiu.

Produkt *N*-deacetylace, látka **7**, je substrátem *N*-methyltransferázy LmbJ/CcbJ, která připojuje methylovou skupinu k aminokyselinové složce za vzniku látky **8** (Najmanová *et al.*, 2013; Kameník *et al.*, 2016). Tato *N*-methylace je posledním analogickým krokem v biosyntéze linkomycinu a celesticetinu (Kameník *et al.*, 2016).

#### 2.5.4.4 Závěrečné postkondenzační kroky v linkosamidových biosyntetických drahách

Postkondenzační diverzifikace linkomycinové a celesticetinové biosyntetické dráhy je umožněna enzymy LmbF a CcbF, které, ačkoli jsou homologní a oba využívají jako kofaktor pyridoxal-5'-fosfát, katalyzují odlišné modifikace meziprojektu **8** (Obrázek 2.19). LmbF štěpí C-S vazbu mechanismem  $\beta$ -eliminace, což vede k odstranění celé deacetylované „detoxifikační značky“ (Obrázek 2.19, modře) (Kameník *et al.*, 2016). Sulfhydrylová skupina látky **9** je následně methylována *S*-methyltransferázou LmbG za vzniku linkomycinu (Ushimaru *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a).

CcbF oproti tomu katalyzuje oxidativní deaminaci spojenou s dekarboxylací, která vede k zachování 2C aldehydu připojeného k atomu síry v meziprojektu **10** (Kameník *et al.*, 2016; Ushimaru *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a). Reaktivní aldehydová skupina látky **10** je redukována na alkohol enzymem Ccb5. Dalším krokem je methylace hydroxylové skupiny v pozici C-7 na aminocukerné složce celesticetinového meziprojektu za vzniku desalicetinu. Tuto reakci katalyzuje *O*-methyltransferáza Ccb4, jejíž aktivita může v omezené míře i předcházet reakci katalyzované Ccb5 (Ushimaru *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a). Posledním krokem v biosyntéze celesticetinu je vznik esterové vazby mezi desalicetinem a kyselinou salicylovou. Kyselina salicylová je v producentovi celesticetinu syntetizována pravděpodobně z kyseliny chorismové hypotetickou salicylát syntázou Ccb3 (Janata *et al.*, 2015). Následně je salicylová kyselina aktivována adenylací a přenesena na koenzym A salicylyl-CoA ligázou Ccb2. Vznik esterové vazby mezi salicylátem navázaným na CoA a desalicetinem katalyzuje neobvyklá acyltransferáza Ccb1 za vzniku celesticetinu (Kadlčík *et al.*, 2017). V kmenu produkujícím celesticetin byly ovšem také detekovány jeho deriváty s inkorporovanou kyselinou anthranilovou (vznikající v jiné biosyntetické dráze) místo kyseliny salicylové. To ukazuje širší substrátovou specifitu proteinů Ccb1 a Ccb2 zajišťujících připojení kyseliny (Argoudelis, Coats & Johnson, 1974; Kadlčík *et al.*, 2017).



Obrázek 2.19. Závěrečné postkondenzační kroky v biosyntézách linkosamidů.

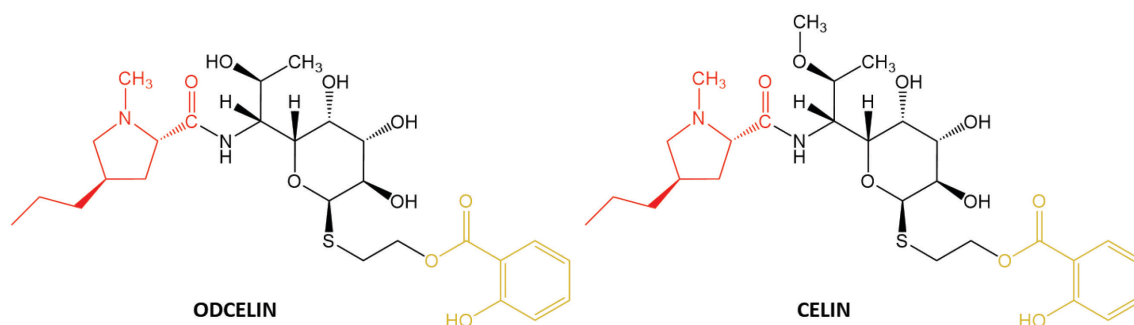
*N*-acetyl-L-cysteinový zbytek odvozený z MSH a jeho zpracování jsou zvýrazněny modře.

#### 2.5.4.5 Příprava hybridních linkosamidů

Znalosti biosyntetických drah specializovaných metabolitů se dají využít k přípravě látek s modifikovanou strukturou a biologickými vlastnostmi, ale také přímo k přípravě hybridních látek, kombinujících strukturální prvky několika existujících specializovaných metabolitů.

Pro tyto biotechnologické aplikace jsou nejzajímavější dvě skupiny biosyntetických proteinů – páry homologních proteinů zajišťujících diverzifikaci biosyntetických drah díky své odlišné substrátové nebo reakční specifitě (například LmbC/CcbC nebo LmbF/CcbF) a proteiny s širokou substrátovou specifitou (například LmbC, Ccb2 a Ccb1). Širší substrátová specifita adenylační domény LmbC a proteinů katalyzujících následné reakce v biosyntéze linkomycinu byla využita k mutasyntetické přípravě derivátů linkomycinu s prodlouženým řetězcem v pozici C-4' (Kapitola 2.5.4.1.3) (Ulanová *et al.*, 2010). Stejně tak i odlišná reakční specifita enzymů LmbF/CcbF, zajišťujících postkondenzační rozvětvení biosyntetických drah linkomycinu a celesticetinu, umožnila přípravu účinnějších linkosamidů. Z kultivačního média geneticky modifikovaného producenta linkomycinu byl izolován substrát enzymu LmbF. Tato látka byla následně použita jako substrát pro enzymy celesticetinové biosyntézy CcbF, Ccb5, Ccb2 a Ccb1. Výsledkem bylo připojení salicylátu stejným způsobem, jako je tomu v molekule celesticetinu. Výsledná hybridní molekula kombinující linkomycin a celesticetin se nazývá ODCELIN (případně CELIN, pokud byla použita i *O*-methyltransferáza Ccb4; Obrázek 2.20) a

vykazuje vyšší antibakteriální aktivitu než klinicky využívaný linkomycin i další přirozeně produkované linkosamidy (Kadlčík *et al.*, 2017).



Obrázek 2.20. **Struktury hybridních linkosamidů.**

Aminokyselínová složka vycházející z PPL je vyznačena červeně. Salicylátová složka je vyznačena žlutě.

Ukazuje se tak, že vzhledem k ekonomické nevýhodnosti přípravy syntetických linkosamidů jsou právě popsané přístupy reálnou možností přípravy nových látek s vyšší antibakteriální účinností, bez nutnosti jejich kompletní chemické syntézy (Janata *et al.*, 2018a). Nezbytnou podmínkou je ovšem detailní znalost biosyntéz linkosamidů, a to především jejich klíčových bodů a reakcí jim těsně předcházejících. Právě studiu některých z nich se věnuje tato práce.

### 3 Cíle práce

1. Detailní biochemická charakterizace adenylačních domén LmbC a CcbC účastnících se biosyntéz linkosamidů
  - a. Příprava mutovaných adenylačních domén LmbC a jejich biochemická charakterizace s cílem stanovit vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu adenylační domény LmbC na její substrátovou specifitu k neobvyklému aminokyselinovému substrátu, PPL
  - b. Experimentální napodobení molekulární evoluce substrátové specifity adenylační domény a biochemická charakterizace výsledné adenylační domény se změněnou substrátovou specifitou
  - c. Příprava chimérického proteinu obsahujícího části adenylačních domén LmbC a CcbC
2. Analýza APD prekurzorů vstupujících do kondenzační reakce v biosyntézách PBD
  - a. Určením substrátové specifity odpovídajících adenylačních domén ověřit, zda prekurzory detekované v kultivačních médiích producentů vybraných PBD opravdu vstupují do kondenzační reakce
3. Identifikace proteinů katalyzujících *N*-deacetylaci v biosyntéze linkosamidů
  - a. Příprava delečních mutant *S. lincolnensis*  $\Delta lmbIH$  a/nebo  $\Delta lmbQ$  a analýza meziproductů linkomycinové biosyntézy hromadících se v kultivačních médiích
  - b. Detailnější charakterizace mutovaných kmenů za využití analýzy jejich celkového proteomu a komplementace mutací
  - c. Produkce proteinů LmbIH a LmbQ a jejich homologů z biosyntézy celesticetinu CcbIH a CcbQ a otestování proteinů *in vitro* reakcích s předpokládaným substrátem *N*-deacetylase
  - d. Otestování endopeptidázové aktivity produkovaných proteinů *in vitro* reakcích

## 4 Výsledky

### 4.1 Název práce: Evolution-guided adaptation of an adenylation domain substrate specificity to an unusual amino acid

**Cíle:** Cílem studie bylo blíže charakterizovat dvě vysoce homologní adenylační domény LmbC a CcbC, kdy celesticetinová doména CcbC aktivuje pouze proteinogenní L-prolin, zatímco linkomycinová doména LmbC je adaptovaná pro aktivaci specializovaného prolinového derivátu, PPL. Druhý cílem práce bylo experimentální napodobení evoluční adaptace substrátové specifity linkomycinové adenylační domény.

**Metody:** Bodové mutace byly do genů vneseny za použití cílené mutagenese metodou QuikChange (Stratagene). Chimerické geny byly připraveny za pomoci PCR s fragmenty genů se vzájemně se překrývajícími konci. Proteiny byly heterologně produkovány v kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) a purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie. Pro biochemickou charakterizaci adenylačních domén byla použita metoda přenosu radioaktivity z [<sup>32</sup>P]-značeného PPI na ATP (ATP [<sup>32</sup>P]PPI Exchange Assay).

**Výsledky:** Cílem první části práce bylo experimentálně stanovit vliv jednotlivých aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu adenylační domény LmbC na její substrátovou specifitu. Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu LmbC, které se odlišují od odpovídajících zbytků neribozomálního kódu CcbC, byly těmito odpovídajícími zbytky nahrazeny. Následně byly stanoveny kinetické parametry mutovaných domén LmbC v reakcích s PPL i L-prolinem. Individuální mutace aminokyselinových zbytků G308V, A207F a L264Y vedly k výraznému zhoršení afinity adenylační domény LmbC k PPL (Tabulka 3.1) a kombinace dvou či tří těchto mutací pak k úplnému zastavení aktivace PPL.

Tabulka 3.1. Kinetické parametry domény LmbC a mutovaných domén LmbC v reakci s PPL.

Adenylační doména	Substrát	K <sub>m</sub> [mM]	k <sub>cat</sub> [min <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]
LmbC	PPL	0.28 ± 0.03	33 ± 1	120
LmbC I300L	PPL	0.24 ± 0.009	45 ± 0.5	185
LmbC V274C	PPL	0.39 ± 0.04	39 ± 1	100
LmbC G308V	PPL	5.8 ± 0.6	0.39 ± 0.02	0.07
LmbC A207F	PPL	8.6 ± 1	4.4 ± 0.3	0.51
LmbC L246Y	PPL	33 ± 6	0.37 ± 0.03	0.011

K<sub>m</sub> – Michaelisova konstanta. k<sub>cat</sub> – katalytická konstanta. k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> – katalytická účinnost. Odchytky odpovídají směrodatné chybě.

Po určení aminokyselinových zbytků významných pro aktivaci PPL doménou LmbC byl na doméně CcbC experimentálně napodoben proces molekulární evoluce substrátové specifity směrem od L-prolinu k PPL. V doméně CcbC byly aminokyselinové zbytky, v pozicích odpovídajících třem výše popsaným klíčovým zbytkům LmbC, za tyto zbytky zaměněny. Ve všech výsledných dvojítech a trojítech mutantách CcbC byla mutace V306G kombinována s mutacemi F205A a/nebo Y244L. Afinita všech těchto mutant k L-prolinu klesla o 2-3 řády v porovnání s nemutovanou doménou CcbC (Tabulka 3.2). Trojitá mutanta CcbC V306G + F205A + Y244L dokonce výrazně preferuje PPL, přirozený substrát domény LmbC. Navíc, stejně jako LmbC, i tato trojitá mutanta aktivuje také syntetické APD s delšími bočními řetězci – BuPL a PePL. I přes posun substrátové specifity směrem k PPL však zůstala celková katalytická účinnost trojité mutanty CcbC velmi nízká oproti nemutované doméně LmbC.

Tabulka 3.2. Hodnoty Michaelisovy konstanty domén CcbC, LmbC a mutovaných domén CcbC v reakcích s L-prolinem a APD substráty.

Adenylační doména	$K_m$ [mM]				
	L-prolin	EPL	PPL	BuPL	PePL
CcbC	0.36 ± 0.03	ND	ND	NT	NT
CcbC V306G	37 ± 2	ND	ND	NT	NT
CcbC V306G + F205A	670 ± 180	ND	ND	NT	NT
CcbC V306G + Y244L	86 ± 6	27 ± 3	24 ± 3	NA	ND
CcbC V306G + F205A + Y244L	670 ± 60	31 ± 7	6.4 ± 1	5.8 ± 1	2.5 ± 1
LmbC	480 ± 70	6.4 ± 0.3	0.28 ± 0.03	0.12 ± 0.006	0.06 ± 0.003

ND – testováno, nebyla detekována žádná aktivita. NT – netestováno. NA – detekována velmi nízká aktivita, nebylo možné určit kinetické parametry.  $K_m$  – Michaelisova konstanta. Odchylky odpovídají směrodatné chybě.

V poslední části práce byl za využití metod napodobujících rekombinaci připraven chimerický protein složený ze středové části proteinu LmbC (143 aminokyselinových zbytků zahrnujících 9 zbytků neribozomálního kódu) a okrajových částí proteinu CcbC. Přestože byl protein rozpustný, neaktivoval nicméně PPL ani L-prolin.

## 4.2 Název práce: Diversity of alkylproline moieties in pyrrolobenzodiazepines arises from postcondensation modifications of a unified building block

**Cíle:** Celkovým cílem studie bylo identifikovat APD prekurzory vstupující do kondenzace v biosyntézách PBD a popsat první postkondenzační krok modifikující jejich strukturu. Součástí této dizertační práce byla produkce vybraných adenylačních domén z biosyntéz PBD a otestování jejich aktivity v *in vitro* reakcích.

**Metody:** APD prekurzory extrahované z kultivačních médií producentů PBD byly detekovány pomocí LC-MS. Identita PBD s inkorporovaným 4-propyliden-L-prolinem značeným deuteriem [(5d<sub>1</sub>)-DH-PPL] byla ověřena za využití nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Všechny proteiny v rámci této studie byly heterologně produkovány v kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) a purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie. Produkty v *in vitro* reakcích byly detekovány pomocí LC-MS. K vnesení genů do genomu byly využity integrativní vektory podle protokolu REDIRECT (Gust *et al.*, 2004).

**Výsledky:** Centrální tricyklická struktura PBD obsahuje *N*-heterocyklický kruh, který může být odvozen z ADP prekurzoru nebo z L-prolinu. Látky inkorporující APD se rozdělují podle délky bočního řetězce na 2C PBD a 3C PBD. V první části práce byla analyzována kultivační média producentů vybraných 2C PBD (tomaymycin) i 3C PBD (sibiromycin, anthramycin a porothramycin) s cílem detekovat finální produkty biosyntézy APD prekurzoru, které vstupují do kondenzace. Vzhledem k odlišným strukturám jednotlivých PBD je překvapivé, že byla v kultivačních médiích detekována vždy jen jedna APD molekula - 4-propyliden-L-prolin (DH-PPL) u všech 3C PBD a 4-ethyliden-L-prolin (DH-EPL) u 2C PBD. K potvrzení, že DH-PPL a DH-EPL jsou meziproducty biosyntézy PBD, byly kmeny produkující porothramycin a sibiromycin kultivovány v přítomnosti značeného (5d<sub>1</sub>)-DH-PPL. LC-MS analýza poté prokázala jeho inkorporaci do struktur obou PBD.

Stále však nebylo prokázáno, zda DH-PPL a DH-EPL vstupují jako prekurzory do kondenzační reakce. Za tímto účelem byly v rámci této dizertační práce heterologně produkovány a následně otestovány adenylační domény z biosyntéz sibiromycinu (SibD) a porothramycinu (Por21), u kterých se předpokládalo, že aktivují DH-PPL. V *in vitro* reakcích však nebyla prokázána aktivace DH-PPL ani jednou z adenylačních domén, a to ani v případě, kdy byl kromě adenylační domény součástí reakce i odpovídající PCP.

Doklad vstupu DH-PPL či DH-EPL do kondenzace tak poskytly až *in vitro* reakce s proteinem Orf7, kódovaným v anthramycinovém biosyntetickém shluku. Tato oxidoreduktáza by měla v APD jednotce katalyzovat vznik druhé dvojně vazby a přesun původní dvojně vazby za vzniku dvou konjugovaných dvojných vazeb. Heterologně produkováný Orf7 nicméně v *in vitro* reakci nekatalyzoval

oxidaci DH-PPL. Proto jsme očekávali, že je DH-PPL nejprve inkorporován do struktury PBD a až následně oxidován Orf7. Předpokládaný substrát z biosyntézy anthramycinu ovšem nebyl dostupný. Pouze jednu exocyklickou dvojnou vazbu v APD jednotce však obsahuje i finální struktura tomaymycinu, ačkoli je zde APD jednotkou DH-EPL. Tomaymycin byl nejprve izolován z kultivačního média producenta a následně opravdu přeměněn proteinem Orf7 v *in vitro* reakci na odpovídající produkt se dvěma dvojnými vazbami.

Kultivací producenta tomaymycinu s chemicky syntetizovaným DH-PPL nebo PPL přidanými v médiu byly poté připraveny deriváty tomaymycin-DH-PPL a tomaymycin-PPL. Přeměnou tomaymycinu-DH-PPL v *in vitro* reakci bylo potvrzeno, že Orf7 oxiduje i substrát s 3C bočním řetězcem. Oproti tomu neaktivita Orf7 v reakci s tomaymycinem-PPL ukázala, že k oxidaci je nezbytná přítomnost exocyklické dvojně vazby, kterou PPL, na rozdíl od DH-EPL a DH-PPL, neobsahuje.

Na závěr byla otestována možnost *in vivo* přípravy derivátu tomaymycinu. Gen *orf7* byl vnesen do genomu kmene produkujícího tomaymycin. I tento postup vedl k produkci tomaymycinu obsahujícího dvě konjugované dvojně vazby, stejně jako v případě *in vitro* experimentů.

### 4.3 Název práce: *N*-deacetylation in lincosamide biosynthesis is catalyzed by a TldD/PmbA family protein

**Cíle:** Cílem práce bylo zjistit, které proteiny katalyzují klíčovou *N*-deacetylaci derivátu kyseliny merkapturové v biosyntézách linkosamidů, která je nezbytným předpokladem pro pozdější postkondenzační reakce a diverzifikaci linkomycinové a celesticetinové biosyntetické dráhy. Následně byly tyto proteiny dále podrobněji charakterizovány.

**Metody:** Inaktivace genů *lmbIH* a *lmbQ* na chromozómu *S. lincolnensis* i následná komplementace byly provedeny podle protokolu REDIRECT (Gust *et al.*, 2004). Meziprodukty linkomycinové biosyntézy extrahované z kultivačních médií mutovaných kmenů byly detekovány využitím LC-MS. Bodové mutace byly do genů vneseny za použití cílené mutagenese metodou QuikChange (Stratagene). Všechny proteiny v rámci studie byly heterologně produkovány v kmenu *E. coli* BL21 (DE3) *pGroESL* a purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie. Produkty *in vitro* reakcí byly detekovány pomocí LC-MS. K detekci proteinů v purifikovaných vzorcích a k analýze celkového proteomu *S. lincolnensis* byla použita metoda kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem.

**Výsledky:** S cílem odhalit proteiny katalyzující *N*-deacetylaci v biosyntéze linkomycinu byly zkoumány proteiny *LmbIH* a *LmbQ*, patřící do rodiny TldD/PmbA. Nejprve byly připraveny deleční mutanty *S. lincolnensis*  $\Delta$ *lmbIH* a  $\Delta$ *lmbQ*. Na rozdíl od typového kmene docházelo u těchto mutantů k hromadění meziproduktů linkomycinové biosyntézy **6**, **7** a **8** (Kapitola 2.5.4.3; Obrázek 2.17) v kultivačním médiu a k výraznému snížení produkce linkomycinu. Hromadění substrátu *N*-deacetylase (látky **6**) naznačovalo zapojení proteinů *LmbIH* a *LmbQ* v této reakci. Oba proteiny však byly při heterologní expresi nerozpustné za všech testovaných podmínek. Proto byly produkovány jejich homology *CcbIH* a *CcbQ* z biosyntézy celesticetinu. Předpokládaný heterodimer *CcbIH/CcbQ* opravdu katalyzoval *in vitro* *N*-deacetylaci látky **6** za vzniku produktu **7**. Na krátkých peptidových substrátech pak bylo prokázáno, že *CcbIH/CcbQ* má také endopeptidázovou aktivitu, stejně jako ostatní proteiny z TldD/PmbA rodiny.

Stále však zůstalo nejasné, proč se v kultivačních médiích mutovaných kmenů hromadí také produkt *N*-deacetylase, látka **7**. Po prohledání genomu *S. lincolnensis* byly mimo linkomycinový biosyntetický shluk nalezeny dva další geny kódující proteiny z TldD/PmbA rodiny – TldD<sub>lin</sub> a TldE<sub>lin</sub>. Oba proteiny byly produkovány a následně testovány v reakci s látkou **6** i s krátkými peptidovými substráty. Dvojice proteinů TldD<sub>lin</sub>/TldE<sub>lin</sub> katalyzovala štěpení peptidů, ne však *N*-deacetylaci. Enzym odštěpující *N*-acetyl z látky **6** v mutovaných kmenech tak zůstává neznámý.

V poslední části práce bylo zjišťováno, proč není v mutovaných kmenech látka **7** zcela přeměněna na linkomycin a místo toho dochází k jejímu hromadění, stejně jako k hromadění látky **8**. Byl studován možný regulační efekt genů *lmbIH* a/nebo *lmbQ* nebo jimi kódovaných proteinů. Komplementace delecí v mutovaných kmenech *S. lincolnensis* plazmidem nesoucím deletovaný gen vedla k produkčnímu profilu shodnému s typovým kmenem. To vyloučilo možný regulační efekt na úrovni nukleotidové sekvence, která byla v mutovaných kmenech nahrazena. Následně byl analyzován kompletní proteom typového kmene *S. lincolnensis* i mutovaných kmenů  $\Delta lmbQ$  a  $\Delta lmbIH\Delta lmbQ$ . Delece *lmbQ* nebo *lmbQ* a *lmbIH* změnila úroveň exprese mnoha genů uvnitř i vně linkomycinového shluku. U genů kódujících proteiny zodpovědné za biosyntetické kroky následující po *N*-deacetylaci (*LmbJ*, *LmbF* a *LmbG*) však nedošlo k významnému snížení exprese. Na základě těchto výsledků je jedním z možných vysvětlení, že v mutovaných kmenech došlo ke zvýšení exprese genu kódujícího dosud nedetekovaný transportér a linkomycinové meziprodukty jsou exportovány do kultivačního média dříve, než mohou být zpracovány biosyntetickými enzymy.

## 5 Diskuze

Ve své práci jsem se zabýval klíčovými body biosyntéz linkosamidových antibiotik, jejichž studium je, kromě prohloubení znalostí v rámci základního výzkumu, nezbytné také pro případnou přípravu hybridních látek s vyšší aktivitou či pozměněným spektrem účinku.

Prvním studovaným krokem linkosamidových biosyntéz je rozpoznání a aktivace strukturně odlišných aminokyselinových prekurzorů linkomycinu a celesticetinu adenylačnickými doménami LmbC resp. CcbC (Vobruba *et al.*, 2017). Nejprve bylo stanoveno, jak přispívají vybrané aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu LmbC k preferenci speciálního substrátu PPL oproti proteinogennímu L-prolinu, tedy pro posun v substrátové specifitě, k jakému zřejmě došlo v průběhu evoluce. Aminokyselinové zbytky, které se v neribozomálním kódu LmbC odlišují od odpovídajících zbytků neribozomálního kódu CcbC (Kapitola 2.5.4.1, Obrázek 2.14), byly za tyto odpovídající zbytky zaměněny.

Stanovení kinetických parametrů výsledných mutantů v reakcích s PPL i L-prolinem umožnilo rozdělit tyto mutanty do dvou skupin. V první skupině jsou mutanty LmbC I300L a V274C, jejichž kinetické parametry jsou téměř shodné jako u LmbC. Rozdílné aminokyselinové zbytky v těchto pozicích mezi doménami LmbC a CcbC tedy mohou být důsledkem náhodných mutací v evoluční historii LmbC, které měly minimální vliv na preferenci PPL. Podobné případy již byly popsány i dříve, kdy variabilita v jednom či dvou aminokyselinových zbytcích neribozomálního kódu neměla vliv na substrátovou specifitu samostatně stojící adenylačnické domény aktivující L-prolin (Harris *et al.*, 2004; Zhang & Parry, 2007).

Zbývající tři mutace LmbC G308V (publikovaná už v předchozí práci Kadlčík *et al.*, 2013), A207F a L246Y však měly výrazný negativní dopad na afinitu modifikovaných domén LmbC k PPL. Aminokyselinové zbytky v těchto pozicích se tedy v doméně LmbC pravděpodobně významně podílejí na formování vazebné kapsy pro rozměrnější substrát, jakým je PPL. V případě aminokyselinových zbytků G308 a A207 se dá jejich význam vysvětlit za využití homologních modelů vazebných míst domén LmbC a CcbC (Kapitola 2.5.4.1; Obrázek 2.14). Žádný či minimální postranní řetězec těchto aminokyselinových zbytků pravděpodobně přispívají k tvorbě kanálu o správné velikosti a tvaru pro zanoření bočního řetězce PPL. Oproti tomu význam L246, jehož mutace na tyrosin nejen nejvýrazněji snížila afinitu k PPL, ale také zvýšila afinitu k L-prolinu, není z homologních modelů zřejmý. Můžeme pouze spekulovat, že by větší planární postranní řetězec tyrosinu mohl vazebné místo stabilizovat, díky čemuž bude kompaktnější a vhodnější pro vazbu L-prolinu, případně by mohl ovlivňovat hydrofobicitu kanálu ve vazebném místě. Pokud navíc srovnáme neribozomální kódy LmbC a samostatně stojících adenylačnických domén aktivujících L-prolin, tak LmbC je jedinou doménou, která v pozici odpovídající

leucinu 246 neobsahuje tyrosin. To pravděpodobně naznačuje neslučitelnost postranního hydrofilního řetězce tyrosinu s aktivací PPL. Přesný význam aminokyselinového zbytku v pozici 246 však pravděpodobně nemůže být odhalen bez znalosti krystalových struktur proteinů LmbC a CcbC.

Při současné mutaci dvou či tří výše popsaných aminokyselinových zbytků v doméně LmbC (G308, A207, L246) nebyla detekována žádná aktivita v reakci s PPL, pravděpodobně z důvodu kompletního zablokování kanálu ve vazebném místě, což dále potvrzuje význam těchto zbytků. Všechny vícenásobně mutované proteiny ovšem stále aktivovaly L-prolin, ačkoli v některých případech dokonce s horšími kinetickými parametry, než má nemutovaná doména LmbC. Jedním z možných vysvětlení je zhoršení celkové katalytické účinnosti mutované domény způsobené dvěma nebo třemi mutacemi ve vazebném místě.

Po stanovení tří aminokyselinových zbytků klíčových pro aktivaci PPL doménou LmbC jsme využili tyto znalosti k napodobení procesu molekulární evoluce substrátové specifity adenylační domény směrem od L-prolinu k PPL. Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu CcbC, v pozicích odpovídajících těmto třem významným zbytkům, byly za tyto zbytky zaměněny. Cílem tedy bylo změnit substrátovou specifitu adenylační domény CcbC, původně aktivující L-prolin, na PPL.

Všechny mutanty obsahovaly záměnu V306G, která se nachází u vstupu do kanálu ve vazebném místě a postranní řetězec valinu by blokoval zanoření bočního řetězce PPL. Ta byla následně kombinována s mutacemi F205A a/nebo Y244L, které jsou umístěny hlouběji v kanále ve vazebném místě, za vzniku vícenásobných mutantů. U všech mutantů došlo ke snížení afinity k L-prolinu oproti CcbC, což je nezbytným krokem k adaptaci na PPL, protože poté nedochází k nežádoucí aktivaci proteinogenního L-prolinu, volně dostupného v buňkách. Nejzajímavější výsledky však byly dosaženy u trojitě mutované CcbC V306G+F205A+Y244L, která nejenže aktivuje PPL, ale dokonce jej významně preferuje před L-prolinem. Zde je třeba zmínit, že trojitá mutanta má stále 99,4% identitu s doménou CcbC aktivující výhradně L-prolin a pouze 56,2% identitu s doménou LmbC aktivující PPL. Pouhé tři změny ve vazebném místě pro substrát mohou tak být dostatečné k napodobení evoluční adaptace adenylační domény k preferenci stericky odlišné substrátové aminokyseliny. Těmito výsledky také byla alespoň částečně potvrzena platnost publikovaných homologních modelů vazebných míst LmbC a CcbC, na jejichž základě se předpokládalo, že aktivace PPL je umožněna hlavně díky přítomnosti hydrofobního kanálu ve vazebném místě, do kterého se zanořuje boční řetězec substrátové aminokyseliny (Kadlčík *et al.*, 2013). Přítomnost kanálu ve vazebném místě adenylační domény byla popsána také ve studii srovnávající jinou dvojici adenylačních domén lišících se substrátovou specifitou. V biosyntézách makrolaktamových antibiotik incedninu a cremimycinu jsou úvodní  $\beta$ -aminokyseliny vznikajícího řetězce aktivovány samostatně stojícími adenylačními doménami IdnL1 a CmiS6. IdnL1 aktivující 3-aminobutanoát má vazebné místo s mělkým kanálem, kde aminokyselinový zbytek L220 blokuje zanoření delšího řetězce, než je methylová skupina substrátové aminokyseliny.

Oproti tomu doména CmiS6, která aktivuje 3-aminononanovou kyselinu, má v odpovídající pozici G220, což vytváří dostatečně prostorný kanál pro 6C boční řetězec substrátové aminokyseliny (Cieslak *et al.*, 2017). Podobně jako u linkosamidových adenylačních domén je tak i v tomto případě velikost postranního řetězce jednoho aminokyselinového zbytku klíčová pro určení substrátové specifity celé domény.

Trojité mutanta CcbC navíc, podobně jako LmbC, vedle PPL aktivuje i APD s prodlouženým bočním řetězcem – 4C BuPL a 5C PePL. To by teoreticky v budoucnu mohlo umožnit přípravu hybridních linkosamidů s prodlouženým bočním řetězcem pomocí geneticky modifikovaného kmene původně produkujícího celesticetin. Nejprve by byl v genomu producenta celesticetinu nahrazen nemutovaný gen *ccbC* za variantu kódující trojitou mutantu. Následně by byl tento kmen kultivován v médiu s dodanými prekurzory PPL, BuPL nebo PePL za potenciální produkce hybridních linkosamidů – CELINU (již připraveného *in vitro* v práci Kadlčík *et al.*, 2017), ale i jeho derivátů s prodlouženým řetězcem v pozici C-4'. Tyto deriváty by pak mohly mít ještě vyšší biologickou účinnost než CELIN, vzhledem k tomu, že v předchozích experimentech vedla inkorporace BuPL nebo PePL do struktury linkomycinu ke vzniku látek se zvýšenou účinností – 4'-depropyl-4'-butyl-linkomycinu a 4'-depropyl-4'-pentyl-linkomycinu (Ulanová *et al.*, 2010).

Nevýhodou tohoto přístupu je, že kromě posunu substrátové specifity došlo u trojité mutanty CcbC i k výraznému zhoršení celkové katalytické účinnosti oproti CcbC. Nespecifické zhoršení katalytické účinnosti je nicméně častým důsledkem nepřírozených mutací v adenylačních doménách (Cheng-Yu *et al.*, 2009; Villiers & Hollfelder, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Bian *et al.*, 2015). Na rozdíl od substrátové specifity je celková katalytická účinnost více ovlivněna aminokyselinovými zbytky v širším okolí vazebného místa pro substrát (Eppelmann *et al.*, 2002; Sieber & Marahiel, 2005). Jedním z možných vysvětlení nízké katalytické účinnosti trojité mutanty CcbC tedy může být nekompatibilita mezi změněnými aminokyselinovými zbytky a okolím vazebného místa pro substrát.

Tento problém jsme se pokusili vyřešit přípravou chimérického LmbC/CcbC proteinu (obsahuje střední část proteinu LmbC a okrajové části proteinu CcbC) metodou připomínající rekombinaci, mechanismus popsáný v evoluční historii některých adenylačních domén (Fewer *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2009; Höfer *et al.*, 2011; Crüsemann *et al.*, 2013). Ačkoli již byla tato metoda úspěšně využita k přípravě chimérických proteinů z adenylačních domén z biosyntézy hormaomycinu (Crüsemann *et al.*, 2013), v případě chimérického proteinu LmbC/CcbC byl sice připraven protein v rozpustné formě, nicméně neaktivoval v reakci ani PPL ani L-prolin. Možným vysvětlením je, že zatímco v případě hormaomycinové domény byla jako místa fúze zvolena přirozená místa rekombinace v genu kódujícím tuto doménu (Crüsemann *et al.*, 2013), u genů *ccbC* ani *lmbC* evoluce substrátové specifity pomocí rekombinace neproběhla (Kadlčík *et al.*, 2013). U CcbC je tedy vyšší pravděpodobnost, že vybraná místa fúze negativně postihla regiony proteinu nezbytné pro jeho správnou funkci.

Ačkoli byla tato práce první, která studovala evoluční adaptaci substrátové specifity adenylační domény na páru evolučně blízkých, ale substrátovou specifikou odlišných domén, použitá metoda cílené mutagenese neribozomálního kódu již byla využita k modifikacím substrátových specifit mnoha jiných adenylačních domén. Některé z prací vycházejí z analýzy krystalové struktury studované adenylační domény, jako je tomu například u domény ApnA z biosyntézy anabaenopeptinu, u které byly odhaleny tři aminokyselinové zbytky klíčové pro rozpoznání přirozených substrátů argininu a tyrosinu. Mutace těchto zbytků vedly k vytvoření adenylačních domén aktivujících jen jeden ze dvou přirozených substrátů nebo preferujících nepřirozené substráty tryptofan a 4-azidofenylalanin (Kaljunen *et al.*, 2015). Mezi dalšími publikovanými příklady pak najdeme mutaci měnící substrátovou specifikou adenylační domény GrsA<sub>A</sub> z fenylalaninu na aminokyseliny s navázanými azidovými nebo alkynovými skupinami (Kries *et al.*, 2014) a různé mutace posouvající substrátovou specifikou stejné adenylační domény směrem k řadě dalších aminokyselin (leucinu, argininu, glutamátu, lysinu a aspartátu) (Cheng-Yu *et al.*, 2009). V biosyntéze antibiotik závislých na vápníku byla jednou mutací změněna substrátová specifita adenylační domény z (2S,3R)-3-methyl-glutamátu a glutamátu na (2S,3R)-3-methyl-glutamin a glutamin (Thirlway *et al.*, 2012) a jedna až tři mutace jsou nezbytné pro změnu specifity adenylační domény ApsA z aspartátu na asparagin (Eppelmann *et al.*, 2002). Zajímavý je také případ úpravy substrátové specifity adenylační domény Plu3263<sub>A3</sub> z biosyntézy luminimidů, která má rozvolněnou specifikou a aktivuje jeden majoritní (fenylalanin) a čtyři minoritní aminokyselinové substráty. Pouhými dvěma mutacemi byla nicméně zcela zrušena aktivace fenylalaninu za současného zvýšení afinity k některým původně minoritním substrátovým aminokyselinám (Bian *et al.*, 2015). V nedávné době bylo dosaženo i úspěšné změny substrátové specifity domény VinN z  $\alpha$ -aminokyseliny na  $\beta$ -aminokyselinu záměnou tří aminokyselin neribozomálního kódu (Niquille *et al.*, 2018). Celkově jsou tedy mutace neribozomálního kódu adenylačních domén v biosyntézách specializovaných metabolitů nadějným způsobem, jak připravovat zcela nové hybridní látky, a to *in vitro* i *in vivo* (Niquille *et al.*, 2018).

Kromě aktivace PPL linkosamidovými adenylačními doménami jsem se ve své práci podílel na studiu inkorporace APD prekurzorů také do PBD látek (Kameník *et al.*, 2017). Dříve se předpokládalo, že APD prekurzory v biosyntézách PBD vstupují do kondenzace ve své finální či téměř finální podobě, stejně jako je tomu u PPL v biosyntéze linkomycinu. V případě čtyř studovaných PBD s publikovanými biosyntetickými shluky (tomaymycin, sibiromycin, anthramycin a porothramycin; Kapitola 2.5.2.1; Obrázek 2.10) by tak do kondenzace pokaždé vstupoval strukturně jiný APD prekurzor. Při analýze kultivačních médií producentů všech čtyř vybraných PBD však byly detekovány pouze dvě různé APD molekuly – DH-PPL u všech PBD s 3C bočním řetězcem a DH-EPL u tomaymycinu, jediného z vybraných PBD s 2C bočním řetězcem. Bylo však třeba prokázat, zda tyto molekuly opravdu vstupují jako prekurzory do kondenzační reakce.

Z tohoto důvodu byly heterologně produkovány adenylační domény z biosyntéz sibiromycinu (SibD) a porothramycinu (Por21), u kterých se předpokládalo, že aktivují DH-PPL. Šlo by tak o třetí případ experimentálně ověřené aktivace APD prekurzoru adenylační doménou, po PPL aktivovaném LmbC (Kadlčík *et al.*, 2013) a 4-(Z)-propenyl-L-prolinu aktivovaném HrmP3<sub>A</sub> v biosyntéze hormaomycinu (Crüsemann *et al.*, 2013). Dříve již sice byla testována také doména SibD, nicméně byla aktivní jen v reakcích se souborem proteinogenních aminokyselin (Saha & Rokita, 2016). Aktivaci DH-PPL v *in vitro* reakci se SibD nebo Por21 se nicméně nyní nepodařilo prokázat. Výsledek se nezměnil ani v případě produkce a otestování proteinů zahrnujících vždy jak studovanou adenylační doménu, tak i jí odpovídající PCP. Stejně tak nedošlo k aktivaci DH-PPL ani v případě *in vitro* reakce s doménou SibD spolu s jejím dříve publikovaným aktivátorem SibB (Saha & Rokita, 2016).

Přesvědčivý důkaz, že DH-PPL a DH-EPL opravdu vstupují do kondenzační reakce, se podařilo získat až studiem enzymů katalyzujících postkondenzační modifikace APD jednotek vybraných PBD. Enzym, u kterého se předpokládalo, že katalyzuje první z těchto modifikací v biosyntéze anthramycinu, je FAD-závislá oxidoreduktáza Orf7 (Hu *et al.*, 2007). Ta v reakci nekatalyzovala přeměnu samotného DH-PPL. Odlišného výsledku se ovšem dosáhlo při použití kompletní PBD molekuly jako substrátu, konkrétně tomaymycinu, jehož APD jednotka strukturně odpovídá nemodifikovanému DH-EPL (má pouze jednu exocyklickou dvojnou vazbu). Oxidoreduktáza Orf7 katalyzovala vznik druhé dvojně vazby a přesun původní dvojně vazby za vzniku dvou konjugovaných dvojných vazeb v APD jednotce. Analogicky katalyzovala Orf7 vznik druhé dvojně vazby i u derivátu tomaymycinu obsahujícího jako APD jednotku DH-PPL. Diverzifikace APD jednotek v různých PBD je tak skutečně dosaženo až postkondenzačními modifikacemi a do kondenzační reakce vstupuje jeden ze dvou prekurzorů – DH-EPL nebo DH-PPL.

Prezentované výsledky byly i přímo využity, a to při *in vivo* přípravě nových látek. Vnesení genu *orf7* z biosyntetického genového shluku anthramycinu do genomu producenta tomaymycinu vedlo k produkci tomaymycinu se dvěma konjugovanými dvojnými vazbami v APD jednotce. Po přidání DH-PPL do kultivačního média tohoto mutovaného kmene se pak analogicky produkoval derivát tomaymycinu se dvěma dvojnými vazbami, a navíc 3C bočním řetězcem. Širší substrátová specifita enzymu Orf7 tedy posloužila k přípravě nových derivátů tomaymycinu nejen *in vitro*, ale dokonce i *in vivo*, podobně, jako by tomu potenciálně mohlo být v budoucnosti u linkosamidů.

V případě linkosamidových biosyntéz totiž nepatří mezi klíčové body umožňující přípravu nových derivátů jen aktivace strukturně odlišných substrátů adenylačními doménami popsána výše, ale také postkondenzační reakce katalyzované homologními, nicméně funkčně odlišnými enzymy LmbF/CcbF (Kapitola 2.5.4.4, Obrázek 2.19). Již dříve bylo odhaleno, že nezbytnou podmínkou pro průběh těchto reakcí je předchozí *N*-deacetylace derivátu kyseliny merkapturové 6 (Kapitola 2.5.4.3, Obrázek 2.17), která poskytuje volnou primární aminoskupinu (Kameník *et al.*, 2016). Protože ovšem

nebyl znám enzym katalyzující tuto *N*-deacetylaci, věnoval jsem se jejímu studiu v poslední části své práce.

Úspěšná heterologní produkce proteinů CcbIH a CcbQ z biosyntézy celesticetinu a následné *in vitro* reakce, stejně jako delece genů *lmbIH a/nebo lmbQ* v producentovi linkomycinu prokázaly, že je tato *N*-deacetylace katalyzována právě dvojicí proteinů CcbIH/CcbQ v biosyntéze celesticetinu, respektive LmbIH/LmbQ v biosyntéze linkomycinu (Vobruba *et al.*, 2020). Kromě látky **6** byly enzymy CcbIH/CcbQ testovány také v reakci s jejím *N'*-methylovaným derivátem, vznikajícím methylací na dusíku aminokyselinové složky. Tento *N'*-methylovaný derivát ovšem nebyl enzymy CcbIH/CcbQ *N*-deacetylován. Výsledek je tak v souladu s dříve publikovaným pořadím reakcí linkosamidové biosyntézy (Kameník *et al.*, 2016), kdy *N*-deacetylace látky **6** musí předcházet *N'*-methylaci katalyzované enzymem LmbJ nebo CcbJ, jinak dochází ke vzniku *N'*-methylovaného derivátu látky **6**, který již nemůže být dále zpracováván.

Nejprekvapivější však je, že dvojice proteinů CcbIH/CcbQ a LmbIH/LmbQ spadají do rodiny označované TldD/PmbA. Proteiny z této rodiny jsou sice široce rozšířené v rámci prokaryotních organismů, kdy jsou kódovány ve zhruba 60 % bakteriálních a ve většině archeálních genomů (Allali *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2012; Rawlings, 2020), ale jejich funkce je téměř ve všech případech neznámá. Vzhledem k jejich širokému rozšíření je nicméně pravděpodobné, že některé z TldD/PmbA proteinů hrají roli v primárním metabolismu. Tomu nasvědčuje i fakt, že v některých genomech jsou dva páry genů kódujících tyto proteiny. Jeden se nachází v blízkosti genů kódujících proteiny primárního metabolismu a druhý je součástí biosyntetického shluku specializovaného metabolitu, jako je tomu například v genomech producentů linkomycinu i celesticetinu (Koběrská *et al.*, 2008; Janata *et al.*, 2015; Vobruba *et al.*, 2020). Většina z mála dosud charakterizovaných TldD/PmbA proteinů je nicméně součástí biosyntéz RiPPs či jiných specializovaných metabolitů, kde působí jako endopeptidázy (Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016b; Ghilarov *et al.*, 2017; Tsibulskaya *et al.*, 2017; Travin *et al.*, 2018).

Z TldD/PmbA proteinů byla nejlépe strukturně i funkčně charakterizována heterodimerní metalopeptidáza TldD/TldE, kódovaná dvěma homologními geny v genomu bakterie *Escherichia coli* (Ghilarov *et al.*, 2017). Heterodimer TldD/TldE se účastní biosyntézy RiPPs mikrocinu B17 (MccB17), kde po posttranslačním vzniku thiazolových a oxazolových heterocyklů katalyzuje odštěpení *N*-koncového vedoucího peptidu za vzniku funkčního antibiotika. Odštěpení *N*-koncového peptidu je také nezbytné pro export MccB17 z buněk producenta (Ghilarov *et al.*, 2017). V cílových buňkách pak MccB17 ovlivňuje správnou funkci DNA gyrázy, což vede k hromadění dvouvláknových zlomů DNA a smrti buňky (Heddle *et al.*, 2001). S DNA gyrázou je spojena i druhá popsaná funkce proteinů TldD/TldE v *E. coli*. Mutace v genech *tldD* a *tldE* byly detekovány v kmenech rezistentních k CcdB toxinu kódovanému na F-plazmidu jako součást *ccdAB* toxin/antitoxin systému (Murayama *et al.*, 1996). Toxin

CcdB inhibuje funkci DNA gyrázy, čemuž může zabránit vazba antitoxinu CcdA na CcdB (Maki *et al.*, 1992; Bahassi *et al.*, 1999; De Jonge *et al.*, 2009). Proteiny TldD/TldE pravděpodobně ovlivňují stabilitu antitoxinu CcdA, nicméně přesný mechanismus není znám (Allali *et al.*, 2002).

V práci Ghilarov *et al.*, 2017 byla také publikována krystalová struktura heterodimeru TldD/TldE, a to jak samostatně, tak i v komplexech se substráty či inhibitory metalopeptidáz. Katalytická podjednotka TldD obsahuje aktivní místo, do kterého se váže ion kovu (nejčastěji zinek či železo), zatímco ve druhé podjednotce TldE se toto místo nevyskytuje (Ghilarov *et al.*, 2017). Stejně je tomu u dvojic proteinů CcbIH/CcbQ i LmbIH/LmbQ, kde jsou katalytickými podjednotkami CcbIH a LmbIH (Vobruba *et al.*, 2020). Sekvence aminokyselinových zbytků v aktivním místě TldD (HExxxH) je neobvyklá (Ghilarov *et al.*, 2017), ovšem ne zcela unikátní v rámci peptidáz, jelikož byla stejná sekvence popsána v dipeptidylpeptidáze III (Baral *et al.*, 2008) a podobná (HExxH) v thermolysinu a matrixové metaloproteáze (Holden & Matthews, 1988; Cerdà-Costa & Xavier Gomis-Rüth, 2014). Přesto má aktivní místo TldD i celý heterodimer unikátní strukturu, nepodobnou jiným proteinům v databázi (Ghilarov *et al.*, 2017), s výjimkou čtyř struktur homologů TldE, kdy však byla vždy krystalizována jen tato katalyticky neaktivní podjednotka (Rife *et al.*, 2005), zbývající struktury byly zveřejněny pouze v proteinové databance ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) pod kódy 3QTD, 3TV9 a 1VPB. TldD/TldE tak tvoří samostatnou rodinu heterodimerních metalopeptidáz (Rawlings, 2020), ve kterých je katalytický kov koordinován pouze aminokyselinovými zbytky podjednotky TldD, a to dvěma histidiny ze sekvence HExxxH a vzdáleným cysteinem (Ghilarov *et al.*, 2017). Všechny tyto aminokyselinové zbytky jsou však konzervovány i v proteinech CcbIH a LmbIH, přestože katalyzují primárně deacetylaci a ne peptidázovou reakci.

U dalších proteinů z TldD/PmbA rodiny pak byla popsána pouze jejich reakční a substrátová specifita, ovšem není známá krystalová struktura. Velmi podobnou funkci jako v biosyntéze MccB17 mají proteiny z této rodiny v biosyntézách dalších dvou RiPPs. Homology proteinů TldD/TldE katalyzují odštěpení N-koncového peptidu z prekurzoru klebsazolicinu, inhibitoru translace produkovaném v *Klebsiella pneumonia* (Travin *et al.*, 2018), a z prekurzoru peptidu příbuzného mikrocínu C (MccC<sup>Yps</sup>), inhibitoru aminoacyl-tRNA syntetázy produkovaném v *Yersinia pseudotuberculosis* (Tsibulskaya *et al.*, 2017). V obou případech je toto odštěpení N-koncového peptidu nezbytné pro biologickou aktivitu finální látky a pro export z produkční buňky, stejně jako u MccB17 (Tsibulskaya *et al.*, 2017; Travin *et al.*, 2018). Ačkoli není dosud nic známo o regulaci aktivity TldD/TldE proteinů z *E. coli* ani jejich homologů, předpokládá se, že jejich aktivace za specifických podmínek může sloužit k okamžité produkci velkého množství biologicky aktivních látek ze zásob dříve syntetizovaných prekurzorů (Tsibulskaya *et al.*, 2017). Analogicky je i N-deacetylase biologicky neaktivního linkosamidového meziprojektu (Kameník *et al.*, 2016) katalyzovaná proteiny CcbIH/CcbQ nebo LmbIH/LmbQ „únikovou

cestou“ z detoxifikačního módu a „vstupní branou“, umožňující pokračování biosyntézy a následný vznik biologicky aktivního linkomycinu nebo celesticetinu.

Neobvyklý substrát mají proteiny z TldD/PmbA rodiny v biosyntéze kofaktoru pyrroloquinolin quinonu v *Gluconobacter oxydans*, kde štěpí cyklický peptidový intermediát (Wang *et al.*, 2016b). Posledním alespoň částečně charakterizovaným zástupcem této rodiny pak je Sso0660, archeální homolog proteinu TldD kódovaný v genomu *Sulfolobus solfataricus*, u kterého bylo prokázáno, že štěpí běžně testované obecné substráty endopeptidáz, nicméně jeho přirozený substrát je neznámý. Protein Sso0660 je v rámci rodiny TldD/PmbA unikátní svou schopností katalyzovat štěpení i ve formě homodimeru dvou katalyticky aktivních podjednotek, zatímco u všech ostatních proteinů z rodiny je vždy katalyticky aktivní pouze heterodimer (Hu *et al.*, 2012). Je však pravděpodobné, že i tento protein je v buňkách ve formě heterodimeru, protože v genomu *S. solfataricus* je vedle genu *sso0660* gen *sso0661*, kódující druhý protein z TldD/PmbA rodiny, který však pouze nebyl v práci Hu *et al.*, 2012 dostatečně testován.

Vzhledem k reakční specifitě všech ostatních charakterizovaných proteinů z TldD/PmbA rodiny byla u proteinů CcbIH/CcbQ kromě deacetylázové otestována také jejich proteolytická aktivita. Pro reakce byly vybrány obecné substráty peptidáz, využitě v předchozích pracích pro testování jiných proteinů z této rodiny. Ačkoli CcbIH/CcbQ nejsou schopné štěpit azokasein, překvapivě katalyzovaly rozštěpení některých krátkých peptidů, stejně jako dvojice proteinů TldD<sub>lin</sub>/TldE<sub>lin</sub>, kódovaná v genomu *S. lincolnensis* mimo linkomycinový biosyntetický genový shluk i dříve testované proteiny TldD/TldE z *E. coli* (Ghilarov *et al.*, 2017). U proteinů TldD/TldE z *E. coli* se na základě experimentálních dat a krystalové struktury předpokládá, že jsou schopny štěpit pouze peptidové/proteinové substráty zcela bez sekundární struktury nebo ty, které mají na N-konci alespoň 15 aminokyselinových zbytků bez sekundární struktury (za předpokladu, že je ze substrátu odštěpován tripeptid). Ostatní substráty se pravděpodobně nemohou dostat úzkým kanálem k aktivnímu místu heterodimeru (Ghilarov *et al.*, 2017). Vzhledem k tomu, že struktura CcbIH/CcbQ proteinů není známá, lze pouze spekulovat, že i v jejich případě by mohla mít substrátová specifita pro krátké peptidy stejný důvod. Ve výsledku tak lze očekávat, že schopnost štěpit krátké peptidy bude zachována u všech proteinů z TldD/PmbA rodiny nezávisle na jejich primární funkci.

Unikátnosti *N*-deacetylase katalyzované proteiny CcbIH/CcbQ a LmbIH/LmbQ v rámci TldD/PmbA rodiny odpovídají i výsledky analýzy podobnosti sekvencí. V síti tvořené 5000 nejbližšími homology proteinu CcbIH tvoří linkosamidové proteiny samostatný shluk, vzdálený od ostatních proteinů z TldD/PmbA rodiny.

Obecně jsou ovšem deacetylázy běžnými enzymy, účastnicími se mnoha buněčných procesů, jakými jsou například deacetylase histonů (Somoza *et al.*, 2004) nebo syntéza vnější membrány gramnegativních bakterií (Anderson *et al.*, 1993). Kromě těchto případů je ale *N*-deacetylase součástí

například i biosyntézy heparan sulfátu v savčích buňkách (Wei *et al.*, 1993) a biosyntéz mnoha mikrobiálních metabolitů produkovaných převážně aktinobakteriemi. V nich je však vždy acetyl odštěpován z *N*-acetyl-D-glukosaminové skupiny, ať už jde o biosyntézu lipoglykopeptidových antibiotik teikoplaninu a A40926 (Zou, Brunzelle & Nair, 2008; Chan *et al.*, 2011), aminoglykosidového antibiotika neomycinu (Fan *et al.*, 2008), dalšího antibiotika produkovaného bakteriemi rodu *Streptomyces*, streptothricinu (Guo *et al.*, 2015) či nízkomolekulárních thiolů MSH (Maynes *et al.*, 2003) a bacillithiolu (Perera, Newton & Pogliano, 2015).

Vzhledem k tomu, že ve všech těchto reakcích je substrátem aminosacharidová skupina, tak jediný další příklad *N*-deacetylace, kde je acetyl odštěpován z *N*-acetyl-L-cysteinového zbytku, nalezneme v metabolismu savců. Konkrétně jde o reakce katalyzované lidskou aminoacylázou 1 (Uttamsingh, Keller & Anders, 1998; Stocker *et al.*, 2012) a myší aminoacylázou III (Commandeur *et al.*, 1991; Newman *et al.*, 2007). Je zajímavé, že i v tomto případě je *N*-deacetylace spojená s detoxifikačním procesem, stejně jako v biosyntéze linkosamidů (Kapitola 2.5.4.3). Elektrofilní toxiny jako například halogenované alkeny jsou v játrech nebo ledvinách savců nejprve konjugovány s glutathionem (ekvivalentem MSH) a následně převedeny na deriváty kyseliny merkapturové (obsahující *N*-acetyl-L-cysteinový zbytek) (Newman *et al.*, 2007; Stocker *et al.*, 2012). Právě tyto deriváty mohou být buď vyloučeny z těla, nebo *N*-deacetylovány aminoacylázou a opustit tak detoxifikační proces (Anders & Dekant, 1998). Tento proces je analogický k biosyntéze linkosamidů, kde je derivát kyseliny merkapturové (látko 6) také poslední látkou odpovídající meziproductům detoxifikačního systému (Kameník *et al.*, 2016). V savčích buňkách poté může být *N*-deacetylovaný derivát kyseliny merkapturové přeměněn  $\beta$ -lyázou na reaktivní toxický thiol (Stevens, Robbins & Byrd, 1986). I tento krok má svou paralelu v biosyntéze linkomycinu, kde je *N*-deacetylovaný derivát kyseliny merkapturové (látko 7) přeměněn  $\beta$ -eliminací katalyzovanou LmbF na reaktivní thiol, který je ovšem dále *S*-methylován za vzniku linkomycinu (Kameník *et al.*, 2016). Není bez zajímavosti, že jak savčí  $\beta$ -lyázy, tak LmbF patří do skupiny enzymů využívajících jako kofaktor pyridoxal-5'-fosfát (Stevens *et al.*, 1986; Lock, 2010; Kameník *et al.*, 2016). Oproti tomu všechny popsání *N*-deacetylace v savčích buňkách jsou katalyzovány enzymy nepříbuznými s linkosamidovými *N*-deacetylázami.

Inkorporace nových prekurzorů do struktur linkosamidů jsou považovány za jedny z milníků v jejich evoluční historii, ať už jde o nahrazení původního L-prolinu za PPL v případě linkomycinu či připojení salicylátu u celesticetinu. Obě tyto změny vedly k „prodloužení“ základní linkosamidové kostry (odpovídající struktuře Bu-2545) a tím ke zvýšení biologické účinnosti díky lepší vazbě do peptidyltransferázového místa velké ribozomální podjednotky (Magerlein, 1971; Hanada *et al.*, 1980; Schlünzen *et al.*, 2001; Kadlčík *et al.*, 2017; Janata *et al.*, 2018a). Právě z tohoto důvodu je významné studium klíčových reakcí přímo umožňujících inkorporaci těchto prekurzorů nebo nezbytných předcházejících reakcí. A to jak z hlediska pochopení molekulární evoluce těchto unikátních

specializovaných metabolitů, ale také z důvodů potenciální přípravy účinnějších hybridních linkosamidů *in vivo*, bez nutnosti nákladné chemické syntézy.

## 6 Seznam literatury

- Aharonowitz, Y. & Cohen, G. (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 461–495.
- Allali, N., Afif, H., Couturier, M. & Melderer, L. Van. (2002). The highly conserved TldD and TldE proteins of *Escherichia coli* are involved in microcin B17 processing and in CcdA degradation. *J. Bacteriol.* **184**, 3224–3231.
- Anders, M.W. & Dekant, W. (1998). Glutathione-dependent bioactivation of haloalkenes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 501–537.
- Anderson, M.S., Bull, G., Galloway, S.M., Kelly, M., Mohan, S. & Radikag, K. (1993). UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19858–19865.
- Ángel Rubio, M., Barrado, P., Carlos Espinosa, J., Jiménez, A. & Lobato, M.F. (2004). The *pur6* gene of the puromycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces alboniger* encodes a tyrosinyl-aminonucleoside synthetase. *FEBS Lett.* **577**, 371–375.
- Argoudelis, A.D., Coats, J.H. & Johnson, L.E. (1974). Directed biosynthesis of new celestosaminide-antibiotics by *Streptomyces caelestis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **27**, 738–743.
- Bagley, M.C., Dale, J.W., Merritt, E.A. & Xiong, X. (2005). Thiopeptide antibiotics. *Chem. Rev.* **105**, 685–714.
- Bahassi, E.M., O’Dea, M.H., Allali, N., Messens, J., Gellert, M. & Couturier, M. (1999). Interactions of CcdB with DNA Gyrase. *J. Biol. Chem.* **274**, 10936–10944.
- Baltz, R.H. (2011). Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1747–1760.
- Baltz, R.H. (2014). MbtH homology codes to identify gifted microbes for genome mining. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 357–369.
- Baral, P.K., Jajčanin-Jozić, N., Deller, S., Macheroux, P., Abramić, M. & Gruber, K. (2008). The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 22316–22324.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **65**, 385–395.
- Bergy, M. & Herr, R. (1963). Antibiotic lincolnensis and method of production. United States patent 3086912.
- Bian, X., Plaza, A., Yan, F., Zhang, Y. & Müller, R. (2015). Rational and efficient site-directed mutagenesis of adenylation domain alters relative yields of luminide derivatives in vivo. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1343–1353.
- De Boer, C. & Dietz, A. (1960). Celesticetin, its salts and method of preparation. United States patent 2928844.
- Boll, B. & Heide, L. (2013). A domain of RubC1 of rubradirin biosynthesis can functionally replace MbtH-like proteins in tyrosine adenylation. *ChemBioChem* **14**, 43–44.
- Bosello, M., Zeyadi, M., Kraas, F.I., Linne, U., Xie, X. & Marahiel, M.A. (2013). Structural characterization of the heterobactin siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and elucidation of their biosynthetic machinery. *J. Nat. Prod.* **76**, 2282–2290.
- Le Bouter, A., Leclercq, R. & Cattoir, V. (2011). Molecular basis of resistance to macrolides; lincosamides and streptogramins in clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 118–123.
- Brook, I. (2016). Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **22**, 1–13.
- Brown, E.D. & Wright, G.D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* **529**, 336–343.
- Cane, D.E. & Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 319–325.
- Cerdà-Costa, N. & Xavier Gomis-Rüth, F. (2014). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci.* **23**, 123–144.

- Challis, G.L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **6**, 601–611.
- Challis, G.L., Ravel, J. & Townsend, C. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211–224.
- Chan, C.X., Beiko, R.G., Darling, A.E. & Ragan, M. (2009). Lateral transfer of genes and gene fragments in prokaryotes. *Genome Biol. Evol.* **1**, 429–438.
- Chan, H.C., Huang, Y.T., Lyu, S.Y., Huang, C.J., Li, Y.S., Liu, Y.C., Chou, C.C., Tsai, M.D. & Li, T.L. (2011). Regioselective deacetylation based on teicoplanin-complexed Orf2\* crystal structures. *Mol. Biosyst.* **7**, 1224–1231.
- Chang, Z., Ansbacher, T., Zhang, L., Yang, Y., Ko, T.P., Zhang, G., Liu, W., Huang, J.W., Dai, L., Guo, R.T., Major, D.T. & Chen, C.C. (2019). Crystal structure of LepI, a multifunctional SAM-dependent enzyme which catalyzes pericyclic reactions in leporin biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 2070–2076.
- Cheng-Yu, C., Ivelin, G., Anderson, A.C. & Donald, B.R. (2009). Computational structure-based redesign of enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3764–3769.
- Chevrette, M.G. & Currie, C.R. (2019). Emerging evolutionary paradigms in antibiotic discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 257–271.
- Cieslak, J., Miyanaga, A., Takaku, R., Takaishi, M., Amagai, K., Kudo, F. & Eguchi, T. (2017). Biochemical characterization and structural insight into aliphatic  $\beta$ -amino acid adenylation enzymes IdnL1 and CmiS6. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **85**, 1238–1247.
- Colabroy, K.L., Hackett, W.T., Markham, A.J., Rosenberg, J., Cohen, D.E. & Jacobson, A. (2008). Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **479**, 131–138.
- Colabroy, K.L., Horwitz, A.D., Basciano, V.R., Fu, Y., Travitz, K.M., Robinson, M.K., Shimanski, B.A. & Hoffmann, T.W. (2019). A new way of belonging: active-site investigation of L-DOPA dioxygenase, a VOC family enzyme from lincomycin biosynthesis. *Biochemistry* **58**, 4794–4798.
- Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Wijngaard, J. & Vermeulen, N.P.E. (1991). Metabolism of L-cysteine S-conjugates and N-(trideuteroacetyl)-L-cysteine S-conjugates of four fluoroethylenes in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 31–38.
- Conti, E., Franks, N.P. & Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a super-family of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287–298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. & Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J.* **16**, 4174–4183.
- Crüseman, M., Kohlhaas, C. & Piel, J. (2013). Evolution-guided engineering of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Sci.* **4**, 1041–1045.
- Davidson, J.M., Bartley, D.M. & Townsend, C.A. (2013). Non-ribosomal propeptide precursor in nocardicin A biosynthesis predicted from adenylation domain specificity dependent on the MbtH family protein Nocl. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1749–1759.
- Drake, E.J., Cao, J., Qu, J., Shah, M.B., Straubinger, R.M. & Gulick, A.M. (2007). The 1.8 Å crystal structure of PA2412, an MbtH-like protein from the pyoverdine cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **282**, 20425–20434.
- Drake, E.J., Miller, B.R., Shi, C., Tarrasch, J.T., Sundlov, J.A., Leigh Allen, C., Skiniotis, G., Aldrich, C.C. & Gulick, A.M. (2016). Structures of two distinct conformations of holo-non-ribosomal peptide synthetases. *Nature* **529**, 235–238.
- Du, L., He, Y. & Luo, Y. (2008). Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. *Biochemistry* **47**, 11473–11480.
- Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S. & Cate, J.H.D. (2010). Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17152–17157.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**, 9718–9726.

- Essig, A., Hofmann, D., Münch, D., Gayathri, S., Künzler, M., Kallio, P.T., Sahl, H.G., Wider, G., Schneider, T. & Aebi, M. (2014). Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *J. Biol. Chem.* **289**, 34953–34964.
- Evans, B.S., Chen, Y., Metcalf, W.W., Zhao, H. & Kelleher, N.L. (2011). Directed evolution of the nonribosomal peptide synthetase AdmK generates new andrimid derivatives *in vivo*. *Chem. Biol.* **18**, 601–607.
- Fan, Q., Huang, F., Leadlay, P.F. & Spencer, J.B. (2008). The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: genetic and biochemical evidence for the roles of two glycosyltransferases and a deacetylase. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 3306–3314.
- Felnagle, E.A., Barkei, J.J., Park, H., Podevels, A.M., McMahon, M.D., Drott, D.W. & Thomas, M.G. (2010). MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **49**, 8815–8817.
- Ferir, G., Petrova, M.I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., Snoeck, R., Vanderleyden, J., Balzarini, J., Bartoschek, S., Brönstrup, M., Süßmuth, R.D. & Schols, D. (2013). The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications. *PLoS One* **8**, e64010.
- Fewer, D.P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H. & Sivonen, K. (2007). Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evol. Biol.* **7**, 183.
- Fichera, M.E. & Roos, D.S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390**, 407–409.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 3468–3496.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**, 1089–1093.
- Francklyn, C.S. (2008). DNA polymerases and aminoacyl-tRNA synthetases: shared mechanisms for ensuring the fidelity of gene expression. *Biochemistry* **47**, 11695–11703.
- Garneau, S., Dorrestein, P.C., Kelleher, N.L. & Walsh, C.T. (2005). Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis. *Biochemistry* **44**, 2770–2780.
- Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R. & Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**, 1853–1862.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A. & Walsh, C.T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **36**, 8495–8503.
- Genghof, D.S. & Vandamme, O. (1964). Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J. Bacteriol.* **87**, 852–862.
- Ghilarov, D., Serebryakova, M., Stevenson, C., Hearnshaw, S., Volkov, D., Maxwell, A., Lawson, D. & Severinov, K. (2017). The origins of specificity in the microcin-processing protease TldD/E. *Structure* **25**, 1549–1561.
- Gonsior, M., Mühlenweg, A., Tietzmann, M., Rausch, S., Poch, A. & Süßmuth, R.D. (2015). Biosynthesis of the peptide antibiotic feglymycin by a linear nonribosomal peptide synthetase mechanism. *ChemBioChem* **16**, 2610–2614.
- Grammel, N., Pankevych, K., Demydchuk, J., Lambrecht, K., Saluz, H.-P. & Krügel, H. (2002). A  $\beta$ -lysine adenylation enzyme and a  $\beta$ -lysine binding protein involved in poly  $\beta$ -lysine chain assembly in nourseothricin synthesis in *Streptomyces noursei*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 347–357.
- Gulick, A.M. (2009). Conformational dynamics in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* **4**, 811–827.
- Gulick, A.M., Lu, X. & Dunaway-Mariano, D. (2004). Crystal structure of 4-chlorobenzoate:CoA ligase/synthetase in the unliganded and aryl substrate-bound states. *Biochemistry* **43**, 8670–8679.
- Guo, Z., Li, J., Qin, H., Wang, M., Lv, X., Li, X. & Chen, Y. (2015). Biosynthesis of the carbamoylated D-gulosamine moiety of streptothricins: involvement of a guanidino-N-glycosyltransferase and an

- N*-acetyl-D-glucosamine deacetylase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 5175–5178.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C. & Chater, K. (2004).  $\lambda$  red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 107–128.
- Hanada, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Tsukiura, H. & Kawaguchi, H. (1980). Antibiotic Bu-2545, a new member of the celesticetin-lincomycin class. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **33**, 751–753.
- Harris, A.K.P., Williamson, N.R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H.T., Leeper, F.J. & Salmond, G.P.C. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* **150**, 3547–3560.
- Havarstein, L.S., Diep, D.B. & Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**, 229–240.
- Heddle, J.G., Blance, S.J., Zamble, D.B., Hollfelder, F., Miller, D.A., Wentzell, L.M., Walsh, C.T. & Maxwell, A. (2001). The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* **307**, 1223–1234.
- Herbst, D.A., Boll, B., Zocher, G., Stehle, T. & Heide, L. (2013). Structural basis of the interaction of MbtH-like proteins, putative regulators of nonribosomal peptide biosynthesis, with adenylating enzymes. *J. Biol. Chem.* **288**, 1991–2003.
- Hiratsuka, T., Koketsu, K., Minami, A., Kaneko, S., Yamazaki, C., Watanabe, K., Oguri, H. & Oikawa, H. (2013). Core assembly mechanism of quinocarcin/SF-1739: bimodular complex nonribosomal peptide synthetases for sequential mannich-type reactions. *Chem. Biol.* **20**, 1523–1535.
- Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A. & Piel, J. (2011). Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem. Biol.* **18**, 381–391.
- Holden, H.M. & Matthews, B.W. (1988). The binding of L-valyl-L-tryptophan to crystalline thermolysin illustrates the mode of interaction of a product of peptide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **263**, 3256–3260.
- Hu, Y., Peng, N., Han, W., Mei, Y., Chen, Z., Feng, X., Liang, Y.X. & She, Q. (2012). An archaeal protein evolutionarily conserved in prokaryotes is a zinc-dependent metalloprotease. *Biosci. Rep.* **32**, 609–618.
- Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C.M., Zazopoulos, E. & Bachmann, B.O. (2007). Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem. Biol.* **14**, 691–701.
- Hur, G.H., Vickery, C.R. & Burkart, M.D. (2012). Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1074–1098.
- Igarashi, N., Harada, J., Nagashima, S., Matsuura, K., Shimada, K. & Nagashima, K. V. (2001). Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J. Mol. Evol.* **52**, 333–341.
- Imker, H.J., Krahn, D., Clerc, J., Kaiser, M. & Walsh, C.T. (2010). *N*-acylation during glidobactin biosynthesis by the tridomain nonribosomal peptide synthetase module G1bF. *Chem. Biol.* **17**, 1077–1083.
- Ishida, K., Welker, M., Christiansen, G., Cadel-Six, S., Bouchier, C., Dittmann, E., Hertweck, C. & De Marsac, N.T. (2009). Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2017–2026.
- Iwasaki, H., Horii, S., Asai, M., Mizuno, K., Miyake, A. & Ueyanagi, J. (1973). Enduracidin, a new antibiotic. VIII. Structures of enduracidins A and B. *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 1184–1191.
- Janata, J., Kadlčík, S., Koběřská, M., Ulanová, D., Kameník, Z., Novák, P., Kopecký, J., Novotná, J., Radojevic, B., Plháčková, K., Gažák, R. & Najmanová, L. (2015). Lincosamide synthetase - a unique condensation system combining elements of nonribosomal peptide synthetase and mycothiol metabolism. *PLoS One* **10**, 118850.
- Janata, J., Kameník, Z., Gažák, R., Kadlčík, S. & Najmanová, L. (2018a). Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products. *Nat. Prod. Rep.* **35**, 257–289.
- Janata, J., Kameník, Z., Kadlčík, S., Najmanová, L. & Gažák, R. (2018b). Lincosamide derivatives,

- preparation and use thereof as antimicrobial agent. Patent WO/2018/161979.
- Jirásková, P., Gažák, R., Kameník, Z., Steiningrová, L., Najmanová, L., Kadlčík, S., Novotná, J., Kuzma, M. & Janata, J. (2016). New concept of the biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin, hormaomycin, and pyrrolobenzodiazepines: could a  $\gamma$ -glutamyltransferase cleave the C–C bond? *Front. Microbiol.* **7**, 276.
- Jogl, G. & Tong, L. (2004). Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* **43**, 1425–1431.
- De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H. & Loris, R. (2009). Rejuvenation of CcdB-poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Mol. Cell* **35**, 154–163.
- Jothivasan, V.K. & Hamilton, C.J. (2008). Mycothiol: synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 1091–1117.
- Kadlčík, S., Kameník, Z., Vašek, D., Nedvěd, M. & Janata, J. (2017). Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics. *Chem. Sci.* **8**, 3349–3355.
- Kadlčík, S., Kučera, T., Chalupská, D., Gažák, R., Koběrská, M., Ulanová, D., Kopecký, J., Kutějová, E., Najmanová, L. & Janata, J. (2013). Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLoS One* **8**, 84902.
- Kalb, D., Lackner, G., Rappe, M. & Hoffmeister, D. (2015). Activity of  $\alpha$ -amino adipate reductase depends on the N-terminally extending domain. *ChemBioChem* **16**, 1426–1430.
- Kaljunen, H., Schiefelbein, S.H.H., Stummer, D., Kozak, S., Meijers, R., Christiansen, G. & Rentmeister, A. (2015). Structural elucidation of the bispecificity of A domains as a basis for activating non-natural amino acids. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 8833–8836.
- Kameník, Z., Gažák, R., Kadlčík, S., Steiningrová, L., Rynd, V. & Janata, J. (2018). C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation. *Nat. Commun.* **9**, 3167.
- Kameník, Z., Kadlčík, S., Gažák, R., Vobruba, S., Palánová, L., Kuzma, M. & Janata, J. (2017). Diversity of alkylproline moieties in pyrrolobenzodiazepines arises from postcondensation modifications of a unified building block. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1993–1998.
- Kameník, Z., Kadlčík, S., Radojevic, B., Jirásková, P., Kuzma, M., Gažák, R., Najmanová, L., Kopecký, J. & Janata, J. (2016). Deacetylation of mycothiol-derived ‘waste product’ triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics. *Chem. Sci.* **7**, 430–435.
- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T. & Keating, A.E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 522–526.
- Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. & Marahiel, M.A. (2004). The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J. Biol. Chem.* **279**, 7413–7419.
- Khayatt, B.I., Overmars, L., Siezen, R.J. & Francke, C. (2013). Classification of the adenylation and acyl-transferase activity of NRPS and PKS systems using ensembles of substrate specific hidden Markov models. *PLoS One* **8**, e62136.
- Kleinkauf, H., Gevers, W. & Lipmann, F. (1969). Interrelation between activation and polymerization in gramicidin S biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **62**, 226–233.
- Knerr, P.J. & van der Donk, W.A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 479–505.
- Koběrská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelínková, M., Ulanová, D., Man, P., Fliieger, M. & Janata, J. (2008). Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol.* **53**, 395–401.
- Kochan, G., Pilka, E.S., von Delft, F., Oppermann, U. & Yue, W.W. (2009). Structural snapshots for the conformation-dependent catalysis by human medium-chain acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A. *J. Mol. Biol.* **388**, 997–1008.
- Koehnke, J., Mann, G., Bent, A.F., Ludewig, H., Shirran, S., Botting, C., Lebl, T., Housen, W.E., Jaspars,

- M. & Naismith, J.H. (2015). Structural analysis of leader peptide binding enables leader-free cyanobactin processing. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 558–563.
- Kopp, M., Irschik, H., Gemperlein, K., Buntin, K., Meiser, P., Weissman, K.J., Bode, H.B. & Müller, R. (2011). Insights into the complex biosynthesis of the leupyrrins in *Sorangium cellulosum* So ce690. *Mol. Biosyst.* **7**, 1549–1563.
- Kries, H., Niquille, D.L. & Hilvert, D. (2015). A subdomain swap strategy for reengineering nonribosomal peptides. *Chem. Biol.* **22**, 640–648.
- Kries, H., Wachtel, R., Pabst, A., Wanner, B., Niquille, D. & Hilvert, D. (2014). Reprogramming nonribosomal peptide synthetases for “clickable” amino acids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 10105–10108.
- Kudo, F., Miyana, A. & Eguchi, T. (2018). Structural basis of the nonribosomal codes for nonproteinogenic amino acid selective adenylation enzymes in the biosynthesis of natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 515–536.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Gumpenberger, M. & Fastner, J. (2005). Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology* **151**, 1525–1533.
- Laer, K., Hamilton, C.J. & Messens, J. (2013). Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange. *Antioxidants Redox Signal.* **18**, 1642–1653.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J. & Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521–555.
- Lee, S.G. & Lipmann, F. (1977). Isolation of amino acid activating subunit-pantetheine protein complexes: their role in chain elongation in tyrocidine synthesis. *Biochemistry* **74**, 2343–2347.
- Lee, T.V., Johnson, L.J., Johnson, R.D., Koulman, A., Lane, G. a., Lott, J.S. & Arcus, V.L. (2010). Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 2415–2427.
- Lee, T.V., Johnson, R.D., Arcus, V.L. & Lott, J.S. (2015). Prediction of the substrate for nonribosomal peptide synthetase (NRPS) adenylation domains by virtual screening. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 2052–2066.
- Li, W., Chou, S., Khullar, A. & Gerratana, B. (2009a). Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2958–2963.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A. & Gerratana, B. (2009b). Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2869–2878.
- Li, Y. & Wang, G. (2016). Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 932–940.
- Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. & Walsh, C.T. (1996). From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science.* **274**, 1188–1193.
- Lin, C.I., Sasaki, E., Zhong, A. & Liu, H. (2014). *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.* **136**, 906–909.
- Lin, C.Y., Pang, A.P., Zhang, Y., Qiao, J. & Zhao, G.R. (2020). Comparative transcriptomic analysis reveals the significant pleiotropic regulatory effects of LmbU on lincomycin biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* **19**, 30.
- Lin, D.Y.W., Huang, S. & Chen, J. (2015). Crystal structures of a polypeptide processing and secretion transporter. *Nature* **523**, 425–430.
- Lock, E.A. (2010). Renal Xenobiotic Metabolism. V *Comprehensive Toxicology, Second Edition*, 55–79. Elsevier Inc.
- Magerlein, B.J. (1971). Modification of lincomycin. *Adv. Appl. Microbiol.* **14**, 185–229.
- Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T. & Horiuchi, T. (1992). Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 12244–12251.
- Martens, E. & Demain, A.L. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J. Antibiot. (Tokyo).* **70**, 520–526.

- Maruyama, C., Toyoda, J., Kato, Y., Izumikawa, M., Takagi, M., Shin-ya, K., Katano, H., Utagawa, T. & Hamano, Y. (2012). A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 791–797.
- Matzov, D., Eyal, Z., Benhamou, R.I., Shalev-Benami, M., Halfon, Y., Krupkin, M., Zimmerman, E., Rozenberg, H., Bashan, A., Fridman, M. & Yonath, A. (2017). Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10284–10292.
- Maynes, J.T., Garen, C., Cherney, M.M., Newton, G., Arad, D., Av-Gay, Y., Fahey, R.C. & James, M.N.G. (2003). The crystal structure of 1-D-myo-inosityl 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside deacetylase (MshB) from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a zinc hydrolase with a lactate dehydrogenase fold. *J. Biol. Chem.* **278**, 47166–47170.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 285–308.
- McIntosh, J.A., Donia, M.S. & Schmidt, E.W. (2009). Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 537–559.
- McIntosh, J.A. & Schmidt, E.W. (2010). Marine molecular machines: heterocyclization in cyanobactin biosynthesis. *ChemBioChem* **11**, 1413–1421.
- McMahon, M.D., Rush, J.S. & Thomas, M.G. (2012). Analyses of MbtB, MbtE, and MbtF suggest revisions to the mycobactin biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **194**, 2809–2818.
- Méjean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D. & Ploux, O. (2010). *In vitro* reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: From free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. *Biochemistry* **49**, 103–113.
- Melby, J.O., Nard, N.J. & Mitchell, D.A. (2011). Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 369–378.
- Meyer, S., Kehr, J.C., Mainz, A., Dehm, D., Petras, D., Süßmuth, R.D. & Dittmann, E. (2016). Biochemical dissection of the natural diversification of microcystin provides lessons for synthetic biology of NRPS. *Cell Chem. Biol.* **23**, 462–471.
- Miller, B.R., Drake, E.J., Shi, C., Aldrich, C.C. & Gulick, A.M. (2016). Structures of a nonribosomal peptide synthetase module bound to MbtH-like proteins support a highly dynamic domain architecture. *J. Biol. Chem.* **291**, 22559–22571.
- Miller, B.R., Sundlov, J.A., Drake, E.J., Makin, T.A. & Gulick, A.M. (2014). Analysis of the linker region joining the adenylation and carrier protein domains of the modular nonribosomal peptide synthetases. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 2691–2702.
- Miyana, A., Cieslak, J., Shinohara, Y., Kudo, F. & Eguchi, T. (2014). The crystal structure of the adenylation enzyme VinN reveals a unique  $\beta$ -amino acid recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **289**, 31448–31457.
- Mohr, K.I., Volz, C., Jansen, R., Wray, V., Hoffmann, J., Bernecker, S., Wink, J., Gerth, K., Stadler, M. & Müller, R. (2015). Pinensins: the first antifungal lantibiotics. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 11254–11258.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **3**, 490–504.
- Mori, S., Pang, A.H., Lundy, T.A., Garzan, A., Tsodikov, O. V. & Garneau-Tsodikova, S. (2018). Structural basis for backbone N-methylation by an interrupted adenylation domain. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 428–430.
- Mukherjee, S., Seshadri, R., Varghese, N.J., Eloie-Fadrosh, E.A., Meier-Kolthoff, J.P., G?ker, M., Coates, R.C., Hadjithomas, M., Pavlopoulos, G.A., Paez-Espino, D., Yoshikuni, Y., Visel, A., Whitman, W.B., Garrity, G.M., Eisen, J.A., Hugenholtz, P., Pati, A., Ivanova, N.N., Woyke, T., Klenk, H.-P. & Kyrpides, N.C. (2017). 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life. *Nat. Biotechnol.* **35**, 676–683.
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Mainz, A., Hertlein, G., Heid, N.C., Mösker, E., Van Den Elst, H., Overkleeft, H.S., Genersch, E. & Süßmuth, R.D. (2014). Paenilamicin: structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus*

- larvae. Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 10821–10825.
- Murayama, N., Shimizu, H., Takiguchi, S., Baba, Y., Amino, H., Horiuchi, T., Sekimizu, K. & Miki, T. (1996). Evidence for involvement of *Escherichia coli* genes *pmbA*, *csrA* and a previously unrecognized gene *tldD*, in the control of DNA gyrase by *letD* (*ccdB*) of sex factor F. *J. Mol. Biol.* **256**, 483–502.
- Myers, A. & Mitcheltree, M. (2019). Lincosamide antibiotics and their uses thereof. Patent WO/2019/032956.
- Najmanová, L., Kutějová, E., Kadlec, J., Polan, M., Olšovská, J., Benada, O., Novotná, J., Kameník, Z., Halada, P., Bauer, J. & Janata, J. (2013). Characterization of *N*-demethylincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ. *ChemBioChem* **14**, 2259–2262.
- Najmanová, L., Ulanová, D., Jelínková, M., Kameník, Z., Kettnerová, E., Koběrská, M., Gažák, R., Radojevic, B. & Janata, J. (2014). Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiol. (Praha)*. **59**, 543–552.
- Newman, D., Abuladze, N., Scholz, K., Dekant, W., Tsuprun, V., Ryazantsev, S., Bondar, G., Sassani, P., Kurtz, I. & Pushkin, A. (2007). Specificity of aminoacylase III-mediated deacetylation of mercapturic acids. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 43–50.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661.
- Newton, G.L., Arnold, K., Price, M.S., Sherrill, C., Delcardayre, S.B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R.C. & Davis, C. (1996). Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.* **178**, 1990–1995.
- Newton, G.L., Buchmeier, N. & Fahey, R.C. (2008). Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 471–494.
- Niquille, D.L., Hansen, D.A., Mori, T., Fercher, D., Kries, H. & Hilvert, D. (2018). Nonribosomal biosynthesis of backbone-modified peptides. *Nat. Chem.* **10**, 282–287.
- Novotná, J., Honzátko, A., Bednář, P., Kopecký, J., Janata, J. & Spížek, J. (2004). L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3678–3683.
- Novotná, J., Olšovská, J., Novák, P., Mojzes, P., Chaloupková, R., Kameník, Z., Spížek, J., Kutějová, E., Marečková, M., Tichý, P., Damborský, J. & Janata, J. (2013). Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS One* **8**, 6–15.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Rev. Antimicrob. Resist.* 1–84.
- Ortega, M.A. & Van Der Donk, W.A. (2016). New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chem. Biol.* **23**, 31–44.
- Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.* **26**, 449–457.
- Pakarian, P. & Pawelek, P.D. (2016). Intracellular co-localization of the *Escherichia coli* enterobactin biosynthetic enzymes EntA, EntB, and EntE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 25–32.
- Pang, A.P., Du, L., Lin, C.Y. & Qiao, J. (2015). 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*. *J. Appl. Microbiol.* **119**, 1064–1074.
- Pavlíková, M., Kameník, Z., Janata, J., Kadlčík, S., Kuzma, M. & Najmanová, L. (2018). Novel pathway of 3-hydroxyanthranilic acid formation in limazepine biosynthesis reveals evolutionary relation between phenazines and pyrrolbenzodiazepines. *Sci. Rep.* **8**, 7810.
- Perera, V.R., Newton, G.L. & Pogliano, K. (2015). Bacillithiol: a key protective thiol in *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 1089–1107.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z. & Piepersberg, W. (1995). Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* **16**, 1137–1156.
- Pickens, L.B., Tang, Y. & Chooi, Y.-H. (2011). Metabolic engineering for the production of natural products. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**, 211–236.

- Prunier, A.L., Malbruny, B., Tandé, D., Picard, B. & Leclercq, R. (2002). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3054–3056.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. & Huson, D.H. (2005). Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res.* **33**, 5799–5808.
- Rawlings, N.D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1868**, 140345.
- Reger, A.S., Wu, R., Dunaway-Mariano, D. & Gulick, A.M. (2008). Structural characterization of a 140° domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-chlorobenzoate:CoA ligase. *Biochemistry* **47**, 8016–8025.
- Reimer, J.M., Aloise, M.N., Harrison, P.M. & Martin Schmeing, T. (2016). Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase. *Nature* **529**, 239–242.
- Rife, C., Schwarzenbacher, R., McMullan, D., Abdubek, P., Ambing, E., Axelrod, H., Biorac, T., Canaves, J.M., Chiu, H.J., Deacon, A.M., DiDonato, M., Elsliger, M.A., Godzik, A., Grittini, C., Grzechnik, S.K., Hale, J., Hampton, E., Han, G.W., Haugen, J., Hornsby, M., Jaroszewski, L., Klock, H.E., Koesema, E., Kreuzsch, A., Kuhn, P., Lesley, S.A., Miller, M.D., Moy, K., Nigoghossian, E., Paulsen, J., Quijano, K., Reyes, R., Sims, E., Spraggon, G., Stevens, R.C., Van Den Bedem, H., Velasquez, J., Vincent, J., White, A., Wolf, G., Xu, Q., Hodgson, K.O., Wooley, J. & Wilson, I.A. (2005). Crystal structure of a putative modulator of DNA gyrase (pmbA) from *Thermotoga maritima* at 1.95 Å resolution reveals a new fold. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **61**, 444–448.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Jones, C.E., Ratyal, A.H., Miller, Y.W., Vyakrnam, S. & Cunliffe, W.J. (1997). Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1162–1165.
- Röttig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011). NRPSpredictor2 – a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 362–367.
- Saha, S. & Rokita, S.E. (2016). An activator of an adenylation domain revealed by activity but not sequence homology. *Eur. J. Chem. Biol.* **17**, 1818–1823.
- Salwan, R. & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiol. Res.* **231**, 126374.
- Sareen, D., Steffek, M., Newton, G.L. & Fahey, R.C. (2002). ATP-dependent L-cysteine:1D-*myo*-inosityl 2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside ligase, mycothiol biosynthesis enzyme MshC, is related to class I cysteinyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **41**, 6885–6890.
- Sasaki, E., Lin, C.I., Lin, K.Y. & Liu, H.W. (2012). Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17432–17435.
- Scaglione, A., Fullone, M.R., Montemiglio, L.C., Parisi, G., Zamparelli, C., Vallone, B., Savino, C. & Grgurina, I. (2017). Structure of the adenylation domain Thr1 involved in the biosynthesis of 4-chlorothreonine in *Streptomyces* sp. OH-5093 – protein flexibility and molecular bases of substrate specificity. *FEBS J.* **284**, 2981–2999.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. & Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**, 814–821.
- Sieber, S.A. & Marahiel, M.A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* **105**, 715–738.
- Sivonen, K., Leikoski, N., Fewer, D.P. & Jokela, J. (2010). Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1213–1225.
- Skinninger, M.A., Dejong, C.A., Rees, P.N., Johnston, C.W., Li, H., Webster, A.L.H., Wyatt, M.A. & Magarvey, N.A. (2015). Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Res.* **43**, 9645–9662.
- Somoza, J., Skene, R., Katz, B., Mol, C., Ho, J., Jennings, A., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J., Chi, E., Tang,

- J., Sang, B.C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E., Dougan, D., Snell, G., Navre, M., Knuth, M., Swanson, R., McRee, D. & Tari, L. (2004). Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* **12**, 1325–1334.
- Sprenger, M. & Fukuda, K. (2016). New mechanisms, new worries. *Science* **351**, 1263–1264.
- Stachelhaus, T., Mootz, D. & Marahiel, A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493–505.
- Steiningerová, L., Kameník, Z., Gažák, R., Kadlčík, S., Bashiri, G., Man, P., Kuzma, M., Pavlíková, M. & Janata, J. (2020). Different reaction specificities of F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-dependent reductases facilitate pyrrolobenzodiazepines and lincomycin to fit their biological targets. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 3440–3448.
- Stevens, J.L., Robbins, J.D. & Byrd, R.A. (1986). A purified cysteine conjugate β-lyase from rat kidney cytosol. *J. Biol. Chem.* **261**, 15529–15537.
- Stocker, P., Brunel, J.M., De Rezende, L., Do Amaral, A.T., Morelli, X., Roche, P., Vidal, N., Giardina, T. & Perrier, J. (2012). Aminoacylase 1-catalysed deacetylation of bioactives epoxides mycotoxin-derived mercapturates; 3,4-epoxyprococenes as models of cytotoxic epoxides. *Biochimie* **94**, 1668–1675.
- Süssmuth, R.D. & Mainz, A. (2017). Nonribosomal peptide synthesis—principles and prospects. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 3770–3821.
- Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.O. & Marahiel, M.A. (2008). Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* **321**, 659–663.
- Tatham, E., Sundaram Chavadi, S., Mohandas, P., Edupuganti, U.R., Angala, S.K., Chatterjee, D. & Quadri, L.E.N. (2012). Production of mycobacterial cell wall glycopeptidolipids requires a member of the MbtH-like protein family. *BMC Microbiol.* **12**, 118.
- Thibodeaux, C.J., Melançon, C.E. & Liu, H.W. (2008). Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 9814–9859.
- Thirlway, J., Lewis, R., Nunns, L., Al Nakeeb, M., Styles, M., Struck, A.W., Smith, C.P. & Micklefield, J. (2012). Introduction of a non-natural amino acid into a nonribosomal peptide antibiotic by modification of adenylation domain specificity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 7181–7184.
- Thomas, M.G., Burkart, M.D. & Walsh, C.T. (2002). Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chem. Biol.* **9**, 171–184.
- Toda, S., Nakagawa, S., Naito, T. & Kawaguchi, H. (1981). Structure of antibiotic Bu-2545, a new member of the celesticetin-lincomycin class. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **34**, 596–599.
- Travin, D., Metelev, M., Serebryakova, M., Komarova, E., Osterman, I., Ghilarov, D. & Severinov, K. (2018). Biosynthesis of translation inhibitor klebsazolicin proceeds through heterocyclization and N-terminal amidine formation catalyzed by a single YcaO enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 5625–5633.
- Tsibulskaya, D., Mokina, O., Kulikovskiy, A., Piskunova, J., Severinov, K., Serebryakova, M. & Dubiley, S. (2017). The product of *Yersinia pseudotuberculosis* mcc operon is a peptide-cytidine antibiotic activated inside producing cells by the TldD/E protease. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16178–16187.
- Ulanová, D., Novotná, J., Smutná, Y., Kameník, Z., Gažák, R., Šulc, M., Sedmera, P., Kadlčík, S., Plháčková, K. & Janata, J. (2010). Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 927–930.
- Ushimaru, R., Lin, C., Sasaki, E. & Liu, H. (2016). Characterization of enzymes catalyzing transformations of cysteine S-conjugated intermediates in the lincosamide biosynthetic pathway. *ChemBioChem* **17**, 1606–1611.
- Uttamsingh, V., Keller, D. & Anders, M. (1998). Acylase I-catalyzed deacetylation of N-acetyl-L-cysteine and S-alkyl-N-acetyl-L-cysteines. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 800–809.
- Van De Vijver, P., Vondenhoff, G.H.M., Kazakov, T.S., Semenova, E., Kuznedelov, K., Metlitskaya, A., Van Aerschot, A. & Severinov, K. (2009). Synthetic microcin C analogs targeting different aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Bacteriol.* **191**, 6273–6280.
- Villiers, B. & Hollfelder, F. (2011). Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Biol.* **18**, 1290–1299.

- Vobruba, S., Kadlčík, S., Gažák, R. & Janata, J. (2017). Evolution-guided adaptation of an adenylation domain substrate specificity to an unusual amino acid. *PLoS One* **12**, e0189684.
- Vobruba, S., Kameník, Z., Kadlčík, S. & Janata, J. (2020). *N*-deacetylation in lincosamide biosynthesis is catalyzed by a TldD/PmbA family protein. *ACS Chem. Biol.* **15**, 2048–2054.
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A. & Patel, H.M. (2001). Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 525–534.
- Walsh, C.T. & Fischbach, M. a. (2010). Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2469–2493.
- Wang, H., Fewer, D.P., Holm, L., Rouhiainen, L. & Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9259–9264.
- Wang, M., Zhao, Q. & Liu, W. (2015). The versatile low-molecular-weight thiols: beyond cell protection. *BioEssays* **37**, 1262–1267.
- Wang, M., Zhao, Q., Zhang, Q. & Liu, W. (2016a). Differences in PLP-dependent cysteinyl processing lead to diverse *S*-functionalization of lincosamide antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 6348–6351.
- Wang, P., Xia, Y., Li, J., Kang, Z., Zhou, J. & Chen, J. (2016b). Overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes affects L-sorbose production in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Biochem. Eng. J.* **112**, 70–77.
- Wang, S.-A., Lin, C.I., Zhang, J., Ushimaru, R., Sasaki, E. & Liu, H. (2020). Studies of lincosamide formation complete the biosynthetic pathway for lincomycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 24794–24801.
- Watts, K.T., Mijts, B.N. & Schmidt-Dannert, C. (2005). Current and emerging approaches for natural product biosynthesis in microbial cells. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 927–940.
- Wei, Z., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Orellana, A. & Hirschberg, C.B. (1993). A single protein catalyzes both *N*-deacetylation and *N*-sulfation during the biosynthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3885–3888.
- Wilson, D.N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 35–48.
- Witz, D.F., Hessler, E.J. & Miller, T.L. (1971). Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* **10**, 1128–1133.
- Wolpert, M., Gust, B., Kammerer, B. & Heide, L. (2007). Effects of deletions of *mbtH*-like genes on clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **153**, 1413–1423.
- World Health Organization. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*.
- World Health Organization. (2019). *No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections*.
- Wright, G.D. (2017). Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* **34**, 694–701.
- Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M. a. & Stubbs, M.T. (2008). Crystal structure of DltA: implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J. Biol. Chem.* **283**, 32484–32491.
- Zhang, K., Nelson, K.M., Bhuripanyo, K., Grimes, K.D., Zhao, B., Aldrich, C.C. & Yin, J. (2013). Engineering the substrate specificity of the DhbE adenylation domain by yeast cell surface display. *Chem. Biol.* **20**, 92–101.
- Zhang, X. & Parry, R.J. (2007). Cloning and characterization of the pyrrolomycin biosynthetic gene clusters from *Actinosporangium vitaminophilum* ATCC 31673 and *Streptomyces* sp. strain UC 11065. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 946–957.
- Zhao, Q., Wang, M., Xu, D., Zhang, Q. & Liu, W. (2015). Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature* **518**, 115–119.
- Zheng, Q., Wang, Q., Wang, S., Wu, J., Gao, Q. & Liu, W. (2015). Thiopeptide antibiotics exhibit a dual mode of action against intracellular pathogens by affecting both host and microbe. *Chem. Biol.* **22**, 1002–1007.
- Zhong, G., Chen, H. & Liu, W. (2018). Reply to ‘C–C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline

- precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation.' *Nat. Commun.* **9**, 3168.
- Zhong, G., Zhao, Q., Zhang, Q. & Liu, W. (2017). 4-alkyl-L-(dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage. *Nat. Commun.* **8**, 16109.
- Zolova, O.E. & Garneau-Tsodikova, S. (2014). KtzJ-dependent serine activation and O-methylation by KtzH for kutznerides biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **67**, 59–64.
- Zou, Y., Brunzelle, J.S. & Nair, S.K. (2008). Crystal structures of lipoglycopeptide antibiotic deacetylases: implications for the biosynthesis of A40926 and teicoplanin. *Chem. Biol.* **15**, 533–545.

## 7 Přílohy

### Seznam publikací:

1. Vobruba, Š., Kadlčík, S., Gažák R., Janata, J. (2017). Evolution-guided adaptation of an adenylation domain substrate specificity to an unusual amino acid. *PLoS One*, 12, e0189684.
2. Kameník, Z., Kadlčík, S., Gažák, R., Vobruba, Š., Palánová, L., Kuzma, M., Janata, J. (2017). Diversity of alkylproline moieties in pyrrolbenzodiazepines arises from postcondensation modifications of a unified building block. *ACS Chem. Biol.*, 12, 1993–1998.
3. Vobruba, Š., Kameník, Z., Kadlčík, S., Janata, J. (2020). *N*-deacetylation in lincosamide biosynthesis is catalyzed by a TldD/PmbA family protein. *ACS Chem. Biol.*, 15, 2048–2054.