

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

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Lucie Steiningerová**

Funkce proteinu LmbW v biosyntéze antibiotika linkomycinu

Function of LmbW protein in biosynthesis of antibiotic lincomycin

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 30. 04. 2015

.....  
Lucie Steiningerová

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především svému školiteli Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za to, že mi umožnil vypracovat svoji diplomovou práci v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu, za odborné vedení práce, cenné rady a připomínky. Velké poděkování také patří Mgr. Petře Jiráskové, za ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu nejen práce v laboratoři věnovala a Mgr. Zdeňku Kameníkovi, PhD., který mi umožnil vhlédnout do světa vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Poděkování patří i všem ostatním členům naší laboratoře, kteří po celou dobu vytvářeli příjemné pracovní prostředí.

Poděkování jistě patří i mé rodině, která mě po celou dobu studia velmi podporovala.

Tato práce vznikala v letech 2013 – 2015 v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i. a byla finančně podporována z grantu OPVK (registrační číslo CZ.1.07/2.3.00/20.0055). Za finanční podpory „Nadace Českého literárního fondu“ a „Nadání Josefa, Marie a Zdenky Hlávkových“ mi bylo umožněno zúčastnit se a získat nové poznatky na vědecké konferenci „International Symposium on the Biology of *Actinomycetes*, Turecko 2014“.

## Abstrakt

4-Alkyl-L-prolinové deriváty (APD) jsou specializované prekurzory, které jsou zabudovány do struktur nejméně tří skupin jinak zcela odlišných látek: některých pyrrolo-1,4-benzodiazepinů, látek s protinádorovou aktivitou, bakteriálního hormonu hormaomycinu a linkomycinu, klinicky používaného linkosamidového antibiotika. Tyto látky sdílejí biosyntetickou dráhu, která je kódovaná 5 či 6 homologními geny nalezenými v biosyntetických genových shlucích producentů těchto látek. Podobnosti biosyntézy a zároveň rozdílnosti struktur jejich APD by mohly být využity k přípravě hybridního producenta biologicky účinnějšího derivátu linkomycinu. APD prekurzorem linkomycinu je neobvyklá aminokyselina 4-propyl-L-prolin (PPL). Původní představa biosyntetické dráhy PPL není zcela v souladu s dosavadními poznatky, bylo tedy nutné ji revidovat. První dva kroky PPL dráhy jsou funkčně prokázány, prokázání následujícího kroku bylo cílem této práce.

Protein LmbW byl nadprodukován a *in vitro* testováním byla potvrzena jeho methyltransferasová aktivita, která odpovídá jeho sekvenční analýze. LmbW je schopný methylovat přímo meziproduct druhého kroku biosyntetické dráhy, zatímco dosavadní koncept PPL dráhy předpokládal methylaci až v pozdější fázi biosyntézy. Zajímavé je zjištění, že LmbW je schopný ke svému substrátu připojit i delší alkylový řetězec. Rozšířené substrátové specifity LmbW by mohlo být využito v mutasyntéze biologicky účinnějšího derivátu linkomycinu.

## Klíčová slova

linkomycin, pyrrolo-1,4-benzodiazepiny, hormaomycin, biosyntéza linkomycinu, 4-propyl-L-prolin, LmbW, methyltransferasa závislá na S-adenosyl-L-methioninu

## Abstract

4-Alkyl-L-proline derivatives (APD) are specialized precursors involved in the biosynthesis of at least three groups of different natural compounds: some pyrrolo-1,4-benzodiazepines with antitumor activity, bacterial hormone hormaomycin and clinically used lincosamide antibiotic lincomycin. These compounds share a biosynthetic pathway encoded by 5 or 6 homologous genes present in the biosynthetic gene clusters of the producing organisms. Similarities in biosynthesis and differences between APD structures of these compounds could be used to prepare a hybrid producing strain of biologically more effective lincomycin derivative. Unusual amino acid 4-propyl-L-proline (PPL) is the APD precursor of lincomycin. The originally proposed scheme of the PPL pathway does not comply with our current knowledge. Therefore, it was necessary to revise this scheme according to new results. The first two steps of the PPL pathway are functionally proved. Probing the next step was the main aim of this work.

The protein LmbW was overproduced and its methyltransferase activity was confirmed *in vitro*. LmbW is able to directly methylate intermediate of second step of the pathway while the originally scheme proposed methylation at a later stage of biosynthesis. LmbW is also able to attach a longer alkyl chain to its substrate. This finding could be utilize in preparation of biologically more active lincomycin derivatives.

## Keywords

lincomycin, pyrrolo-1,4-benzodiazepines, hormaomycin, biosynthesis of lincomycin, 4-propyl-L-proline, LmbW, S-adenosyl-L-methionine dependent methyltransferase

# Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Definice rodu <i>Streptomyces</i>	12
2.1.1 Srovnávací genomové analýzy vybraných zástupců streptomycet	12
2.2 Biosyntéza sekundárních metabolitů	13
2.3 Evoluce biosyntetických genových shluků sekundárních metabolitů	14
2.4 Linkosamidy	18
2.4.1 Struktura linkosamidů a její vliv na biologickou aktivitu	18
2.4.2 Další látky inkorporující do své struktury APD vznikající z L-tyrosinu	19
2.4.3 Genetická analýza linkomycinového genového shluku	22
2.5 Biosyntéza linkomycinu	23
2.5.1 Biosyntéza PPL	26
2.5.2 LmbW jako možný kandidát katalyzující třetí krok PPL dráhy	30
3 CÍLE PRÁCE	36
4 MATERIÁL A METODY	37
4.1 Materiál	37
4.1.1 Bakteriální kmeny a vektory	37
4.1.2 Kultivační média a půdy	38
4.1.3 Roztoky a pufry	39
4.1.4 Enzymy, oligonukleotidy, zásobní roztoky antibiotik	40
4.1.5 Chemikálie	41
4.1.6 Výpočetní technika – software a aplikace	42
4.2 Metody	43
4.2.1 Kultivace bakterií	43
4.2.2 Příprava kompetentních buněk pro transformace	43
4.2.3 Stanovení koncentrace DNA či proteinů v malém objemu	43
4.2.4 Transformace <i>E. coli</i> cizorodou DNA metodou tepelného šoku	44
4.2.5 Preparace DNA z většího objemu (100 ml)	44
4.2.6 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	45
4.2.7 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu	46
4.2.8 Vyříznutí fragmentu DNA z agarosového gelu	46
4.2.9 TA klonování	47
4.2.10 Preparace plazmidové DNA alkalickou lyzí – „hrubý miniprep“	48
4.2.11 Preparace plazmidové DNA – metoda vazby na aktivované sklo	48
4.2.12 Sekvenování úseku DNA	48

4.2.13	Štěpení DNA restrikčními enzymy a defosforylace štěpených konců .....	49
4.2.14	Ligace fragmentu DNA do vektoru pET-42b(+) .....	49
4.2.15	Produkce rekombinantního proteinu LmbW .....	49
4.2.16	Dezintegrace buněk sonikací .....	50
4.2.17	Purifikace proteinu metaloafinitní chromatografií .....	50
4.2.18	Dialýza .....	51
4.2.19	Kvalitativní zjištění přítomnosti proteinů ve vzorku pomocí Ponceau S .....	51
4.2.20	SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu) .....	51
4.2.21	BN-PAGE (modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza).....	52
4.2.22	Ultrafiltrace .....	53
4.2.23	Testování enzymové aktivity proteinu LmbW .....	54
4.2.24	Chemická syntéza analogů SAM.....	54
4.2.25	Vyhodnocování vznikajících produktů pomocí UHPLC-UV-MS.....	55
5	VÝSLEDKY .....	57
5.1	Zjednodušené schéma experimentu .....	57
5.2	Příprava expresního vektoru .....	58
5.2.1	Amplifikace genu <i>lmbW</i> .....	58
5.2.2	Vložení genu <i>lmbW</i> do vektoru pGEM-T Easy .....	58
5.2.3	Vložení genu <i>lmbW</i> do expresního vektoru pET-42b(+).....	59
5.3	Heterologní produkce proteinu LmbW .....	59
5.4	Purifikace proteinu LmbW.....	61
5.4.1	Určení kvartérní struktury proteinu LmbW .....	61
5.4.2	Testování stability proteinu LmbW .....	62
5.5	Testování enzymové aktivity proteinu LmbW.....	64
5.5.1	Stanovení enzymové aktivity proteinu LmbW .....	64
5.5.2	Optimalizace podmínek pro aktivitu proteinu LmbW .....	70
5.5.3	Schopnost proteinu LmbW katalyzovat připojení alternativního alkylu .....	71
6	DISKUZE.....	75
7	SOUHRN.....	81
8	SEZNAM LITERATURY .....	82

## Seznam použitých zkratek

APD	4-alkyl-L-prolinový derivát/4-alkyl-L-prolinové deriváty
AU	jednotka vyjadřující absorbanci vztaženou k relativnímu množství látky
BN-PAGE	modrá nativní (blue native) polyakrylamidová elektroforéza
bp	base pair (páry bazí)
<i>ccb</i>	gen pro biosyntézu celesticetinu
Da	jednotka molekulové hmotnosti, [dalton]
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
EGT	ergothionein
EPL	4-ethyl-L-prolin
g	tíhové zrychlení
<i>hrm</i>	gen pro biosyntézu hormaomycinu
<i>lmb</i>	gen pro biosyntézu linkomycinu
MSH	mykothiol
MT	methyltransferasa
OD	optická denzita
<i>orf</i>	gen pro biosyntézu anthramycinu
PBD	pyrrolo-1,4-benzodiazepiny
PCR	polymerasová řetězová reakce
<i>por</i>	gen pro biosyntézu porothramycinu
PPL	4-propyl-L-prolin
RT	pokožová teplota (room temperature)
SA-analog	analog S-adenosyl-L-methioninu
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SAM-MT	methyltransferasa závislá na S-adenosyl-L-methioninu
SDS	sodium dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová elektroforéza
<i>sib</i>	gen pro biosyntézu sibiromycinu
<i>tom</i>	gen pro biosyntézu tomaymycinu
UHPLC-UV-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance chromatography) spojená s UV detekcí a hmotností spektrometrií (MS)

Další používané zkratky jsou definovány v kapitole 4. MATERIÁL A METODY.

# 1 ÚVOD

„Sekundární metabolit“ je termín, jenž je v literatuře bohatě a často skloňován. Práce zabývající se těmito nízkomolekulárními produkty bakterií se pokoušejí objasnit původ těchto látek, jejich funkci v produkujícím organismu či například jejich biosyntézu. Sekundární metabolity bakterií jsou látky vyznačující se biologickou aktivitou. Mívají antibakteriální, antivirové, protinádorové, antiparazitické či také například imunosupresivní vlastnosti. Mikrobiální sekundární metabolity nabízejí obrovský potenciál pro vývoj nových, lékařsky využitelných látek a jejich studium je proto velmi důležité.

Přírodní produkty mikroorganismů mají dlouhou historii. I přesto, že se vědecké poznatky týkající se těchto látek začaly shromažďovat teprve asi tak před sto lety, prakticky byly tyto substance běžně aplikovány dávno předtím. V posledních letech se začíná hovořit o antibiotické krizi spojené s narůstající rezistencí patogenních bakterií a také s ekonomickými problémy (Demain & Sanchez 2009; Rossolini et al. 2014). Tradiční postupy při objevování nových látek jsou zdoluhavé a pracné. Výzkum se dnes zaměřuje nejen na zlepšování a optimalizaci metod využívaných při objevování nových látek, ale velký potenciál nabízejí také DNA sekvence přístupné ve veřejných databázích (Zerikly & Challis 2009). Za pomoci výpočetní techniky lze tyto sekvence srovnávat a cíleně hledat „zajímavé“ úseky genomu. Jinou možností je příprava účinnějších derivátů biologicky aktivních látek. Zajímavá je především myšlenka, kdy by nová antibiotika mohla vznikat tzv. kombinatorní biosyntézou. Podstatou je přenos biosyntetických genů mezi různými druhy bakterií, které antibiotika produkují. Tímto se získá geneticky hybridní bakterie, která ve svém genomu obsahuje jeden či více genů z odlišného organismu a produkuje tak nový, biosynteticky příbuzný metabolit. Tyto metabolity jsou pak nazývány hybridními látkami. Biosyntetické geny byly za pomoci metod genomového inženýrství již přenášeny například v rámci rodu *Streptomyces* (Hopwood et al. 1985). Dalším příkladem je úspěšná příprava hybridních makrolidových antibiotik (Sakai et al. 2012).

Podobný záměr, tedy příprava hybridního antibiotika, je dlouhodobým cílem laboratoře, ve které byla tato diplomová práce vypracovávána. Prvním důležitým krokem je objasnění biosyntézy 4-propyl-L-prolinu, aminokyselinového prekuzoru antibiotika linkomycinu. Homology genů kódujících biosyntézu 4-propyl-L-prolinu byly nalezeny v dalších dvou skupinách jinak zcela odlišných látek – u některých pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (Hu et al. 2007; Li et al. 2009a; Li et al. 2009b; Najmanová et al. 2014)

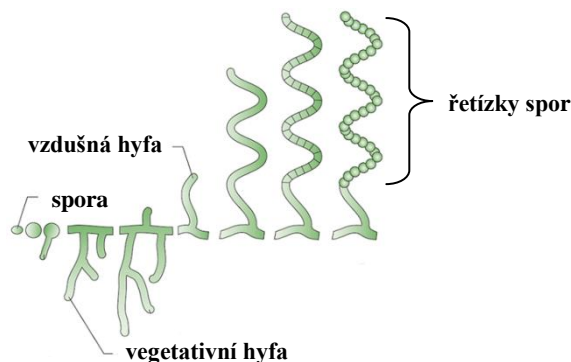
a hormaomycinu (Höfer et al. 2011). Přenos genů z biosyntetických genových shluků producentů zmíněných látek do biosyntetického genového shluku producenta linkomycinu by mohl vést k přípravě hybridního producenta linkomycinu se zvýšenou biologickou aktivitou. Detailní znalost genetického základu a samotné biosyntetické dráhy 4-propyl-L-prolinu je tedy základním předpokladem pro přípravu takovéto látky.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Definice rodu *Streptomyces*

Streptomycety jsou Gram-pozitivní aerobní členové řádu *Actinomycetales*, třídy *Actinobacteria*. Jsou to myceliální saprofytické půdní bakterie podstupující komplexní morfologickou diferenciaci (Obr. 2.1; Waksman & Henrici 1943; Flärdh & Buttner 2009). Půda je nutričně, fyzikálně a biologicky velmi náročné prostředí. Hlavní zdroj živin v půdě představují látky rostlinného původu. Streptomycety se vyznačují schopností využít tyto zdroje tvorbou specializovaných enzymů, čímž si zajišťují významné postavení v koloběhu uhlíku (Bentley et al. 2002).

To, že jsou streptomycety stále tak atraktivní v oblasti výzkumu, je zejména díky jejich schopnosti produkovat zajímavé sekundární metabolity, které jsou využitelné jak v klinické a veterinární praxi, tak třeba i v zemědělství a dalších odvětvích průmyslu (Demain 1999).



Obr. 2.1: Životní cyklus modelové streptomycety *Streptomyces coelicolor*. Klíčení spory dává vzniknout vegetativním hyfám. Vyčerpání živin a další faktory jsou signálem pro diferenciaci vegetativních hyf na hyfy vzdušné, které se dále diferencují v řetězce spor. Velké dormantní spory se mohou uvolnit a šířit se do okolí. V případě, že naleznou vhodné podmínky pro růst, vyklíčí. Hyfy jsou uspořádány do větších celků – mycelií. Převzato a upraveno z Flärdh & Buttner (2009).

#### 2.1.1 Srovnávací genomové analýzy vybraných zástupců streptomycet

Streptomycety vlastní velké lineární genomy s vysokým obsahem GC párů bází. Geneticky nejprozkoumanějším zástupcem rodu *Streptomyces* je *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Hopwood 1999). Genom *Streptomyces coelicolor* A3(2) je ve srovnání s genomy

známých modelových organizmů jako *Escherichia coli* (Blattner et al. 1997) nebo *Bacillus subtilis* (Kunst et al. 1997) asi dvakrát větší (8 667 507 bp; Bentley et al. 2002).

Dalšími zástupci rodu *Streptomyces*, jejichž genom je již plně znám, je například *Streptomyces avermitilis* (Ikeda et al. 2003), producent avermektinů, skupiny antiparazitických látek, či *Streptomyces griseus* (Ohnishi et al. 2008), producent streptomycinu, aminoglykosidového antibiotika s antituberkulózními účinky. Genomy těchto tří streptomycet ukazují pozoruhodné homologie ve vnitřní konzervované části chromozomů, jejíž součástí jsou esenciální geny (Ikeda et al. 2003; Ohnishi et al. 2008). Tyto vnitřní úseky tvoří jakýsi základ chromozomů streptomycet a mají zřejmě stejný původ. Telomerické oblasti jsou naopak vysoce variabilní a obsahují geny „postradatelné“, jako např. geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů. Je zřejmé, že právě takové uspořádání genů v genomu streptomycet hraje významnou roli v evoluci jejich sekundárních metabolitů.

## 2.2 Biosyntéza sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity bakterií jsou chemicky velmi různorodé a často strukturně zajímavé látky, které se účastní obrany buňky, signalizace v ekologických interakcích či například poskytují produkujícímu organismu konkurenční výhodu (Yim et al. 2007). Biosyntéza sekundárního metabolitu je několikastupňový proces (Drew & Demain 1978). Většinou vychází z všeobecně přítomných prekurzorů v buňce (často acetyl koenzym A, aminokyseliny, šikimová kyselina), z nichž jsou syntetizovány specifické stavební bloky konkrétního metabolitu. Ty jsou nakonec spojeny a formují konečný produkt.

Geny kódující biosyntetickou dráhu určitého sekundárního metabolitu jsou v mikrobiálním genomu téměř vždy lokalizovány společně, v tzv. shluku genů. Ve shluku jsou obvykle přítomny i geny rezistence, transportéry a regulační elementy (Hopwood 1988). Exprese těchto genů je typicky pod environmentální i vývojovou kontrolou a je zprostředkována komplexními regulačními kaskádami. Produkce sekundárních metabolitů obvykle souvisí s nutriční limitací, která nastává ve stacionární fázi. Již samotné snížení růstové rychlosti, ne-li zastavení růstu, je důležitým signálem pro spuštění exprese (shrnutí v Bibb 2005).

## **2.3 Evoluce biosyntetických genových shluků sekundárních metabolitů**

Sekvenování DNA je velmi užitečný nástroj pro studium evoluce. Srovnávání sekvencí jednotlivých genů z různých organismů mění naše chápání toho, jak se vyvíjejí nejen jednotlivé geny ale i geny, které jsou součástí větší funkční skupiny, jako je například biosyntetický genový shluk.

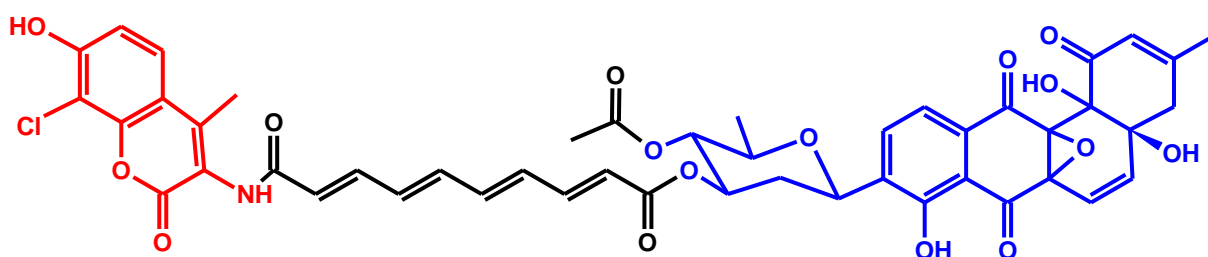
Při detailnějším pohledu na strom života prokaryot lze skrze obrovskou diverzitu biosyntetických genových shluků odhadovat, že tyto shluky jsou velmi rychle se vyvíjejícími genomovými entitami (Cimermancic et al. 2014). Navíc mají fenotyp – malou molekulu, která může být lehce izolována, strukturně analyzována a biologicky testována. Pro studium evoluce jsou tedy ideální (Fischbach et al. 2008). Četnost evolučních událostí v genových shlucích sekundárního metabolismu je v porovnání s genovými shluky primárního metabolismu mnohem větší (Cimermancic et al. 2014). Evoluční změny v biosyntetických genových shlucích mohou probíhat buď na úrovni změny sekvence genu (např. mutacemi genů) či na úrovni změny počtu genů (dochází k získkům/ztrátám určitých genů; Fischbach et al. 2008). Události, které vedou v biosyntetickém genovém shluku ke změnám v počtu genů, jsou zprostředkovávány horizontálním přenosem genů, díky kterému je možné přenášet i více genů najednou či celou nezávislou funkční jednotku (např. genový „podshluk“, viz dále). Výjimečně vysoká je ale také četnost inzercí, delecí, duplikací či genomových přestaveb (Medema et al. 2014). V průběhu evoluce tak mohou vznikat nové, chemicky i biologicky zajímavé molekuly.

### **2.3.1.1 „Komplexní“ metabolity skládané ze sdílených stavebních bloků – jedna z možností evoluce**

Geny kódující určitou funkční část metabolitu (stavební blok) jsou v biosyntetickém genovém shluku často uspořádány do menší, samostatné jednotky – „podshluku“. Kombinováním různých podshluků mohou vznikat nové shluky kódující biosyntézu nových „komplexních“ látek (Fischbach et al. 2008; Medema et al. 2014). V takovémto shluku jsou pak kromě genů kódujících klíčové stavební bloky důležité i geny kódující funkce spojování jednotlivých bloků, transport metabolitu či regulaci. Evoluční původ těchto individuálních genů je nejasný (Fischbach et al. 2008). Během evoluce se mohou různé podshluky běžně objevovat v nepříbuzných biosyntetických genových shlucích a zároveň, jeden biosyntetický

genový shluk může zahrnovat více nepříbuzných podshluků. Podshluky nejsou stálé, dochází v nich ke změnám, jež se poté odráží v odpovídající části chemické struktury metabolitu. Genové podshluky jsou zřejmě nezávislé evoluční entity (Medema et al. 2014). Další stupněm v evoluci je pak slučování několika genových shluků do formy tzv. „supershluků“.

Získávání funkčně odlišných genetických elementů hraje například významnou roli v evoluci glykopeptidových genových shluků (Donadio et al. 2005). Dalším příkladem může být komplexní molekula antibiotika simocyklinonu (Obr. 2.2; Fischbach 2009). Zajímavé je také využití prolinu a jeho derivátů jako stavebního bloku různých metabolitů, čemuž se věnuje následující kapitola.



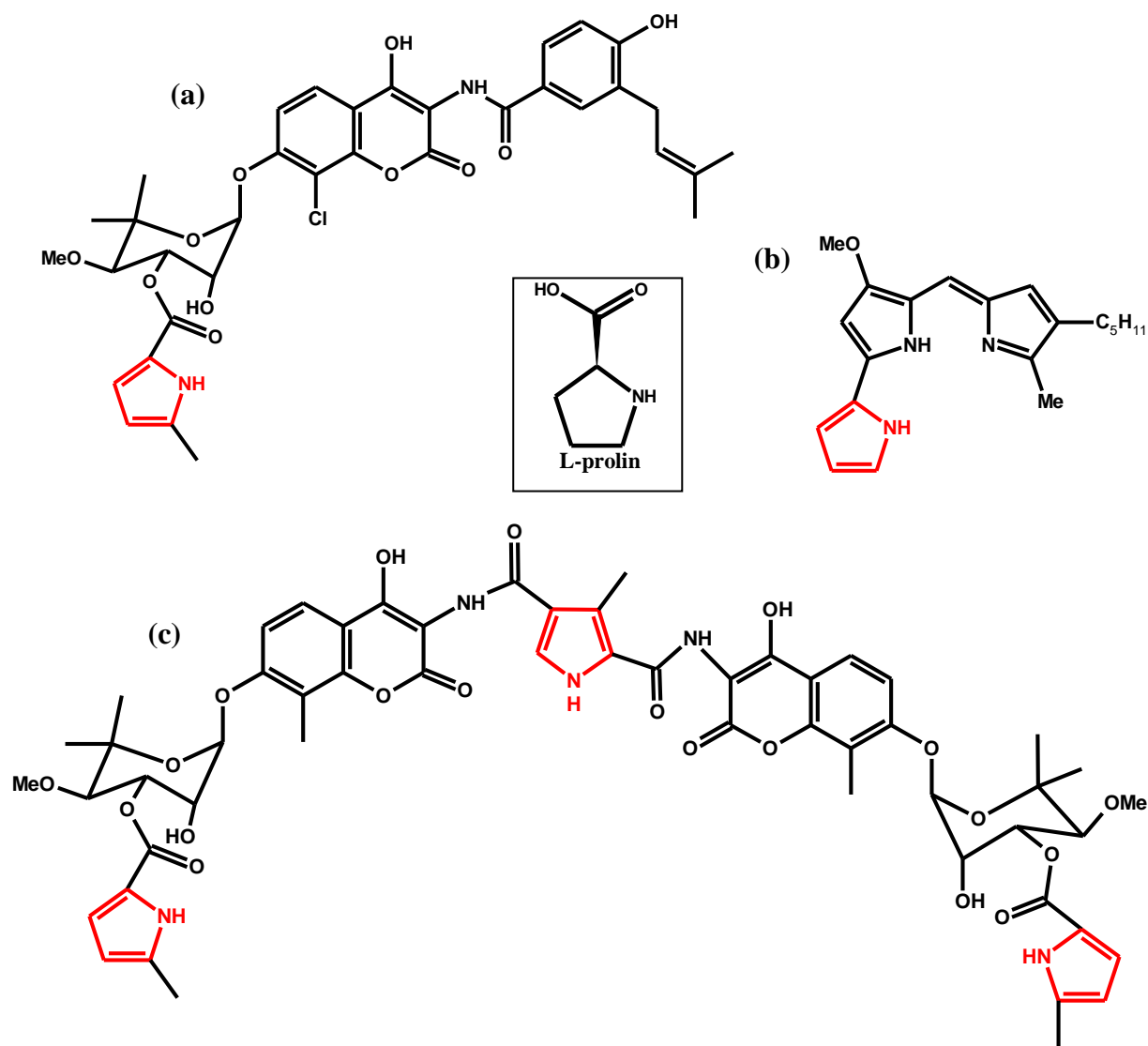
Obr. 2.2: Antibiotikum simocyklinon je strukturně aminokumarin (červeně) konjugovaný s anthracyklinem (modře). Spojení zajišťuje lineární polyen (černě). Biosyntetický genový shluk simocyklinonu je příkladem „supershluků“ a ukazuje podobnost ke třem odpovídajícím genovým shlukům. Převzato a upraveno z Trefzer et al. (2002).

### 2.3.1.2 Prolin a jeho deriváty jako sdílené stavební bloky přírodních látek

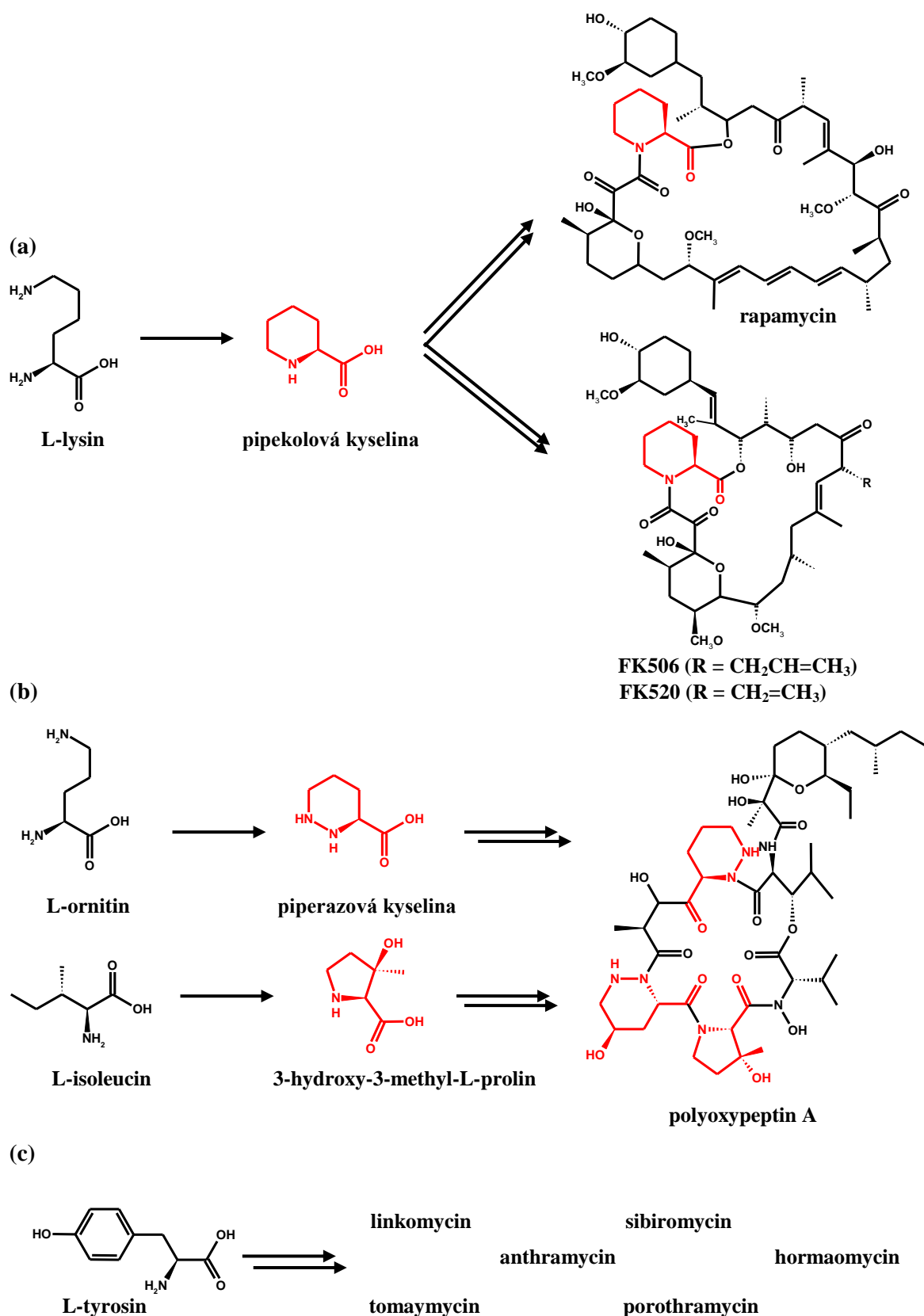
Pod pojmem stavební blok si můžeme představit chemický vzor, který se nachází ve strukturně odlišných látkách. Názorně může být toto ukázáno na příkladu, kde je jako stavební blok přírodních látek využit prolin a jeho deriváty. Stavební blok s prolinovým motivem nemusí vždy vznikat z proteinogenního L-prolinu.

Proteinogenní L-prolin se uplatní například v biosyntéze tripyrrolového pigmentu prodigiosinu (Garneau-Tsodikova et al. 2006) či aminokumarinových antibiotik kumermycinu A<sub>1</sub> a chlorobiocinu (Obr. 2.3; Garneau et al. 2005). Prolinové motivy, které vznikají z ne-prolinových aminokyselin, se pak jako stavební bloky vyskytují v řadě dalších látek (Obr. 2.4). Například aminokyselina L-lysin je přeměňována na pipekolovou kyselinu, která je zabudována do makrolaktonových imunopresantů FK506, FK520 a rapamycinu (Gatto et al. 2006). Dalším příkladem je L-ornitin, ze kterého vzniká piperazová kyselina (homolog pipekolové kyseliny obsahující dusík) a L-soleucin, z něhož vzniká 3-hydroxy-3-methylprolin. Piperazová kyselina a 3-hydroxy-3-methylprolin jsou součástí struktury polyoxypeptinu A (Umezawa et al. 2001). Biosyntetická dráha vedoucí

od L-tyrosinu k různým 4-alkyl-L-prolinovým derivátům je důležitá v biosyntéze linkomycinu (Brahme et al. 1984b), některých pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (PBD; anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu, porothramycinu; Hu et al. 2007; Li et al. 2009a; Li et al. 2009b; Najmanová et al. 2014) a hormaomycinu (Höfer et al. 2011) a ukazuje na možné evoluční propojení těchto tří skupin látek (schematické znázornění struktur těchto látek je uvedeno v kapitolách 2.4.1 a 2.4.2).



Obr. 2.3: Struktura: (a) prodigiosinu, (b) chlorobiocinu a (c) kumermycinu A<sub>1</sub>, látek, do jejichž struktury je zabudováván proteinogenní L-prolin (uprostřed), znázorněno červeně. Převzato a upraveno z Garneau-Tsodikova et al. (2006) a Garneau et al. (2005).



Obr. 2.4: Prolinové deriváty vznikající z ne-prolinových aminokyselin jako stavební bloky různých přírodních látek. (a) L-lysine je přeměňován na pipekolovou kyselinu, která je zabudovávána do rapamycinu, molekuly FK506 a molekuly FK520. (b) L-ornitin dává vzniknout piperazové kyselině a L-isoleucin 3-methyl-3-hydroxy-L-prolinu, jenž jsou zabudovávány do polyoxypeptinu A. (c) L-tyrosin je přeměňován na různé 4-alkyl-L-prolinové deriváty, prekurzory stavebních jednotek molekul: linkomycinu, anthramycinu, sibiromycinu, tomamycinu, porothramycinu a hormaomycinu. Převzato a upraveno z Walsh & Fischbach (2010), Gatto et al. (2006) a Umezawa et al. (2001).

## 2.4 Linkosamidy

Linkosamidy jsou antimikrobiální látky produkované hlavně zástupci rodu *Streptomyces*. Jsou známy pouze dvě přirozeně produkované látky této skupiny: linkomycin, produkovaný druhem *Streptomyces lincolnensis* (Bergy et al. 1963) a celesticetin, produkovaný druhem *Streptomyces caelestis* (De Boer et al. 1960). Z připravených semisyntetických derivátů je významný zejména klindamycin (Birkenmeyer & Kagan 1970).

Mechanismus působení linkosamidů je založen na inhibici proteosyntézy, konkrétně inhibici peptidyltransferasové reakce na velké podjednotce bakteriálního ribozomu (Tenson et al. 2003). Linkosamidy interagují s A a P místem na ribozomu a přímo tak zabraňují tvorbě peptidové vazby (Douthwaite 1992).

Linkomycin a klindamycin představují klinicky důležitá antibiotika. Celesticetin se vzhledem ke své nízké biologické aktivitě (asi jen 5 % biologické aktivity linkomycinu) v praxi nevyužívá (shrnutí v Spížek et al. 2004).

### 2.4.1 Struktura linkosamidů a její vliv na biologickou aktivitu

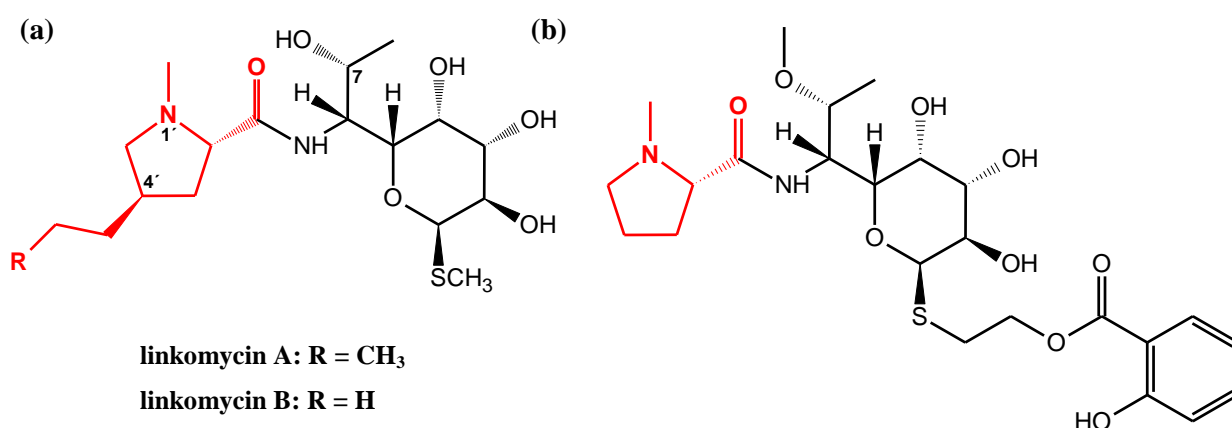
Linkosamidy jsou složeny ze dvou stavebních jednotek – aminokyselinové a aminocukerné, které jsou spojeny amidovou vazbou (Obr. 2.5). Je třeba zmínit, že při kultivaci produkčního kmene *Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis* vzniká jako majoritní produkt linkomycin A, kterým se tato práce zabývá. V minoritním zastoupení je ale tvořen také linkomycin B, který má oproti linkomycinu A boční alkylový řetězec o jeden uhlík kratší (Argoudelis et al. 1965).

Aminocukerná část je pro linkosamidy charakteristická. V linkomycinu je to triviálním názvem označovaný  $\alpha$ -methylthiolinkosamid (MTL, chemicky se jedná o methyl 6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- $\alpha$ -D-galakto-oktopyranosid; Schroeder et al. 1967). Celesticetin má ve své molekule inkorporovanou obdobnou strukturu – thiocelestosamidin, jenž má oproti MTL navíc přes thioskupinu připojený salicylát (Hoeksema 1964).

Mnohem zajímavější je aminokyselinová část linkosamidů. Základ tvoří molekula prolinu (Hoeksema 1964; Hoeksema et al. 1964), na které se nacházejí dvě místa, jenž jsou pro aktivitu linkosamidů zásadní – C4', N1 (Obr. 2.5; třetí a zároveň poslední důležité místo je v pozici C7 na molekule aminocukru). Různé substituenty v těchto pozicích mají na biologickou aktivitu linkosamidů významný vliv (Magerlein 1971). Právě délka bočního

alkylového řetězce v pozici C4' je jedním z důvodů rozdílné biologické aktivity přírodních linkosamidů. Delší alkylový řetězec koresponduje se zvýšenou biologickou aktivitou (Magerlein 1971). Aminokyselinovým prekurzorem linkomycinu je tzv. 4-alkyl-L-prolinový derivát (APD), který vzniká z L-tyrosinu (Witz et al. 1971). APD linkomycinu B je 4-ethyl-L-prolin (EPL), APD linkomycinu A (dále jen linkomycinu) je 4-propyl-L-prolin (PPL; Hoeksema et al. 1964). Prekurzorem aminokyselinové části celesticetinu je proteinogenní L-prolin (Hoeksema 1964). Aminokyselinové prekurzory linkosamidů jsou dále v biosyntéze metylovány v pozici N1' (Hoeksema 1964, Hoeksema et al. 1964).

Halogenovaný derivát linkomycinu – klindamycin, jenž v pozici C7 obsahuje místo hydroxylové skupiny atom chlóru, je důkazem toho, že i třetí, již zmíněné zásahové místo, má na biologickou aktivitu této skupiny antibiotik významný vliv. Nejen chlor, ale i další halové prvky významně potencují zvýšení antimikrobiálního účinku (Birkenmeyer & Kagan 1970).



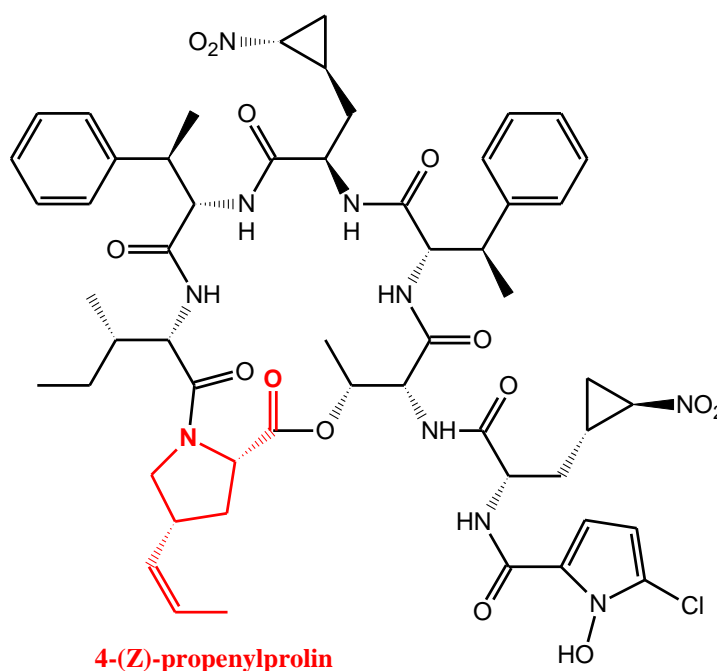
Obr. 2.5: Struktura linkosamidových antibiotik: (a) linkomycinu a (b) celesticetinu. Červeně zvýrazněny jsou jejich aminokyselinové části, očíslována jsou zásahová místa – různé substituenty v těchto místech mají na biologickou aktivitu linkosamidů významný vliv.

## 2.4.2 Další látky inkorporující do své struktury APD vznikající z L-tyrosinu

V současné době jsou známy nejméně další dvě skupiny přírodních látek, které do své struktury včleňují různě modifikovaný APD vznikající stejně jako PPL z L-tyrosinu (Hurley & Zmijewski 1974; Hurley 1980; Höfer et al. 2011; Najmanová et al. 2014). Jedná se o (1) hormaomycin a (2) některé PBD (anthramycin, sibiromycin, tomaymycin, porothramycin).

### 2.4.2.1 Hormaomycin

*Streptomyces griseoflavus* je producentem depsipeptidu zvaného hormaomycin (Obr. 2.6). První zmínka o této látce pochází z roku 1984 (Omura et al. 1984). Jeho kompletní struktura byla objasněna totální chemickou syntézou (Zlatopolskiy & de Meijere 2004). Hormaomycin obsahuje unikátní stavební bloky, jedním z těchto bloků je APD – 4-(Z)-propenylprolin.



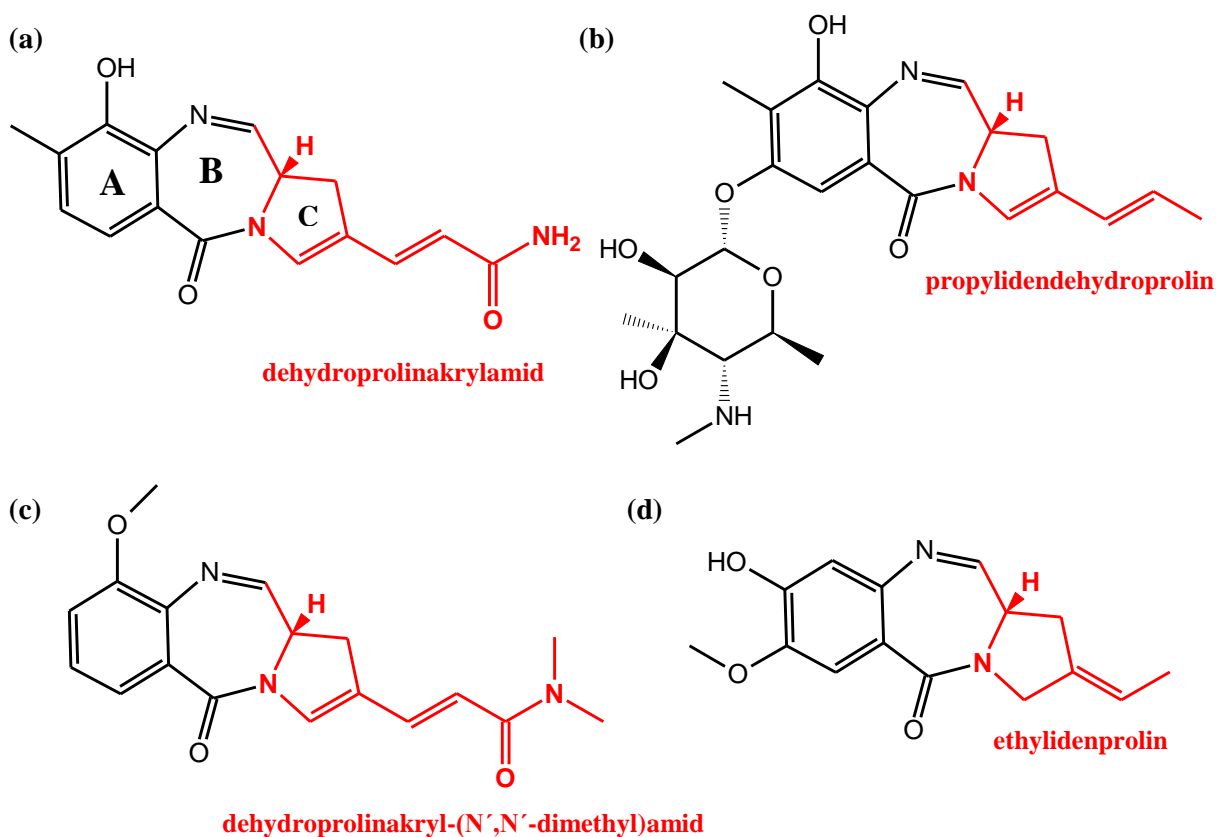
Obr. 2.6: Struktura bakteriálního hormonu hormaomycinu. Červeně zvýrazněný a pojmenovaný je APD vznikající stejně jako APD linkomycinu a PBD z L-tyrosinu.

### 2.4.2.2 PBD – anthramycin, sibiromycin, tomaymycin, porothramycin

Přírozně produkované PBD jsou látky definované přítomností anthranilátového (A), diazepinového (B) a hydropyrrolového (C) kruhu (Obr. 2.7). Tento tricyklický systém, tzv. pyrrolo-1,4-benzodiazepinové jádro, tvoří základ všech PBD. Různé modifikace anthranilátové a hydropyrrolové části udělují PBD značnou chemickou diverzitu. Hlavními producenty těchto látek je rod *Streptomyces* a rod *Micrococcus* (shrnutí v Gerratana 2012). Mechanismus působení je založen na specifické vazbě PBD do malého žlábků DNA, kde ireverzibilně interagují s guaninem a způsobují tak lehkou distorzi dvojšroubovice (Petrušek et al. 1981). Mezi PBD najdeme zástupce bez zjevné biologické aktivity, zástupce vyznačující se lehkou antimikrobiální či antivirovou aktivitou, nejzajímavější jsou ovšem

zástupci vykazující protinádorovou aktivitu. Problém v zavedení těchto látek do klinické praxe spočívá v jejich cytotoxicitě (shrnuje Hurley 1977).

Anthramycin, první objevený PBD, je látka produkovaná druhem *Streptomyces refuineus* (Tendler & Korman 1963). APD, který je součástí struktury anthramycinu, je dehydroprolinakrylamid (Leimgruber et al. 1965). Sibiromycin, glykosylovaný PBD byl izolován z kultivačního média *Streptosporangium sibiricum* (Brazhnikova et al. 1972). Součástí molekuly sibiromycinu je APD propylidendehydroprolin (Mesentsev et al. 1974). Ethylidenprolin je APD tomaymycinu (Kariyone et al. 1971). Tomaymycin byl izolován z kultivačního média *Streptomyces achromogenes* (Arima et al. 1972). Porothramycin, antibiotikum strukturně velmi podobné anthramycinu, inkorporuje do své struktury vůbec nejvíce modifikovaný APD – dehydroprolinakryl-(N',N'-dimethyl)amid (Tsunakawa et al. 1988). Producentem porothramycinu je druh *Streptomyces albus* (Tsunakawa et al. 1987).



Obr. 2.7: Struktury PBD: (a) anthramycinu, (b) sibiromycinu, (c) porothramycinu, (d) tomaymycinu. Červeně zvýrazněny a pojmenovány jsou APD vznikající stejně jako APD linkomycinu a hormaomycinu z L-tyrosinu. Ve struktuře anthramycinu je dále označen anthranilátový (A), diazepinový (B) a hydropyrrolový (C) kruh.

### 2.4.3 Genetická analýza linkomycinového genového shluku

Sekvenční charakterizace linkomycinového biosyntetického shluku vysokoprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 byla publikována v roce 1995 (Peschke et al. 1995). Sekvenční charakterizací linkomycinového biosyntetického shluku typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 byl základní koncept upřesněn (Koběrská et al. 2008). Shluk je velký 32 kbp, zahrnuje 29 biosyntetických či regulačních genů (*lmb* geny) a dále pak 3 geny rezistence (*lmr* geny). Existence *lmb* genů zapojených do biosyntézy linkomycinu vyskytujících se mimo shluk nebyla zcela vyloučena (Peschke et al. 1995; Janata et al. 2015). Ve shluku jsou geny, jež pro přehlednost můžeme rozdělit do čtyř skupin: nachází se zde geny rezistence, geny kódující biosyntézu aminokyselinového prekurzoru, geny kódující biosyntézu aminocukerného prekurzoru a dále geny pro kondenzaci a postkondenzační reakce (Peschke et al. 1995; Koběrská et al. 2008; Koběrská 2010; Janata et al. 2015; Zhao et al. 2015).

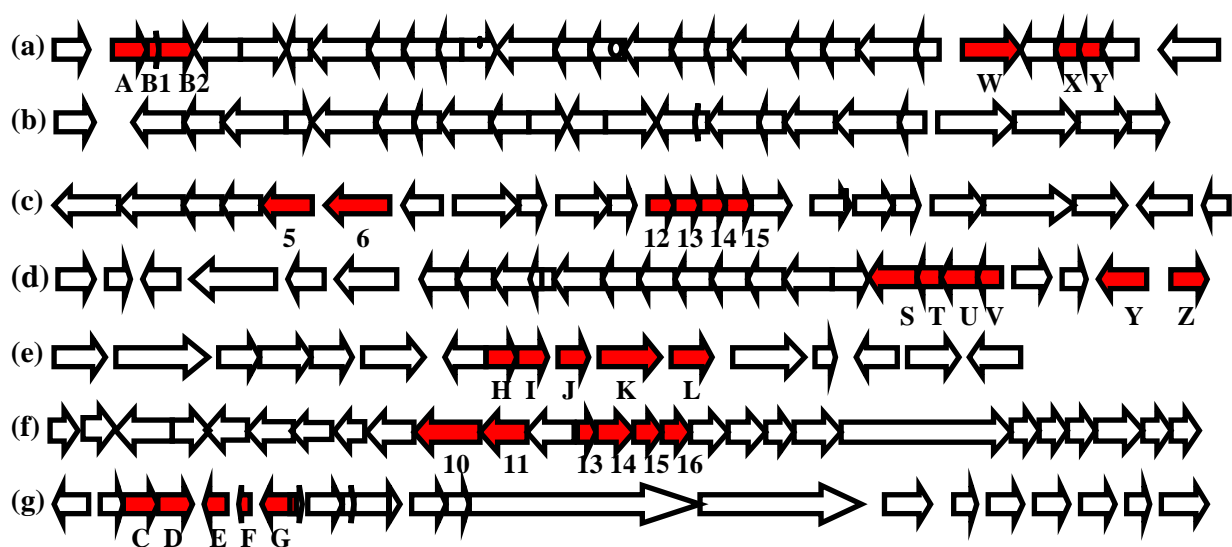
#### 2.4.3.1 Podobnost biosyntetických shluků producentů linkosamidů, PBD a hormaomycinu

V linkomycinovém a celesticetinovém biosyntetickém shluku můžeme nalézt vysokou podobnost stejně jako odlišnosti odrážející specifické znaky obou linkosamidových drah. Společné, tj. tvořící homologní páry, jsou geny kódující biosyntézu základu aminocukerných částí těchto antibiotik, kondenzaci podjednotek a postkondenzační modifikace. Logicky, v celesticetinovém biosyntetickém shluku se nenacházejí geny pro biosyntézu aminokyselinové části tohoto antibiotika a podobně, v linkomycinovém biosyntetickém shluku se nenacházejí geny pro biosyntézu salicylátu a dále pak jednu specifickou metylaci (Peschke et al. 1995; Koběrská et al. 2008; Janata et al. 2015).

Podobnost lze také najít mezi linkomycinovým, PBD a hormaomycinovým biosyntetickým shlukem. V biosyntetických shlucích těchto látek bylo nalezeno pět (tomaymycin, hormaomycin; Li et al. 2009b; Höfer et al. 2011) či šest (linkomycin, anthramycin, sibiromycin, porothramycin; Koběrská et al. 2008; Hu et al. 2007; Li et al. 2009a; Najmanová et al. 2014) homologních genů kódujících biosyntézu jejich APD. APD těchto látek tak vznikají sdílenou biosyntetickou dráhou.

Z rozložení homologních genů v biosyntetických genových shlucích producentů PBD, linkomycinu a hormaomycinu (Obr. 2.8) a ze struktur jejich APD lze předpokládat směr molekulární evoluce těchto látek. PBD jsou látky, jejichž APD jsou v porovnání s APD

linkomycinu a hormaomycinu více modifikované. Také uspořádání genů kódujících APD je v biosyntetických genových shlucích producentů PBD ve srovnání s biosyntetickým genovým shlukem producenta linkomycinu více kompaktní. U producenta hormaomycinu jeden homologní gen chybí. Zdá se tedy, že geny kódující biosyntézu APD pocházejí z producenta PBD a v průběhu evoluce byly začleněny do biosyntetického genového shluku producenta linkomycinu i hormaomycinu. Linkomycinový genový shluk tedy zřejmě vznikl fúzí biosyntetického genového shluku původního linkosamidu, který do své struktury včleňoval prolin (jako je tomu u celestictinu), s biosyntetickým genovým shlukem PBD.

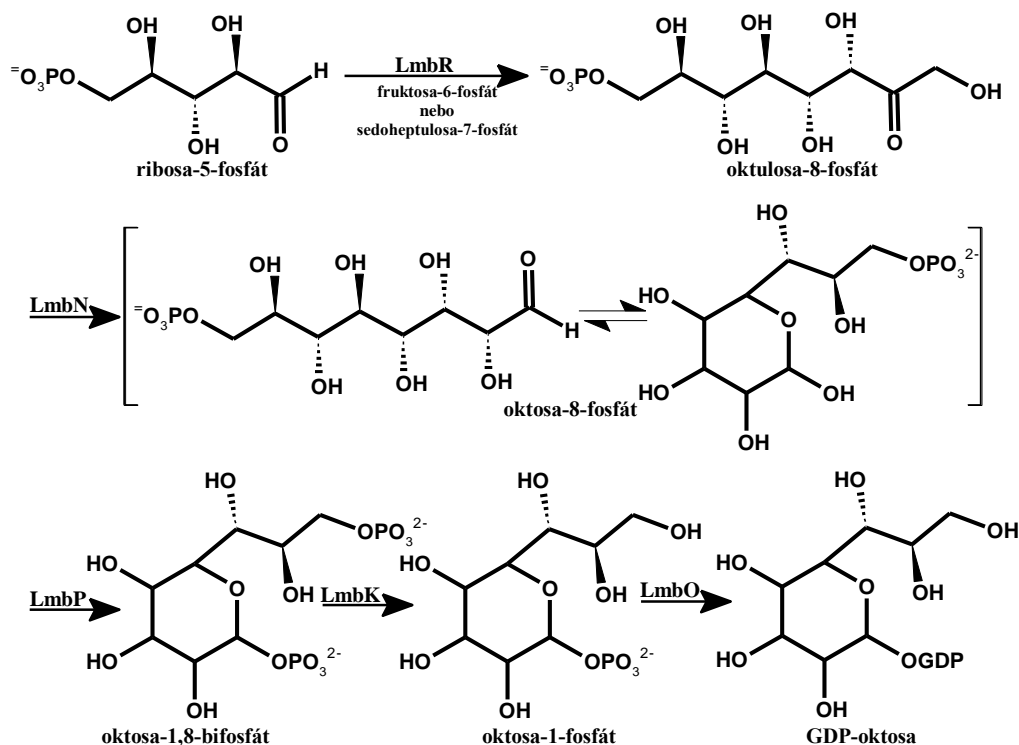


Obr. 2.8: Biosyntetické genové shluky: (a) linkomycinu, (b) celestictinu, (c) anthramycinu, (d) sibiromycinu, (e) tomaymycinu, (f) porothramycinu a (g) hormaomycinu. Červeně zvýrazněny jsou homologní geny zapojené v biosyntéze jejich APD. Převzato a upraveno z Koběrská et al. (2008); Hu et al. (2007); Li et al. (2009a); Li et al. (2009b); Najmanová et al. (2014); Höfer et al. (2011).

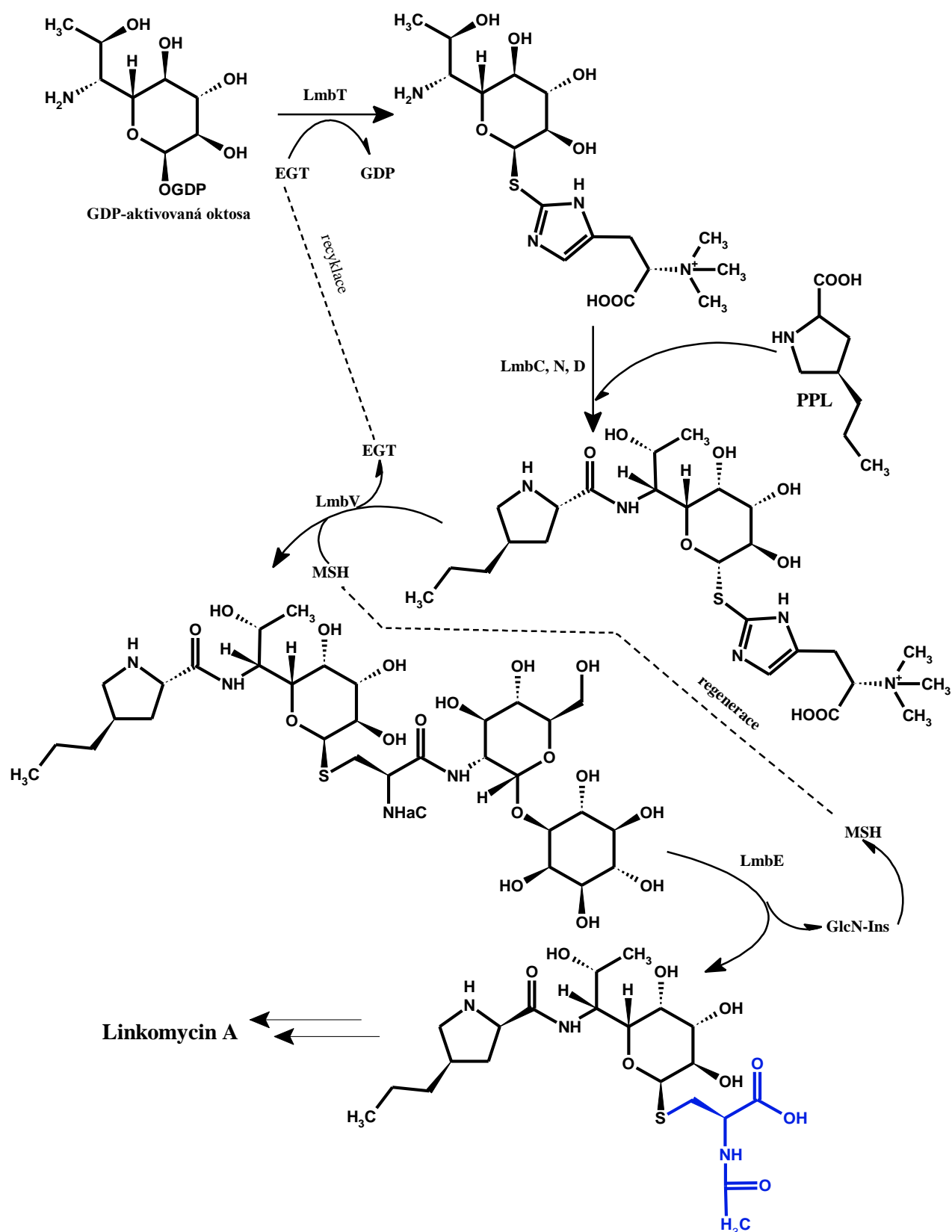
## 2.5 Biosyntéza linkomycinu

Biosyntéza linkomycinu zahrnuje dvě separované dráhy. Biosyntetickou dráhou, ve které vzniká PPL, se detailně zabývají následující kapitoly. V paralelní dráze vzniká prekurzor aminocukerné části linkomycinu, GDP-aktivovaná oktosa. První návrh biosyntetické dráhy aminocukerné části linkomycinu byl publikován v roce 1984 (Brahme et al. 1984a). Aktuálně navrhované schéma upřesňuje možný průběh biosyntézy (Obr. 2.9; Lin et al. 2014).

Recentní publikace ukazuje zajímavý mechanismus kondenzace obou jednotek (Obr. 2.10; Zhao et al. 2015). Důležitou součástí kondenzačního enzymu propojujícího obě části je LmbC, samostatně stojící adenylační doména (Peschke et al. 1995). LmbC je zodpovědný za výběr a aktivaci substrátu (PPL) do kondenzační reakce (Kadlčík et al. 2013). Aktivovaný PPL je kondenzován s aminocukrem, na který je připojen ergothionein (EGT) přes atom síry (Zhao et al. 2015). Další kroky připomínají mykothiolový detoxikační systém, který se obecně využívá k odstranění elektrofilních toxinů z buňky. Ergothionein (EGT) je vyměněn za mykothiol (MSH), ze kterého amidasa LmbE odštěpuje pseudo-disacharid (Zhao et al. 2015). Vzniká „odpadní produkt“ označený detoxikační chemickou značkou. Následující reakce vedou k odstranění detoxikační značky a transformaci na linkomycin (Kameník et al. v přípravě).



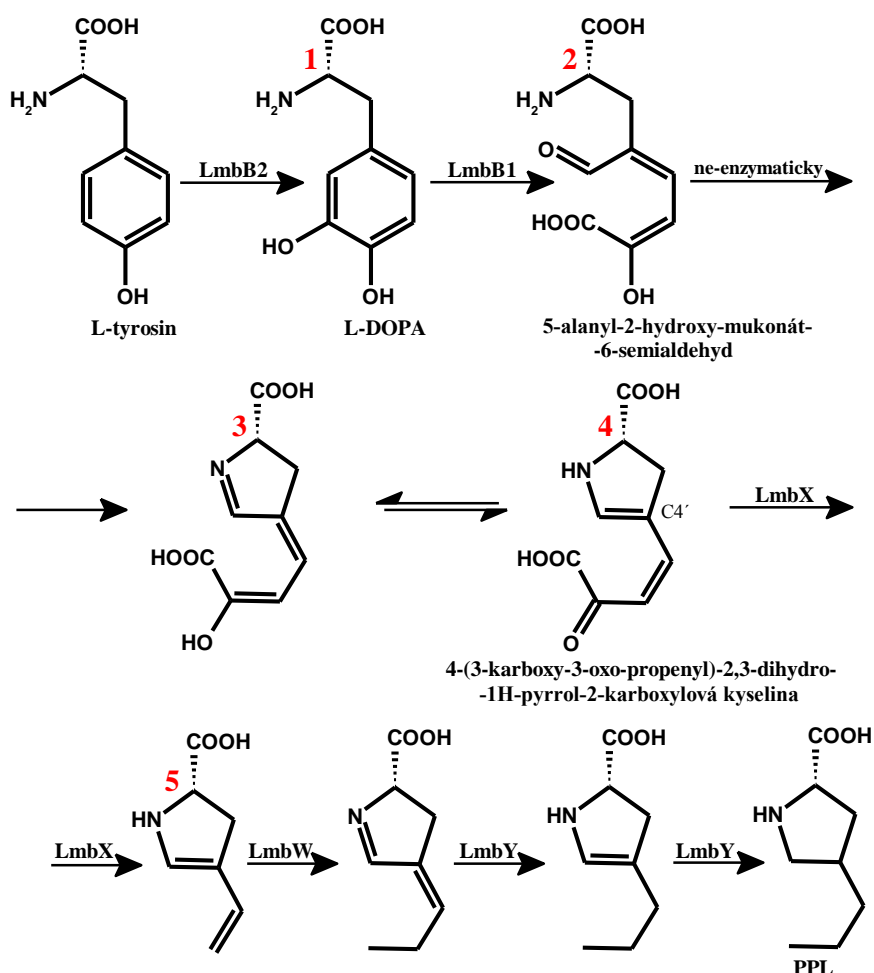
Obr. 2.9: Navrhovaná biosyntetická dráha aminocukerného prekurzoru linkomycinu. C8 kostra (Brahme et al. 1984a) vzniká reakcí katalyzovanou transaldolou LmbR (Sasaki et al. 2012). Následují reakce katalyzované isomerasou LmbN (Sasaki et al. 2012), poté zřejmě kinasou LmbP, fosfatasou LmbK a nukleotidyltransferasou LmbO (Lin et al. 2014). Převzato a upraveno z Lin et al. (2014).



Obr. 2.10. Navrhované schéma kondenzace obou stavebních prekurzorů linkomycinu. Modře zvýrazněná je detoxikační chemická značka. GlcN-Ins – 1-O-glukosamin-D-*myo*-inositol; pseudo-disacharid (zbytek po MSH). Převzato a upraveno ze Zhao et al. (2015).

## 2.5.1 Biosyntéza PPL

Jedny z prvních dat, které vedly k vytvoření uceleného návrhu biosyntézy PPL, byly získány v experimentech založených na radioaktivně značených substrátech. Argoudelis et al. (1969) ukázal, že donorem methylové skupiny bočního propylového řetězce je L-methionin. To, že biosyntéza PPL vychází z L-tyrosinu, bylo objasněno o dva roky později (Witz et al. 1971). Původní návrh biosyntetické dráhy PPL ukazuje Obr. 2.11 (Brahme et al. 1984b; Kuo et al. 1992). Kódování biosyntetické dráhy PPL, APD linkomycinu, by měla plně zajišťovat šestice genů: *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX*, *lmbY*, *lmbW*. Zapojení jednotlivých proteinů do biosyntézy PPL bylo původně navrženo na základě podobnosti s funkčně známými proteiny (Peschke et al. 1995; Koběrská et al. 2008). Homology PPL genů nalezené v biosyntetických genových shlucích producentů PBD a hormaomycinu shrnuje Tab. 2.1.



Obr. 2.11: Původní návrh PPL dráhy. Červená čísla jsou uvedena pro srozumitelnost následujících kapitol. Převzato a upraveno z Brahme et al. (1984b) a Kuo et al. (1992).

geny kódující biosyntézu APD linkomycinu	<i>lmbA</i>	<i>lmbB1</i>	<i>lmbB2</i>	<i>lmbW</i>	<i>lmbX</i>	<i>lmbY</i>
prokázaná/předpokládaná funkce	$\gamma$ -glutamyl-transferasa	L-DOPA-2,3-dioxygenasa	L-tyrosin-3-hydroxylasa	methyl-transferasa	isomerasa	F420 závislá reduktasa
homology v anthramycinovém BGS* (% sekvenční homologie)	<i>orf6</i> (75 %)	<i>orf12</i> (49 %)	<i>orf13</i> (41 %)	<i>orf5</i> (78 %)	<i>orf15</i> (35 %)	<i>orf14</i> (52 %)
homology v sibiromycinovém BGS (% sekvenční homologie)	<i>sibY</i> (58 %)	<i>sibV</i> (57 %)	<i>sibU</i> (45 %)	<i>sibZ</i> (62 %)	<i>sibS</i> (45 %)	<i>sibT</i> (56 %)
homology v tomamycinovém BGS (% sekvenční homologie)	<i>tomL</i> (60 %)	<i>tomH</i> (59 %)	<i>tomI</i> (42 %)		<i>tomK</i> (48 %)	<i>tomJ</i> (55 %)
homology v porothramycinovém BGS (% sekvenční homologie)	<i>por11</i> (73 %)	<i>por13</i> (50 %)	<i>por14</i> (38 %)	<i>por10</i> (75 %)	<i>por16</i> (34 %)	<i>por15</i> (50 %)
homology v hormaomycinovém BGS (% sekvenční homologie)	<i>hrmG</i> (65 %)	<i>hrmF</i> (56 %)	<i>hrmE</i> (48 %)	<i>hrmC</i> (56 %)		<i>hrmD</i> (48 %)

\* BGS – biosyntetický genový shluk

Tabulka 2.1: Homology PPL genů nalezené v biosyntetických genových shlucích producentů některých PBD a hormaomycinu. U PPL genů jsou uvedeny prokázané (červeně zvýrazněno) či předpokládané funkce jejich proteinových produktů. Prázdné pole znamená, že homolog daného genu není v příslušném shluku přítomen. Zdroj: BLAST.

### 2.5.1.1 Shody a rozpory v původním schématu PPL dráhy determinované na základě dosavadních experimentálních dat

Následující odstavce se věnují jednotlivým proteinům zapojených do PPL dráhy. V každém odstavci je uvedeno, jaké experimenty byly již s daným proteinem (či odpovídajícím genem) provedeny, s jakým výsledkem a zda tento závěr koreluje s původně navrženým schématem PPL dráhy. Do souvislostí jsou také dávány proteiny katalyzující biosyntézu APD hormaomycinu a PBD.

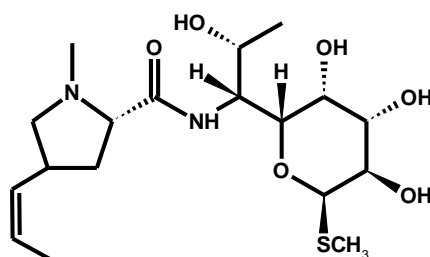
**LmbB2:** LmbB2 je jedním z proteinů, u kterého bylo funkčními testy prokázáno jeho zapojení do biosyntézy PPL. Jedná se o hemový protein, jenž konvertuje L-tyrosin na molekulu L-DOPA (Obr. 2.11, látka **1**; Novotná et al. 2013). Tato funkce byla prokázána i u proteinu Orf13, produktu homologního genu *orf13* z anthramycinového genového shluku (Connor et al. 2011). Tento krok biosyntézy dobře koreluje s původním návrhem PPL dráhy.

**LmbB1:** I funkce proteinu LmbB1 již byla prokázána (Novotná et al. 2004; Colabroy et al. 2008). L-DOPA-2,4-dioxygenasová aktivita tohoto proteinu se uplatní

k 2,3-extradiolovému štěpení aromatického jádra molekuly L-DOPA. Vzniká látka **2** (Obr. 2.11). Následně dochází k intramolekulární cyklizaci do formy pětičlenného heterocyklu s jedním atomem dusíku. Generuje se unikátní 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina (látka **4**), která spontánně může přecházet do enol formy (látka **3**). Dioxygenasové aktivity proteinů HrmF, Orf12 a SibV, produktů homologních genů *hrmF*, *orf12*, resp. *sibV*, byly již také prokázány (Höfer et al. 2011; Saha et al. 2015). I tento krok je v souladu s původní představou.

**LmbX:** Funkční testy rekombinantního proteinu LmbX (Jiráčková 2012) daly vzniknout prvním pochybnostem o správnosti původního schématu dráhy, kde měl tento protein zkracovat boční řetězec látky **4** (Obr. 2.11, pozice C4'). Navržená hydrolytická aktivita tohoto proteinu (Li et al. 2009a) však nebyla potvrzena a navíc bylo zjištěno, že LmbX nevykazuje sekvenční homologii k hydrolasám, nýbrž k isomerasám (Jiráčková 2012).

Homolog genu *lmbX* nebyl nalezen v hormaomycinovém biosyntetickém shluku (Höfer et al. 2011). Když se blíže podíváme na strukturu APD linkomycinu a APD hormaomycinu (Obr. 2.5, Obr. 2.6), rozdíl nenajdeme v délce bočního řetězce, jak bychom dle původní hypotézy předpokládali, ale jen v saturaci jedné vazby v bočním řetězci. Hydrolytická aktivita LmbX nevyplývá ani z produkčního profilu mutantního kmene  $\Delta lmbX$ , jehož hlavním produktem je dehydrolinkomycin A (Obr. 2.12; Jiráčková 2012), látka, která má ve středu tříuhlíkatého bočního řetězce v *cis*-konfiguraci dvojnou vazbu (Jiráčková et al. v přípravě) – stejně jako je tomu u APD hormaomycinu. V tomto kroku tedy nacházíme zásadní rozpor s původním schématem.



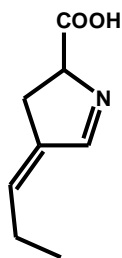
Obr. 2.12. Struktura dehydrolinkomycinu A. Převzato a upraveno z Jiráčková et al. v přípravě.

**LmbW:** Pro protein LmbW byla na základě sekvence LmbW navržena methyltransferasová aktivita (Peschke et al. 1995). V původním návrhu PPL dráhy LmbW katalyzuje připojení methylové skupiny k bočnímu řetězci látky **5** (Obr. 2.11). Methyltransferasovou aktivitu LmbW podporuje produkční profil mutantního kmene  $\Delta lmbW$  (Jiráčková 2012), který

produkuje linkomycin B (Obr. 2.5). Chybějící homolog genu *lmbW* v tomaymycinovém biosyntetickém shluku (Li et al. 2009b) také odpovídá navrhované methyltransferasové funkci, neboť bočním řetězcem APD tomaymycinu je pouze dvouuhlíkatý alkyl (Obr. 2.7d). Je zde tedy dobře podložená hypotéza, že LmbW je methyltransferasa. Otázkou zůstává, v jaké části dráhy nalézá svoje uplatnění.

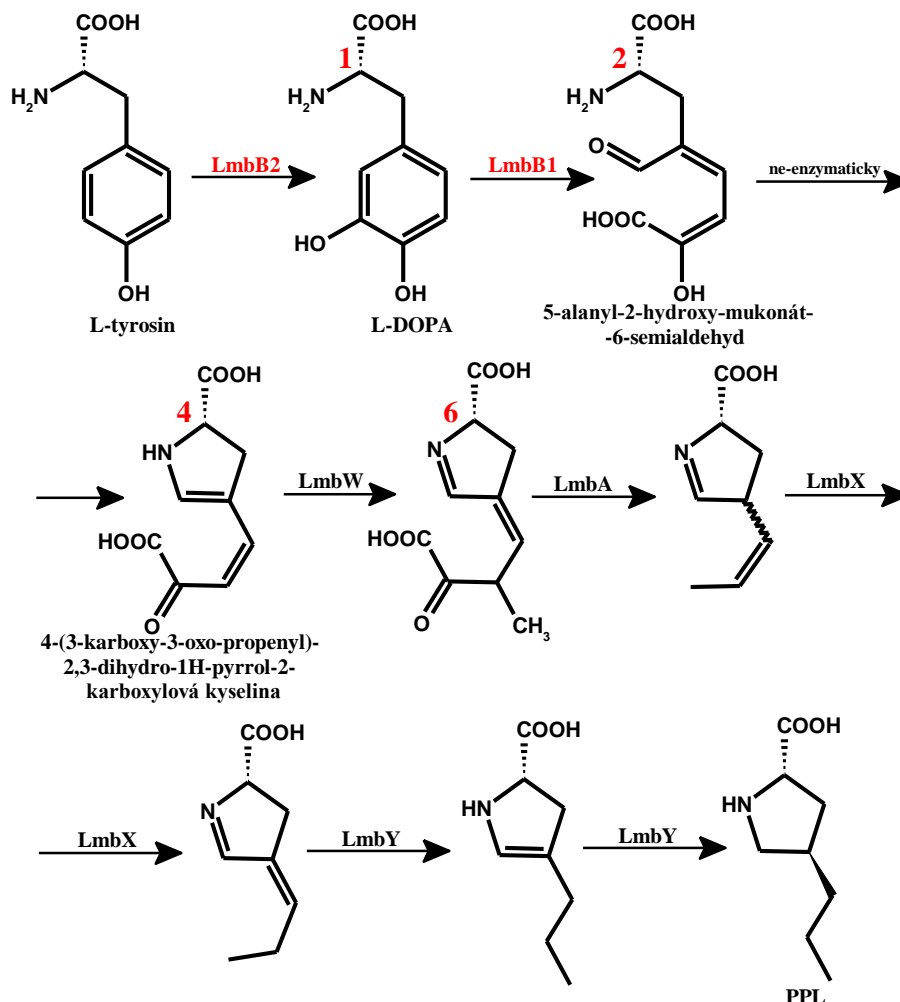
**LmbA:** V předpokládaném zapojení proteinu LmbA do biosyntézy PPL opět nacházíme nesrovnalosti. Původně měl tento protein sloužit jako aktivátor kofaktoru F420, jehož přítomnost je nezbytná pro redukční reakci katalyzovanou proteinem LmbY (Peschke et al. 1995). Sekvenční analýza LmbA ukazuje podobnost spíše ke glutamyltransferasám. LmbA tedy zřejmě není pro funkci LmbY nutný (Jiráčková 2012). Podporu glutamyltransferasové funkce LmbA nalezneme v mutantních kmenech  $\Delta lmbA$  a  $\Delta lmbY$ , jejichž produkční profily neodpovídají tomu, že by LmbY bylo na LmbA nějak funkčně závislé. Přitom funkce LmbA je v celé biosyntéze nepostradatelná – připravený mutantní kmen  $\Delta lmbA$  neprodukoval téměř žádný linkomycin (Jirásková et al. v přípravě).

**LmbY:** Dle původní představy LmbY katalyzuje dva závěrečné kroky PPL dráhy (Obr. 2.11). Jak již bylo naznačeno, sekvenční analýza LmbY ukazuje na podobnost s reduktasami vyžadujícími pro svou funkci kofaktor F420 (Peschke et al. 1995). Bylo zjištěno, že v nepřítomnosti kofaktoru F420 dochází k tvorbě jiného meziprojektu dráhy (od původního se liší saturací vazeb): 4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylové kyseliny (Obr. 2.13; Kuo et al. 1992). Při vyřazení genu *lmbY* ( $\Delta lmbY$ ) nedochází k úplnému zastavení produkce linkomycinu, jak bychom očekávali, nicméně oproti typovému kmeni je snížena. Hlavním produktem je dehydrolinkomycin A, ovšem jiný izomer, než u  $\Delta lmbX$ . V médiu se dále našla i struktura se dvěma dvojnými vazbami, která zřejmě bude odpovídat produktu, který izoloval Kuo et al. (1992; Jirásková et al. v přípravě).



Obr. 2.13: Struktura 4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylové kyseliny, meziprojektu PPL dráhy v nepřítomnosti kofaktoru F420. Převzato a upraveno z Kuo et al. (1992).

Výše uvedené rozpory v původním, všeobecně přijímaném schématu PPL dráhy vedly k myšlence revidovat tuto dráhu, aby co nejlépe korelovala s dosavadními poznatky. Revidované schéma PPL dráhy ukazuje Obr. 2.14.



Obr. 2.14: Revidovaná PPL dráha. Červeně jsou označeny proteiny, jejichž funkce již byla experimentálně prokázána. Červená čísla jsou uvedena pro srozumitelnost následujících kapitol, pojmenovány jsou prokázané meziprodukty. Převzato a upraveno z Jirásková et al. v přípravě.

## 2.5.2 LmbW jako možný kandidát katalyzující třetí krok PPL dráhy

Dle revidovaného schématu je třetí krok PPL dráhy katalyzován domnělou C-methyltransferasou (methylace na atomu uhlíku) LmbW, která prodlužuje boční alkylový řetězec. Terminální uhlík tohoto řetězce pochází z L-methioninu (Argoudelis et al. 1969).

Gen *lmbW* se v biosyntetickém genovém shluku producenta linkomycinu nachází mezi samostatně stojícím genem rezistence *lmbR* a genem *lmbV*, jenž je součástí většího operonu. LmbV se účastní postkondenzační reakce v biosyntéze aminocukerné části linkomycinu

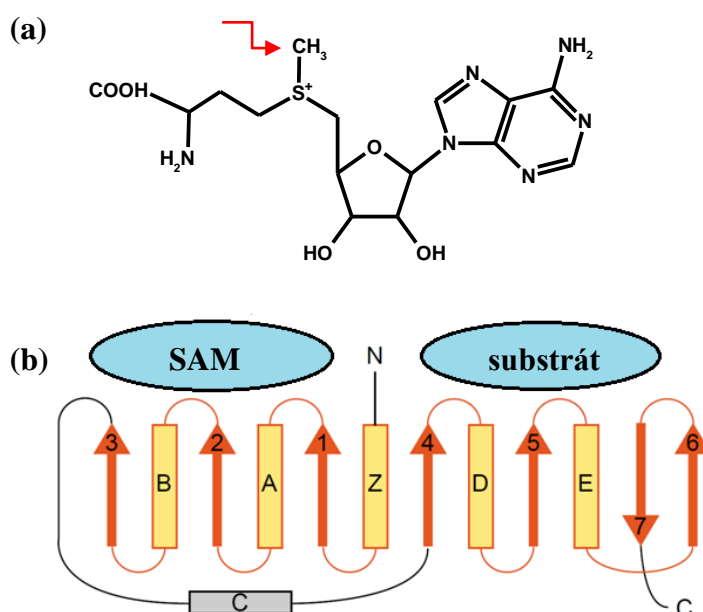
(Zhao et al. 2015). Mezigenová vzdálenost *lmbV/lmbW* a *lmbW/lmrB* je 47, resp. 54 bp. Vůči těmto dvěma genům má *lmbW* opačnou orientaci, je přepisován z plus vlákna a tvoří samostatnou transkripční jednotku. Sekvence genu *lmbW* čítá celkem 1 053 bp (Zdroj: GenBank). Přepisem sekvence nukleotidů do pořadí aminokyselin vzniká protein LmbW složený z 350 aminokyselinových zbytků. Vypočtená molekulová hmotnost proteinu LmbW je 38 827 Da (Zdroj: BLAST).

### 2.5.2.1 Methyltransferasy závislé na SAM

S-adenosyl-L-methionin (SAM; Obr. 2.15a), konjugát L-methioninu a adenosinové části ATP (Cantoni 1953), je univerzální biologický kofaktor účastnící se řady biochemických procesů. SAM-závislé methyltransferasy (SAM-MT) využívají SAM jako donor methylové skupiny, kterou přenášejí na různé biomolekuly primárního i sekundárního metabolismu. S ohledem na jejich substrátovou specifitu methylují např. DNA, proteiny či malé molekuly sekundárních metabolitů. Donorová methylová skupina může být připojena na atom uhlíku, kyslíku, dusíku, síry (shrnuto v Struck et al. 2012) nebo dokonce na halogenid (Attieh et al. 1995; Ohsawa et al. 2001). Po odejmutí donorové methylové skupiny z molekuly SAM je generován S-adenosyl-L-homocystein (SAH).

Na základě strukturních znaků katalytické domény byly SAM-MT děleny do pěti základních tříd (I – V; shrnuto v Schubert et al. 2003). Studie provedená na *Saccharomyces cerevisiae* navrhla další čtyři nové třídy (Wlodarski et al. 2011). I přesto, že SAM-MT sdílejí malou sekvenční identitu, v jejich terciárních strukturách můžeme nalézt vysoce konzervované domény (Martin & McMillan 2002). Největší skupinou SAM-MT je třída I. Enzymy z této skupiny katalyzují hlavní methylační reakce napříč všemi třemi doménami života (Struck et al. 2012). Mohou se vyskytovat jako monomery (nejčastěji), dimery i jako tetramery (shrnuto v Schubert et al. 2003), avšak v biosyntéze linkosamidů je známa i N-methyltransferasa (methylace na atomu dusíku) s neobvyklou hexamerní strukturou – methyltransferasa CcbJ, resp. LmbJ (Najmanová et al. 2013; Bauer et al. 2014). Jednou z prvních strukturně charakterizovaných SAM-MT, dnes řazenou do třídy I, byla katecholová O-MT (methylace na atomu kyslíku; Vidgren et al. 1994). Terciární struktura této malé SAM-MT je jakýmsi prototypem všech SAM-MT I. třídy (Obr. 2.15b). Pro vazbu molekuly SAM byly v SAM-vazebné doméně determinovány tři důležité oblasti (Kagan & Clarke 1994; Martin & McMillan 2002). Mezi  $\beta$ 1 a  $\alpha$ A v N-terminální oblasti (aminový konec proteinu) se typicky vyskytuje glycin bohatá sekvence (G<sub>x</sub>G<sub>x</sub>G, či alespoň G<sub>x</sub>G), konzervovaný

motiv I, který interaguje s aminokyselinovou částí molekuly SAM. Tento motiv byl predikován i u proteinu LmbW (Peschke et al. 1995). Další silně konzervovaný motiv (motiv II) je mezi  $\beta 2$  a  $\alpha B$ , kde dochází k interakci s ribosovými hydroxyly molekuly SAM. Třetí oblast, která přispívá k interakci s molekulou SAM, je v oblasti mezi  $\beta 4$  a  $\alpha D$ . Hydrofóbní aminokyselinové zbytky v této oblasti interagují s adeninovým kruhem SAM (Martin & McMillan 2002). Většina SAM-MT, na rozdíl od katecholové O-MT, obsahuje více přídatných domén hrající významnou roli v rozpoznávání substrátů (shrnuje Schubert et al. 2003).



Obr. 2.15:

(a) Chemická struktura SAM. Donorová methylová skupina je označena červenou šipkou. To, že je tato methylová skupina připojena na silně nabitý atom síry, dělá celou molekulu SAM termodynamicky nestabilní. Převzato a upraveno z Martin & McMillan (2002).

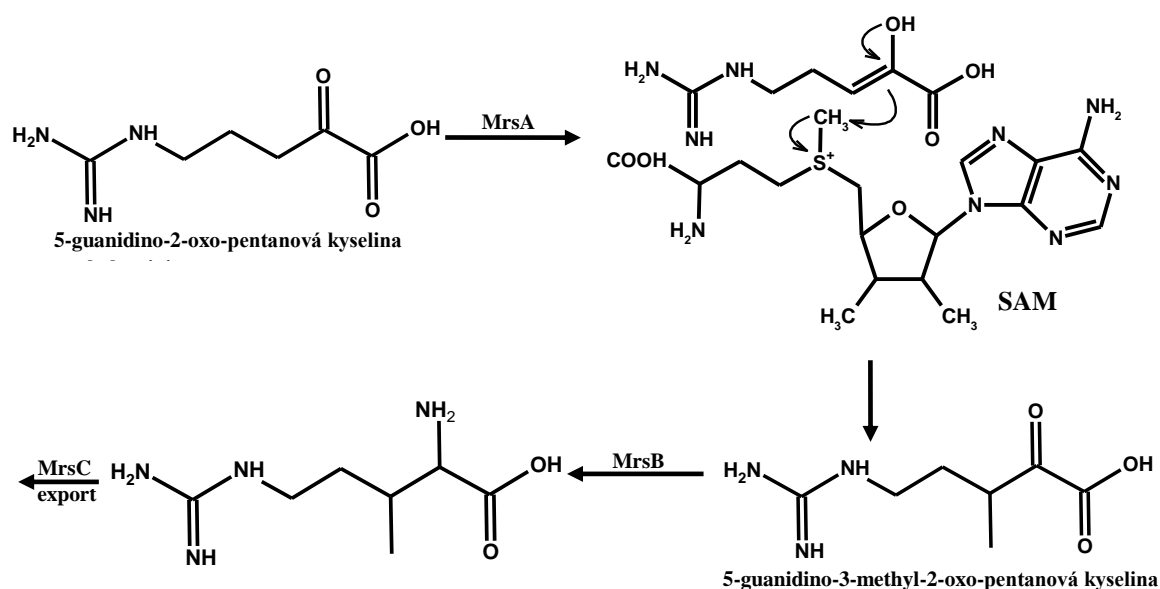
(b) Diagram topologie konzervované domény SAM-MT I. třídy: Základ tvoří sedm střídajících se  $\beta$ -listů (1-7; červené šipky) se šesti  $\alpha$ -helixy (oranžové obdélníky; Z, A, B na jedné straně; C, D, E na straně druhé). Pořadí  $\beta$  vláken je 3214576,  $\beta$ -list 7 je vůči ostatním  $\beta$ -listům antiparalelní. Šedě je znázorněn  $\alpha$ -helix C, ne vždy bývá ve struktuře konzervován. Znázorněny jsou také vazebné oblasti pro SAM a substrát a dále N (aminový) a C (karboxylový) konec proteinu. Převzato a upraveno z Martin & McMillan (2002).

### 2.5.2.2 Proteiny podobné LmbW

V současné době lze v proteinové databázi UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) nalézt proteiny vykazující k LmbW různou sekvenční identitu. Experimentálně prokázaná funkce je prozatím jen u dvou z nich. SAM-MT MrsA, která byla identifikována v biosyntéze rostlinného toxinu 3-methylargininu (Braun et al. 2010) a dále SAM-MT MppJ účastnící se biosyntézy antibiotika manopeptimycinu (Magarvey et al. 2006; Huang et al. 2009).

### 2.5.2.2.1 MrsA

Vzácná aminokyselina 3-methylarginin je toxin produkovaný epifytní bakterií z rodu *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Braun et al. 2008). Tento toxin silně inhibuje růst příbuzného, ale patogenního druhu *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, původce nemoci rostliny sóji (Völksch et al. 1996). V biosyntéze 3-methylargininu se zřejmě uplatňují jen 3 enzymy (Obr. 2.16). Funkce MrsA byla přímo potvrzena v *in vitro* reakci, kde katalyzuje přenos methylové skupiny z molekuly SAM na 5-guanidino-2-oxo-pentanovou kyselinu (Braun et al. 2010). MrsA má k LmbW sekvenční identitu 26 % (Zdroj: BLAST).

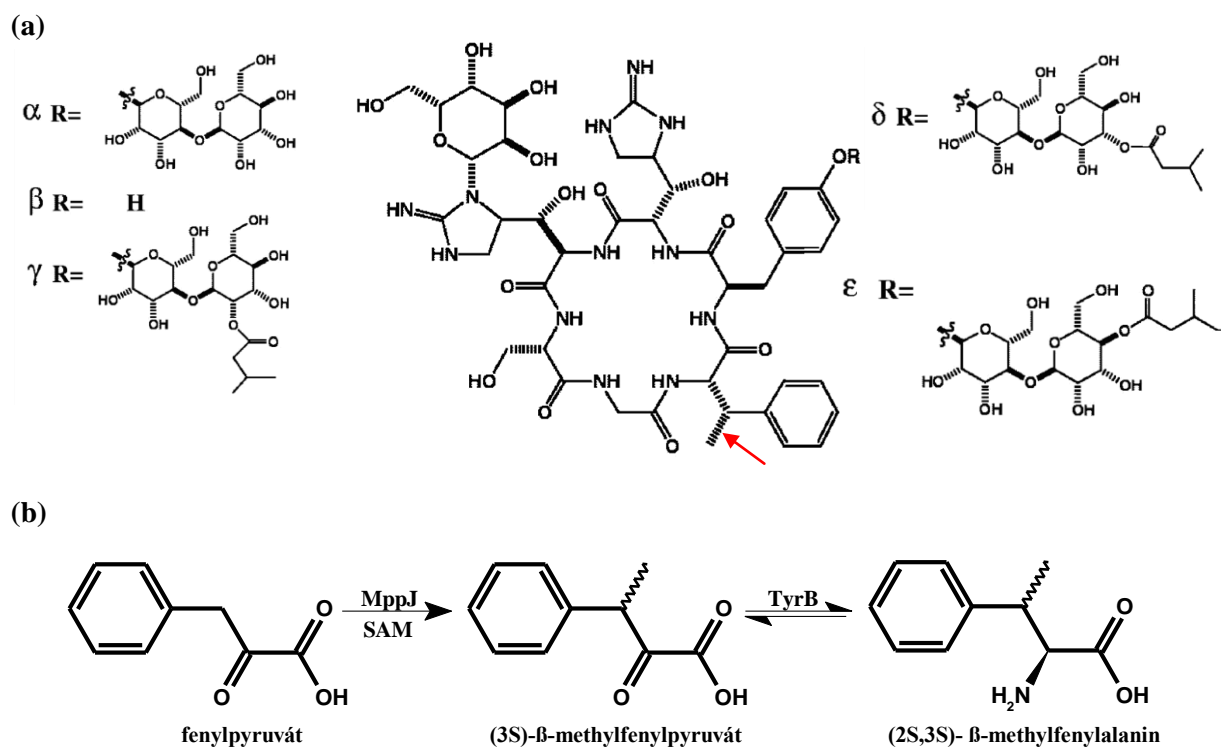


Obr. 2.16: Navrhovaná biosyntetická dráha, ve které vzniká toxin 3-methylarginin. MrsA katalyzuje připojení methylové skupiny z molekuly SAM na svůj substrát – 5-guanidino-2-oxo-pentanovou kyselinu. Převzato a upraveno z Braun et al. (2010).

### 2.5.2.2.2 MppJ

Manopeptimyciny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ; Obr. 2.17a), sekundární metabolity produkované druhem *Streptomyces hygroscopicus*, jsou třídou lipoglykopeptidových antibiotik vykazujících biologický účinek proti multirezistentním patogenům (Singh et al. 2003; He et al. 2002). V manopeptimycinovém genovém shluku se nachází gen *mppJ* (Magarvey et al. 2006). Jeho produkt, protein MppJ, vykazuje k LmbW 27% sekvenční identitu (Zdroj: BLAST). MppJ je zapojen v biosyntéze jednoho ze stavebních bloků manopeptimycinů (He et al. 2002), neproteinogenní aminokyseliny (2S,3S)- $\beta$ -methylfenylalaninu (Obr. 2.17b; Magarvey et al. 2006; Huang et al. 2009).

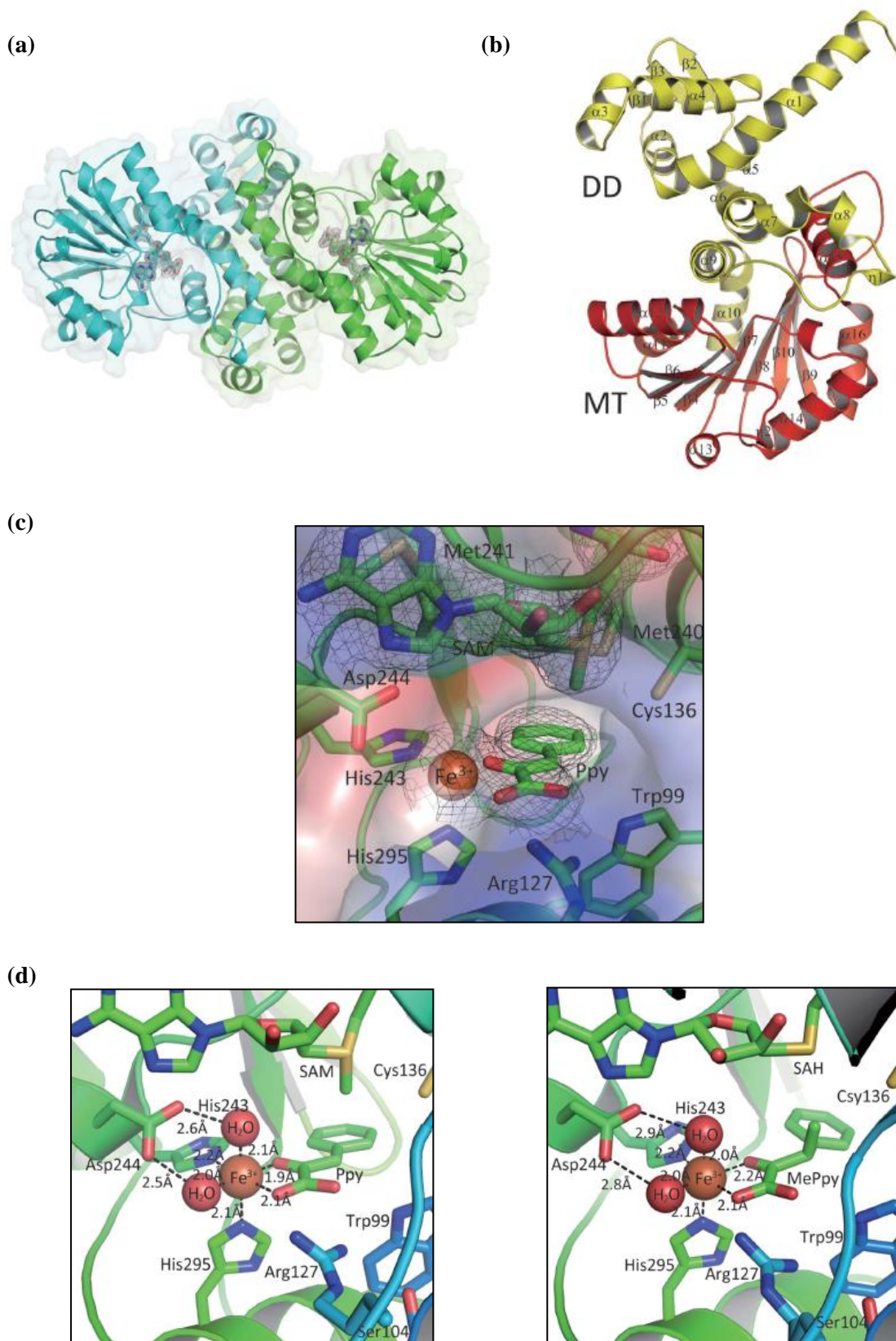
U methyltransferasy MppJ byla také již určena kvartérní struktura (Zou et al. 2014). MppJ je ve své aktivní formě homodimer řadící se do skupiny SAM-MT I (Obr. 2.18). Krystalová struktura dále ukázala, že MppJ má ve svém centru nehemový železitý ion, který váže, orientuje a aktivuje jeho substrát (Zou et al. 2014).



Obr. 2.17:

(a) Struktura manopeptimycinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Červenou šipkou je znázorněna methylová skupina připojovaná methyltransferasou MppJ. Převzato a upraveno z Magarvey et al. (2006).

(b) Schéma znázorňující biosyntézu (2S,3S)- $\beta$ -methylfenylalaninu, stavebního bloku manopeptimycinů. Fenylpyruvát je methylován proteinem MppJ za vzniku (3S)- $\beta$ -methylfenylpyruvátu, který je dále aminotransferasou TyrB přeměňován na (2S,3S)- $\beta$ -methylfenylalanin. Převzato a upraveno z Huang et al. (2009).



Obr. 2.18: Kvartérní struktura methyltransferasy MppJ. (a) MppJ je ve své kvartérní struktuře homodimer. (b) Každý polypeptid se skládá ze dvou domén: dimerizační (DD) a methyltransferasové (MT). (c) Substrát vazebné místo je situováno na rozhraní obou domén. (d) Struktura komplexu: MppJ-SAM-fenylpyruvát (vlevo) a MppJ-SAH- $\beta$ -methylfenylpyruvát (vpravo). Převzato a upraveno ze Zou et al. (2014).

### 3 CÍLE PRÁCE

Náplní této diplomové práce bylo nejen prokázat navrhovanou methyltransferasovou aktivitu proteinu LmbW účastnícího se biosyntetické dráhy PPL, ale především potvrdit jeho zařazení v revidovaném konceptu PPL dráhy. Hlavní cíle byly definovány jako:

- Připravit expresní vektor s vloženým genem *lmbW*.
- Nadprodukovat protein LmbW expresí v heterologním producentovi.
- Nalézt vhodné podmínky pro purifikaci získaného proteinu LmbW.
- *In vitro* prokázat methyltransferasovou aktivitu proteinu LmbW v reakci s jeho předpokládaným substrátem – látkou **4** (Obr. 2.14).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny a vektory

##### *Escherichia coli* JM109

*Původ:* Promega

*Popis:* Kmen je vhodným hostitelem k transformaci vektorů. Genotypové vlastnosti kmene: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rk-,mk+), *relA1*, *supE44*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [*F'traD36*, *proAB*, *laqIqZAM15*].

*Použití:* Transformace kmene plazmidovou DNA za účelem jejího namnožení.

##### *Escherichia coli* BL21(DE3), *Escherichia coli* BL21(DE3)/pGroESL

*Původ:* Stratagene

*Popis:* Chemicky kompetentní kmen *Escherichia coli* vhodný pro expresi genů vložených do expresního vektoru řízenou T7 promotorem. Nese gen pro T7 RNA polymerasu, která je pod kontrolou lacUV5 inducibilního promotoru. Indukce exprese T7 RNA polymerasy pomocí IPTG vede k produkci polymerasy, jejímu nasedání na T7 promotor expresního vektoru a expresi vložených genů. Genotypové vlastnosti kmene: F-, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>), *gal*,  $\lambda$ (DE3). Kmen *Escherichia coli* BL21(DE3)/pGroESL navíc nese plazmid pGroESL.

*Použití:* Exprese genu *lmbW*.

##### pGroESL

*Původ:* DuPont

*Popis:* Vektor pGroESL je velký 6 500 bp. Kóduje chaperoniny GroES a GroEL, jejichž funkcí je pomáhat sbalovat proteiny či stabilizovat částečně sbalené a nesbalené proteiny. Dále nese gen pro chloramfenikolovou rezistenci.

*Použití:* pGroESL je součástí kmene *Escherichia coli* používaného pro expresi *lmbW*.

### **pLK6**

*Původ:* k dispozici v naší laboratoři (Koběřská et al. 2008)

*Popis:* Vektor SuperCos I (7 900 bp; Stratagene), který má do své sekvence vložený inzert dlouhý 38 217 bp (linkomycinový biosyntetický genový shluk; pochází z kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466). Kosmid nese gen pro rezistenci ke kanamycinu.

*Použití:* Kosmid byl použit jako výchozí zdroj sekvence genu *lmbW*.

### **pGEM-T Easy**

*Původ:* Promega

*Popis:* Systém pGEM-T Easy je vhodný pro klonování PCR produktů. 3'-T přesahy usnadňují ligaci PCR produktu zabráněním recirkularizace vektoru a také slouží jako kompatibilní přesahy pro PCR produkty některých termostabilních polymeras (produkty těchto polymeras mívají na 3' konci přidaný jeden deoxyadenosin). Vektor je velký 3 015 bp a jako selekční znak nese ampicilinovou rezistenci.

*Použití:* Vektor byl použit k TA klonování genu *lmbW*.

### **pET-42b(+)**

*Původ:* Novagen

*Popis:* Vektor umožňuje produkci proteinů fúzovaných na C konci proteinu (karboxylový konec proteinu) s tzv. histidinovou kotvou, díky které je pak usnadněna purifikace produkovaného proteinu. Vektor je velký 5 929 bp, součástí sekvence je i T7 promotor a gen pro rezistenci ke kanamycinu.

*Použití:* Vektor byl použit jako expresní vektor nesoucí gen *lmbW*.

## **4.1.2 Kultivační média a půdy**

<b>LB médium</b>	
NaCl	10 g
trypton	10 g
kvasničný extrakt	5 g
destilovaná H <sub>2</sub> O (dH <sub>2</sub> O)	do objemu 1000 ml
pH	7,5

<b>LB agar</b>	
LB médium	1000 ml
agar	15 g

<b>MÉDIUM A (příprava kompetentních buněk)</b>
LB médium
10 mM MgSO <sub>4</sub>
0,2% glukosa

<b>MÉDIUM B (příprava kompetentních buněk)</b>
LB médium
12 mM MgSO <sub>4</sub>
36% glycerol
12% polyethylenglykol

<b>AIX agar</b>
LB agar
100 µg · ml <sup>-1</sup> ampicilin (zásobní roztok 100 mg · ml <sup>-1</sup> , rozpuštěn v dH <sub>2</sub> O)
0,4 mM IPTG (zásobní roztok 1 M, rozpuštěn v dH <sub>2</sub> O)
30 µg · ml <sup>-1</sup> X-gal (zásobní roztok 20 mg · ml <sup>-1</sup> , rozpuštěn v DMSO)

### 4.1.3 Roztoky a pufrы

<b>Roztoky a pufrы používané při práci s DNA</b>	
Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí: Roztok 1	25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50 mM glukosa; pH 8,0
Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí: Roztok 2	0,3 M NaOH; 1% SDS; pH neupravováno
Izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí: Roztok 3	3 M CH <sub>3</sub> COOK; pH 5,0
TAE pufr	1 mM EDTA; 40 mM Tris-acetát; pH 8,0
10 × DNA vzorkový pufr (agarosová elektroforéza)	100 mM EDTA; 20% glycerol; 1% SDS; 0,25% bromfenolová modř; pH 8,0
TE <sup>-1</sup> pufr	0,1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH 8,0
<b>Roztoky a pufrы používané při práci s proteinem LmbW</b>	
Elektrodový pufr (SDS-PAGE - SDS-polyakrylamidová elektroforéza)	25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS; pH neupravováno
2 × vzorkový pufr (SDS-PAGE)	125 mM Tris-HCl; 20% glycerol; 5% merkaptoethanol; 2% SDS; 0,002% bromfenolová modř; pH 6,8
Tris-HCl pufr A (SDS-PAGE, pro přípravu dělicího gelu)	1,875 M Tris-HCl; pH 8,9
Tris-HCl pufr B (SDS-PAGE, pro přípravu zaostřovacího gelu)	1 M Tris-HCl; pH 6,9
Anodový pufr (BN-PAGE - modrá nativní (blue native) polyakrylamidová elektroforéza)	50 mM Bis-Tris-HCl; pH 7,0 při 4°C
Katodový pufr (BN-PAGE)	15 mM Bis-Tris-HCl; 50 mM tricín; 0,0002% Coomassie blue G-250; pH 7,0 při 4°C
3× gel pufr (BN-PAGE)	150 mM Bis-Tris-HCl; 1,5 M ε-aminokapronová kyselina; pH 7,0 při 4°C

Roztoky a pufrы používané při práci s proteinem LmbW	
3× vzorkový pufr (BN-PAGE)	150 mM Bis-Tris-HCl; 45% glycerol; pH 7,0 při 4°C
Barvicí roztok (SDS-PAGE, BN-PAGE)	50% methanol; 10% kyselina octová; 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250
Odbarvovací roztok (SDS-PAGE, BN-PAGE)	10% methanol; 10% kyselina octová
Základní sonikační pufr/ dialyzační pufr A	20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,0
Promývací/eluční pufrы pro purifikaci proteinu (různá koncentrace imidazolu)	20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50/100/250 mM imidazol; pH 8,0
Dialyzační pufr B	20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 20% glycerol; pH 8,0
Dialyzační pufr C1	50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,0
Dialyzační pufr C2	50 mM Tris-HCl; pH 8,0
Dialyzační pufr D (D1-D5; různé pH)	100 mM Tris-HCl, pH 7,0/7,5/8,0/8,5/9,0
Dialyzační pufr E	25 mM HEPES-NaOH; 100 mM NaCl; pH 7,0
Dialyzační pufr F (F1-F3; různé pH)	30 mM glycín-HCl, 100 mM NaCl; pH 9,0/9,5/10,0
Dialyzační pufr G (G1-G3; různé pH)	40 mM glycín-HCl, pH 9,5/10,0/10,5
Roztok Ponceu S (detekce proteinů)	0,2% Ponceau S; 3% trichloroctová kyselina
10 × reakční pufr Tris-HCl A (A1-A4; různé pH)	1 M Tris-HCl; pH 7,5/8,0/8,5/9,0
10 × reakční pufr Tris-HCl B1	500 mM Tris-HCl; pH 8,0
10 × reakční pufr Tris-HCl B2	500 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; pH 8,0
10 × reakční pufr glycín-HCl C (C1-C3; různé pH)	400 mM glycín-HCl; pH 9,5/10,0/10,5
10 × reakční pufr HEPES-NaOH	250 mM HEPES; 100 mM NaCl; pH 7,0

#### 4.1.4 Enzymy, oligonukleotidy, zásobní roztoky antibiotik

ENZYMY	
Název:	Výrobce:
DNA polymerasa Expand High Fidelity <sup>PLUS</sup>	Roche
T4 DNA ligasa	New England BioLabs
<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> (restrikční endonukleasy)	New England BioLabs
Alkalická fosfatasa CIP	New England BioLabs
Lysozym	Sigma
Ribonukleasa A	Promega

OLIGONUKLEOTIDY		
Název:	Charakteristika:	Výrobce:
primer W <sub>fw</sub>	5' - GCATATGACAGCCGTTTCGGCAAAA - 3'	Sigma
primer W <sub>rev</sub>	5' - ATTCTCGAGCCGCCGCGGCACCA - 3'	Sigma

<b>ZÁSOBNÍ ROZTOKY ANTIBIOTIK (1000 × koncentrované*)</b>			
<b>Název:</b>	<b>Rozpuštěno v:</b>	<b>Koncentrace:</b>	<b>Selekce:</b>
ampicilin	dH <sub>2</sub> O	100 mg · ml <sup>-1</sup>	kmen <i>E. coli</i> JM109 transformovaný vektorem pGEM-T Easy
chloramfenikol	ethanol	34 mg · ml <sup>-1</sup>	kmen <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pGroESL transformovaný vektorem pET-42b(+)
kanamycin	dH <sub>2</sub> O	30 mg · ml <sup>-1</sup>	kmen <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformovaný vektorem pET-42b(+)
			kmen <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pGroESL transformovaný vektorem pET-42b(+)
			kmen <i>E. coli</i> JM109 transformovaný kosmidem pLK6

\* 1000 × koncentrované znamená, že pro odpovídající koncentraci je na 1 l média nutné přidat 1 ml zásobního roztoku antibiotika

#### 4.1.5 Chemikálie

<b>Název:</b>	<b>Výrobce:</b>
1,3-diazoacyklopenta-2,4-diene (imidazol)	Sigma
2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2', 2''-nitrilotriethanol (Bis-Tris)	Fluka
4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethan-sulfonová kyselina (HEPES)	Sigma
4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina (látka 4)	připraveno v naší laboratoři
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-gal)	Sigma-Aldrich
acetonitril	Biosolve
adenosin trifosfát (ATP)	Fermentas
agar	Oxoid
agarosa	Invitrogen
akrylamid	Sigma
allyl bromid	Sigma
ampicilin	Duchefa Biochemie
betain	Lachema
bromethan (ethyl bromid)	Sigma-Aldrich
bromfenolová modř	Bio-Rad
Comassie brilliant blue G-250	Serva
Comassie brilliant blue R-250	Serva
diethylether	Lach-Ner
dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma
ethidium bromid	Sigma
ethyldiaminotetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát (EDTA)	Sigma
glukosa	Lach-Ner
glycerol	Lachema
glycin	Lach-Ner
hydroxid amonný (NH <sub>4</sub> OH)	Sigma-Aldrich

Název:	Výrobce:
hydroxid sodný (NaOH)	Lach-Ner
chloramfenikol	Serva
chlorid sodný (NaCl)	Lach-Ner
isopropanol	Lachema
isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
kanamycin	Amresco
krotyl bromid	Sigma
kvasničný extrakt	Oxoid
kyselina mravenčí (HCOOH)	Merck
kyselina octová (CH <sub>3</sub> COOH)	Lachema
leucin-enkefalin acetát	Sigma-Aldrich
merkptoethanol	Serva
methanol	Lachema
<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylendiamin (TEMED)	Serva
<i>N, N'</i> -methylenbisakrylamid (bisakrylamid)	ICN Biomedicals
<i>N</i> -tris(hydroxymethyl)methylguanin (tricin)	Serva
nukleosid trifosfátová směs (dNTP)	Fermentas
octan draselný (CH <sub>3</sub> COOK)	Lach-Ner
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma
polyethylenglykol; $M_r = 8000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Sigma
Ponceau S	Sigma
S-(5'-adenosyl)-L-homocystein (SAH)	Sigma-Aldrich
S-(5'-adenosyl)-L-methionin chlorid dihydrochlorid (SAM)	Sigma-Aldrich
síran hořečnatý heptahydrát (MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	Merck
síran nikelnatý (NiSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
trifluormethansulfonát stříbrný (AgOTf)	Sigma
trichloroctová kyselina	Lach-Ner
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Aldrich
trypton	Difco
$\epsilon$ -aminokapronová kyselina	Serva

#### 4.1.6 Výpočetní technika – software a aplikace

Název:	Funkce:
ACD/ChemSketch 12.01	tvorba chemických vzorců a rovnic
<b>Basic Local Alignment Search Tools</b> (BLAST; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a> ; Altschul et al. 1997)	srovnávání sekvencí, hledání podobností
GenBank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a> )	genová databáze
Geneious Pro 5.5.6.	práce se sekvencemi, navrhování primerů
KaleidaGraph 4.5.2	program pro tvorbu grafů
Mass Lynx™ 4.1	analýza dat z UHPLC
Mendeley Desktop 1.13.3	citační software
Universal Protein Resource (UniProt; <a href="http://www.uniprot.org/">www.uniprot.org/</a> )	proteinová databáze

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kultivace bakterií

Pro kultivaci všech používaných kmenů *E. coli* bylo využito LB média či LB agaru s přidavky příslušných antibiotik. Běžně používaná růstová teplota byla 37 °C, teploty 17 °C a 28 °C byly používány pro heterologní produkci proteinu LmbW. V případě třepaných kultivací bylo využito rotační inkubační třepačky Unitron (Infors), použitá rychlost 200 RPM (200 otáček za minutu).

### 4.2.2 Příprava kompetentních buněk pro transformace

2 ml LB média byly zaočkovány z jediné kolonie *E. coli*. Následovala kultivace při 37 °C, 200 RPM přes noc. Poté byl 1 ml narostlé kultury přenesen do MÉDIA A, kde probíhala další kultivace při 37 °C, 200 RPM. V průběhu kultivace byla měřena OD<sub>600</sub> (optická denzita při 600 nm; Hexios  $\gamma$ , Unicam). Kultura rostla z OD<sub>600</sub> ~ 0,04 do OD<sub>600</sub> 0,4 – 0,6. Po dosažení požadované OD byla kultura na 10 min vložena do ledové lázně. Buňky byly poté odděleny centrifugací (Juan BR4i, Thermo Scientific; 4000  $\times$  g, 10 min při 4 °C). Sediment byl resuspendován v 1 ml MÉDIA A, dále bylo přidáno 5 ml vychlazeného MÉDIA B, směs byla promíchána a rozdělena na 100  $\mu$ l alikvoty. Kompetentní buňky byly skladovány v -70 °C.

### 4.2.3 Stanovení koncentrace DNA či proteinů v malém objemu

NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific) je spektrofotometr umožňující kvantifikaci a vyhodnocení čistoty nukleových kyselin či proteinů. Využívá retenční technologii, vzorek je na určeném místě držen díky povrchovému napětí. To umožňuje analýzy vzorku o objemu 1  $\mu$ l. Měření je možné při vlnové délce 220 – 750 nm.

Přístroj byl využíván ke stanovování koncentrace DNA a proteinu LmbW. Jako blank (odečet pozadí) byly při měření využívány roztoky, ve kterých byly DNA a protein LmbW rozpuštěné.

#### 4.2.4 Transformace *E. coli* cizorodou DNA metodou tepelného šoku

Transformace je děj, kdy kompetentní bakterie přijímá cizorodou DNA z prostředí. Metoda teplotního šoku je založená na principu náhlých změn teplot působících na bakteriální buňku. Při přestupu z chladného prostředí do prostředí znatelně teplejšího dochází v bakteriální membráně k vytvoření pórů, kterými může cizorodá DNA pronikat dovnitř buněk.

Ke 100  $\mu$ l zmražených (či čerstvě připravených) kompetentních buněk bylo přidáno ~ 100 ng DNA. Buňky byly nejméně 20 min inkubovány na ledu. Následoval teplotní šok: buňky byly 1 min inkubovány ve 42 °C, následně byly 1 min drženy na ledu. Poté byl přidán 1 ml přehřátého (37 °C) LB média. Následovala kultivace ve vodní lázni při 37 °C, nejméně 60 min, čímž byla umožněna exprese genu rezistence. To je důležité pro následný růst transformovaných buněk na selekční půdě s příslušným antibiotikem (při 37 °C přes noc).

#### 4.2.5 Preparace DNA z většího objemu (100 ml)

Preparace DNA je metoda umožňující extrahovat a přečistit plazmidovou DNA. K práci byla využívána komerční sada Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel). Princip metody je založený na narušení bakteriálních buněk použitím lyzačního roztoku, který obsahuje NaOH (denaturuje chromozomální i plazmidovou DNA) a SDS (denaturuje proteiny; Birnboim & Doly 1979). Při rychlé neutralizaci pomocí  $\text{CH}_3\text{COOK}$  plazmidová ccc-forma DNA (kovalentně uzavřená kružnicová forma DNA), na rozdíl od chromozomální DNA, rychle renaturuje a je tak dobře oddělitelná. Chromozomální DNA percipituje společně s proteiny a detergentem, se kterými dohromady tvoří komplex s draslíkem. Sraženina je poté oddělena pomocí filtru. Plazmidová DNA (záporně nabitá díky fosfátovým skupinám) zůstává zachycena na kolonce, kterou tvoří silikátové kuličky s navázaným methyl-amino-ethanolem (kladný náboj). Následnými promývacími kroky je plazmidová DNA přečištěna a nakonec eluována roztokem o vysoké iontové síle. Z roztoku je DNA získána alkoholovým srážením. Tento postup byl použit pro izolaci plazmidové DNA (pLK6) použité do PCR reakce. Preparace byla prováděna z transformovaných buněk, které byly přeočkovány do 100 ml LB média a kultivovány při 37 °C, 200 RPM přes noc. Buňky byly odděleny centrifugací (4000  $\times$  g, 15 min při 4 °C) a dále bylo pokračováno dle přiloženého protokolu. Buňky byly resuspendovány (RES pufr) a lyzovány (LYS pufr) po dobu 5 min. Mezi tím byla ekvilibrována kolonka a filtr

(EQU pufr). Následně byl buněčný lyzát neutralizován (NEU pufr). Lyzát byl nanesen na kolonku a promyt (EQU pufr), následně byl odstraněn filtr a kolonka byla promyta podruhé (WASH pufr). Zachycená DNA byly eluována (ELU pufr). Následovalo alkoholové srážení. K DNA byl přidán isopropanol, směs byla promíchána a ponechána 2 min při RT, poté byla centrifugována (5415R, Eppendorf;  $14000 \times g$ , 30 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant byl odstraněn a DNA byla promyta 70% ethanolem. Směs byla ponechána 5 min při RT a opět následovala centrifugace ( $14000 \times g$ , 10 min při RT). Supernatant byl odstraněn, zbytek ethanolu byl odpařen ve vakuové odparce (SDP1010 SpeedVacSystem, Thermo Savat). Získaná DNA byla resuspendována v  $\text{TE}^{-1}$  pufru.

#### 4.2.6 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda používaná k *in vitro* namnožení (tzv. amplifikaci) specifického úseku molekuly DNA (tzv. templátu). Metoda byla použita k amplifikaci genu *lmbW*. Jednou z esenciálních složek reakční směsi jsou synteticky připravené primery, nukleotidové sekvence komplementární každý k jednomu kraji množeného úseku. Primery pro amplifikaci *lmbW* byly navrhovány pomocí programu Geneious. Samotná reakce probíhala v PCR-cykleru (TGradient Thermocycler 96, Biometra). Složení reakční směsi a reakční podmínky a ukazuje Tab. 4.1, resp. Tab. 4.2.

Složení PCR reakční směsi	
Látka:	Objem:
2, 6 M betain	25 $\mu\text{l}$
5 $\times$ EHF* pufr s 7,5 mM $\text{MgCl}_2$	10 $\mu\text{l}$
$\text{dH}_2\text{O}$	8 $\mu\text{l}$
DMSO	2,5 $\mu\text{l}$
100 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pLK6	1 $\mu\text{l}$
směs dNTP (10 mM každý dNTP)	1 $\mu\text{l}$
primer $W_{\text{fw}}$	1 $\mu\text{l}$
primer $W_{\text{rev}}$	1 $\mu\text{l}$
5 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ EHF* polymerasa	0,5 $\mu\text{l}$
celkový objem reakce	50 $\mu\text{l}$

\* EHF – pufr i polymerasa jsou součástí Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR Systému (Roche).

Tab. 4.1: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci genu *lmbW*.

PCR reakční podmínky				
Krok:	Teplota:	Délka:	Počet cyklů:	Poznámka:
1	94 °C	2 min	1	iniciace denaturace
2	68 °C	pauza	1	časový prostor pro přidání polymerasy
3	94 °C	40 s	35 (střídá se krok 3,4,5)	denaturace řetězců
4	50 °C/55 °C/60 °C	30 s		nasedání primerů
5	72 °C	1,5 min		polymerační reakce
6	72 °C	7 min	1	dosyntetizování řetězců

Tab. 4.2: Podmínky PCR pro amplifikaci genu *lmbW*.

#### 4.2.7 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

Agarosová elektroforéza je separační metoda využívající odlišné pohyblivosti částic v agarosovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost závisí na molekulové hmotnosti (u DNA počet bp) a náboji separované molekuly, intenzitě elektrického pole a porozitě gelu (obsah agarosy v gelu). DNA se vzhledem ke svému negativně nabitým fosfátovým skupinám pohybuje směrem k anodě. K separaci DNA byl používán 1% agarosový gel (agarosa rozpuštěná v TAE pufru) s přídavkem 0,005% ethidium bromidu (indikátor), separování probíhalo pod napětím 3 – 5 V/cm. Jako standard byl využíván roztok 1kb PLUS DNA Ladder (Invitrogen; velikost fragmentů (bp): 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1 000, 1 650, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000, 8 000, 9 000, 10 000, 11 000, 12 000), k nanášeným vzorkům byl přidáván 10 × vzorkový pufr.

#### 4.2.8 Vyříznutí fragmentu DNA z agarosového gelu

Touto metodou lze ze směsi DNA fragmentů separovaných pomocí agarosové elektroforézy izolovat fragment o požadované velikosti. Pro práci byla využita komerční sada Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Prvním krokem je klasická agarosová elektroforéza, požadovaný fragment je po rozdělení z gelu vyříznut pod UV světlem. Vyříznutá část gelu je rozpuštěna v pufru (Membrane Binding Buffer; 60 °C), směs se přenese na kolonku. Díky vysoké iontové síle dojde k zachycení DNA k membráně kolonky, následuje centrifugace (Biofuge pico, Heraeus; 14000 × g, 1 min při RT; stejné podmínky centrifugace jsou používány i v dalších krocích). Postupnými promývacími kroky

(přidání pufru s ethanolem, centrifugace) dochází k odmytí nečistot. DNA je uvolněna díky nízké iontové síle elučního roztoku – dH<sub>2</sub>O (inkubace 1 min při RT a následná centrifugace).

#### 4.2.9 TA klonování

TA klonování bylo využito k ligaci PCR produktu (genu *lmbW*) do vektoru pGEM-T Easy. Systém využívá jednonukleotidových přesahů na PCR produktu (deoxyadenosin) a na linearizovaném vektoru (deoxythymidin), které jsou tak komplementární. Pozitivní klony jsou pak vybírány pomocí modro-bílé selekce. Systém je založený na aktivitě enzymu  $\beta$ -galaktosidasy pro jehož aktivitu jsou potřeba dva fragmenty ( $\alpha$ ,  $\omega$ ), které dohromady vytvářejí funkční enzym. Plazmid, který je vnášen do hostitelského kmene, nese gen kódující fragment  $\alpha$ , ve kterém je zároveň umístěno polyklonovací místo. Hostitelský kmen naopak musí gen pro  $\alpha$  fragment postrádat a dále musí nést gen kódující  $\omega$  fragment. Pokud do plazmidu byla úspěšně vložena cizí DNA, narostlé kolonie hostitelského kmene by měly být krémově bílé (DNA vložená do polyklonovacího místa uvnitř genu pro  $\alpha$  fragment zruší jeho čtecí rámeček, nedochází ke komplementaci a aktivní  $\beta$ -galaktosidasa se tak netvoří – ke štěpení X-gal nedochází). Pokud se cizí DNA do plazmidu nevloží, kolonie jsou modré (čtecí rámeček genu zůstal neporušený, podjednotka  $\alpha$  a  $\omega$  se spojí a tvoří aktivní enzym; Takeshita et al. 1987). K TA klonování byla využita komerční sada pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Ligační reakci řídí enzym T4 DNA ligasa katalyzující vznik fosfodiesterové vazby mezi vzájemně cizími fragmenty DNA. Po namíchání reakční směsi (Tab. 4.3) probíhala ligace 60 min při RT. Poté bylo 5  $\mu$ l reakce použito k transformaci hostitelského kmene *E. coli* JM109. Směs byla vyseta na plotny s AIX agarem. Pro další práci byly vybrány krémově bílé kolonie (pozitivní).

Ligační reakční směs	
Látka:	Objem:
2 $\times$ Rapid ligační pufr	5 $\mu$ l
50 ng PCR produkt ( <i>lmbW</i> )	X $\mu$ l
50 ng pGEM-T Easy	1 $\mu$ l
5U $\cdot$ $\mu$ l <sup>-1</sup> T4 DNA ligasy	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	do celkového objemu 10 $\mu$ l

Tab. 4.3: Složení ligační reakční směsi pro TA klonování.

#### 4.2.10 Preparace plazmidové DNA alkalickou lyzí – „hrubý miniprep“

Metoda byla používána pro izolaci DNA použité pouze k ověření vložení genu *lmbW* do vektoru pGEM-T Easy. Vzhledem k tomu, že s DNA není dále pracováno, je pro preparaci možné využít roztoky připravené přímo v laboratoři, jejichž použitím nezískáme tak čistou DNA jako u komerčních sad. Princip metody je ale obdobný, jako v kapitole 4.2.5. Jedna kolonie testovaného kmene byla zaočkována do 4 ml LB média (s příslušným antibiotikem). Kultura byla ponechána při 37 °C, 200 RPM přes noc. Následně byly buňky odděleny centrifugací (4000 × g, 15 min při 4 °C) a resuspendovány ve 100 µl Roztoku 1, následně bylo přidáno 200 µl Roztoku 2. Směs byla opatrně míchána převrácením (5 min). Následovala neutralizace přidáním 150 µl Roztoku 3 a centrifugace (14000 × g, 15 min při RT). K supernatantu, ve kterém se nachází DNA, byl dále přidán 2,5 násobek objemu ethanolu. DNA byla ponechána srážet na ledu (5 min). Vysrážená DNA byla získána centrifugací (14000 × g, 15 min při 4 °C), promyta 70% ethanolem a opět centrifugována (14000 × g, 15 min při 4 °C). Supernatant byl odstraněn, zbytek ethanolu byl odpařen při 42 °C. Vysušená DNA byla resuspendována ve 20 µl roztoku dH<sub>2</sub>O s ribonukleasou A (20 µg · ml<sup>-1</sup>).

#### 4.2.11 Preparace plazmidové DNA – metoda vazby na aktivované sklo

V této metodě je k získání čisté DNA využita kolonka s aktivovaným sklem. K práci byla využita komerční sada Wizard®<sup>PLUS</sup> SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Princip lyze buněk je obdobný jako ve dvou již popsanych metodách (Kap. 4.2.5 a 4.2.10). K buňkám byl přidán resuspendační a lyzační roztok. Směs byla promíchána převrácením (4 min). Následně byla přidána alkalická proteasa a po 4 min neutralizační roztok. Lyzát byl centrifugován (14000 × g, 10 min při RT). Supernatant byl přenesen na kolonku s aktivovaným sklem. Díky vysoké iontové síle dojde k vazbě DNA na stěnu kolonky. Následují dva promývací kroky. Posledním krokem je eluce sterilní dH<sub>2</sub>O, která z aktivovaného skla DNA uvolní.

#### 4.2.12 Sekvenování úseku DNA

Sekvenováním byla ověřena správnost sekvence genu *lmbW* vloženého do klonovacího vektoru pGEM-T Easy. DNA sekvenace je poskytována servisně v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR. Sekvenční data byla zpracována pomocí programu Geneious.

#### 4.2.13 Štěpení DNA restrikčními enzymy a defosforylace štěpených konců

Restrikční enzymy rozpoznávají na molekule DNA specifické sekvence a v těchto sekvencích jsou schopné molekulu DNA štěpit. K práci byly využity dva restrikční enzymy, endonukleasy *NdeI* a *XhoI*. Enzymy byly použity pro vyštěpování sekvence *lmbW* z vektoru pGEM-T Easy a dále ke štěpení vektoru pET-42b(+). V obou reakcích bylo postupováno dle návodu výrobce. Při přípravě linearizovaného vektoru pET-42b(+) byla bezprostředně po naštěpení do reakce navíc přidána alkalická fosfatasa CIP (5U na 3  $\mu\text{g}$  pET-42b(+)) zajišťující defosforylací volných konců a tím zabránění recirkularizace vektoru.

#### 4.2.14 Ligační reakce fragmentu DNA do vektoru pET-42b(+)

Ligační reakce probíhala 60 min při RT, poté byla ligační směs použita k transformaci příslušného kmene *E. coli*. Negativní kontrolou byla ligační směs ve stejném složení, ale bez inzertu. Složení reakce ukazuje Tab. 4.4.

Ligační reakční směs	
Látka:	Objem:
10 $\times$ T4 DNA ligační pufr	2 $\mu\text{l}$
inzert*	X $\mu\text{l}$
vektor	X $\mu\text{l}$
10 mM ATP	1 $\mu\text{l}$
5U $\cdot \mu\text{l}^{-1}$ T4 DNA ligasy	1 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	do celkového objemu 20 $\mu\text{l}$

\* vhodné množství inzertu do reakce je stanoveno molárním poměrem 3:1 (inzert:vektor)

Tab. 4.4: Složení ligační reakční směsi.

#### 4.2.15 Produkce rekombinantního proteinu LmbW

Heterologní produkce proteinů je metoda, která umožňuje pomocí heterologního producenta s vloženým expresním systémem získat produkt zvoleného genu. Pro expresi byl používán kmen *E. coli* BL21(DE3) a *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL. Buňky byly transformovány expresním vektorem a přes noc byly selektovány na LB agaru s příslušnými antibiotiky. Čerstvě narostlé kolonie byly zaočkovány do předeřátého LB média (s příslušnými antibiotiky; OD<sub>600</sub> 0,1 – 0,2). Kultura byla ponechána růst při 37 °C, 200 RPM. Po dosažení exponenciální fáze růstu (OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,8) byla exprese vloženého genu indukována přidáním IPTG (finální koncentrace 0,4 mM; vzorek, který sloužil jako negativní

kontrola, byl odebrán ještě před indukcí). Expresce poté probíhala při 17 °C přes noc, při 28 °C 4 hod nebo při 37 °C 1 hod. Následně byly buňky sklizeny centrifugací (4000 × g, 15 min při 4 °C) a dále zpracovávány či zmrazeny pro pozdější použití (-20 °C).

#### **4.2.16 Dezintegrace buněk sonikací**

Při práci s proteiny byly vzorky drženy na ledu či v ledové lázni, používané roztoky byly vždy vychlazené. Tímto se eliminuje riziko denaturace proteinů.

Buňky získané v předchozím kroku (Kap. 4.2.15) byly resuspendovány v sonikačním pufru (v 1/20 původního kultivačního objemu) a rozbity ultrazvukovým homogenizátorem (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer). 1 ml suspenze byl sonikován 3 × 10 s (s odstupem min. 30 s), 7,5 ml suspenze bylo sonikováno 3 × 10 s (s odstupem min. 30 s) a 3 × 20 s (s odstupem min. 90 s). Buněčná suspenze byla centrifugována (14000 × g, 15 min při 4 °C). Supernatant i sediment byly poté testovány na přítomnost rekombinantního proteinu pomocí SDS-PAGE.

#### **4.2.17 Purifikace proteinu metaloafinitní chromatografií**

Metaloafinitní chromatografie je separační metoda využívající schopnosti přechodných kovů (např. nikl) vázat sloučeniny, které obsahují dusík, síru a kyslík. Pro práci byla využita kolonka (HiTrap™ Chelating HP 1 ml, GE Healthcare Life Sciences), která je naplněna sorbentem s navázanou iminoctovou kyselinou. Kolonku je nutné těsně před použitím promýt 1M roztokem NiSO<sub>4</sub>. Nikelnaté ionty se váží ke kyselině iminoctové a slouží jako ligand pro histidinovou kotvu proteinu LmbW (LmbW je produkován již s touto kotvou). Zachycený protein je uvolněn pufrům obsahujícím imidazol. Kolonky jsou v laboratoři uchovávány ve 4 °C naplněné 20% ethanolem. Před použitím je nutné ethanol odstranit. Kolonka byla připravena následujícím způsobem: promytí 5 ml dH<sub>2</sub>O, promytí 5 ml sonikačního pufru, nabití 0,5 ml 1M NiSO<sub>4</sub>, promytí 5 ml dH<sub>2</sub>O, promytí 5 ml sonikačního pufru. Na připravenou kolonku byl nanesen vzorek (supernatant získaný v předchozím kroku). Poté byla kolonka promyta 5 ml sonikačního pufru a dále 5 ml pufru s imidazolem (50 mM, 100 mM, 250 mM), přičemž tyto frakce byly jímány po 1 ml a následně testovány na přítomnost proteinu (barvení pomocí Ponceau S, SDS-PAGE). Pufry byly do kolonky přiváděny pomocí peristaltické pumpy P-1 (Pharmacia Biotech).

#### **4.2.18 Dialýza**

Dialýza je metoda založená na difuzi látek přes membránu. Pro práci byla využita membrána VISKING® dialysis tubing 20/32 (Serva). Membrána je nepropustná pro velké částice (LmbW), nízkomolekulární látky (např. imidazol, NaCl) však procházet mohou. Díky difuzi tak dochází k vyrovnání koncentrace nízkomolekulárních látek na obou stranách membrány. Dialýza byla používána k vyředění imidazolu ze vzorku purifikovaného proteinu a dále také k převedení purifikovaného proteinu do jiného pufru. Membrána byla nejdříve změkčena povařením 15 – 20 min v dH<sub>2</sub>O a promyta 5 ml dialyzačního pufru. Poté byla membrána naplněna vzorkem (~ 1 ml). Dialýza proteinu probíhala za stálého míchání (magnetické míchadlo, Variomag) ve 2 l dialyzačního pufru při 4 °C přes noc.

#### **4.2.19 Kvalitativní zjištění přítomnosti proteinů ve vzorku pomocí Ponceau S**

Toto rychlé kvalitativní stanovení proteinu ve vzorku bylo používáno bezprostředně po purifikaci proteinu za účelem zjištění, v jaké eluční frakci se protein LmbW nachází. 5 µl z každé frakce bylo nanášeno na nitrocelulosovou membránu Protran® BA85; 0,45 µm (Whatman). Po viditelném zaschnutí nanášky (~ 10 min) byla membrána převrstvena roztokem Ponceau S, který se specificky váže a barví proteiny červeně (5 min). Poté byla barva odstraněna a červené pozadí bylo vymyto pod tekoucí vodou. Tímto byla detekována přítomnost proteinů (červený signál).

#### **4.2.20 SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)**

SDS-PAGE je separační metoda, při které se využívá vertikální elektroforetické jednotky s polyakrylamidovým gelem. Stejně jako při klasické agarosové elektroforéze jsou analyty též děleny v elektrickém poli. Metoda se používá k rozdělení denaturovaných proteinů. Denaturace je zprostředkována povařením vzorku proteinu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) a dále v přítomnosti β-merkptoethanolu, který redukuje disulfidické můstky mezi podjednotkami multimerních proteinů. Proteiny jsou obalovány uniformním množstvím SDS (vztaženo na µg proteinu), který jim tak uděluje na jednotku hmotnosti unifikovaný náboj. Proteiny se tedy v gelu pohybují jako podjednotky a skoro výhradně dle své molekulové hmotnosti. SDS-PAGE byla použita k analýze směsi proteinů z dezintegrovanych buněk a také k analýze jednotlivých elučních frakcí získaných

při purifikaci LmbW. Ke vzorkům byl přidán 2 × vzorkový pufr pro SDS-PAGE (k sedimentu získaného z 1 ml sonikované buněčné suspenze bylo přidáno 250 µl pufr, k supernatantu a jednotlivým elučním frakcím bylo přidáno ekvivalentní množství tohoto pufru). Poté byly vzorky ponechány v termobloku při teplotě 80 °C 15 min a následně byly naneseny na polyakrylamidový gel. Jako standard byl využit komerční PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific; velikosti standardních proteinů (Da): 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250). Složení gelu je uvedeno v Tab. 4.5. K samotné elektroforéze, která probíhala v elektrodovém pufru pro SDS-PAGE při konstantním napětí 200 V, byla využita komerční vertikální aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Elektroforéza byla ukončena poté, co migrující čelo dosáhlo konce separačního gelu. Proteiny byly detekovány obarvením v lázni s barvicím roztokem (15 min), barva byla odstraněna a pozadí bylo odbarveno přelitím horkým odbarvovacím roztokem. Odbarvovací roztok byl ještě 1 – 2 × vyměněn (již nezahříván) a gel v něm byl ponechán přes noc.

Složení gelu pro SDS-PAGE		
Látka:	Množství:	
	10% separační gel	zaostřovací gel
Akrylamid (1,7% bisakrylamid ,40% akrylamid)	1 250 µl	112 µl
Tris-HCl pufr A	1 000 µl	-
Tris-HCl pufr B	-	126 µl
H <sub>2</sub> O (deionizovaná)	2 625 µl	875 µl
SDS (4%)	125 µl	32 µl
APS (30%)	5 µl	2,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

Tab. 4.5: Složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE.

#### 4.2.21 BN-PAGE (modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza)

BN-PAGE je druh vertikální elektroforézy určený k rozdělení proteinů či multiproteinových komplexů v enzymaticky aktivní formě. Důležitou látkou, používanou při BN-PAGE, je aniontové barvivo Coomassie Blue G-250, které se váže na proteiny, ale nedenukuje je. Uděluje proteinům negativní náboj a posouvá jejich isoelektrický bod směrem do kyselé oblasti. Při pH 7, ve kterém elektroforéza probíhá, se tak k anodě mohou pohybovat i bazické proteiny. Samotná elektroforéza probíhá v chladu (~ 4 °C), taktéž všechny používané roztoky a gel jsou předem vychlazené. Jako standard byl využit komerční kalibrační kit (Pharmacia; velikosti standardních proteinů (Da): 67 000, 140 000, 232 000,

440 000, 669 000), prášek, který je před použitím nutno naředit 100 µl sonikačního pufru. Vzorky i standard byly smíchány s 3 × vzorkový pufr pro BN-PAGE (v poměru 2:1) a rovnou nanášeny na gel. BN-PAGE probíhala ve stejné aparatuře jako SDS-PAGE. Mezi skla aparatury byl po okraj nalit katodový pufr pro BN-PAGE (modrý, obsahuje Coomassie Brilliant Blue G-250), do elektroforetické vany, v níž je aparatura usazena, byl do vyznačené doporučené výšky nalit anodový pufr. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V, dokud vzorek nepřestoupil do separačního gelu (~ 30 min), následně bylo napětí zvýšeno na 300 V. V momentu, kdy čelo migrujících částic dosáhlo konce dělicího gelu, byla elektroforéza ukončena. Barvení gelu probíhalo stejně jako u SDS-PAGE.

Při BN-PAGE byl používán gradientový gel, který je charakteristický tím, že se směrem od startu postupně zmenšuje velikost pórů. Pomocí speciální aparatury (Hofer SG50, Hofer) je separační gel namícháván ze dvou paralelně připravených gelů rozdílné hustoty (8 % a 18 %). Aparatura zajišťuje tvorbu gradientu. Dále je postup stejný jako při přípravě separačního gelu pro SDS-PAGE. Složení gelu ukazuje Tab. 4.6.

<b>Složení separačního gelu pro BN-PAGE</b>			
<b>Látka:</b>	<b>Množství:</b>		
	<b>8% separační gel</b>	<b>18% separační gel</b>	<b>zaostřovací gel</b>
Akrylamid (1,5% bisakrylamid, 48% akrylamidem)	483 µl	916 µl	83 µl
3 × gel pufr	1 000 µl	833 µl	333 µl
glycerol	-	0,5 g	-
H <sub>2</sub> O (deionizovaná)	1 500 µl	347 µl	580 µl
APS (30%)	5,5 µl	2,8 µl	2,8 µl
TEMED	1,6 µl	0,8 µl	0,8 µl

Tab. 4.6: Složení polyakrylamidového gelu pro BN-PAGE.

#### 4.2.22 Ultrafiltrace

Komerční kolonky Microcon® (Millipore) byly využity pro převedení vzorků proteinu do jiného pufru, než do kterého byl protein LmbW původně dialyzován. Kolonka má uvnitř celulosovou membránu, centrifugační silou jsou pak prostorově odděleny nízkomolekulární látky od proteinu. Zatímco nízkomolekulární látky membránou projdou do sběrné mikrozkušky, ze které jsou pak odstraněny, protein zůstává zachycen nad membránou. Postupováno bylo dle přiloženého protokolu. Filtr YM-50 byl vložen do mikrozkušky a byl naplněn maximálně 500 µl vzorku proteinu. Následovala centrifugace (14000 × g,

24 min při 4 °C). Poté byl filtr 2 × naplněn 500 µl pufru, do něhož měl být protein převeden a opět následovala centrifugace (za stejných podmínek). Nakonec byl filtr v opačné orientaci vložen do nové mikrozkušavky a centrifugací (1000 × g, 3 min při 4 °C) byl protein uvolněn.

#### 4.2.23 Testování enzymové aktivity proteinu LmbW

Enzymová aktivita proteinu LmbW byla testována *in vitro*. Základními složkami v reakci byly kromě samotného proteinu jeho substrát (látka 4) a donor methylové skupiny (SAM). Látka 4 byla připravena v naší laboratoři (Novotná et al. 2004). Uchovávána je v -70 °C v pevném skupenství. Pro reakce byl připraven 200mM zásobní roztok (rozpuštěno v dH<sub>2</sub>O). SAM je látka komerčně vyráběná (S-(5'-adenosyl)-L-methionin chlorid dihydrochlorid, Sigma-Aldrich), pro reakce byl připraven 40mM zásobní roztok (rozpuštěno v dH<sub>2</sub>O). Stálé pH v reakci zajišťoval HEPES-NaOH, Tris-HCl či glycin-HCl pufr. Testovány byly různé podmínky. Sledován byl vliv teploty a délky reakce, vliv koncentrace reagujících látek, vliv pH či vliv NaCl. Testována byla i schopnost enzymu LmbW přenášet na svůj substrát jinou donorovou skupinu než methyl. Analýza reakčních směsí byla prováděna pomocí UHPLC-UV-MS.

#### 4.2.24 Chemická syntéza analogů SAM

Analogy SAM byly připravovány za účelem testování enzymové aktivity LmbW. Výchozím substrátem pro syntézu analogů SAM byl S-adenosyl-L-homocystein (SAH), látka, která se od molekuly SAM liší nepřítomností donorové methylové skupiny. Do stejného místa, kde je v molekule SAM připojena tato donorová methylová skupina, bylo k molekule SAH zkoušeno pomocí chemické syntézy připojit delší alkylové řetězce. Zdrojem těchto alkylových řetězců byl allyl bromid, krotyl bromid a ethyl bromid. Syntéza některých z těchto analogů již byla publikována (Stecher et al. 2009). K přípravě byl použit modifikovaný protokol. Jednotlivé látky a katalyzátor byly smíchány a rozpuštěny v HCOOH (složení reakčních směsí ukazuje Tab. 4.7). Směs se míchala pomocí magnetického míchadla přes noc v digestoři při RT. Následující den byly vzniklé SAM analogy přečištěny extrakcí diethyletherem následujícím způsobem. K 0,5 ml reakční směsi bylo přidáno 2,5 ml dH<sub>2</sub>O a 2,5 ml diethyletheru. Směs byla důkladně promíchána (Vortex MS2 Minishaker IKA, IKA-Works). Po oddělení obou fází (organické a vodné) byla vrchní organická fáze odstraněna. Poté byl znovu přidán diethylether a extrakce byla provedena podruhé a následně

potřetí. Po poslední extrakci bylo z vodné fáze odebráno 0,5 ml roztoku připraveného analogu – produkt byl analyzován pomocí UHPLC-UV-MS.

<b>Složení reakční směsi pro přípravu SAM analogů</b>	
<b>Látka:</b>	<b>Množství:</b>
SAH	5,202 nM
allyl bromid / krotyl bromid / ethyl bromid	312,120 nM
AgTOF (katalyzátor)	15,608 nM
HCOOH (konc.)	1 ml

Tab. 4.7 Složení reakční směsi pro přípravu analogů SAM – SA-allylu, SA-krotylu a SA-ethylu.

#### 4.2.25 Vyhodnocování vznikajících produktů pomocí UHPLC-UV-MS

Ultra **H**igh-**P**erformance **L**iquid **C**hromatography (UHPLC) je analytická separační metoda s následnou detekcí dělených složek. Separace látek probíhá na chromatografické koloně naplněné vhodnou stacionární fází. Vzorek je po nanesení na kolonu unášen mobilní fází, přičemž každá látka ve směsi interaguje se stacionární fází rozdílně. Dělené látky postupují kolonou jinou rychlostí a liší se tedy svým retenčním časem. V okamžiku, kdy separovaná složka opouští kolonu, je ještě analyzována UV/VIS detekcí a hmotnostní spektrometrií (MS). UV/ VIS detekována může být látka, která je schopná absorbovat světlo vlnové délky 200 – 800 nm (musí obsahovat chromofor, např. systém dvojných vazeb). Výstupem je UV chromatogram a UV absorpční spektrum. Hmotností spektrometrie determinuje hmotu molekuly měřením poměru hmota/náboj ( $m/z$ ) jejího iontu ve vakuu. Výsledkem tohoto procesu je chromatogram a hmotnostní spektrum.

Všechna měření byla prováděna na analyzátoru Acquity UPLC (Waters), který je spojený s detektorem DAD-UV (detektor diodového pole 2996) a dále s MS detektorem LCT Premier XE (analyzátor ToF, doba letu; **time of flight**). K měření byly využity stejné podmínky jako při stanovování látky **4** (Olšovská et al. 2007). Směs byla dělena na koloně Acquity BEH C<sub>18</sub> (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm; Waters) při konstantní teplotě 30 °C. Jako mobilní fáze byly využity 0,1% HCOOH a methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na 0,4 ml · min<sup>-1</sup>. Posloupnost průtoku mobilní fáze kolonou po nadávkování vzorku (5 μl): lineární gradientová eluce (min/% methanolu: 0/5; 1,5/5; 5,5/9,4), výplach kolony (1 min, methanol), ekvilibrace kolony (1,5 min, 5% methanol). DAD-UV detektorem byly zachycovány složky absorbující vlnovou délku 200 – 600 nm. Podmínky analýzy nastavené na hmotnostním spektrometru shrnuje Tab. 4.8. Vyhodnocení bylo provedeno

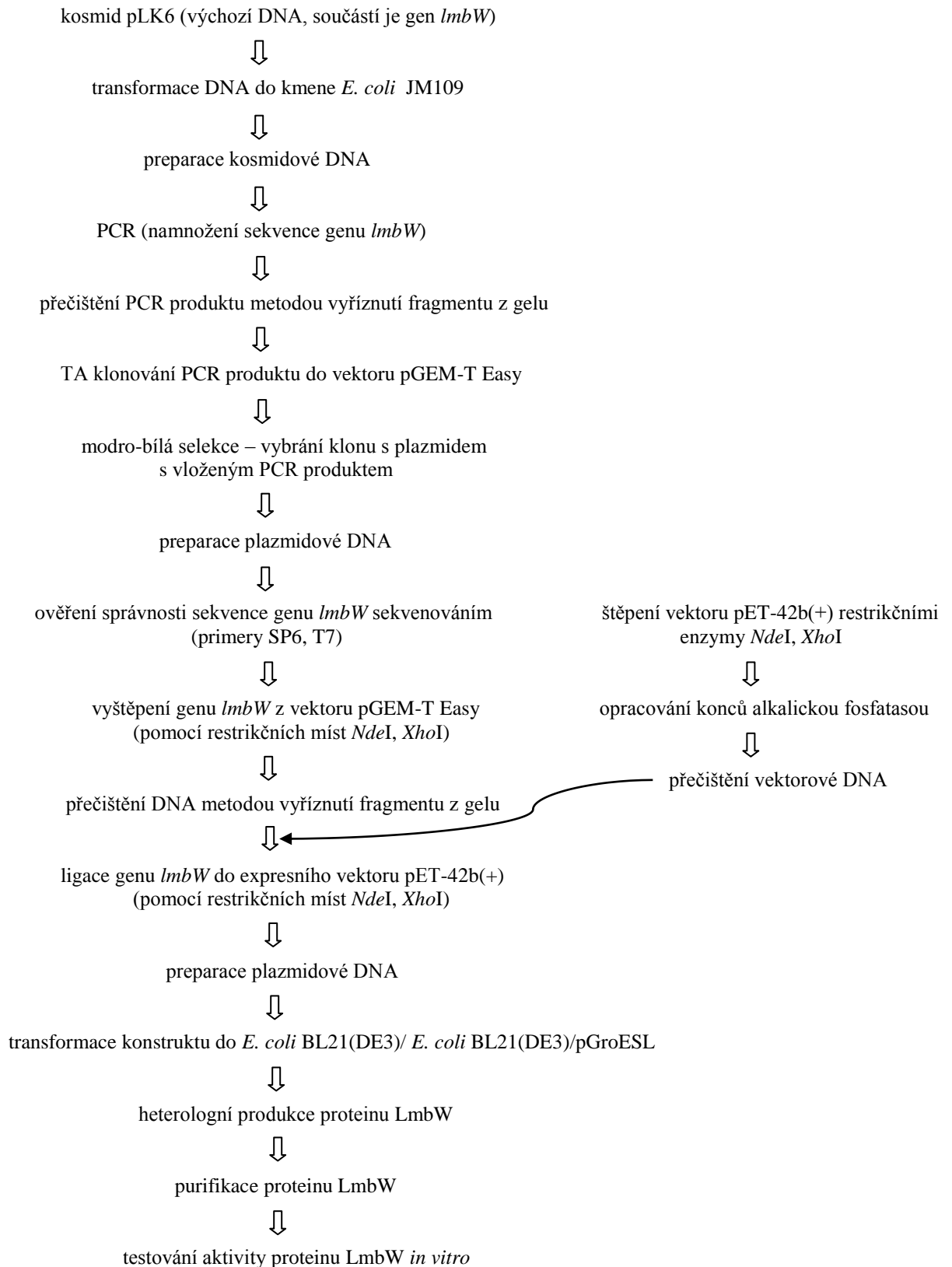
z výsledných chromatogramů získaných UV detekcí pomocí programu MassLynx™ 4.1 (Waters). Integrací píku nepotřebovaného substrátu (v UV záznamu) byla získána hodnota – plocha píku. Porovnání získaných hodnot vzorků s negativní kontrolou lze určit efektivitu reakce.

<b>Podmínky pro MS detekci</b>	
<b>Podmínka:</b>	<b>Hodnota:</b>
rozsah měřených hodnot ( $W^+$ mód)	100 – 1000 $m/z$
referentní látka	2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ leucin-enkefalin acetát
rychlost dávkování referentní látky	5 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
doba skenu	0,1 s
pauza mezi skeny	0,01 s
pauza mezi skeny pro referentní látku	0,1 s
pauza mezi skeny při změně polariry látky	0,3 s
napětí vložené na kapiláru	2400 V
napětí vložené na vstup do analyzátoru	240 V
průtok dusíku (desolvatační plyn)	800 $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
průtok dusíku při vstupu do analyzátoru	50 $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
teplota dusíku	350 °C
teplota bloku iontového zdroje	120 °C

Tab. 4.8: Podmínky analýzy nastavené na hmotnostně spektrometrickém detektoru.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Zjednodušené schéma experimentu



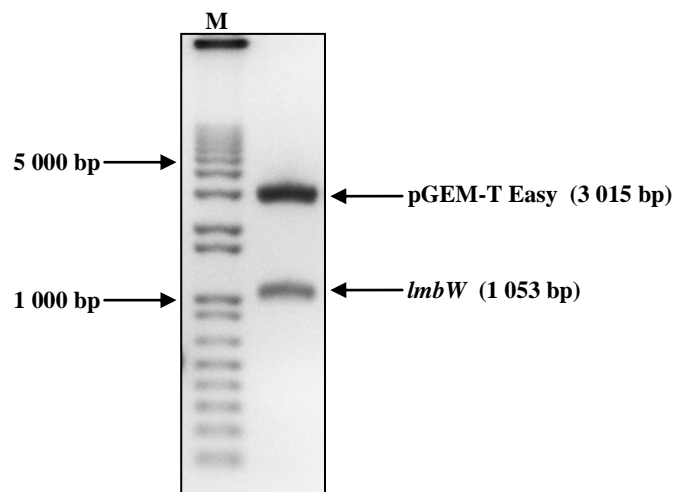
## 5.2 Příprava expresního vektoru

### 5.2.1 Amplifikace genu *lmbW*

Gen *lmbW* byl amplifikován z kosmidu pLK6 pomocí PCR. Pro amplifikaci byly navrženy dva primery komplementární ke koncům genu *lmbW*. Sekvence primeru  $W_{fw}$  byla navržena tak, aby obsahovala restrikční místo *NdeI*, které zároveň obsahuje start kodon genu *lmbW*, sekvence primeru  $W_{rev}$  byla navržena tak, aby obsahovala restrikční místo *XhoI*. Při optimalizaci podmínek PCR byl testován vliv teploty na nasedání primerů. Byl použit gradient teplot 50 °C, 55 °C a 60 °C. Výtěžek byl při všech použitých teplotách srovnatelný. PCR produkt byl přečištěn z gelu.

### 5.2.2 Vložení genu *lmbW* do vektoru pGEM-T Easy

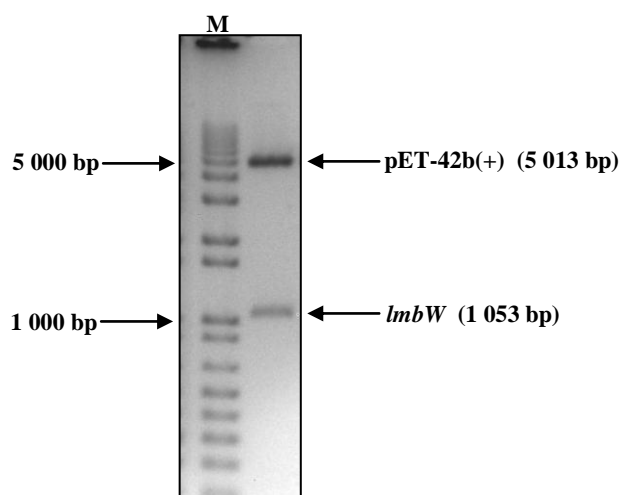
Gen *lmbW* byl pomocí TA klonování vložen do vektoru pGEM-T Easy. Vytvořeným konstruktem byly transformovány buňky *E. coli* JM109. Modro-bílou selekcí byly nalezeny pozitivní kolonie, které byly kultivací namnoženy, a poté z nich byla izolována plazmidová DNA. Vložení *lmbW* do vektoru bylo ověřeno kontrolním vyštěpením tohoto genu z vektoru (Obr. 5.1). Následně byla správnost vložené sekvence zkontrolována DNA sekvenováním.



Obr. 5.1: Kontrolní štěpení vektoru pGEM-T Easy s vloženým genem *lmbW* pomocí restrikčních enzymů *NdeI* a *XhoI* (agarosová elektroforéza). M = standard molekulové velikosti DNA.

### 5.2.3 Vložení genu *lmbW* do expresního vektoru pET-42b(+)

Cirkulární expresní vektor pET-42b(+) byl štěpen restričními enzymy *NdeI* a *XhoI*. Recirkularizaci bylo zabráněno přidáním alkalické fosfatasy. Gen *lmbW* štěpený z vektoru pGEM-T Easy byl přečištěn a pomocí restričních míst *NdeI* a *XhoI* byl ligován do štěpeného expresního vektoru pET-42b(+). Připraveným konstruktem byly transformovány buňky *E. coli* JM109. Z narostlých kolonií byla získána plazmidová DNA. Vložení *lmbW* do vektoru bylo ověřeno kontrolním vyštěpením tohoto genu z vektoru (Obr. 5.2).



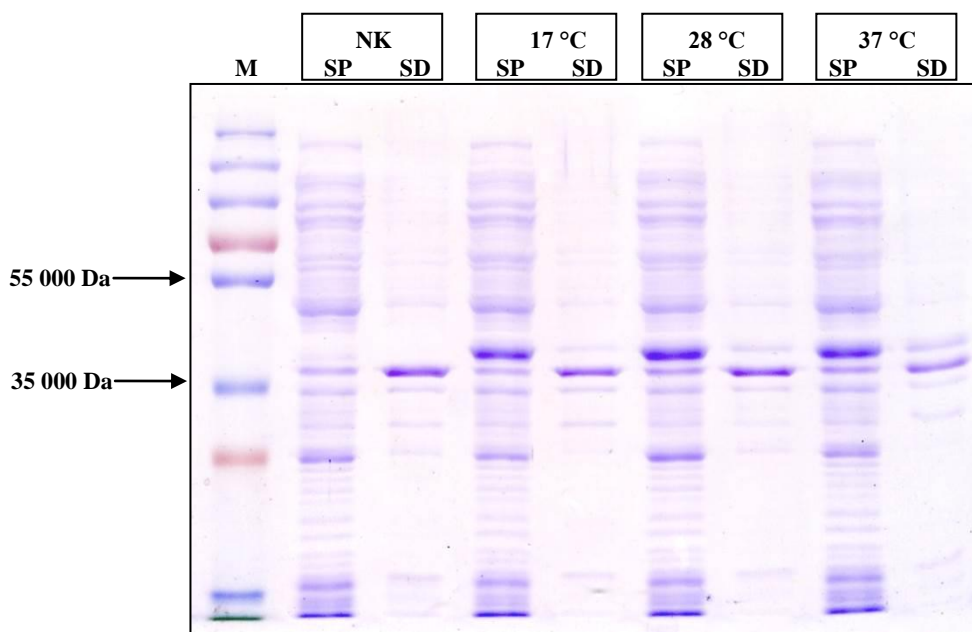
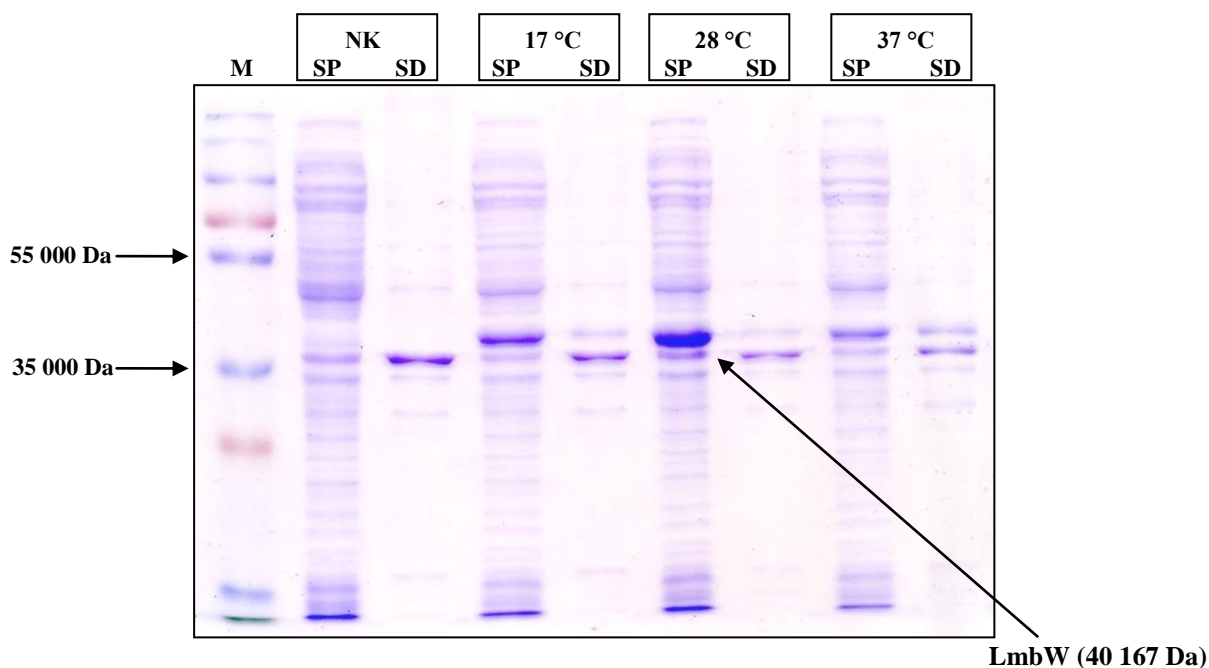
Obr. 5.2: Kontrolní štěpení vektoru pET-42b(+) s vloženým genem *lmbW* pomocí restričních enzymů *NdeI* a *XhoI* (agarosová elektroforéza). **M** = standard molekulové velikosti DNA.

## 5.3 Heterologní produkce proteinu LmbW

K nadprodukcí rekombinantního proteinu LmbW bylo využito kmene *E. coli* BL21(DE3) a *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL. Pro zjištění optimálních podmínek nadprodukce LmbW byla indukovaná kultura stejnoměrně rozdělena na tři paralelní kultivace (A, B, C), které byly dále kultivovány v rozdílných postindukčních podmínkách: kultivace A v 17 °C 24 hod, kultivace B ve 28 °C 4 hod a kultivace C ve 37 °C 1 hod. Buňky byly sklizeny centrifugací, resuspendovány a sonikovány. Další centrifugací byl oddělen buněčný pelet od supernatantu. Připravené vzorky negativní kontroly, supernatantů a sedimentů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 5.3). Největšího výtěžku bylo dosaženo u kmene *E. coli* BL21(DE3) při postindukčních podmínkách 28 °C/4 hod. Tyto podmínky tedy byly používány pro všechny následující exprese. Pozitivní vliv produkce chaperoninů na produkci

LmbW nebyl zaznamenán. Expresí bylo průměrně získáno 2,8 mg LmbW na 100 ml kultivačního média.

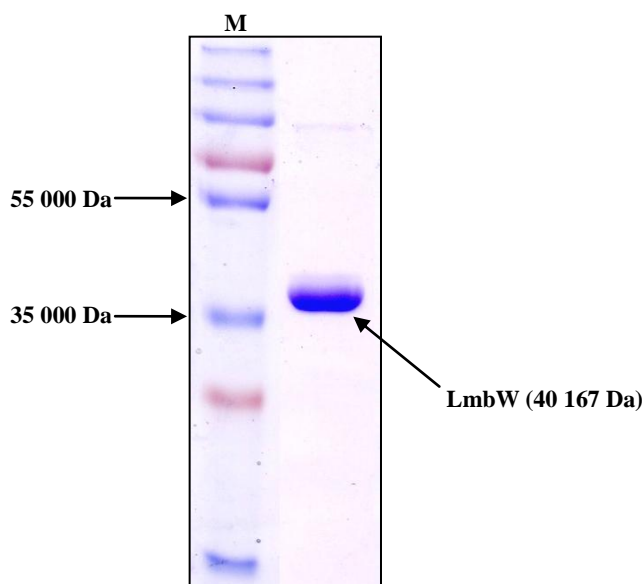
Vypočtená molekulová hmotnost proteinu LmbW včetně histidinové kotvy je 40 167 Da.



Obr. 5.3: Nadprodukce proteinu LmbW ve dvou různých producentech (SDS-PAGE): (a) *E. coli* BL21(DE3) (b) *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL. V obou případech kultivace probíhala ve třech různých postindukčních podmínkách (17 °C/24 hod, 28 °C/4 hod, 37 °C/1 hod). **M** = standard molekulové hmotnosti; **NK** = negativní kontrola; **SP** = vzorky připravené ze supernatantu; **SD** = vzorky připravené z buněčného sedimentu.

## 5.4 Purifikace proteinu LmbW

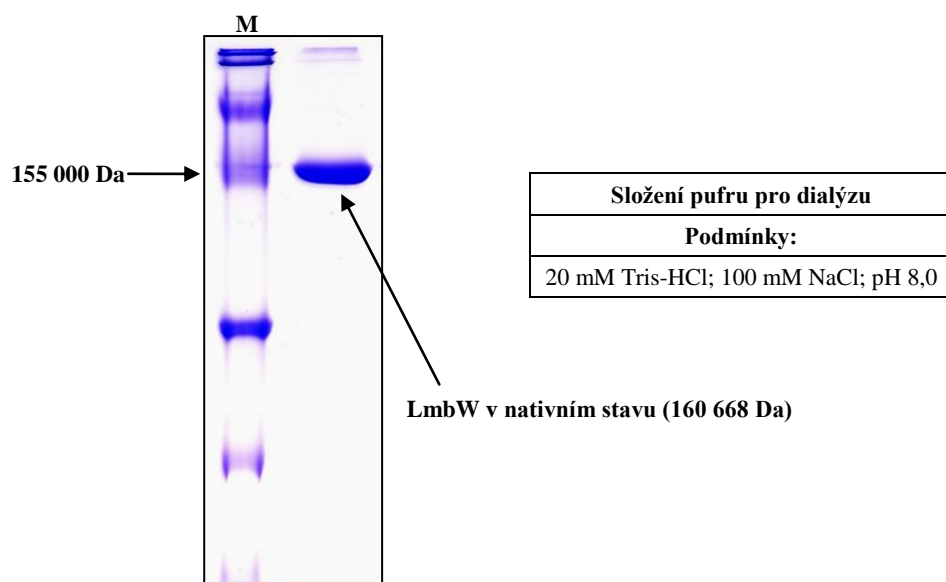
Pro purifikaci LmbW metaloafinitní chromatografií byly jako optimální určeny následující podmínky: po nanesení vzorku na kolonku promytí 5 ml sonikačního pufru se 100mM imidazolem, eluce 5 ml sonikačního pufru s 250mM imidazolem. Imidazol byl ze vzorku odstraněn dialýzou.



Obr. 5.5. Purifikovaný protein LmbW (SDS-PAGE), který byl z kolonky uvolněn sonikačním pufrům s 250mM imidazolem, na gelu je nanesena 2. frakce. **M** = standard molekulové hmotnosti.

### 5.4.1 Určení kvartérní struktury proteinu LmbW

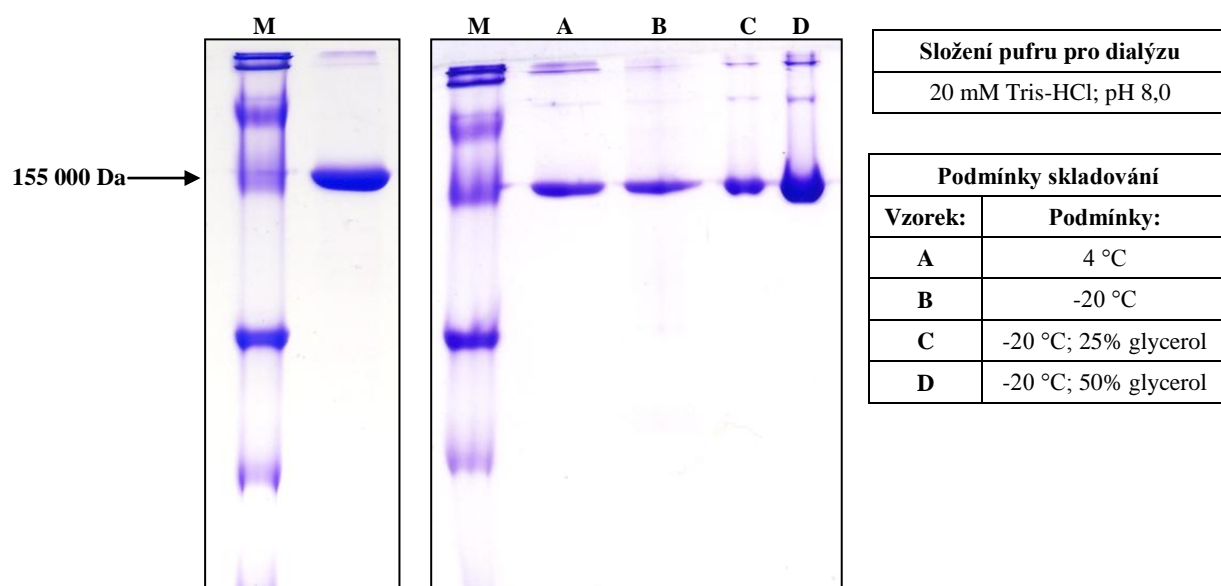
K určení podjednotkového uspořádání proteinu LmbW byla využita BN-PAGE. Na gel byl nanesen vzorek purifikovaného LmbW (Obr. 5.6). Ze snímku je patrné, že LmbW má za nativních podmínek BN-PAGE pohyblivost odpovídající velikosti kolem 155 000 Da, což zhruba odpovídá čtyřnásobku vypočtené molekulové hmotnosti monomeru LmbW (160 668 Da – včetně histidinových kotev). LmbW je tedy ve svém nativním stavu zřejmě homotetramer.



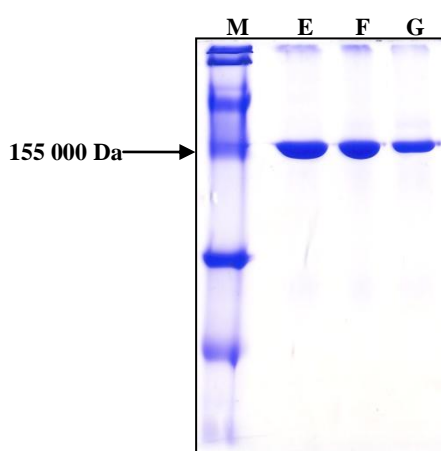
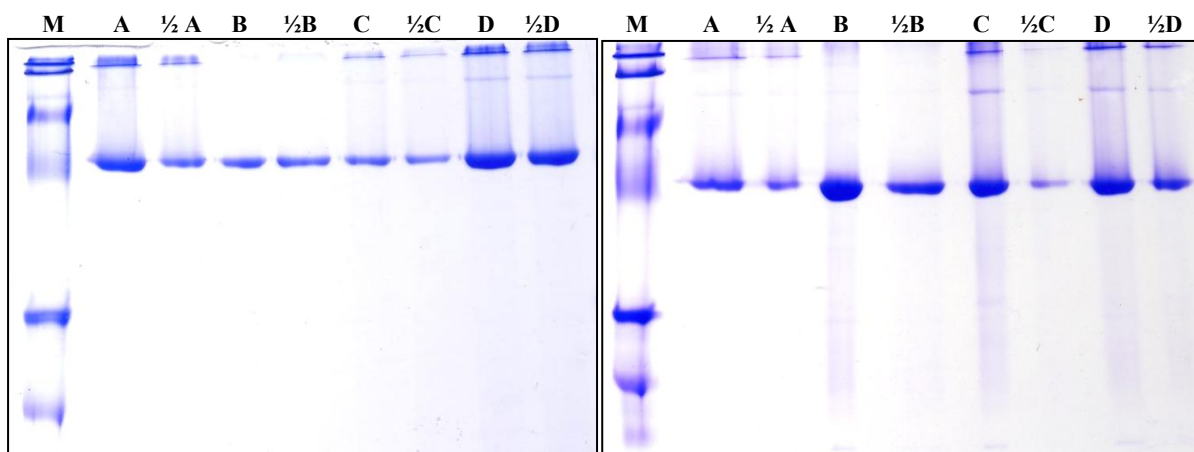
Obr. 5.6: Pohyblivost purifikovaného proteinu LmbW za nativních podmínek (BN-PAGE). **M** = standard molekulové hmotnosti.

#### 5.4.2 Testování stability proteinu LmbW

Pro stanovení stability LmbW byl testován vliv skladovacích podmínek (teploty skladování a glycerolu; Obr. 5.7), vliv různých pH (pH 7,0 – 10,0; různé pufrů; Obr. 5.8) a vliv NaCl (Obr. 5.9). Stabilita byla testována pomocí BN-PAGE. Pro LmbW je vhodnější vyšší pH (8,0 – 10,0) a prostředí bez přídavku NaCl. Po delší době skladování ve 4 °C začíná protein LmbW agregovat (v řádech týdnů). Pro dlouhodobé skladování byla tedy volena teplota -20 °C.

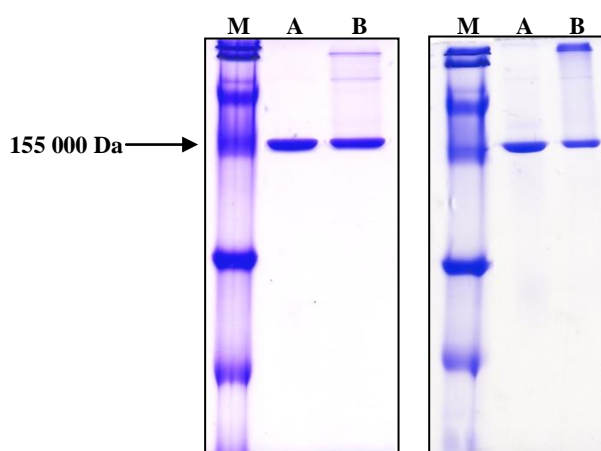


Obr. 5.7: Stabilita LmbW v různých skladovacích podmínkách (BN-PAGE). Snímek vlevo ukazuje purifikovaný protein LmbW nanesený na gel ihned po dialýze. Snímek vpravo ukazuje ten samý vzorek, aplikovaný ve stejném množství, po třech týdnech skladování v různých podmínkách (**A - D**). **M** = standard molekulové hmotnosti.



Složení pufru pro dialýzu	
Vzorek:	Podmínky:
A	25 mM HEPES-NaOH; 100 mM NaCl; pH 7,0
B	30 mM glycin-HCl; 100 mM NaCl; pH 9,0
C	20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,0
D	20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 20% glycerol; pH 8,0
E	30 mM glycin-HCl; 100 mM NaCl; pH 9,0
F	30 mM glycin-HCl; 100 mM NaCl; pH 9,5
G	30 mM glycin-HCl; 100 mM NaCl; pH 10,0

Obr. 5.8: Stabilita LmbW v různém pH (různé pufrů; BN-PAGE). Snímek vlevo nahoře ukazuje protein LmbW nanesený na gel ihned po dialýze, ve dvou různých koncentracích (c; 1/2c). Snímek vpravo nahoře ukazuje ty samé vzorky, aplikované ve stejném množství, po jednom týdnu skladování ve 4 °C. pH 8,0 a vyšší je pro LmbW vhodnější. Snímek dole ukazuje jiný vzorek purifikovaného LmbW v pH 9,0; 9,5 a 10,0 nanesený na gel ihned po dialýze. **M** = standard molekulové hmotnosti.



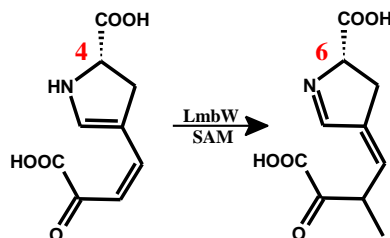
Složení pufru pro dialýzu	
Vzorek:	Podmínky:
A	50 mM Tris-HCl; pH 8,0
B	50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,0

Obr. 5.9: Vliv NaCl na stabilitu LmbW (BN-PAGE). Snímek vlevo ukazuje purifikovaný protein LmbW nanesený na gel ihned po dialýze. Snímek vpravo ukazuje ty samé vzorky, aplikované ve stejném množství, po třech týdnech skladování ve 4 °C. **M** = standard molekulové hmotnosti.

## 5.5 Testování enzymové aktivity proteinu LmbW

Pro protein LmbW byla navržena methyltransferasová aktivita (Peschke et al. 1995). První dva kroky PPL dráhy, katalyzované proteiny LmbB2 a LmbB1, jsou již prokázané *in vitro* testy s příslušnými rekombinantními proteiny (Novotná et al. 2013; Novotná et al. 2004; Colabroy et al. 2008). Tyto proteiny generují unikátní 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylovou kyselinu (látka **4**). Dle nově navrženého konceptu C-methyltransferasa LmbW závislá na SAM katalyzuje reakci následující, kde k látce **4** připojuje methylovou skupinu (Obr. 5.10).

Enzymová aktivita proteinu LmbW byla testována *in vitro*. Základními složkami reakční směsi byly: LmbW (enzym), látka **4** (substrát enzymu) a SAM (donor methylové skupiny). Jako negativní kontrola byly používány paralelní vzorky o stejném složení, ale s denaturovaným proteinem LmbW (denaturace LmbW zahřátím na 80 °C, 15 min). Reakce byly zastavovány inaktivací LmbW přidáním HCOOH (do finální koncentrace 1% HCOOH). Reakční směsi byly analyzovány pomocí UHPLC-UV-MS. Vyhodnocení bylo provedeno ze získaných chromatogramů a hmotnostních spekter naměřených v pozitivním módu.



Obr. 5.10: Reakční schéma znázorňující předpokládanou přeměnu látky **4** enzymem LmbW na látku **6** v přítomnosti SAM. Červená čísla označují dané látky.

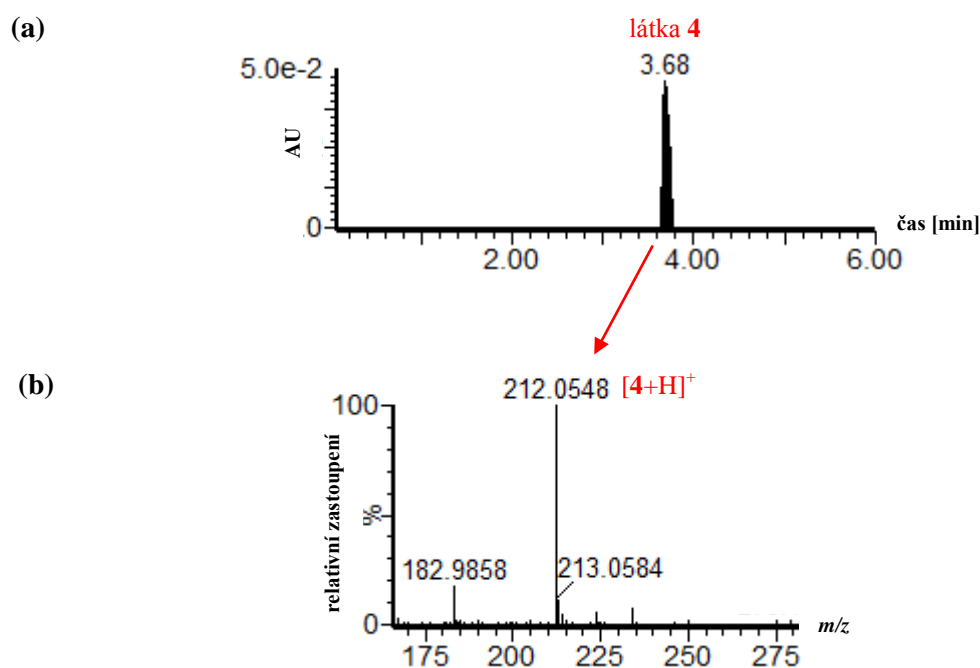
### 5.5.1 Stanovení enzymové aktivity proteinu LmbW

To, zda protein LmbW v přítomnosti látky **4** nějakou enzymovou aktivitu vykazuje, bylo nejprve testováno v experimentu, kde byl sledován úbytek substrátu v reakci v závislosti na absolutním množství proteinu LmbW. Podmínky a složení reakční směsi ukazuje Tab. 5.1. Z dřívějších experimentů naší laboratoře je známo, že látka **4**, která jako chromofor obsahuje systém konjugovaných dvojných vazeb, při UV detekci absorbuje světlo vlnové délky 405 nm. Tato vlnová délka byla tedy extrahována ze získaného UV záznamu (Obr. 5.11a). V hmotnostním spektru píku s retenčním časem odpovídajícím látce **4** (na Obr. 5.11a

3,68 min) byla současně ověřena přítomnost iontu odpovídajícímu látce **4** (Obr. 5.11b). Integrací plochy píku v jednotlivých UV záznamech byly získány hodnoty vypovídající o tom, kolik substrátu bylo v reakci spotřebováno. Z grafu (Obr. 5.12) je patrné, že nejvíce substrátu bylo proteinem LmbW spotřebováno v reakci s jeho nejvyšším absolutním množstvím, tedy 100  $\mu\text{g}$ .

0,1 $\mu\text{g}$ ; 1 $\mu\text{g}$ ; 10 $\mu\text{g}$ ; 100 $\mu\text{g}$ LmbW
10 mM látka <b>4</b>
2 mM SAM
50 mM Tris-HCl
celkový objem reakce: 100 $\mu\text{l}$
<i>podmínky reakce:</i> pH 8,0; 28 $^{\circ}\text{C}$ ; 60 min

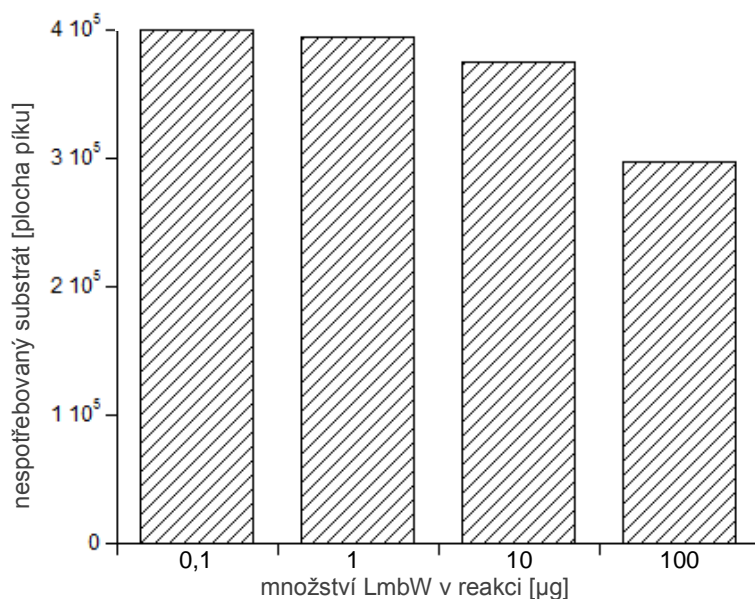
Tab. 5.1: Podmínky a složení reakční směsi v experimentu, ve kterém byla sledována spotřeba substrátu proteinem LmbW v závislosti na jeho absolutním množství v reakci.



Obr. 5.11.

(a) Chromatogram extrahovaný pro vlnovou délku 405 nm ukazuje nespotebovaný substrát v reakci se 100  $\mu\text{g}$  proteinu LmbW.

(b) Hmotnostní spektrum ukazuje přítomnost látky **4** na základě detekovaného iontu  $[4+\text{H}]^+$ .

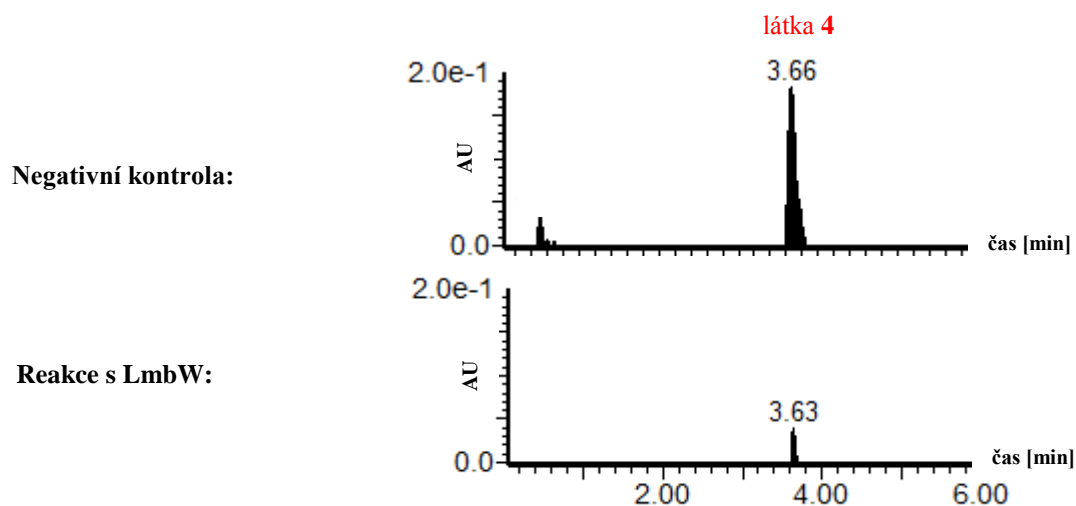


Obr. 5.12: Množství nespotřebovaného substrátu v závislosti na absolutním množství proteinu LmbW v reakci (0,1 µg; 1 µg; 10 µg; 100 µg). Pozn. menší hodnota plochy píku nespotřebovaného substrátu znamená, že více substrátu bylo přeměněno proteinem LmbW směrem k produktu.

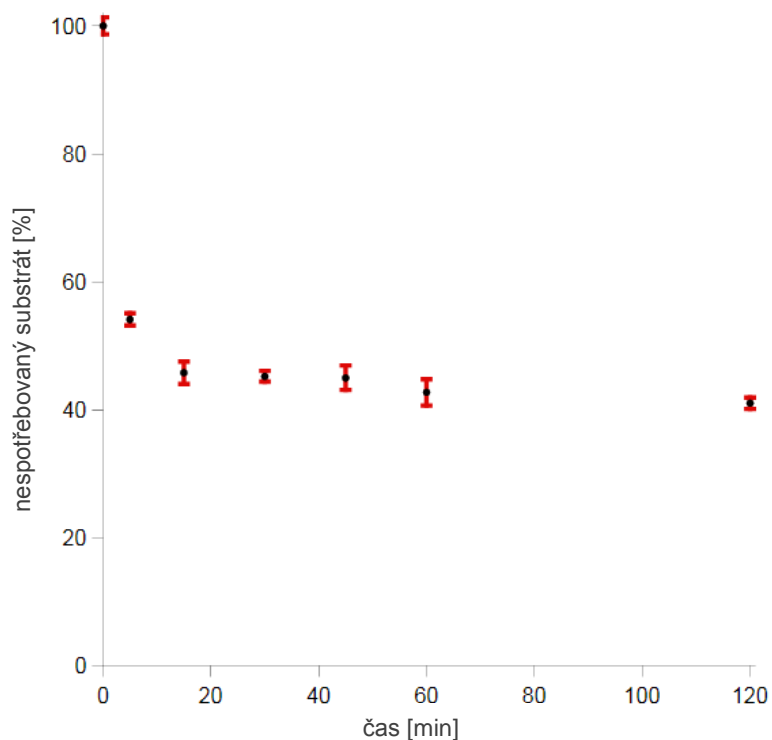
V následujícím experimentu byl sledován úbytek substrátu (látky **4**) v čase. Experiment byl proveden ve třech nezávislých paralelních pokusech. Ve stanovených časech byly odebírány alikvoty, ke kterým byla ihned přidána HCOOH k denuraci proteinu. Negativní kontrolou byly vzorky s tepelně denaturovaným proteinem LmbW a odpovídají času „0 min“. Do reakce byla použita vyšší koncentrace SAM a nižší koncentrace látky **4**, než v předchozím experimentu tak, aby jejich molární množství bylo ekvivalentní. Vyšší koncentrace SAM v reakci ale znamenala také nutnost zvýšit koncentraci Tris-HCl pufru (z 50 mM Tris-HCl na 100 mM Tris-HCl), neboť SAM (ve formě dihydrochloridu) pH reakce významně posouval směrem do kyselé oblasti. Složení reakční směsi ukazuje Tab. 5.2. Z UV záznamu extrahovaného pro vlnovou délku 405 nm je vidět úbytek substrátu po 120 minutách reakce (Obr. 5.13). Z grafu vyplývá (Obr. 5.14), že po 10 minutách již nedochází k žádné významné konverzi substrátu.

200 µg LmbW
4 mM látka <b>4</b>
4 mM SAM
100 mM Tris-HCl
celkový objem reakce: 200 µl
<b>podmínky reakce:</b> pH 8,0; 28 °C; 0 – 120 min

Tab. 5.2: Podmínky a složení reakční směsi v experimentu, ve kterém byla sledována spotřeba substrátu proteinem LmbW v čase.



Obr. 5.13. Chromatogramy extrahované pro vlnovou délku 405 nm ukazují úbytek substrátu (látko 4) v reakci po 120 minutách.

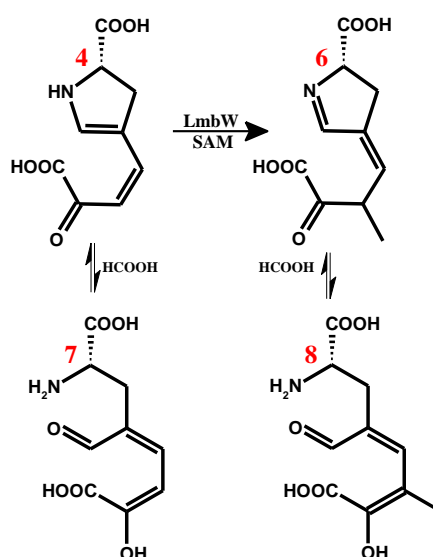


Obr. 5.14: Spotřeba substrátu proteinem LmbW v čase. Chybové úsečky určují směrodatnou odchylku měření ( $n = 3$ ).

Pro srozumitelnost získaných výsledků, které budou nyní uváděny, následuje Tab. 5.3, ve které jsou uvedeny všechny dále diskutované látky a jim odpovídající ionty detekované MS detektorem (hmotnostně spektrometrickým detektorem). Navržené struktury těchto látek jsou pak znázorněny na následujícím Obr. 5.15.

Látky hledané/detekované v chromatogramech			
Látka:	Detekovaný ion:	<i>m/z</i> iontu:	Retenční čas[min]:
látka <b>4</b> (předpokládaný substrát LmbW)	[ <b>4</b> +H] <sup>+</sup>	212,0559	~ 3,7
látka <b>7</b> (acyklická forma látky <b>4</b> )	[ <b>7</b> +H] <sup>+</sup>	230,0665	~ 0,6
	[ <b>7</b> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	212,0559	~ 0,6
látka <b>6</b> (předpokládaný produkt reakce)	[ <b>6</b> +H] <sup>+</sup>	226,0715	> než látka <b>4</b>
látka <b>8</b> (acyklická forma látky <b>6</b> )	[ <b>8</b> +H] <sup>+</sup>	244,0821	~ 0,6
	[ <b>8</b> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	226,0715	~ 0,6

Tab. 5.3. Látky hledané/detekované v chromatogramech a jejich vybrané charakteristiky.



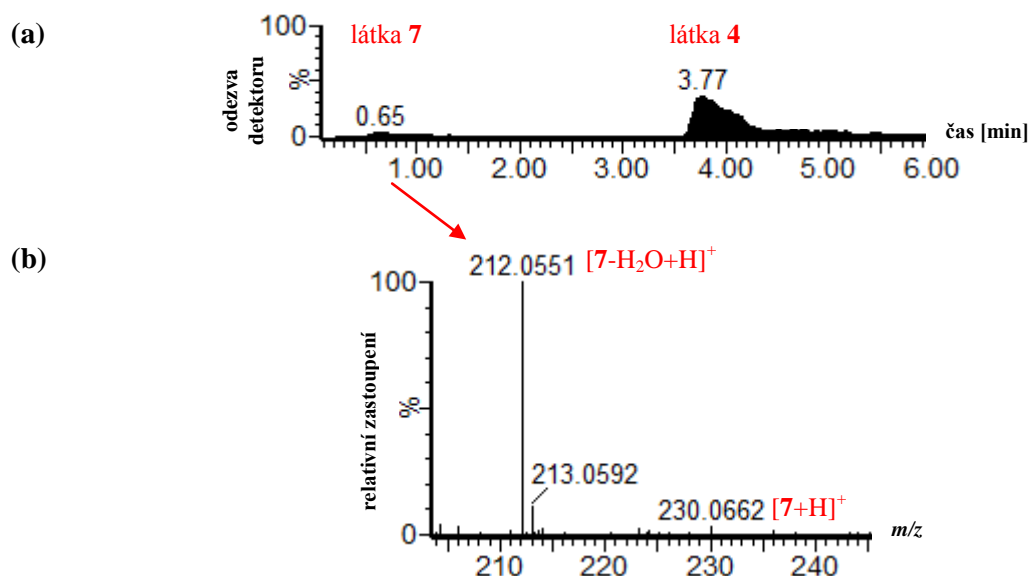
Obr. 5.15: Reakční schéma znázorňující předpokládanou přeměnu látky **4** proteinem LmbW na látku **6** v přítomnosti SAM a přechod na acyklické formy těchto látek vlivem kyselého prostředí. Červená čísla označují dané látky.

Extrahované chromatogramy při 405 nm jasně ukázaly, že látka **4** je v reakci s LmbW spotřebovávána (Obr. 5.13). V chromatogramech bylo dále nutné stanovit i očekávaný produkt, tedy látku **6**. Ta by měla být díky připojené methylové skupině méně polární než látka **4**. Předpokládalo se tedy, že vznikající produkt bude detekován jako pík extrahovaný stejně jako látka **4** při 405 nm, ovšem s retenčním časem vyšším než je tomu u látky **4**, tedy dle Obr. 5.13: > 3,66 min. Takovýto pík se však v chromatogramech extrahovaných při 405 nm nenachází.

Při extrakci chromatogramu pro ion [**4**+H]<sup>+</sup>, který odpovídá substrátu, byl kromě majoritního píku s retenčním časem odpovídajícím látce **4** (na Obr. 5.16a – 3,77 min), nalezen i další, minoritní pík (na Obr. 5.16a – 0,65 min). Hmotností spektrum odpovídající tomuto

minoritnímu píku ukázalo přítomnost iontu jiné formy látky **4** (Obr. 5.16b). Bylo zjištěno, že během chromatografické analýzy dochází zřejmě vlivem kyselých podmínek k hydrolyze pětičtého kruhu látky **4** a vzniká její acyklická forma, látka **7**. Látka **7** je detekována převážně jako fragment vzniklý ztrátou hydroxylové skupiny během ionizace ve zdroji, tedy jako ion  $[7-H_2O+H]^+$ , který má hodnotu  $m/z$  stejnou jako ion látky **4**  $[4+H]^+$ . Proto jsou píky obou látek zobrazeny v chromatogramu extrahovaném pro tentýž ion ( $m/z$  212,0559). Rozdílné retenční časy látky **4** a látky **7** odpovídají předpokládané odlišné polaritě cyklické a acyklické formy.

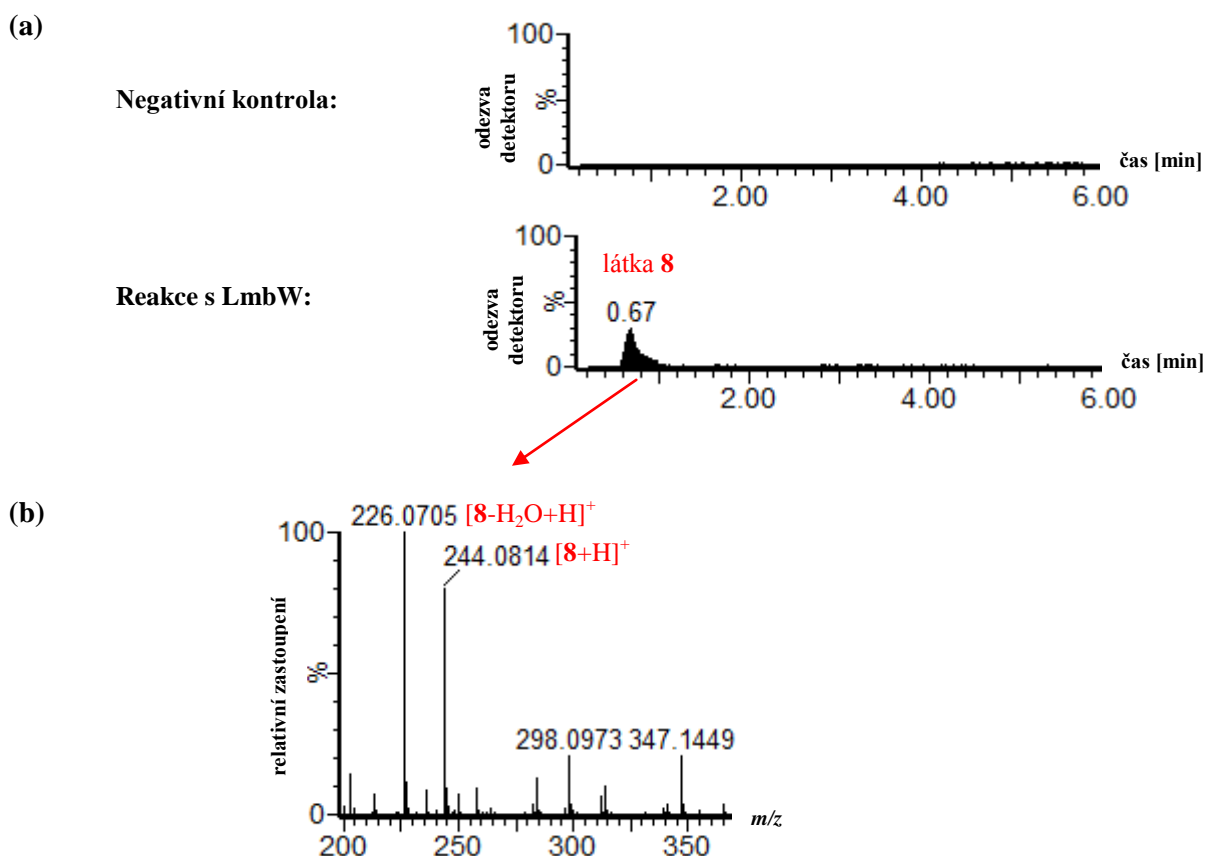
Dle těchto zjištění se tedy nově předpokládalo, že pokud během analýzy dochází k hydrolyze látky **4** a tím k její přeměně na látku **7**, bude zřejmě docházet k podobnému jevu i u vznikajícího produktu – u látky **6**. Byl tedy extrahován chromatogram pro ion odpovídající látce **8**,  $[8+H]^+$ , který by dle předpokladu měl v kyselých chromatografických podmínkách odpovídat produktu reakce a jeho přítomnost by tedy měla potvrdit methyltransferasovou aktivitu proteinu LmbW. Tento chromatogram ukazuje Obr. 5.17a. Hmotnostní spektrum odpovídajícího píku (Obr. 5.17b) ukazuje nejen přítomnost hledaného iontu  $[8+H]^+$ , ale také fragmentu tohoto iontu  $[8-H_2O+H]^+$ , tedy stejně jako je tomu u substrátu – látky **4**. Ani jeden z těchto iontů ( $[8+H]^+$ ;  $[8-H_2O+H]^+$ ) nebyl v negativní kontrole detekován. Tímto tedy byla potvrzena methyltransferasová aktivita proteinu LmbW.



Obr. 5.16:

(a) Chromatogram extrahovaný pro ion  $[4+H]^+$  o  $m/z$  212,0559 odpovídající iontu cyklického substrátu reakce, látky **4**. Hodnota  $m/z$  212,0559 však odpovídá i iontu acyklického substrátu – látce **7**, který během analýzy ztratil molekulu  $H_2O$ , tedy iontu  $[7-H_2O+H]^+$ .

(b) Hmotnostní spektrum píku s retenčním časem 0,65 min ukazuje přítomnost iontu látky **7** na základě detekovaných iontů  $[7+H]^+$  a  $[7-H_2O+H]^+$ .



Obr. 5.17:

(a) Chromatogram extrahovaný pro ion  $[8+H]^+$  o  $m/z$  244,0821 odpovídající acyklickému produktu reakce, látky **8**.

(b) Hmotnostní spektrum ukazuje přítomnost látky **8** na základě detekovaných iontů  $[8+H]^+$  a  $[8-H_2O+H]^+$ .

## 5.5.2 Optimalizace podmínek pro aktivitu proteinu LmbW

Účelem následujících pokusů bylo zjistit, zda má některá z podmínek zásadní vliv na aktivitu LmbW. Reakce, které testovaly určitou podmínku, měly vždy shodné složení a lišily se jen v jedné testované podmínce. Data k těmto experimentům nejsou uvedena, uvedeny jsou pouze předběžné závěry.

### 5.5.2.1 Vliv teploty na průběh reakce

Vliv teploty, při které reakce probíhá, na enzymovou aktivitu LmbW byl testován v experimentech, ve kterých byly srovnávány teploty: 18 °C, 23 °C, 28 °C, 32 °C, 37 °C a 42 °C. Cílem tohoto pokusu nebylo zjistit, jak rychle reakce probíhá, kinetické parametry v této práci stanovovány nebyly, cílem bylo pouze determinovat, zda teplota je či není pro přeměnu substrátu proteinem LmbW limitujícím faktorem. Získaná data neukázala významnější rozdíly, pouze při 42 °C byla efektivita přeměny substrátu na produkt o něco

menší, než v ostatních testovaných teplotách. Teplota ve sledovaném rozmezí tedy pravděpodobně není limitujícím faktorem reakce katalyzované proteinem LmbW.

#### **5.5.2.2 Vliv NaCl na průběh reakce**

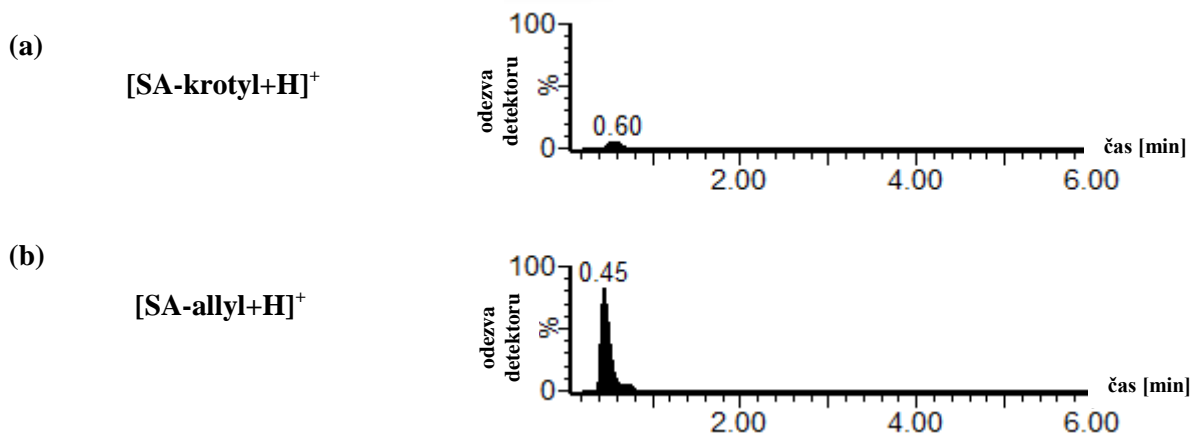
Protein LmbW byl vždy purifikován pomocí pufrů obsahujících 100 mM NaCl. Srovnání proteinu LmbW dialyzovaného do pufru s NaCl s proteinem LmbW dialyzovaného do pufru bez NaCl na snímku z BN-PAGE ukazovalo ve prospěch nepřítomnosti soli (Obr. 5.9). To, zda sůl má vliv i na průběh reakce, bylo testováno v reakcích, které se lišily v její koncentraci (0 mM NaCl; 100 mM NaCl). Nepatrně větší efektivity přeměny substrátu na produkt bylo dosaženo v reakcích bez přídavku soli, usuzují tedy, že NaCl významný vliv na aktivitu LmbW pravděpodobně také nemá.

#### **5.5.2.3 Optimalizace pH**

Aktivita proteinu byla testována v pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 a 10,5. Dle výsledků je protein LmbW schopný přeměňovat svůj substrát ve všech testovaných pH. Vhodnější se zdá být pH spíše vyšší (9,0 – 10,0), což je v souladu s výsledky testování stability LmbW v různých pH pomocí BN-PAGE (Obr. 5.8). V pH 7,0 a 7,5 měl protein LmbW tendenci částečně agregovat.

### **5.5.3 Schopnost proteinu LmbW katalyzovat připojení alternativního alkylu**

Dále bylo testováno, zda je protein LmbW schopný připojit k látce **4** i delší alkylový řetězec než methyl. Pro tento experiment bylo nejprve nutné připravit donory alkylových skupin, které nejsou komerčně vyráběné. Syntetizován byl SA-allyl a SA-krotyl. Syntéza analogu SA-ethylu, který je nejvíce podobný SAM, nebyla úspěšná. Do experimentu byl vybrán SA-allyl, který se povedlo připravit ve významně větším množství než SA-krotyl (Obr. 5.18).



Obr. 5.18: Chromatogramy extrahované pro hodnotu  $m/z$  odpovídající iontům látek:

(a) SA-krotyl: [SA-krotyl+H]<sup>+</sup>;  $m/z$  439,1764.

(b) SA-allyl: [SA-allyl+H]<sup>+</sup>;  $m/z$  425,1607.

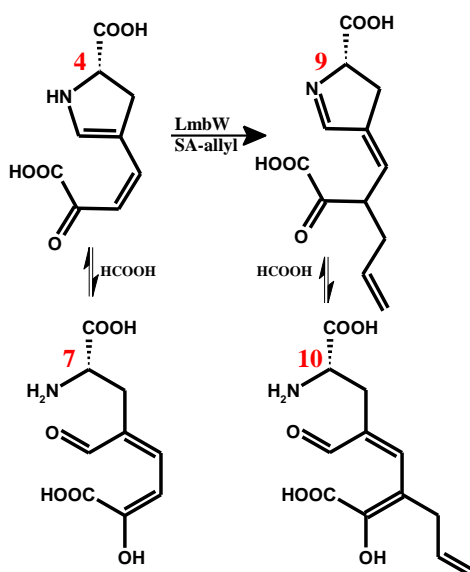
Z předchozích experimentů s LmbW bylo zřejmé, že pH 7 je nevyhovující. Vzhledem k tomu, že při přípravě SAM analogů jsou jednotlivé reagující složky rozpouštěny v HCOOH, výsledné pH roztoků těchto analogů je velmi nízké. Pufrovací kapacita glycinového-HCl pufru (40 mM) nebyla dostatečná, vyšší koncentrace by ale zřejmě znamenala agregaci LmbW. Bylo tedy nutné pH roztoků analogů zvýšit přidáním NH<sub>4</sub>OH. Složení a podmínky reakční směsi ukazuje Tab. 5.4. Negativní kontrolou byla reakce ve stejném složení, s denaturovaným LmbW. Reakční směs byla analyzována pomocí UHPLC-UV-MS. Tab. 5.5 ukazuje látky a jim odpovídající ionty hledané v chromatogramech. Navržené struktury těchto látek jsou pak znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 5.19). Z výsledných chromatogramů extrahovaných pro hodnotu  $m/z$  odpovídající iontu očekávaného produktu [10+H]<sup>+</sup> je patrné, že LmbW je schopný katalyzovat připojení allylu k látce **4** (Obr. 5.20).

SA-allyl [ $\sim 77 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
40 mM glycin-HCl pufr (pH 10,0)
dH <sub>2</sub> O (do finálního objemu reakce 30 $\mu\text{l}$ )
29 – 31% NH <sub>4</sub> OH [3 $\mu\text{l}$ ]
30 $\mu\text{g}$ LmbW (pH 10)
4 mM látka <b>4</b>
<b>podmínky reakce:</b> výsledné pH 8,0; 28 °C; 30 min

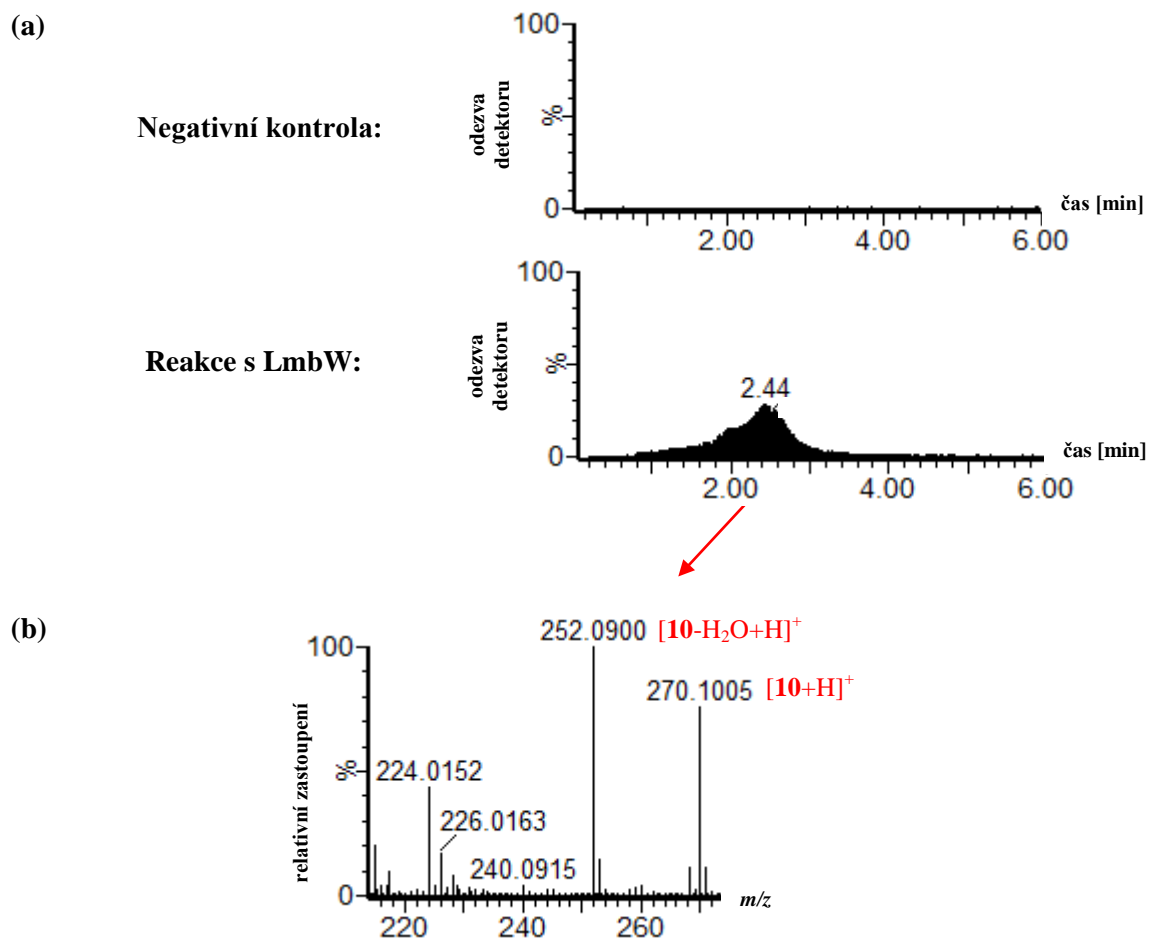
Tabulka 5.4: Složení reakční směsi a podmínky v reakci pro zjištění schopnosti methyltransferasy LmbW katalyzovat připojení allylu k látce **4**. Jednotlivé složky byly míchány v uvedeném pořadí.

Látky hledané/detekované v chromatogramech			
Látka:	Detekovaný ion:	<i>m/z</i> iontu:	Retenční čas [min]:
látka <b>4</b> (předpokládaný substrát LmbW)	[ <b>4</b> +H] <sup>+</sup>	212,0559	~ 3,7
látka <b>7</b> (acyklická forma látky <b>4</b> )	[ <b>7</b> +H] <sup>+</sup>	230,0665	~ 0,6
	[ <b>7</b> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	212,0559	~ 0,6
látka <b>9</b> (předpokládaný produkt reakce)	[ <b>9</b> +H] <sup>+</sup>	252,0872	> než látka <b>4</b>
látka <b>10</b> (acyklická forma látky <b>9</b> )	[ <b>10</b> +H] <sup>+</sup>	270,0978	~ 2,4
	[ <b>10</b> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	252,0872	~ 2,4

Tab. 5.5. Látky hledané/detekované v chromatogramech a jejich vybrané charakteristiky.



Obr. 5.19: Reakční schéma znázorňující předpokládanou přeměnu látky **4** proteinem LmbW na látku **9** v přítomnosti SA-allylu a přechod na acyklické formy těchto látek vlivem kyselého prostředí. Červená čísla označují dané látky.



Obr. 5.20:

**a)** Chromatogram extrahovaný pro ion  $[10+H]^+$  o  $m/z$  270,0978 odpovídající acyklickému produktu reakce, látky **10**.

**(b)** Hmotnostní spektrum ukazuje přítomnost látky **10** na základě detekovaných iontů  $[10+H]^+$  a  $[10-H_2O+H]^+$ .

## 6 DISKUZE

Tato práce navazuje na výsledky P. Jiráčkové (2012). To, že rekombinantní protein LmbX nebyl v *in vitro* reakci a dokonce ani v systému *in vivo* schopný přeměnit meziprodukt PPL dráhy generovaný proteiny LmbB2 a LmbB1 (látku **4**), jak bylo předpokládáno (Brahme et al. 1984b), spolu s dalšími zjištěními nekonzistentními se stávajícím konceptem, změnilo pohled na PPL dráhu a vedlo k její celkové revizi. Do nového konceptu bylo třeba vyřešit funkci čtyř zbývajících proteinů: LmbW, LmbA, LmbX a LmbY, které by měly v biosyntéze PPL prekursoru participovat. V souladu se všemi dosavadními poznatky bylo navrženo, že poslední prokázaný meziprodukt dráhy, látka **4**, by mohla být dále přeměňována domnělou C-methyltransferasou LmbW. Toto místo se zdá být v biosyntéze PPL pro metylaci nejvhodnější. Ve srovnání s původně navrženým substrátem methyltransferasy LmbW, je nově předpokládaným substrátem látka chemicky rozdílná (látka **5** vs. látka **4**, Obr. 2.11). Cílem této práce bylo nejen prokázat navrhovanou methyltransferasovou aktivitu proteinu LmbW, ale především potvrdit zařazení LmbW do nového konceptu PPL dráhy, tedy do jiného stupně biosyntézy, bezprostředně za biochemicky prokázané první dva kroky dráhy.

Bez ohledu na výsledky získané v rámci této diplomové práce bylo již dříve v literatuře možné nalézt experimentální data a informace, které navrhované hypotézy, především navrhovanou methyltransferasovou aktivitu proteinu LmbW, dobře podporovaly:

### ► Podpora navrhované methyltransferasové aktivity proteinu LmbW:

Sekvenční analýza LmbW (Peschke et al. 1995), inaktivační experimenty (Jiráčková 2012) i nepřítomnost homologu *lmbW* v tomaymycinovém biosyntetickém shluku (Li et al. 2009b) byly velmi silnou podporou navrhované methyltransferasové aktivity LmbW. V proteinové databázi bylo také možné nalézt dva proteiny podobné LmbW, jejichž methyltransferasová aktivita již byla prokázána. Jedná se o C-methyltransferasu MrsA (sekvenční identita s LmbW je 26 %), která se účastní biosyntézy rostlinného toxinu 3-methyl-argininu (Braun et al. 2008) a dále pak o C-methyltransferasu MppJ (sekvenční identita s LmbW je 27 %) účastnící se biosyntézy manopeptimycinů, lipoglykopeptidových antibiotik (Huang et al. 2009).

► Podpora látky **4** jako vhodného substrátu pro protein LmbW:

Nově navržený substrát, látka **4**, se zdá být pro metylaci proteinem LmbW vhodnější, než původní látka **5**. Látku **5** v reakci s LmbW testovat nelze, jelikož není dostupná. Látka **4** a látka **5** jsou chemicky rozdílné natolik, že i mechanismus methylace by musel být rozdílný. Podporu toho, že látka **4** je k metylaci vhodnější, než látka **5**, bylo možné nalézt v substrátech methyltransferas MrsA a MppJ. Chemické okolí místa v substrátu, kde dochází k metylaci, se v obou případech podobá látce **4** (Obr. 2.16, Obr. 2.17b). Významná je především přítomnost keto skupiny na uhlíku sousedícím s atomem uhlíku, který je methylován. U MppJ je dokonce přítomnost této keto skupiny navrhována jako jeden z rozhodujících faktorů methylace (Huang et al. 2009). Jak bude ještě dále diskutováno, stejnému mechanismu methylace (tedy methylace látky **4**) nasvědčuje i podobné optimální pH všech těchto tří methyltransferas (LmbW, MrsA, MppJ).

### **Podjednotkové uspořádání a stabilita proteinu LmbW**

Expresí v heterologním producentovi *E. coli* BL21(DE3) byl nadprodukován rekombinantní protein LmbW. Pomocí BN-PAGE byl sledován vliv různých podmínek na stabilitu tohoto proteinu. LmbW se zdá být stabilním proteinem po dlouhou dobu skladování v -20 °C (v řádech týdnů). Teplotu 4 °C lze využít spíše při krátkodobém skladování. Glycerol a NaCl mají na stabilitu LmbW spíše negativní vliv. Pro LmbW se jako optimální jeví pH spíše zásaditější – pH 9,0 – 10,0. Pomocí BN-PAGE bylo také zjišťováno pravděpodobné podjednotkové uspořádání proteinu LmbW. Rychlost pohybu v polyakrylamidovém gelu ukazuje na oligomerní strukturu, pravděpodobně homotetramerickou. MppJ je své kvartérní struktury homodimer (Zou et al. 2014), kvartérní struktura MrsA prozatím publikována nebyla. Methyltransferas tetramerickou strukturou nebylo popsáno mnoho (shrnuto v Schubert et al. 2003), ale existují. Příkladem je O-methyltransferasa MycE účastníci se biosyntézy mycinamicinů, makrolidových antibiotik (Akey et al. 2011).

### **Testování enzymové aktivity proteinu LmbW**

Enzymová aktivita LmbW byla testována *in vitro* v reakcích se substrátem proteinu – látkou **4** a dále za přítomnosti donoru methylové skupiny – SAM. Všechny analýzy reakčních směsí byly prováděny pomocí UHPLC-UV-MS. Ze získaných UV záznamů extrahovaných pro vlnovou délku 405 nm byl v reakci s aktivním LmbW oproti negativní kontrole (inaktivovaný LmbW) pozorován znatelný úbytek substrátu. Předpokládaný produkt reakce –

látka **6** (Obr. 5.15), však v chromatogramech extrahovaných pro hodnotu  $m/z$  jejího iontu, nebyla detekována.

Bylo zjištěno, že kyselé podmínky chromatografické analýzy mají významný vliv na struktury analyzovaných látek. Již samotný výchozí substrát byl v chromatogramech pozorován ve směsi s jeho acyklickou formou, látkou **7** (Obr. 5.15). Zřejmě dochází k hydrolyze pětičtého kruhu, který obsahuje hydrolyzovatelnou enamínovou vazbu, a tím tedy k *in vitro* tvorbě acyklické formy látky **4**. Toto pozorování je v souladu i s dalšími publikacemi, které tento jev také popisují (Colabroy et al. 2008; Saha et al. 2015).

V souladu s tímto zjištěním bylo tedy nově předpokládáno, že k podobnému jevu bude zřejmě docházet i u očekávaného produktu, u látky **6**. V chromatogramech byl tedy hledán ion látky, který by svou přesnou molekulovou hmotností odpovídal iontu methylované látky **7**. Takovýto ion, odpovídající látce **8** (Obr. 5.15), opravdu detekován byl. Na základě tohoto zjištění bylo zvažováno, zda nejprve nedochází k přeměně látky **4** na látku **7**, která je pak výchozím substrátem proteinu LmbW. Tato možnost však není příliš pravděpodobná. Látka **7** je totiž velice nestabilní (její poločas rozpadu je v řádu sekund; Saha et al. 2015), methylace navíc probíhá v bazickém prostředí, které rovněž přispívá spíše k přeměně acyklické látky **7** na cyklickou látku **4**. Zdá se tedy, že látka **6** (v *in vivo* systému zřejmě skutečný produkt reakce), která vůbec detekována nebyla, je ke kyselým podmínkám analýzy mnohem více senzitivní než látka **4**, která se v chromatogramech objevuje i v cyklické formě. Rovnováha tautomerů výchozí látky **4** je posunuta směrem k enamínu (keto tautomer; Saha et al. 2015). Připojení methylové skupiny k látce **4** zřejmě bude posouvat rovnováhu tautomerů vznikajícího produktu směrem k iminové formě (enol tautomeru), která může být v důsledku příčinou vyšší senzitivity k hydrolyze kruhu v kyselém prostředí a látku **6** tak není možné v chromatogramech pozorovat. To, že látka **8** je skutečně hydrolyzovaný produkt enzymu LmbW dále podpořila i analytická podobnost látky **8** (acyklický produkt) s látkou **7** (acyklický substrát). Obě tyto látky mají podobnou polaritu (a tedy retenční čas) a navíc byl v chromatogramech také determinován stejný fragmentační profil (fragменты látek vznikající během analýzy) odpovídající ztrátě hydroxylové skupiny, která je přítomná v obou těchto látkách. Tímto tedy byla potvrzena nejen methyltransferasová aktivita proteinu LmbW, ale především bylo prokázáno, že LmbW svojí aktivitou a schopností katalyzovat přeměnu látky **4** na látku **6** skutečně zapadá do nově navrhovaného konceptu PPL dráhy.

## **Zhodnocení efektivity konverze látky 4 na látku 6 methyltransferasou LmbW a hledání optimálních podmínek reakce**

Vyhodnocení efektivity reakce bylo provedeno z chromatogramů extrahovaných pro vlnovou délku 405 nm. Integrací píku, odpovídajícího látky **4**, byly získány hodnoty, které byly vyneseny do grafu. Bylo ukázáno, kolik substrátu bylo v závislosti na absolutním množství proteinu LmbW v reakci či v závislosti na délce reakce proteinem LmbW spotřebováno. Přeměna látky **4** na její acyklickou formu (látku **7**) vlivem analýzy znemožňuje její zachycení UV detektorem. Otevřením kruhu ztrácí molekula schopnost absorbovat světlo, a tím pádem ji nelze kvantifikovat integrací plochy odpovídajícího píku. Tento fakt může výsledné hodnoty nekonvertovaného substrátu zkreslovat. Intenzita a závislosti, s jakou je látka **4** přeměňována na látku **7**, není prozatím známa. Nicméně z paralelně naměřených hodnot se zdá, že se analýzou tímto způsobem vždy „ztratilo“ zhruba stejné množství substrátu. Hodnoty lze tedy brát jako dostatečně vypovídající o přeměně substrátu proteinem LmbW, nebudou však zcela přesné z pohledu kvantitativního zhodnocení. Nicméně, ze získaných dat vyplývalo, že LmbW v reakci přeměni zhruba 50 % vloženého substrátu. V následujících experimentech tedy byl hledán faktor, který by mohl být limitujícím prvkem této methyltransferasové reakce.

Získaná data ukázala, že nejvíce substrátu je přeměněno během prvních pěti minut reakce. Kinetika reakce katalyzované enzymem LmbW z výše uvedených důvodů v této práci stanovována nebyla. Konstanty  $k_{cat}$  a  $K_m$  u proteinů podobných LmbW, MrsA a MppJ, byly stanoveny jako  $85 \text{ min}^{-1}$  resp.  $48 \text{ min}^{-1}$  a  $7,5 \text{ mM}$  resp.  $2,5 \text{ mM}$  (Braun et al. 2010; Huang et al. 2009). Methylace je tedy v obou případech rychlá a zřejmě obdobně progresivní bude i enzym LmbW. Reakce byly standardně zastavovány po jedné hodině, nedostatečný čas pro přeměnu substrátu směrem k produktu jako možná příčina nízkého výtěžku reakce je nepravděpodobná.

Reakce standardně probíhaly ve  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Byl testován vliv různý teplot ( $18 \text{ }^\circ\text{C} - 42 \text{ }^\circ\text{C}$ ) na efektivitu reakce, teplota se však nezdá být hledaným limitujícím faktorem.

Optimální pH pro MrsA bylo určeno jako pH 9,0 (v pH 7,0 měl MrsA sníženou katalytickou aktivitu třikrát, v pH 10,0 dokonce desetkrát; Braun et al. 2010). Pro MppJ bylo jako optimální stanoveno pH 8,0 (Huang et al. 2009). U LmbW byl testován vlivu pH v rozmezí 7,0 – 10,5. Ve sledovaném rozmezí byl LmbW stále enzymaticky aktivní. Jako optimální se jevílo pH 9,0 – 10,0 (což je v souladu i s výsledky BN-PAGE). Naopak, testované pH 7,0 a 7,5 bylo pro LmbW nevyhovující. Ani pH se ve sledovaném rozmezí nezdálo být limitujícím faktorem reakce.

Koncentrace jednotlivých reaktantů (LmbW, látka **4**, SAM) byly odvozeny z některých dostupných publikovaných dat (Braun et al. 2010; Huang et al. 2009; Bauer et al. 2014). Bylo zjištěno, že i po 120 minutách v reakci stále zůstává dostatek SAM. Vzhledem k tomu, že žádná z výše uvedených podmínek viditelně nelimituje reakci, do popředí se tak dostává možnost zpětnovazebné inhibice vznikajícími produkty. Slabá inhibice S-adenosyl-L-homocysteinem (zbytek SAM po odnětí methylové skupiny) byla popsána nejméně u eukaryotické glycinové SAM-MT (Kerr 1972).

V případě *in vitro* testování methyltransferas MrsA a MppJ nebylo nezbytně nutné přidávat do reakcí další látky (Braun et al. 2010; Huang et al. 2009). I když se v současné době nepředpokládá, že LmbW ke své aktivitě nějakou další látku vyžaduje, vyloučit to nelze. Například při funkčním testování MycE a MycF, O-methyltransferas zapojených do biosyntézy mycinamicinů, bylo zapotřebí do reakce přidávat 10 mM MgCl<sub>2</sub> i přes to, že závislost na kovovém kofaktoru nebyla předpokládána. Aktivitu těchto proteinů podpořila navíc i přítomnost dalších iontů jako Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> či Zn<sup>2+</sup> (Li, Anzai et al. 2009).

### **Testování enzymové aktivity proteinu LmbW – schopnost LmbW katalyzovat připojení alternativního alkyly**

Linkomycin A a B se liší jen délkou bočního alkylového řetězce (Argoudelis et al. 1965), přesto je jejich biologická aktivita velmi rozdílná (shrnutí v Spížek et al. 2004). Bylo ukázáno, že délka a modifikace postranního řetězce připojeného k molekule prolinu má na biologickou aktivitu linkosamidů významný vliv (Magerlein 1971).

Součástí této práce byl i experiment, ve kterém se podařilo v reakci katalyzované methyltransferasou LmbW připojit k substrátu (látka **4**) namísto methyly delší allyl. Původním záměrem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je LmbW k látce **4** schopen připojit ethyl, který do celkové struktury výsledného aminokyselinového prekurzoru nezasáhne v takové míře jako allyl, nicméně analog SAM s touto alkylovou skupinou se nepodařilo připravit. Důvodem je zřejmě to, že ethyl bromid (výchozí donor ethylové skupiny), ve své struktuře neobsahuje, na rozdíl od allyl bromidu a krotyl bromidu, dvojnou vazbu a není tak vhodným alkylačním činidlem.

Z literatury je zřejmé, že substrátová specifita proteinů PPL dráhy katalyzujících reakce následující po reakci katalyzované LmbW (LmbA, LmbX, LmbY), je rozšířená. Tyto proteiny jsou schopné po vyřazení LmbW ( $\Delta$ *lmbW* mutantní kmen) pokračovat v biosyntéze, jejímž výsledkem je pak EPL namísto PPL (Jiráčková 2012). Rozšířenou substrátovou specifitu nalezneme také u proteinu LmbC, samostatně stojící adenylační domény, která má

zásadní úlohu při rozpoznávání a aktivaci vhodného substrátu do kondenzační reakce (Kadlčík et al. 2013), a dále také u N-methyltransferasy LmbJ katalyzující metylaci N-demethyllinkomycinu (Najmanová et al. 2013; Bauer et al. 2014). Těchto vlastností proteinů LmbC a LmbJ bylo již například využito k mutasyntéze biologicky účinnějších derivátů linkomycinu: 4'-depropyl-4'-butyllinkomycinu a 4'-depropyl-4'-pentyllinkomycinu (Ulanová et al. 2010). Experiment s SA-allylem, jako donorem alkylové skupiny ukázal, že i substrátová specifita LmbW je rozšířená. Tohoto zjištění by mohlo být využito k přípravě biologicky účinnějšího derivátu linkomycinu.

Rozšířená substrátová specifita LmbW by také mohla být dalším možným vysvětlením nízkého výtěžku reakce katalyzované proteinem LmbW, který byl diskutován výše. Totiž v případě, že by látka **4** nebyla přirozeným substrátem proteinu LmbW (což se v současné době nepředpokládá), i tak by ji LmbW zřejmě byl v důsledku své rozšířené substrátové specifity schopný přijmout. Efektivita konverze na látku **6** by už ale nemusela být tak účinná, což by vysvětlovalo nízký výtěžek reakce. I přes to dále považujeme zařazení LmbW do nového konceptu PPL dráhy, a tím tedy látku **4** jako přirozený substrát proteinu LmbW, za pravděpodobnější variantu.

## **Nové cíle**

Získané poznatky dávají vzniknout novým hypotézám a novým cílům. V navazujících studiích bude zejména nutné pokusit se vyvinout takové chromatografické podmínky, které by neměly na látku **4** a další meziproducty PPL dráhy destruktivní vliv. Tato práce pomohla částečně charakterizovat protein LmbW a měla by usnadnit případné následné stanovení kinetických parametrů reakce katalyzované tímto proteinem. Větší prioritou je však další optimalizace a hledání vhodných podmínek pro reakci katalyzovanou proteinem LmbW a to tak, aby bylo možné izolovat produkt reakce, určit jeho strukturu a především tento produkt použít jako substrát pro další reakce. Produkt LmbW se tak v tuto chvíli stává limitujícím pro testování aktivity proteinů, u nichž předpokládáme, že katalyzují následné kroky dráhy: štěpení C-C vazby (odštěpení glyoxalátu; LmbA), izomeraci dvojně vazby (LmbX) a dva redukční kroky (LmbY) vedoucí ke vzniku PPL prekurzoru linkomycinu.

Experimentální výsledky, které byly získány v rámci této diplomové práce, jsou součástí připravované publikace: „Revision of the Biosynthetic Pathway for 4-alkyl-L-proline Precursors of Pyrrolbenzodiazepins, Lincomycin and Hormaomycin“.

## 7 SOUHRN

- Byl připraven expresní konstrukt s vloženým genem *lmbW*. Byl nadprodukován protein LmbW – byly optimalizovány podmínky exprese: největšího výtěžku bylo dosaženo u producenta *E. coli* BL21(DE3), který byl postindukčně kultivován ve 28 °C 4 hod. Expresí se podařilo průměrně získat 2,8 mg LmbW na 100 ml kultivačního média.
- Získaný protein LmbW byl purifikován a pomocí BN-PAGE byla testována jeho stabilita. Pro LmbW je optimální prostředí s pH 9,0 – 10,0; bez NaCl a glycerolu. LmbW může být skladován při 4 °C i při -20 °C. Vhodnější teplota pro dlouhodobé skladování je však -20 °C. Dále bylo zjištěno podjednotkové uspořádání proteinu LmbW – dle BN-PAGE je LmbW zřejmě homotetramer.
- U LmbW byla *in vitro* prokázána methyltransferasová aktivita, která pro tento protein byla navrhována (Peschke et al. 1995). LmbW je schopný v přítomnosti SAM připojovat ke svému navrženému substrátu (látce 4) methylovou skupinu. Tímto bylo potvrzeno navrhované zařazení LmbW do revidované PPL dráhy.
- Dále bylo zjištěno, že podmínky chromatografické analýzy mají na substrát i vznikající produkt reakce významný vliv – dochází k hydrolyze jejich pětičlenného kruhu a tím k tvorbě acyklické formy těchto látek.
- LmbW byl v reakci schopný přeměnit asi polovinu vloženého substrátu. Byla proto hledána podmínka zodpovědná za limitaci methyltransferasové reakce. Žádná ze studovaných podmínek neměla na výtěžek reakce významný vliv. Do popředí se tak dostává možnost zpětnovazebné inhibice vznikajícími produkty.
- Byla také testována schopnost LmbW katalyzovat připojení delšího alkylové řetězce, než je methyl, k látce 4. LmbW byl schopný ke svému substrátu připojit allyl. To ukazuje na rozšířenou substrátovou specifitu LmbW, které by mohlo být v budoucnu využito k přípravě modifikovaného linkomycinu s lepšími biologickými vlastnostmi.

## 8 SEZNAM LITERATURY

Akey, DL; Li, SY; Konwerski, JR; Confer, LA; Bernard, SM; Anzai, Y; Kato, F; Sherman, DH; Smith, JL (2011): A new structural form in the SAM/metal-dependent O-methyltransferase family: MycE from the mycinamicin biosynthetic pathway. *Journal of Molecular Biology*, 413(2): 438-450.

Altschul, SF; Madden, TL; Schaffer, AA; Zhang, JH; Zhang, Z; Miller, W; Lipman, DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402.

Argoudelis, AD; Eble, TE; Fox, JA; Mason, DJ (1969): Studies on biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry*, 8(8): 3408-3411.

Argoudelis, AD; Fox, JA; Eble, TE (1965): U-21,669: a new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry*, 4(4): 698-703.

Arima, K; Kohsaka, M; Tamura, G; Sakai, H; Imanaka, H (1972): Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of tomaymycin. *The Journal of Antibiotics*, 25(8): 437-444.

Attieh, JM; Hanson, AD; Saini, HS (1995): Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(16): 9250-9257.

Bauer, J; Ondrovičková, G; Najmanová, L; Pevala, V; Kameník, Z; Košťan, J; Janta J; Kutějová, E (2014): Structure and possible mechanism of the CcbJ methyltransferase from *Streptomyces caelestis*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 70: 943-957.

Bentley, SD; Chater, KF; Cerdeño-Tárraga, A; Challis, GL; Thomson, NR; James, KD; Harris, DE; Quail, MA; Kieser, H; Harper, D; Bateman, A; Brown, S; Chandra, G; Chen, CW; Collins, M; Cronin, A; Fraser, A; Goble, A; Hidalgo, J; Hornsby, T; Howarth, S; Huang, CH; Kieser, T; Larke, L; Murphy, L; Oliver, K; O'Neil, S; Rabinowitsch, E; Rajandream, MA; Rutherford, K; Rutter, S; Seeger, K; Saunders, D; Sharp, S; Squares, R; Squares, S; Taylor, K; Warren, T; Wietzorrek, A; Woodward, J; Barrell, BG; Parkhill, J; Hopwood, DA (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885): 141-147.

Bergy, ME; Herr, RR; Mason, DJ (1963): Antibiotic lincolnensis and method of production. United States Patent: 3086912.

Bibb, MJ (2005): Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2): 208-215.

Birkenmeyer, R; Kagan, F (1970): Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin. A potent antibacterial agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13(4): 616-619.

Birnboim, HC; Doly, J (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6): 1513-1523.

Blattner, FR; Plunkett, G; Bloch, CA; Perna, NT; Burland, V; Riley, M; ColladoVides, J; Glasner, JD; Rode, CK; Mayhew, GF; Gregor, J; Davis, NW; Kirkpatrick, HA; Goeden, MA; Rose, DJ; Mau, B; Shao, Y (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331): 1453-1462.

- Brahme, NM; Gonzalez, JE; Mizsak, S; Rolls, JR; Hessler, EJ; Hurle, LH (1984a): Biosynthesis of the lincomycins. II. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *Journal of the American Chemical Society*, 106 (25): 7878-7883.
- Brahme, NM; Gonzalez, JE; Rolls, JP; Hessler, EJ; Mizsak, S; Hurley, LH (1984b): Biosynthesis of the lincomycins. I. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl-L-hygric and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycin A and B. *Journal of the American Chemical Society*, 106 (25): 7873-7878.
- Braun, SD; Hofmann, J; Wensing, A; Ullrich, MS; Weingart, H; Völksch, B; Spiteller, D (2010): Identification of the biosynthetic gene cluster for 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8): 2500-2508.
- Braun, SD; Völksch, B; Nuske, J; Spiteller, D (2008): 3-methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *ChemBioChem*, 9(12): 1913-1920.
- Brazhnikova, M; Konstantinova, N; Mesentsev, A (1972): Sibiromycin: isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 25 (11): 668-673.
- Cantoni, GL (1953): S-adenosylmethionine – a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosintriphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 25(11): 668-673.
- Cimermancic, P; Medema, MH; Claesen, J; Kurita, K; Brown, LCW; Mavrommatis, K; Pati, A; Godfrey, PA; Koehrsen, M; Clardy, J; Birren, BW; Takano, E; Sali, A; Lington, RG; Fischbach, MA (2014): Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell*, 158(2): 412-421.
- Colabroy, KL; Hackett, WT; Markham, AJ; Rosenberg, J; Cohen, DE; Jacobson, A (2008): Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 479(2): 131-138.
- Connor, KL; Colabroy, KL; Gerrata B (2011): A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin. *Biochemistry*, 50(41): 8926-8936.
- De Boer, C; Dietz, A; Hoeksema, H (1960): Celesticetin, its salts and method of preparation. United States Patent: 2928844.
- Demain, AL (1999): Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(4): 455-463.
- Demain, AL; Sanchez, S (2009): Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62(1): 5-16.
- Donadio, S; Sosio, M; Stegmann, E; Weber, T; Wohlleben, W (2005): Comparative analysis and insights into the evolution of gene cluster for glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(1): 40-50.
- Douthwaite, S (1992): Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 20(18): 4717-4720.
- Drew, S; Demain, AL (1978): Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Citováno podle Martín JF; Liras, P (1989): Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 43: 173-206.

- Fischbach, MA (2009): Antibiotics from microbes: covering to kill. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5):520-527.
- Fischbach, MA; Walsh, CT; Clardy, J (2008): The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12): 4601-4608.
- Flårdh, K; Buttner, MJ (2009): Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1): 36-49.
- Gatto, GJ; Boyne, MT; Kelleher, NL; Walsh, CT (2006): Biosynthesis of pipecolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 128(9): 3838-3857.
- Gerratana, B (2012): Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Medicinal Research Reviews*, 32(2): 254-293.
- Gernau, S; Dorrestein, PC; Kelleher, NL; Walsh, CT (2005): Protein assembly line components in prodigiosin biosynthesis: characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis. *Biochemistry*, 44(8): 2770-2780.
- Gernau-Tsodikova, S; Kelleher, NL; Walsh, CT (2006): Protein assembly line components in prodigiosin biosynthesis: characterization of PigA,G,H,I,J. *Journal of the American Chemical Society*, 128(39): 12600-12601.
- He, HY; Williamson, RT; Shen, B; Graziani, EI; Yang, HY; Sakya, SM; Petersen, PJ; Carter, GT (2002): Mannopeptimycins, novel antibacterial glycopeptides from *Streptomyces hygroscopicus*, LL-AC98. *Journal of the American Chemical Society*, 124(33): 9729-9736.
- Hoeksema, H (1964): Celesticetin. IV. The structure of celesticetin. *Journal of the American Chemical Society*, 86(19): 4224-4225.
- Hoeksema, H; Magerlein, BJ; Kagan, F; Herr, RR; Slomp, G; Birkenmeyer, RD; Bannister, B; Schroeder, W; Mackellar, FA (1964): Chemical studies on lincomycin. I. The structure of lincomycin. *Journal of the American Chemical Society*, 86(19): 4223-4224.
- 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. *Chemistry & Biology*, 18(3): 381-391.
- Hopwood, DA (1988): The Leeuwenhoek lecture, 1987 – towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*, 235(1279): 121-138.
- Hopwood, DA (1999): Forty years of genetics with *Streptomyces*: From *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology*, 145(9): 2183-2202.
- Hopwood, DA; Malpartida, F; Kieser, HM; Ikeda, H; Duncan, J; Fujii, I; Rudd, BAM; Floss, HG; Omura, S (1985): Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*, 314(6012): 642-644.
- Hu, Y; Phelan, V; Ntai, I; Farnet, CM; Zazopoulos, E; Bachmann, BO (2007): Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology*, 14(6): 691-701.

Huang, YT; Lyu, SY; Chuang, PH; Hsu, NS; Li, YS; Chan, HC; Huang, CJ; Liu, YC; Wu, CJ; Yang, WB; Li, TL (2009): *In vitro* characterization of enzymes involved in the synthesis of neproteinogenic residue (2S,3S)- $\beta$ -methylphenylalanine in glycopeptide antibiotic mannopeptimycin. *ChemBioChem*, 10(15): 2480-2487.

Hurley, LH (1977): Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics. Comparative aspects of anthramycin, tomaymycin and sibiromycin. *The Journal of Antibiotics*, 30(5): 349-370.

Hurley, LH (1980): Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin. *Accounts of Chemical Research*, 13(8): 263-269.

Hurley, LH; Zmijewski, M (1974): Biosynthesis of the antitumor antibiotic anthramycin by *Streptomyces refuines*. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 9: 337-338.

Ikeda H; Ishikawa, J; Hanamoto, A; Shinose, M; Kikuchi, H; Shiba, T; Sakaki, Y; Hattori, M; Omura, S (2003): Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 21(5): 526-531.

Janata, J; Kadlčík, S; Koběrská, 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(3).

Jiráčková, P (2012): Příprava a charakterizace proteinu LmbX zúčastněného v biosyntéze antibiotika linkomycinu. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Diplomová práce.

Jirásková, P; Gažák, R; Kameník, Z; Steiningerová, L; Najmanová, L; Kadlčík, S; Novotná, J; Kuzma, M; Janata, J (v přípravě): Revision of the biosynthetic pathway for 4-alkyl-L-proline precursors of pyrrolobenzodiazepines, lincomycin and hormaomycin.

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(12): 1-16.

Kagan, RM; Clarke, S (1994): Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggest a common structure for these enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2): 417-427.

Kameník, Z; Jirásková, P; Gažák, R; Kadlčík, S; Radojevic, B; Steiningerová, L; Novotná, J; Kuzma, M; Najmanová, L; Janata, J (v přípravě): Deacetylation of mycothiol-dependent detoxification 'waste product' switches the machinery towards completion of antibiotic biosynthesis.

Kariyone, K; Yazawa, H; Kohsaka, M (1971): The structures of tomaymycin and oxotomaymycin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 19(11): 2289-2293.

Kerr, SJ (1972): Competing methyltransferase systems. *Journal of Biological Chemistry*, 247(13): 4248-4252.

Koběrská, M (2010): Komparativní analýza shluku genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Dizertační práce.

Koběrská, M; Kopecký, J; Olšovská, J; Jelínková, M; Ulanová, D; Man, P; Flieger, M; Janata, J (2008): Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiologica*, 53(5): 395-401.

Kunst, F; Ogasawara, N; Moszer, I; Albertini, AM; Alloni, G; Azevedo, V; Bertero, MG; Bessieres, P; Bolotin, A; Borchert, S; Borriss, R; Boursier, L; Brans, A; Braun, M; Brignell, SC; Bron, S; Brouillet, S; Bruschi, CV; Caldwell, B; Capuano, V; Carter, NM; Choi, SK; Codani, JJ; Connerton, IF; Cummings, NJ; Daniel, RA; Denizot, F; Devine, KM; Dusterhoft, A; Ehrlich, SD; Emmerson, PT; Entian, KD; Errington, J; Fabret, C; Ferrari, E; Foulger, D; Fritz, C; Fujita, M; Fujita, Y; Fuma, S; Galizzi, A; Galleron, N; Ghim, SY; Glaser, P; Goffeau, A; Golightly, EJ; Grandi, G; Guiseppi, G; Guy, BJ; Haga, K; Haiech, J; Harwood, CR; Henaut, A; Hilbert, H; Holsappel, S; Hosono, S; Hullo, MF; Itaya, M; Jones, L; Joris, B; Karamata, D; Kasahara, Y; KlaerrBlanchard, M; Klein, C; Kobayashi, Y; Koetter, P; Koningstein, G; Krogh, S; Kumano, M; Kurita, K; Lapidus, A; Lardinois, S; Lauber, J; Lazarevic, V; Lee, SM; Levine, A; Liu, H; Masuda, S; Mauel, C; Medigue, C; Medina, N; Mellado, RP; Mizuno, M; Moestl, D; Nakai, S; Noback, M; Noone, D; O'Reilly, M; Ogawa, K; Ogiwara, A; Oudega, B; Park, SH; Parro, V; Pohl, TM; Portetelle, D; Porwollik, S; Prescott, AM; Presecan, E; Pujic, P; Purnelle, B; Rapoport, G; Rey, M; Reynolds, S; Rieger, M; Rivolta, C; Rocha, E; Roche, B; Rose, M; Sadaie, Y; Sato, T; Scanlan, E; Schleich, S; Schroeter, R; Scoffone, F; Sekiguchi, J; Sekowska, A; Seror, SJ; Serror, P; Shin, BS; Soldo, B; Sorokin, A; Tacconi, E; Takagi, T; Takahashi, H; Takemaru, K; Takeuchi, M; Tamakoshi, A; Tanaka, T; Terpstra, P; Tognoni, A; Tosato, V; Uchiyama, S; Vandenbol, M; Vannier, F; Vassarotti, A; Viari, A; Wambutt, R; Wedler, E; Wedler, H; Weitzenegger, T; Winters, P; Wipat, A; Yamamoto, H; Yamane, K; Yasumoto, K; Yata, K; Yoshida, K; Yoshikawa, HF; Zumstein, E; Yoshikawa, H; Danchin, A (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657): 249-256.

Kuo, MS; Yurek, DA; Coats, JH; Chung, ST; Li, GP (1992): Isolation and identification of 3-propylidene- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *Journal of Antibiotics*, 45(11): 1773-1777.

Leimgruber, W; Batcho, AD; Schenker, F (1965): The structure of anthramycin. *Journal of the American Chemical Society*, 87(24): 5793-5795.

Li, S; Anzai, Y; Kinoshita, K; Kato, F; Sherman, DH (2009): Functional analysis of MycE and MycF, two O-methyltransferases involved in biosynthesis of mycinamicin macrolide antibiotics. *ChemBioChem*, 10(8): 1297-1301.

Li, W; Chou, SC; Khullar, A; Gerratana, B (2009b): Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9): 2958-2963.

Li, W; Khullar, A; Chou, S; Sacramo, A; Gerratana, B (2009a): Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9): 2869-2878.

Lin, CI; Sasaki, E; Zhong, AS; Liu, HW (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. *Journal of the American Chemical Society*, 136(3): 906-909.

Magerlein, BJ (1971): Modification of lincomycin. *Advances of Applied Microbiology*, 14: 185-229.

Magarvey, NA; Haltli, B; He, M; Greenstein, M; Hucul, JA (2006): Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglykopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6): 2167-2177.

Martin, JL; McMillan, FM (2002): SAM dependent I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), 783-793.

- Medema, MH; Cimermanic, P; Sali, A; Takano, E; Fisbach, MA (2014): A systematic computational analysis of biosynthetic gene cluster evolution: lessons for engineering biosynthesis. *Plos Computational Biology*, 10(12): 2-12.
- Mesentsev, AS; Kuljeava, VV; Tubasheva, LM (1974): Structure of sibiromycin. *The Journal of Antibiotics*, 27(11): 866-873.
- Najmanová, L; Kutějová, E; Kadlec, J; Polan, M; Olšovská, J; Beneda, O; Novotná, J; Kameník, Z; Halada, P; Bauer, J; Janata, J (2013): Characterization of N-demethyl lincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ. *ChemBioChem*, 14(17): 2259-2262.
- Najmanová, L; Ulanová, D; Jelínková, M; Kameník, Z; Kettnerová, E; Koběřská, M; Gažák, R; Radojevic, B; Janata, J (2014): Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiologica*, 59(6): 543-552.
- Novotná, J; Honzátko, A; Bednář, P; Kopecký, J; Janata, J; Spížek, J (2004): L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 271(18): 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(12):6-15.
- Ohnisi, Y; Ishikawa, J; Hara, H; Suzuki, H; Ikenoya, M; Ikeda, H; Yamashita, A; Hattori, M; Horinouchi, S (2008): Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 190(11): 4050-4060.
- Ohsawa, N; Tsujita, M; Morikawa, S; Itoh, N (2001): Purification and characterization of a monohalomethane-producing S-adenosyl-L-methionine: halide ion methyltransferase from a marine microalga, *Pavlova pinguis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(11): 2397-2404.
- Olšovská, J; Jelínková, M; Man, P; Koběřská, M; Janata, J; Flieger, M (2007): High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces spp.* Comparison of ultra-performance liquid chromatography and highperformance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1139(2): 214-220.
- Omura, S; Mamada, H; Wang, NJ; Imamura, N; Oiwa, R; Iwai, Y; Muto, N (1984): Takokamycin, a new peptide antibiotic produced by *Streptomyces sp.* *The Journal of Antibiotics*, 37(7): 700-705.
- Peschke, U; Schmidt, H; Zhang, HZ; Piepersberg, W (1995): Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology*, 16(6): 1137-1156.
- Petrusek, RL; Anderson, GL; Garner, TF; Fannin, QL; Kaplan, DJ; Zimmer, SG; Hurley, LH (1981): Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the *in vitro* deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycin A and B. *Biochemistry*, 20(5): 1111-1119.
- Rossolini, GM; Arena, F; Pecile, P; Pollini, S (2014): Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18:56-60.
- Saha S; Li, W; Gerratana, B; Rokita, SE (2015): Identification of the dioxygenase-generated intermediate formed during biosynthesis of the dihydropyrrole moiety common to anthramycin and sibiromycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(3): 449-454.

- Sakai, A; Mitsumori, A; Furukawa, M; Kinoshita, K; Anzai, Y; Kato, F (2012): Production of a hybrid 16-membered macrolide antibiotic by genetic engineering of *Micromonospora sp.* TPMA0041. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(11): 1693-1701.
- Sasaki, E; Chia-I, L; Ke-Yi, L (2012): Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN. *Journal of the American Chemical Society*, 134 (42): 17432-17435.
- Schroeder, W; Bannister, B; Hoeksema, H (1967): Lincomycin. III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *Journal of the American Chemical Society*, 89(10): 2448-2453.
- Schubert, HL; Blumenthal, RM; Cheng, X (2003): Many paths to methyltransfer. A chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6): 329-335.
- Singh, MP; Petersen, PJ; Weiss, WJ; Janso, JE; Luckman, SW; Lenoy, EB; Bradford, PA; Testa, RT; Greenstein, A (2003): Mannopectimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1): 62-69.
- Spížek, J; Novotná, J; Řezanka, T (2004): Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 56:121-154.
- Stecher, H; Tengg, M; Ueberbacher, BJ; Remler, P; Schwab, J; Griengl, H; Gruber-Khadjawi, M (2009): Biocatalytic Friedel-Crafts alkylation using non-natural cofactors. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(50): 9546-9548.
- Struck, AW; Thompson, ML; Wong, LS; Micklefield, J (2012): S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem*, 13(18): 2642-2655.
- Takeshita, S; Sato, M; Toba, M; Masahashi, W; Hashimoto-gotoh, T (1987). High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for lacZ- $\alpha$  complementation and chloramfenicol-resistance or kanamycin-resistance. *Gene*, 61(1): 63-74.
- Tandler, M; Korman, S (1963): 'Refuin' : a non-cytotoxic carcinostatic compound proliferated by a thermophilic actinomycete. *Nature*, 1963(489): 501.
- Tenson, T; Lovmar, M; Ehrenberg, M (2003): The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330(5): 1005-1014.
- Trefzer, A; Pelzer, S; Schimana, J; Stockert, S; Bihlmaier, C; Fiedler, HP; Welzel, K; Vente, A; Bechthold, A (2002): Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5): 1174-1182.
- Tsunakawa, M; Kamie, H; Konishi, M; Miyaki, T; Oki, T; Kawaguchi, H (1988): Prothramycin, a new antibiotic of the anthramycin group: production, isolation, structure and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 41(10): 1366-1373.
- Tsunakawa, M; Konishi, M; Miyaki, T (1987): BMY-28121, a new antitumor antibiotic. United States Patent: 4683230.
- Ulanová, D; Novotná, J; Smutná, Y; Kameník, Z; Gažák, R; Šulc, R; Sedmera, P; Kadlčík, S; Plháčková, K; Janata, J (2010): Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2): 927-930.

- Umezawa, K; Ikeda, Y; Kawase, O; Naganawa, H; Kondo, S (2001): Biosynthesis of polyoxypeptin A: novel amino acid 3-hydroxy-3-methylproline derived from isoleucine. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions 1*, 13: 1550-1553.
- Vidgren, J; Svensson, L; Liljas, A (1994): Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature*, 368(6469): 354-358.
- Völksch, B; Nuske, J; May, R (1996): Characterization of two epiphytic bacteria from soybean leaves with antagonistic activities against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Basic Microbiology*, 36(6): 453-462.
- Waksman, SA; Henrici, AT (1943): The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *Journal of Bacteriology*, 46(4): 337-341.
- Walsh, TCH; Fischbach, MA (2010): Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 132(8): 2469-2493.
- Witz, DF; Hessler, EJ; Miller, TL (1971): Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry*, 10(7): 1128-1133.
- Wlodarski, T; Kutner, J; Towpik, J; Knizewski, L; Rychlewski, L; Kudlicki, A; Rowicka, M; Dziembowski, A; Ginalski K (2011): Comprehensive structural and substrate specificity classification of the *Saccharomyces cerevisiae* methyltransferase. *Plos One*, 6(8): 1-12.
- Yim, G; Wang, HMH; Davies, J (2007): Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 362(1483): 1195-1200.
- Zerikly, M; Challis, GL (2009): Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *ChemBioChem*, 10(4): 625-633.
- Zhao, QF; Wang, M; Xu, DX; Zhang, Q; Liu, W (2015): Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*, 518(7537): 115-119.
- Zlatopolskiy, BD; de Meijere, A (2004): First total synthesis of hormaomycin, a naturally occurring depsipeptide with interesting biological activities. *Chemistry - A European Journal*, 10(19): 4718-4727.
- Zou, XW; Liu, YC; Hsu, NS; Huang, CJ; Lyu, SY; Chan, H; Chang, CY; Yeh, HW; Lin, KH; Wu, CJ; Tsai, MD; Li, TL (2014): Structure and mechanism of a nonhem-iron SAM-dependent C-methyltransferase and its engineering to a hydratase and an O-methyltransferase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 70(6): 1549-1560.