

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lukáš Cudlman

**ANALÝZA A IZOLACE INTERMEDIÁTŮ BIOSYNTETICKÉ
DRÁHY ALKYLPROLINOVÝCH DERIVÁTŮ**

**Analysis and isolation of intermediates involved in the
biosynthetic pathway of alkylproline derivatives**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

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

V Praze dne 13. května 2019

.....

Lukáš Cudlman

Tato diplomová práce vznikala v letech 2017 – 2019 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu. Práce byla finančně podporována z grantů BIOCEV s registračním číslem CZ.1.05/1.1.00/02.0109 a GA ČR s registračním číslem 17-13436Y. Byla mi také umožněna účast, se získáním nových poznatků, na vědecké konferenci „The Chemistry and Biology of Natural Products Symposium XII“, Velká Británie, 2018.

Poděkování

Rád bych především poděkoval své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení této diplomové práce. Chtěl bych poděkovat Ing. Jiřímu Janatovi, CSc., vedoucímu laboratoře Biologie sekundárního metabolismu, za vytvoření přátelského prostředí v laboratoři. Velké poděkování patří Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi, Ph.D. za uvedení do dané problematiky a za trpělivost. Poděkování patří také Mgr. Lucii Steiningarové za veškerou pomoc z oblasti mikrobiologie. Velice rád bych poděkoval své rodině za veškerou podporu během celého studia.

ABSTRAKT (CZ)

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu, analýzu a izolaci intermediátů biosyntetické dráhy 4-alkyl-L-prolinových derivátů pro jejich strukturní identifikaci. Mezi sloučeniny obsahující inkorporované 4-alkyl-L-prolinové deriváty patří klinicky používané antibiotikum, linkomycin A, ze skupiny linkosamidů, dále některé pyrrolbenzodiazepiny s protinádorovými účinky a bakteriální hormon hormaomycin. Studium intermediátů biosyntetických drah těchto biologicky aktivních sloučenin je možné získat poznatky, které mohou být využity při přípravě nových a účinnějších derivátů biologicky aktivních metabolitů.

První část diplomové práce se zaměřuje na žlutě zbarvené dikarboxylové intermediáty **1** a **2** biosyntetické dráhy 4-propyl-L-prolinu – prekursoru linkomycinu A. V přítomnosti methylačního činidla *S*-adenosyl-L-methioninu a C-methyltransferasy LmbW se podařilo částečně přeměnit intermediát **1** na intermediát **2**. Obě sloučeniny byly identifikovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie z absorpčních i hmotnostně-spektrometrických spekter. Byla vyvinuta semi-preparativní chromatografická metoda pro izolaci obou intermediátů. Neočekávaně byla zjištěna výrazně nižší stabilita intermediátu **2** ve srovnání s intermediátem **1** v *in vitro* enzymatické reakční směsi.

Druhá část diplomové práce se zaměřuje na 4-ethyliden-L-prolin – prekursor tomaymycinu ze skupiny pyrrolbenzodiazepinů. Po optimalizaci extrakční metody na pevné fázi byl 4-ethyliden-L-prolin identifikován v kultivačním médiu *Streptomyces purpureus* pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. V rámci vývoje metody pro izolaci 4-ethyliden-L-prolinu pomocí strukturně podobných 4-alkyl-L-prolinových derivátů v semi-preparativním chromatografickém módu byly jako vodné složky mobilní fáze testovány mravenčan a octan amonný o různých iontových silách a hodnotách pH. Metoda byla využita k izolaci 0,7 mg 4-ethyliden-L-prolinu z kultivačního média k následnému určení *E/Z* konfigurace na exocyklické dvojné vazbě pomocí nukleární magnetické rezonance.

ABSTRACT (EN)

This work aims at preparation, analysis and isolation of intermediates of biosynthetic pathways of 4-alkyl-L-proline derivatives for their structural elucidation. Compounds with incorporated 4-alkyl-L-proline derivatives include clinically used lincosamide antibiotic, lincomycin A, antitumor pyrrolbenzodiazepines and bacterial hormone hormaomycin. Detailed knowledge of biosynthetic pathways of these biological active substances can be used to prepare new, more efficient derivatives.

The first part of this work focuses on yellow-coloured dicarboxylic intermediates **1** and **2** of the biosynthetic pathway of 4-propyl-L-proline – the precursor of lincomycin A. In the presence of the methylation agent, *S*-adenosyl-L-methionine, and LmbW C-methyltransferase, **1** was partially converted into intermediate **2**. Using ultra-high performance liquid chromatography, both intermediates were identified from absorption and mass spectrometry spectra. A semi-preparative chromatographic method for isolation of both intermediates was developed. Surprisingly, a significantly lower stability of **2** compared to intermediate **1** was observed in an *in vitro* enzymatic reaction mixture.

The second part of the work focuses on 4-ethylidene-L-proline – the precursor of tomaymycin belonging to pyrrolbenzodiazepines. After optimization of the solid-phase extraction method, 4-ethylidene-L-proline was identified in the culture medium of *Streptomyces purpureus* using ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. For the development of the method for 4-ethylidene-L-proline isolation, structurally similar 4-alkyl-L-proline derivatives were used. For separation of the analytes in the semi-preparative high performance liquid chromatography mode, ammonium formate and ammonium acetate of different ionic strengths and pH as the aqueous part of the mobile phase were tested. The optimized isocratic method was used to isolate 0.7 mg of 4-ethylidene-L-proline from culture broth for subsequent determination of *E/Z* configuration at the exocyclic double bond by nuclear magnetic resonance.

Klíčová slova

4-alkyl-L-prolinové deriváty, intermediát, linkomycin, protein LmbW, tomaymycin, extrakce na pevné fázi, UHPLC-DAD-MS, HPLC-UV

Keywords

4-alkyl-L-proline derivatives, intermediate, lincomycin, protein LmbW, tomaymycin, solid-phase extraction, UHPLC-DAD-MS, HPLC-UV

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část	13
2.1	Mikrobiální specializované metabolity.....	13
2.1.1	Specializované metabolity obsahující APD	13
2.1.1.1	Linkosamidy	14
2.1.1.2	Pyrrlobenzodiazepiny	15
2.1.1.3	Hormaomycin	16
2.1.2	Další skupina sloučenin obsahujících APD	17
2.2	Biosyntetická dráha APD.....	17
2.2.1	Vývoj biosyntézy APD do současnosti	19
2.2.2	Biosyntéza PPL inkorporovaného do linkomycinu.....	19
2.2.2.1	Vlastnosti intermediátů 1 a 2	21
2.2.3	Biosyntéza DH-EPL inkorporovaného do tomaymycinu.....	22
2.3	Kapalinová chromatografie.....	23
2.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	23
2.3.1.1	Chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC).....	24
2.3.1.2	Chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC).....	25
2.3.1.3	Iontově-výměnná chromatografie (IEC).....	25
2.3.1.4	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).....	26
2.3.2	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)	27
2.3.3	Trendy ve vývoji částic v kapalinové chromatografii.....	27
2.4	Detekce v kapalinové chromatografii	28
2.5	Extrakce na pevné fázi (SPE)	29
2.6	Cíle práce	30
3	Experimentální část.....	31
3.1	Biologické vzorky.....	31
3.2	Standardní látky	31
3.3	Chemikálie	31
3.4	Pufry.....	32
3.5	Kultivační média.....	32
3.6	Instrumentace.....	33
3.7	Výpočetní technika a software.....	34
3.8	Metody.....	34

3.8.1	Příprava intermediátů 1 a 2	34
3.8.2	Testování stability intermediátů 1 a 2	34
3.8.3	Příprava intermediátu DH-EPL	35
3.8.4	Extrakce intermediátu DH-EPL (analytický mód).....	35
3.8.5	Extrakce intermediátu DH-EPL (semi-preparativní mód)	36
3.8.6	UHPLC-DAD-MS analýzy (analytický mód).....	36
3.8.7	HPLC-UV analýzy (semi-preparativní mód)	38
4	Výsledky a diskuse	40
4.1	Analýza a izolace intermediátů 1 a 2	40
4.1.1	Analýza enzymatické reakční směsi s LmbW.....	40
4.1.2	Izolace z enzymatické reakční směsi s LmbW.....	42
4.1.3	Testování stability intermediátů 1 a 2	43
4.1.3.1	Stabilita intermediátů 1 a 2	44
4.1.4	Neznámé látky v enzymatické reakční směsi.....	45
4.1.5	Existence isomeru intermediátu 1	46
4.2	Analýza a izolace DH-EPL.....	47
4.2.1	Analýza DH-EPL v kultivačním médiu	47
4.2.2	Optimalizace elučního kroku v extrakci DH-EPL	49
4.2.3	Vývoj semi-preparativní metody izolace DH-EPL	50
4.2.3.1	Určení retenčních časů standardních látek.....	51
4.2.3.2	Výběr poměru acetonitrilu k vodné složce mobilní fáze	52
4.2.3.3	Výběr vodné složky mobilní fáze (pH, iontová síla či přídavek methanolu)	53
4.2.4	Izolace DH-EPL z kultivačního média s off-line LC-MS analýzou	56
4.2.5	Finální vzorek DH-EPL k analýze NMR	56
5	Závěr	59
6	Použitá literatura	60

Seznam zkratek a použitých symbolů

APD	4-alkyl-L-prolinový derivát/4-alkyl-L-prolinové deriváty
Apd	označení pro proteiny účastníci se biosyntézy APD
AU	absorpční jednotka
BEH	hybridní stacionární fáze modifikovaná ethylenovými můstky (z angl. „Bridged ethylene hybrid“)
BPI	chromatogram píků při základní linii (z angl. „Base-peak chromatogram“)
C ₈	oktyl
C ₁₈	oktadecyl
CSH	hybridní stacionární fáze (z angl. „Charged surface hybrid“) vycházející z technologie „Bridged ethylene hybrid“ (BEH)
DAD	detektor s diodovým polem (z angl. „Diode array detector“)
DH-EPL	4-ethyliden-L-prolin
DH-PPL	4-propyliden-L-prolin
DH-PPL _h	4-(Z)-propenyl-L-prolin
EPL	4-ethyl-L-prolin
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. „Electrospray ionization“)
ESI ⁺	ionizace elektrosprejem v kladném módu
ESI ⁻	ionizace elektrosprejem v záporném módu
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. „Hydrophilic interaction liquid chromatography“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „High performance liquid chromatography“)
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí absorpčním spektrofotometrickým detektorem
IEC	iontově-výměnná chromatografie (z angl. „Ion-exchange chromatography“)
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem

L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
Lmb	označení pro proteiny účastníci se biosyntézy linkomycinu
MCX	sorbent v kolonce SPE na bázi hybridního iontoměníče kationtů (z angl. „Mixed cation exchange“)
MS	hmotnostně-spektrometrický (z angl. „Mass-spectrometric“)
<i>m/z</i>	poměr hmotnost/náboj
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. „Nuclear magnetic resonance“)
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi (z angl. „Normal-phase HPLC“)
PBD	pyrrolbenzodiazepiny
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
PPL	4-propyl-L-prolin
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. „Reversed-phase HPLC“)
RPM	počet otáček za minutu (z angl. „Rotation per minute“)
SAM	<i>S</i> -(5'-adenosyl)-L-methionin chlorid dihydrochlorid/ <i>S</i> -adenosyl-L-methionin
SPE	extrakce na tuhé fázi (z angl. „Solid-phase extraction“)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. „Time-of-flight“)
Tom	označení pro proteiny účastníci se biosyntézy tomaymycinu
<i>t_R</i>	retenční čas
<i>u</i>	lineární průtoková rychlost mobilní fáze
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „Ultra-high performance liquid chromatography“)
UHPLC-DAD-MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s detektorem s diodovým polem a hmotnostním spektrometrem
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření (z angl. „Ultraviolet/visible“)
<i>v/v</i>	objemové zlomky
λ	vlnová délka
$\Delta lmbA$	inaktivovaný gen <i>LmbA</i> producenta linkomycinu

1 Úvod

Mikroorganismy patří mezi významné producenty tzv. specializovaných (sekundárních) metabolitů. Tyto chemicky různorodé látky plní v přírodě důležité funkce. K jedné z nich patří ochrana před ostatními mikroorganismy, hmyzem či rostlinami. Specializované metabolity nejsou však nezbytné pro růst a rozmnožování mikroorganismu. Většina mikrobiálních specializovaných metabolitů se vyznačuje biologickou aktivitou, např. antimikrobiálními, antivirovými, antifungálními, protinádorovými či také imunosupresivními účinky. Látky s antimikrobiálními účinky jsou v klinické praxi využívány jako zdroj antibiotik při léčbě bakteriálních infekčních onemocnění. Mezi významné producenty těchto unikátních sloučenin patří půdní bakterie rodu *Streptomyces*, ale i některé druhy hub či vyšší rostliny [1 – 3].

Od přelomu 20. století se mluví o tzv. antibiotické krizi zapříčiněné zvyšující se bakteriální rezistencí. Z toho plyne skutečnost, že proti některým infekcím jsou antibiotika neúčinná, a proto je v současné době nutné hledat nové sloučeniny s významnými biologickými účinky [4 – 5].

Oblast výzkumu se dnes zaměřuje na cílené vyhledávání biologicky aktivních specializovaných metabolitů, produkovaných např. bakteriemi rodu *Streptomyces*, zařazovanými do třídy Aktinobakterií [3]. Se zvyšujícím se počtem sekvenovaných genomů, které jsou dostupné ve veřejně přístupných databázích, lze získat informace o nových biosyntetických klastrech specializovaných metabolitů [6]. Společně s izolačními metodami se rozvíjí moderní analytické techniky kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, které jsou dostatečně účinné a univerzální pro identifikaci a kvantifikaci těchto sloučenin [7 – 9]. Kombinace těchto přístupů umožňuje efektivní studium biosyntetických drah těchto metabolitů a získané znalosti mohou být využity při přípravě nových derivátů s např. výhodnějšími farmakokinetickými či farmakodynamickými parametry [6].

Tato diplomová práce se věnuje specializovaným metabolitům obsahujících 4-alkyl-L-prolinové deriváty (APD), pro jejichž studium je klíčové porozumění enzymatickým procesům jejich biosyntetických drah. Mezi známé sloučeniny obsahující APD patří linkosamidy, pyrrolbenzodiazepiny (PBD) a hormaomycin. Tyto látky se vyznačují rozdílnou strukturou a funkcí, avšak disponují společnou APD

jednotkou.

Linkomycin A (dále linkomycin) ze skupiny linkosamidů působí svými biologickými účinky proti gram-pozitivním bakteriím, např. *Streptococcus* a *Staphylococcus*. PBD se vyznačují antimikrobiálními a především protinádorovými účinky. Hormaomycin slouží některým bakteriím jako signální molekula [10].

2 Teoretická část

2.1 Mikrobiální specializované metabolity

Ve srovnání s primárními metabolity, mezi které jsou zařazovány např. sacharidy, bílkoviny, lipidy a nukleové kyseliny, nejsou specializované metabolity zcela nezbytné pro život organismů. Předpokládá se, že jednou z jejich rolí je ochrana před napadením jinými (mikro)organismy, ale spektrum jejich významu bude pravděpodobně daleko širší. Velké množství specializovaných metabolitů produkují půdní bakterie, což je vysvětlováno jejich velmi omezenými možnostmi pohybu v půdních podmínkách v boji o přežití [1 – 3].

Biologický účinek mikrobiálních specializovaných metabolitů spočívá v zásahu do životního cyklu jiných prokaryotních či eukaryotních organismů na biochemické úrovni v minimálních koncentracích. Konkrétně tyto metabolity ovlivňují syntézu buněčné stěny, replikaci nukleových kyselin či proteosyntézu [1].

Mezi nejvýznamnější mikrobiální specializované metabolity patří bezesporu antibiotika, jejichž výzkum byl odstartován objevem penicilinu mikrobiologem Alexandrem Flemingem. Na rozdíl od penicilinu je však dnes většina používaných antibiotik produkována některými rody Aktinobakterií [1, 5]. Dalšími významnými antibiotiky produkovány mikroorganismy jsou ampicilin či vankomycin [2].

Vedle antibiotik produkují mikroorganismy také látky s antifungálními (natamycin), protinádorovými (doxorubicin), hypercholesterolemickými (pravastatin) nebo imunosupresivními účinky (cyklosporin A) [2].

2.1.1 Specializované metabolity obsahující APD

K dosud známým specializovaným metabolitům, které mají ve své struktuře zabudované APD, patří linkosamidy, PBD a hormaomycin. Jedná se o chemicky různorodé látky s odlišnými biologickými funkcemi, které jsou produkovány zejména bakteriemi *Streptomyces*. APD jsou formálně odvozeny od nepolární aminokyseliny L-prolinu připojením alkylového zbytku na uhlík C-4'. Jejich biosyntetický původ však vychází z tzv. specializovaného (sekundárního) metabolismu L-tyrosinu [10].

Existuje několik variant APD, které se do linkosamidů, PBD a hormaomycinu inkorporují: mezi APD s dvouuhlíkatým postranním řetězcem patří 4-ethyl-L-prolin (EPL) a 4-ethyliden-L-prolin (DH-EPL). K APD s tříuhlíkatým postranním řetězcem patří 4-propyl-L-prolin (PPL), 4-propyliden-L-prolin (DH-PPL) a 4-(Z)-propenyl-L-prolin (DH-PPL_h) [10].

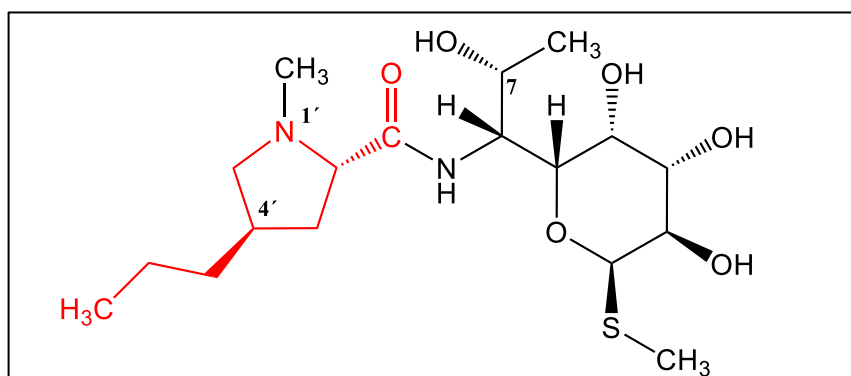
2.1.1.1 Linkosamidy

Linkomycin, patřící do této skupiny, je produkován bakteriálním kmenem *Streptomyces lincolnensis* [11]. Patří sem také méně biologicky aktivní celesticetin [12] a semisyntetický derivát klindamycin [13]. Linkomycin a klindamycin jsou hojně využívány v klinické praxi proti onemocněním způsobených gram-pozitivními bakteriemi *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Pneumococcus* [10]. Účinnější klindamycin, který se vyrábí chlorací linkomycinu [13], disponuje antimalarickými účinky. Klindamycin se v klinické praxi (v kombinaci s dalšími léky) používá k léčbě malárie v některých specifických případech, např. u těhotných žen, pro které jsou jiná antimalarika vysoce toxická [14].

Mechanismus působení linkosamidů na bakteriální buňku je specifický. Spočívá v inhibici proteosyntézy vazbou na 50S podjednotku ribozomu. V důsledku této inhibice nemůže bakterie syntetizovat proteiny potřebné pro její vývoj a růst [15].

Molekula linkomycinu obsahující ve své struktuře PPL je tvořena dvěma částmi, aminokyselinovou a sacharidovou (thiooktosa). Uhlík C-4' a dusík N-1' v aminokyselinové části a uhlík C-7 v sacharidové části jsou důležitá místa pro biologickou aktivitu linkomycinu (obr. 1). Také různé substituenty na linkomycinu mají významný vliv na jeho biologickou aktivitu, např. methylová skupina na dusíku N-1' [11].

Molekula linkomycinu B, která je vedlejším produktem *S. lincolnensis*, obsahuje ve své struktuře EPL. Postranní řetězec linkomycinu B je tak o jeden uhlík kratší než v případě linkomycinu. Je známo, že s prodlužující se délkou postranního řetězce APD se zvyšuje biologická aktivita. To je důvodem nižší biologické aktivity linkomycinu B ve srovnání s linkomycinem [10].



Obr. 1. Chemická struktura linkomycinu. Červeně je zvýrazněn inkorporovaný PPL [10].

2.1.1.2 Pyrrolobenzodiazepiny

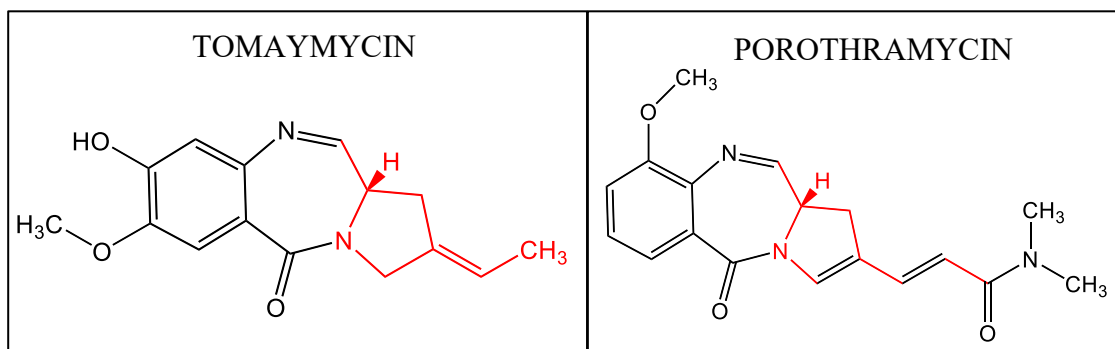
PBD jsou v přírodě se vyskytující látky s protinádorovými účinky, které jsou známé i slabšími antibakteriálními účinky [16]. Mezi typické producenty těchto rozmanitých sloučenin patří bakterie rodu *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Amycolatopsis* a *Nocardia* [10].

Mechanismus působení PBD spočívá v jeho inkorporaci do malého žlábků DNA, kde ireverzibilně interaguje s bázemi, konkrétně s guaninem, a tím způsobuje lehkou distorzi dvoušroubovice DNA. Molekula PBD se dokonale umístí do definovaného místa v molekule DNA nádorové buňky. Nekovalentní interakce PBD-DNA inaktivuje transkripční faktory, a tak je znemožněna transkripce a následná translace [17].

Molekula PBD se skládá z tricyklického systému, jedná se o kruh anthranilátový, diazepinový a hydroxyrrolový. Vysoká variabilita PBD je dána inkorporací dvou- nebo tříuhlíkatého APD, který tvoří hydroxyrrolový kruh, a řadou modifikací na tomto a na anthranilátovém kruhu [18]. Mezi PBD, které obsahují APD s dvouuhlíkatým postranním řetězcem, patří tomaymycin, oxotomaymycin a limazepiny. Mezi PBD obsahující APD s tříuhlíkatým postranním řetězcem jsou zařazovány anthramycin, oxoanthramycin, sibiromycin a prothramycin. Biologický účinek se zvyšuje s délkou alkylového řetězce stejně tak jako u linkosamidů [10].

Tomaymycin (obr. 2), který je produkován bakteriálním kmenem *Streptomyces achromogenes* [19], má jako APD zabudován DH-EPL [20]. Ve své struktuře ho mají pravděpodobně inkorporovány i některé limazepiny [10].

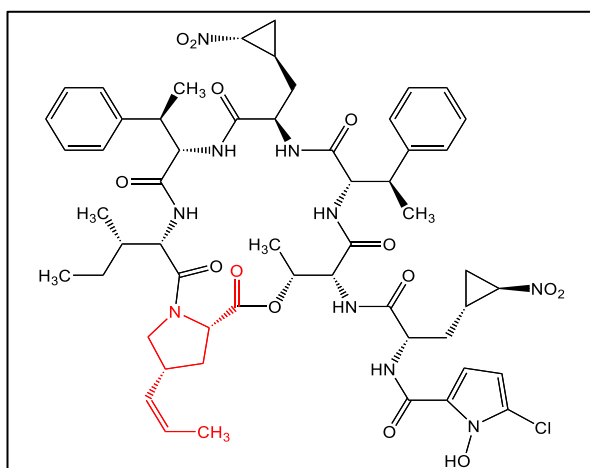
Porothramycin (obr. 2) je produkován *Streptomyces albus*. Obsahuje nejvíce modifikovanou APD jednotku – dehydroprolinakryl-(*N,N'*-dimethyl)amid [21].



Obr. 2. Chemická struktura tomaymycinu a porothramycinu. Červeně jsou zvýrazněny: u struktury tomaymycinu inkorporovaný DH-EPL a u porothramycinu inkorporovaný DH-PPL [10].

2.1.1.3 Hormaomycin

Hormaomycin (obr. 3) je bakteriální signální molekula, kterou produkuje bakterie *Streptomyces griseoflavus*. Jedná se o složitý peptidový lakton obsahující inkorporovaný DH-PPL_h. Jeho biologické účinky jsou velmi rozmanité. Hormaomycin iniciuje tvorbu vzdušného mycelia u rodu *Streptomyces* a u některých kmenů také zvyšuje produkci antibiotik – mechanismus není zcela objasněn. Hormaomycin je také účinným antibiotikem proti koryneformním bakteriím [10, 22].



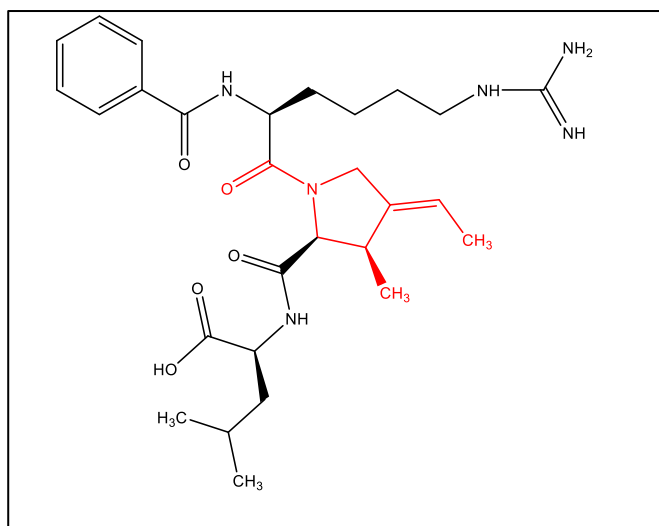
Obr. 3. Chemická struktura hormaomycinu. Červeně je zvýrazněn inkorporovaný DH-PPL_h [10].

2.1.2 Další skupina sloučenin obsahujících APD

Existují i biologicky aktivní látky obsahující APD, u kterých, na rozdíl od výše popsaných tří skupin specializovaných metabolitů, není znám biosyntetický genový klastr. Do této skupiny lze zařazovat lucentamyciny [23 – 24] (obr. 4) a elegantin A [25].

Lucentamyciny, které obsahují modifikovaný DH-EPL (3-methyl-4-ethylidenprolin), se vyznačují protinádorovými účinky. Tyto sloučeniny byly poprvé izolovány z kultivačních médií bakterií *Nocardioopsis* (třída Aktinobakterie) žijící výhradně na slaných mořských půdách. APD jednotka lucentamycinu je pravděpodobně odvozena od L-tyrosinu, to však není experimentálně prokázáno [23 – 24].

Indolový alkaloid elegantin A obsahující DH-EPL byl izolován z listů tzv. ropušího stromu (*Tabernaemontana elegans*) pocházejícího z jižní Afriky. U APD jednotky elegantinu A se však předpokládá jiný způsob vzniku než z L-tyrosinu [25].

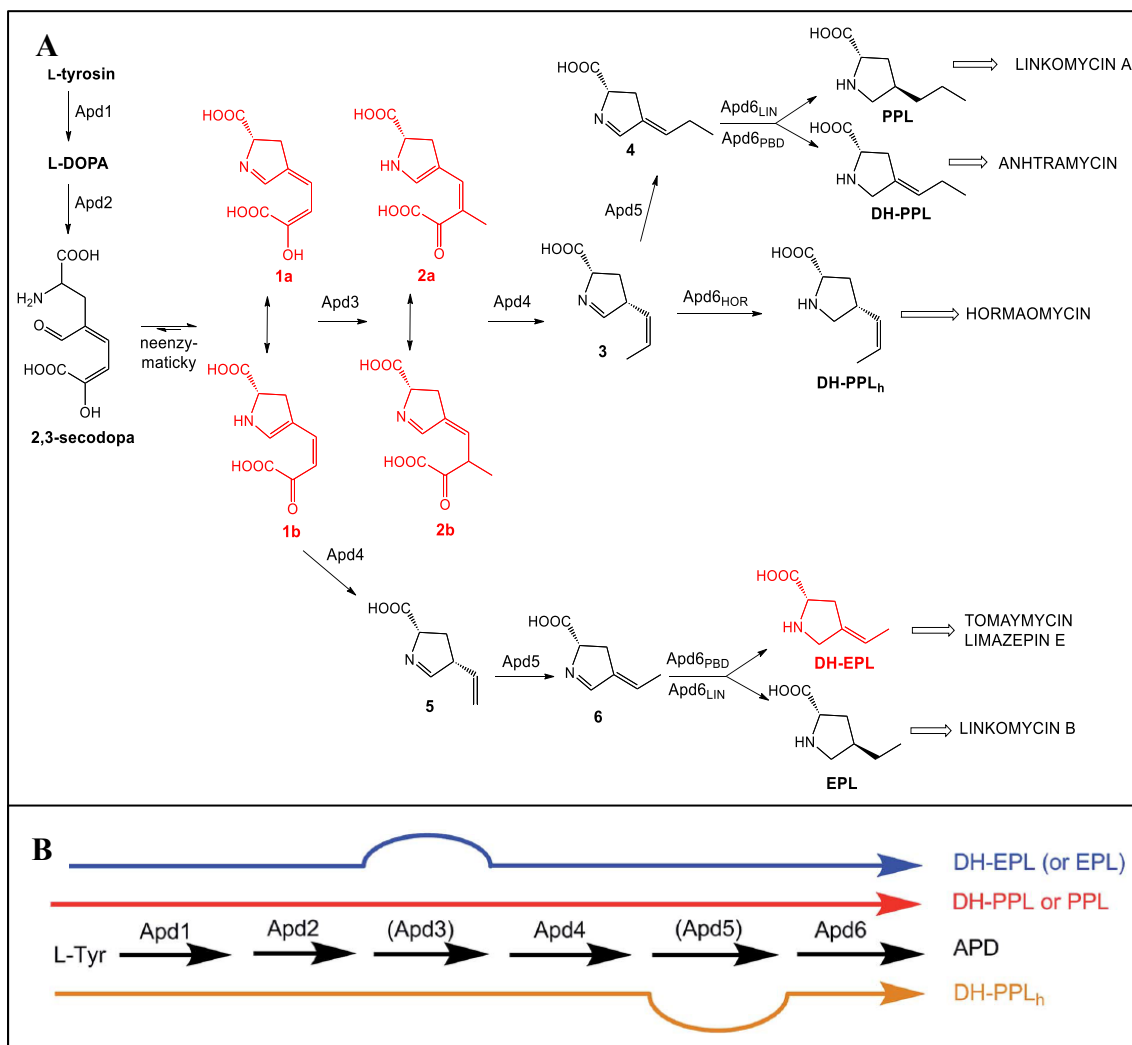


Obr. 4. Chemická struktura lucentamycinu A. Červeně je zvýrazněna APD jednotka [23 – 24].

2.2 Biosyntetická dráha APD

Dosud známé APD vznikají z proteinogenní aminokyseliny L-tyrosinu sledem reakcí řízeným jednotným setem pěti nebo šesti biosyntetických proteinů, které jsou zakódovány v biosyntetickém genovém klastru produkčních mikroorganismů [7, 10]. Na obr. 5 je znázorněno obecné schéma biosyntetické dráhy APD s homologními geny

kódujícími tuto biosyntézu. V případě využití celého souboru proteinů Apd1 – Apd6 vzniká PPL (inkorporován do linkomycinu) nebo DH-PPL (inkorporován do některých PBD). V biosyntéze APD s dvouuhlíkatým postranním řetězcem (EPL inkorporován do linkomycinu B a DH-EPL inkorporován do tomaymycinu a dalších PBD) chybí methylační krok katalyzovaný Apd3. Podobně v biosyntéze hormaomycinu chybí krok řízený isomerasou Apd5 a v důsledku toho je do struktury inkorporován DH-PPL_h [10].



Obr. 5. Biosynetická dráha známých APD. **A**: Celkové schéma (červeně jsou označeny sledované intermediáty této diplomové práce) [10, 26]; **B**: Schéma homologních genů Apd1 – Apd6 kódujících biosyntézu APD; převzato z [10].

2.2.1 Vývoj biosyntézy APD do současnosti

První publikace o biosyntetické dráze APD se objevují koncem šedesátých let 20. století. K prvním experimentům biosyntetické dráhy byly využity substráty, které byly radioaktivně značené. Bylo tak prokázáno, že L-methionin je donor methylu na postranním propylovém řetězci u APD s tříuhlíkatým řetězcem [27]. Záhy na to byly v kultivačním médiu *S. lincolnensis* objeveny PPL a EPL. Bylo také zjištěno, že biosyntéza nevychází ze strukturně podobného L-prolinu, ale z aromatického L-tyrosinu [28].

Důležitým poznatkem na konci minulého století byla úspěšná sekvenace prvních biosyntetických genových klastrů linkomycinu [29], PBD [30 – 31] a později také hormaomycinu [32]. Postupně se výzkum zaměřoval na proteiny katalyzující jednotlivé enzymatické přeměny, a tak se začalo postulovat pořadí jednotlivých kroků biosyntetické dráhy. Pro tuto dráhu jsou typické neobvyklé biochemické aspekty, co se týká jednotlivých enzymatických přeměn.

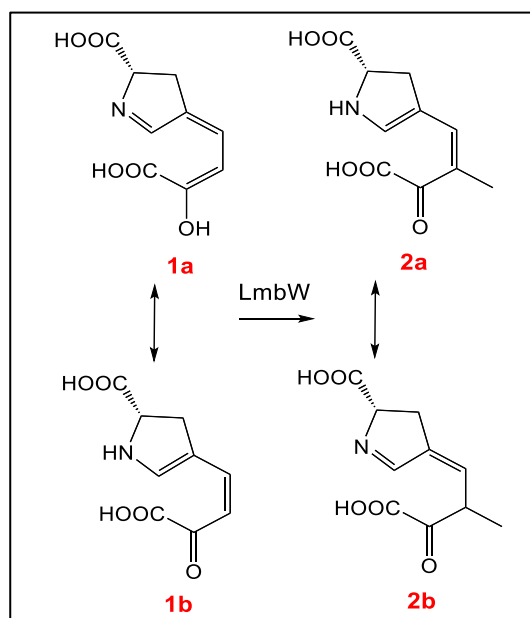
V roce 2016 nastal radikální zlom, kdy byla pozměněna původní verze této unikátní dráhy. Tento nový koncept byl vytvořen specificky pro PPL (APD linkomycinu), ale v principu má obecnou platnost pro biosyntézu ostatních APD vycházejících z L-tyrosinu, které mají v sobě zabudovány různé varianty APD [7].

2.2.2 Biosyntéza PPL inkorporovaného do linkomycinu

Biosyntetická dráha PPL dráhy linkomycinu je řízena proteiny Apd, což je obecný název proteinů katalyzujících jednotlivé enzymatické kroky této dráhy. V závorkách jsou uvedeny názvy konkrétních proteinů linkomycinu. Jedná se o Apd1 (**LmbB2**), Apd2 (**LmbB1**), Apd3 (**LmbW**), Apd4 (**LmbA**), Apd5 (**LmbX**) a Apd6 (**LmbY**) [10].

- **LmbB2** (L-tyrosinhydroxylasa) – hemový protein katalyzující počáteční krok biosyntézy přeměnou L-tyrosinu na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Jedná se o biochemicky běžnou reakci, která je však v případě APD biosyntézy katalyzována neobvyklými hydroxylasami. Funkce LmbB2 byla potvrzena testy aktivity s rekombinantními enzymy *in vitro* [33 – 34].

- LmbB1** (L-DOPA-2,3-dioxygenasa) – protein katalyzující 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu na 5-alanyl-2-hydroxymikonát-6-semialdehyd (2,3-secodopa). Produkt reakce podléhá spontánní neenzymatické intramolekulární cyklizaci na dvě formy intermediátu **1**, a to na cyklický imin **1a** a cyklickou α -ketokyselinu **1b**. Rovnováha obou forem je posunuta k **1b**, není však zřejmé, která z uvedených forem je substrátem následujícího biosyntetického proteinu [7]. Funkce LmbB1 byla prokázána v testech *in vitro* s rekombinantními proteiny [34 – 36].
- LmbW** (C-methyltransferasa) – protein připojující metylovou skupinu k intermediátu **1** v přítomnosti *S*-adenosyl-L-methioninu (SAM), který je zdrojem metylové skupiny. Za jeho katalýzy vznikají buď dvě formy intermediátu **2** (**2a** a **2b**) nebo pouze jedna forma (obr. 6). Funkce LmbW byla potvrzena jak inaktivačními experimenty genů *in vivo* [7, 37], tak testy s rekombinantními enzymy *in vitro* [7]. Tato C-methylace postranního řetězce proteinem LmbW je zařazena v biosyntéze v případě APD s tříuhlíkatým alkylovým řetězcem (PPL, DH-PPL a DH-PPL_h). Naopak v případě APD s dvouuhlíkatým postranním řetězcem (EPL a DH-EPL) je tento krok vynechán nebo není součástí dané biosyntetické dráhy [7, 10].



Obr. 6. Enzymatická přeměna intermediátu **1** (formy **1a** a **1b**) na intermediát **2** (formy **2a** a **2b**) proteinem LmbW [10].

- **LmbA** (homolog γ -glutamyltranspeptidas) – protein štěpící oxalátový zbytek (dvouuhlíkatý fragment) intermediátu **2** za vzniku intermediátu **3**, což bylo experimentálně predikováno na základě inaktivačních experimentů genů *in vivo* [7, 38] a následně potvrzeno *in vitro* [38]. Dosud však není jednoznačně vyřešeno pořadí kroků katalyzovaných proteiny LmbW a LmbA [26, 39].
- **LmbX** (isomerasa) – během reakce katalyzované tímto proteinem podléhá intermediát **3** isomerizaci dvojně vazby na alkylovém řetězci za vzniku intermediátu **4**. Funkce LmbX byla prokázána *in vivo* na základě genových inaktivačních testů [7], nebyla však dosud prokázána *in vitro*.
- **LmbY** (F_{420} -závislá reduktasa) – protein LmbY katalyzuje redukci dvojných vazeb intermediátu **4** na konečný APD (PPL). Na základě sekvenční analýzy se ukazuje podobnost proteinu s reduktasami vyžadující pro svou funkci kofaktor F_{420} . Navržená funkce LmbY je v souladu s *in vivo* inaktivačními testy [7]. Podle recentních *in vitro* experimentů katalyzuje LmbY redukci obou dvojných vazeb **4** za vzniku plně nasyceného PPL, což platí i pro vznik EPL v biosyntéze linkomycinu B. Naproti tomu homology z biosyntézy PBD katalyzují redukci pouze endocyklické dvojně vazby [40].

2.2.2.1 Vlastnosti intermediátů 1 a 2

Intermediát **1** se nepatrně liší svou absorpcí v UV/VIS oblasti ve srovnání s intermediátem **2**. Za tuto absorpci je zodpovědný systém konjugovaných dvojných vazeb. Z odborné literatury je možné dohledat, že maximum absorpce intermediátu **1** je 420 nm [26, 36, 41] a intermediátu **2** 407 nm [26].

V tab. 1 jsou ukázány odpovídající m/z iontů obou intermediátů v hmotnostně-spektrometrické (MS) detekci v kladném a záporném módu elektrospreje. Jedná se o protonované $[M+H]^+$ či deprotonované pseudomolekulární ionty $[M-H]^-$.

Tab. 1: m/z iontů intermediátů **1** a **2**.

Mód ESI	m/z (1)	m/z (2)
ESI ⁺	212,0559 [M+H] ⁺	226,0715 [M+H] ⁺
ESI ⁻	210,0402 [M-H] ⁻	224,0559 [M-H] ⁻

Intermediát **1** byl již dříve detekován spektrofotometricky vzhledem k jeho žlutému zabarvení [36, 41 – 42]. Jsou popsány experimenty ukazující jeho neenzymatickou nestabilitu [41].

O intermediátu **2** není k dispozici dostatek informací, jeho struktura dosud nebyla potvrzena pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) [26].

Kvůli nežádoucí hydrolyze v kyselých podmínkách [7] byla vyvinuta a částečně validována analytická metoda v alkalických podmínkách na koloně BEH-Amide, na které jsou oba analyty za daných podmínek dostatečně zadržovány. Tato metoda umožňuje separaci obou intermediátů současně s detekcí pomocí UV/VIS a MS [43].

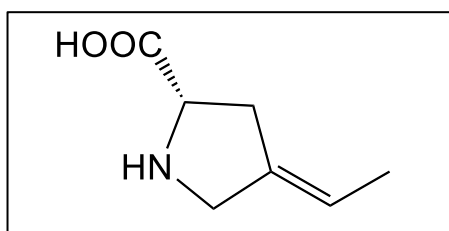
2.2.3 Biosyntéza DH-EPL inkorporovaného do tomaymycinu

V biosyntetické dráze DH-EPL (APD tomaymycinu) je sled reakcí biosyntézy velmi podobný jako u PPL (APD linkomycinu). Na základě sekvenční analýzy genového klastru kódujícího proteiny příslušné dráhy je vynechán methylační krok řízený enzymem Apd3. Funkce proteinů biosyntézy tomaymycinu nebyly zatím prokázány *in vitro* ani *in vivo*. Předpokládá se, že proteiny Apd1 – Apd2, Apd4 – Apd6 biosyntézy DH-EPL tomaymycinu (označení Tom) budou mít stejnou funkci jako v dráze PPL [10].

DH-EPL (obr. 7) se vyznačuje podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako aminokyselina L-prolin. Absorbuje při nízkých vlnových délkách kolem 190 nm, což je způsobeno tím, že v molekule není systém konjugovaných dvojných vazeb ani jiný chromofor [18]. Protonovaný pseudomolekulární ion DH-EPL [M+H]⁺ v MS detekci (kladný ESI mód) odpovídá $m/z = 142,0868$.

Vedle *S. achromogenes* existuje další producent tomaymycinu (nebo jeho derivátu) *Streptomyces purpureus*. Z tohoto kmene bylo izolováno PBD s tím, že jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR. Z výsledků NMR však nebylo jednoznačně

potvrzeno, zda konfigurace na dvojně vazbě DH-EPL inkorporovaného do tohoto PBD se nachází v *E* či *Z* formě [18]. V biosyntetickém genovém klastru *S. achromogenes* je kódován protein TomN, který by měl být tautomerasou, avšak podle jiných studií by měl akceptovat intermediát **1** jako substrát. Tento rozdíl by teoreticky mohl stát za případnou odlišnou isomerií tomaymycinu produkovaného ze *S. achromogenes* a *S. purpureus* [10, 18].



Obr. 7. Chemická struktura prekursoru DH-EPL [10].

2.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je fyzikálně-chemická metoda založená na separaci analyzovaných látek na základě jejich rozdílné distribuce mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární fáze (sorbent) a mobilní fáze (eluent). Lze ji rozdělit podle uspořádání na kolonovou, tenkovrstvou či papírovou. Kapalinová chromatografie je vhodná i k izolaci (preparaci) jednotlivých analytů ze směsi, jedná se o tzv. preparativní chromatografii. V technice kapalinové chromatografie se využívá adsorpce, iontová výměna, biospecifická interakce či síťový efekt [44 – 46].

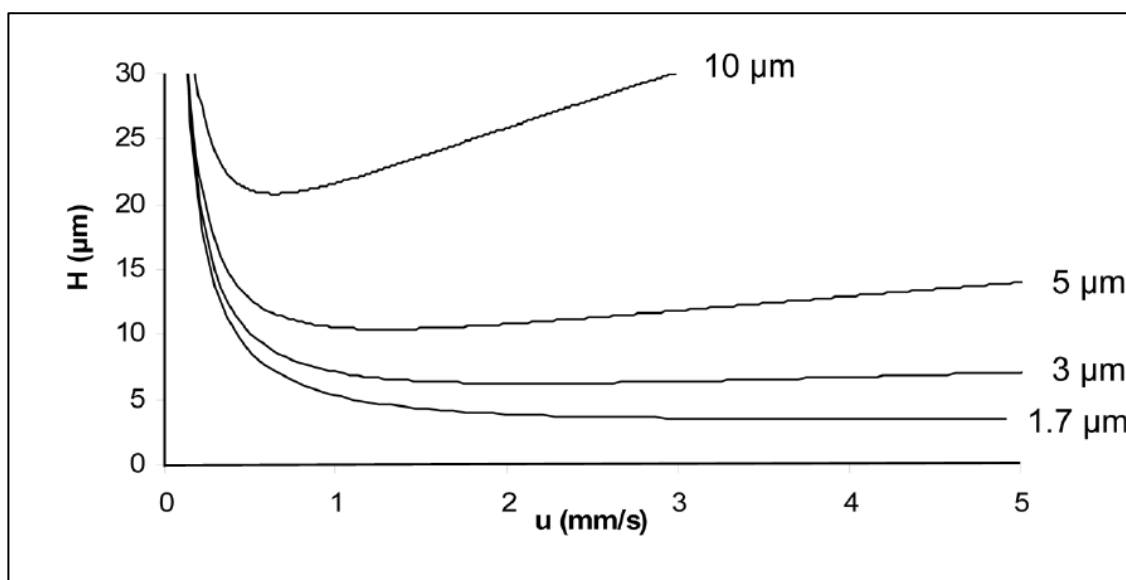
2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V kapalinové chromatografii se v současné době používá částečně či zcela automatizovaného systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která se charakterizuje vyšší účinností a rychlejší separací. Mobilní fáze je protlačována bezpulzními čerpadly pod vysokým tlakem dosahujícího několika desítek MPa. Používají se kolony o vnitřním průměru 2,1 – 5 mm a o délce 10 – 300 mm. Separační kolona je naplněna sorbentem obvykle o velikosti částic 2,6 – 5 μm [44].

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších separačních technik vyznačující se vysokou

univerzálností. Má široké uplatnění jak ve výzkumu, tak ve farmaceutických, toxikologických či environmentálních analýzách [47].

Účinnost chromatografické separace v HPLC je charakterizována mírou rozšiřování elučních zón (píků) analytů. Děje přispívající k rozmývání elučních zón analytů popisuje Van Deemterova teorie. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H (účinnost) na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze u popisuje Van Deemterova křivka. Minimum na křivce odpovídá lineární průtokové rychlosti, při které kolona vykazuje největší účinnost separace za daných podmínek. Čím je nižší průměr částic, tím je dosaženo vyšší separační účinnosti – minimum na křivce je více ploché, jak je možno vidět na obr. 8 [46, 48].



Obr. 8. Van Deemterovy křivky při použití kolon o různé velikosti částic sorbentu; převzato z [48].

2.3.1.1 Chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC)

Chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC) je separační mód HPLC, kdy sorbent v koloně je polárnější než mobilní fáze. Mechanismus dělení je založen na kompetici mezi analytem a eluentem o přítomná adsorpční centra na povrchu sorbentu. Mobilní fáze obvykle obsahuje směs nepolárních a méně polárních organických rozpouštědel (hexanu či dichlormethanu). Velice limitujícím je obsah vody v mobilní fázi, jelikož retenční vlastnosti analytu silně závisí na její polaritě. Jako stacionární fáze

se používají nejčastěji silikagel či alumina [44].

NP-HPLC je vhodná pro separaci zejména polárních látek a isomerů. V dnešní době však ustupuje do pozadí, převažují zde nevýhody, jako je použití nevodných, těkavých a značně toxických rozpouštědel [45].

2.3.1.2 Chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC)

Chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) je v současné době nejčastěji používaný mód HPLC. Velkou výhodou tohoto módu je účinná separace strukturně velice podobných analytů. Na rozdíl od NP-HPLC je mechanismus separace založen na hydrofobních či van der Waalsových interakcích mezi sorbentem a analytem. Mobilní fáze se skládá z vodné (polární) složky a organického modifikátoru, mísitelným s vodou (acetonitril či methanol). Stacionární fáze má nepolární charakter, nejčastěji se používají různé hybridní sorbenty s navázanými alkylovými či arylovými ligandy. Nejrozšířenějším ligandem je oktadecylová skupina (C_{18}) [45 – 46].

Kvůli své univerzálnosti je RP-HPLC velmi často první volbou při vývoji a optimalizaci nové chromatografické metody, a to i přes prudký rozvoj dalších separačních technik. Tento mód není však vhodný pro separaci silně polárních látek. RP-HPLC je vhodný ve spojení s MS detekcí, jelikož se zde používají jako mobilní fáze těkavá rozpouštědla [45].

2.3.1.3 Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

Nejstarším módem separace v kapalinové chromatografii je iontově-výměnná chromatografie (IEC). Mechanismus separace je založen na elektrostatických interakcích mezi analytem a sorbentem (měnič iontů vázající ionty opačného náboje). Mobilní fáze obsahuje obvykle vodný roztok soli a pufru. Ve styku s mobilní fází uvolňují sorbenty ionty, které jsou nahrazeny ionty z vodného roztoku mající k měniči větší afinitu. Podle výměnné funkční skupiny měniče iontů lze rozdělit na katexy vyměňující kationty a anexy vyměňující anionty [45 – 46].

Tento mód kapalinové chromatografie je vhodný pro snadno ionizující analyty, např. kyseliny, proteiny či nukleové kyseliny. V současné době však postupně jeho

využití stále klesá. Novějším trendem jsou kolony IEC založené na nosiči kopolymerů styrenu a divinylbenzenu namísto silikagelového nosiče [49].

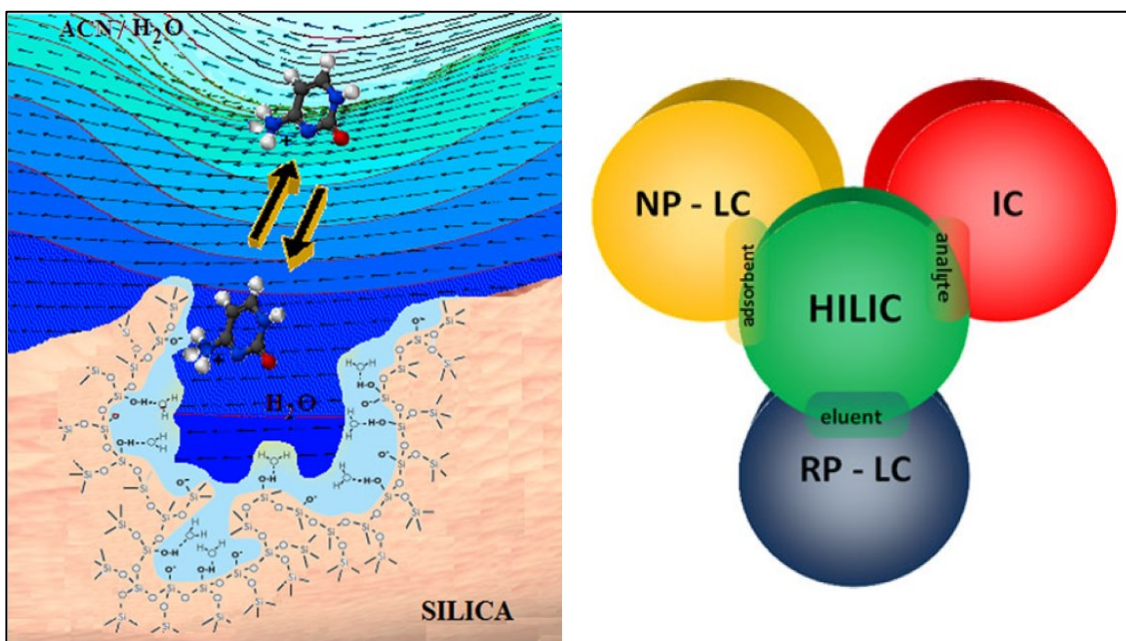
2.3.1.4 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Separační mód hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) nabízí kombinaci všech výše uvedených separačních módů HPLC (obr. 9) [50]. Užitečnost tohoto módu spočívá v separaci analytů, které se málo zadržují na sorbetech používaných v RP-HPLC. Technika HILIC se také využívá pro separaci nepolárních látek obklopených polárními substituenty, např. karboxylovými či amidovými skupinami. HILIC má společnou stacionární fázi s NP-HPLC. Mobilní fáze je polární (vodně-organická), společná s RP-HPLC. Obsah organického rozpouštědla musí být však v rozmezí 55 – 99 obj. % [50 – 51].

Mechanismus separace HILIC není plně prostudován. Při dělení je na povrchu polární stacionární fáze přítomen tenký vodný film. Se zvyšujícím se obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi nabývá film na objemu, což způsobuje delší retenci analytu. V HILIC se uplatňuje i mechanismus iontové výměny, jelikož většina sorbentů má charakter měniče iontů [51 – 52].

V současné době se HILIC používá nejčastěji v oblasti farmaceutických analýz či bioanalytických aplikací. Nabízí se možnost spojení s MS detekcí, pro kterou je vhodné vysoké množství organické složky v mobilní fázi [50].

V módu HILIC se používají i preparativní kolony pro izolaci různých sloučenin, např. kolona HILIC-Diol, která obsahuje modifikovaný silikagel zesíťovaný dihydroxypropylovými skupinami. Oblast použití pH je velice široká od 1 – 11 [53].



Obr. 9. Mechanismus separace v HILIC – kombinace tří separačních módů v HPLC; převzato z [50].

2.3.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

V kapalinové chromatografii se postupně zvyšují nároky na vyšší účinnost separace. Dochází k postupnému zmenšování částic ve stacionární fázi s nutným přizpůsobením instrumentace proti zpětným tlakům vyšším než v HPLC (až 100 MPa). Tyto požadavky daly vzniknout ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC) na začátku tohoto století zavedením prvního komerčně vyrobeného UPLC přístroje (Waters, USA). Bylo dosaženo zvýšení citlivosti, rozlišení a kratší doby chromatografických analýz [48, 54 – 55].

2.3.3 Trendy ve vývoji částic v kapalinové chromatografii

V současné době se nejvíce rozvíjí částice v RP-HPLC a HILIC módu. Zavedením metody UHPLC do praxe se stacionární fáze plní plně porézními částicemi menšími než 2 μm (sub-2- μm) [56]. Jedním z příkladů jsou tzv. BEH částice (Waters, USA). Jejich modifikace oproti klasickým sorbentům spočívá v zesíťování ethylenovými můstky, které zesilují mechanickou a chemickou odolnost v rozmezí

hodnot pH 1 – 12. Používají se BEH sorbenty s různými ligandy, např. C₁₈, C₈, Phenyl či Amide. Oproti klasickému silikagelu mají tak výhodu, že nepodléhají hydrolyze v zásaditém prostředí. Nevýhodou však je, že tyto částice svojí vyšší velikostí vyvolávají vyšší zpětný tlak, a tak nejsou kompatibilní s HPLC systémy [57 – 58].

Vhodnou alternativou k sub-2 μ m částicím jsou povrchově porézní částice (angl. „core shell“), které jsou dobře kompatibilní i s HPLC systémy se zachováním vysokého rozlišení, citlivosti a krátké doby analýz. Tyto částice se skládají z pevného jádra pokrytého tenkou vrstvou modifikovanějšího porézního silikagelu – analyt může difundovat pouze do pórů tenké porézní vrstvy [57, 59].

2.4 Detekce v kapalinové chromatografii

Ve spojení s kapalinovou chromatografií se v současné době nejčastěji používají detektory: absorpční fotometrický (UV/VIS) detektor, popř. detektor s diodovým polem (DAD), dále fluorescenční detektor, amperometrický detektor, hmotnostní spektrometr či NMR detektor [44]. Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem analytů a instrumentaci v této diplomové práci bude věnována pozornost UV/VIS (DAD) a MS detekci.

Detekce UV/VIS (DAD) je nedestruktivní a citlivá technika využívaná ve kvalitativní či kvantitativní analýze separovaných sloučenin. Tato detekce je primárně určena pro sloučeniny s přítomností systému konjugovaných dvojných vazeb zodpovědných za absorpci v UV/VIS či jiného chromoforu. Rozdíl mezi detektory UV/VIS a DAD je v záznamu spekter. UV/VIS detektory zaznamenávají spektra při vybraných vlnových délkách a jsou citlivější než DAD, které naopak snímají spektra v průběhu celé chromatografické separace v celém rozsahu možných vlnových délek daného detektoru s tím, že také umožňují vypočítat čistotu píku [44 – 45].

Dalším typem detekce v kapalinové chromatografii je MS detekce. Hmotnostní spektrometr je přístroj zaznamenávající poměr hmotnosti a náboje (m/z) vybraných iontů po jejich převedení na ionty v iontovém zdroji. Jedná se o vysoce specifický, citlivý, avšak destruktivní detektor. Umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Analyzovaný vzorek je nejprve ionizován vhodným ionizačním

zdrojem, ve kterém dochází k převedení neutrálních molekul na ionty. Poté následuje rozdělení iontů podle poměru m/z v analyzátoru. Ionty se z analyzátoru dále dostávají do detektoru a dochází k detekci signálu [45].

Mezi nejvýznamnější iontové zdroje používané v kapalinové chromatografii patří ESI, fotoionizace za atmosférického tlaku či chemická ionizace za atmosférického tlaku. Jako analyzátory se používají analyzátor doby letu (TOF), kvadrupólový analyzátor, orbitrap či iontová past. K detektorům je zařazován fotonásobič, elektronový násobič nebo také mikrokanálová destička [45, 60].

Novějším trendem v hmotnostní spektrometrii, zejména v rozvíjejících se odvětvích metabolomiky či proteomiky, jsou hybridní hmotnostní spektrometry kombinující více než dva hmotnostní analyzátory, např. QqQ (trojitý kvadrupól), Q-TOF (kvadrupól a TOF) nebo IT-TOF (iontová past a TOF) [60].

2.5 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi (SPE) patří k jedné z dominantních metod úpravy látek ze složitých matric, např. biologických vzorků, před vlastní chromatografickou analýzou. K jejím přednostem patří účinné prekoncentrování analytu a přečištění vzorku spojené s vysokou výtěžností, reprodukovatelností a nižší spotřebou organických rozpouštědel. Z ekonomického hlediska je naopak nevýhodou omezení opakované použitelnosti kolonek SPE. Mechanismus extrakce spočívá v zadržení analytu na kolonce různými interakcemi a následném vymytí analytu vhodným rozpouštědlem (eluentem). Za hlavní interakce v SPE jsou považovány nepolární, polární nebo iontově-výměnné [44].

V současné době je dostupnost kolonek dostačující, nejčastěji se jedná o sorbenty na bázi silikagelu s chemicky vázanými alkyly, např. nepolární C_{18} a C_8 . Mezi polární jsou zařazovány, např. aminopropylové či diolové modifikátory. K iontově-výměnným patří sorbenty se sulfonovou skupinou (katexy) či kvarterní aminy (anexy) [44, 61].

2.6 Cíle práce

Cíl této diplomové práce zahrnoval přípravu, analýzu a izolaci následujících intermediátů biosyntetické dráhy APD pro jejich strukturní charakterizaci pomocí NMR:

- dikarboxylové intermediáty **1** a **2** z biosyntézy PPL (APD z biosyntézy linkomycinu) v enzymatické reakční směsi pro charakterizaci konjugovaného systému dvojných vazeb obou intermediátů
- prekursor DH-EPL (APD z biosyntézy tomaymycinu) v kultivačním médiu bakteriálního kmene *S. purpureus* pro určení konfigurace *E/Z* na exocyklické dvojně vazbě

Cíl práce zahrnoval i vývoj semi-preparativní chromatografické metody pro izolaci studovaných sloučenin.

3 Experimentální část

3.1 Biologické vzorky

- Bakteriální kmen *Streptomyces purpureus* DSM 43360
- Bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21(DE3)

3.2 Standardní látky

Standardní látky EPL, PPL a DH-PPL, pro vývoj izolační metody DH-EPL v semi-preparativním chromatografickém módu, byly připraveny Mgr. Radkem Gažákem, Ph.D., v laboratoři Biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. postupem vycházejícím z publikací [18, 62]. Všechny standardy byly ředěny 50% vodným roztokem acetonitrilu; standardy EPL a PPL na koncentraci 1,25 mg ml⁻¹, standard DH-PPL na 2,5 mg ml⁻¹.

3.3 Chemikálie

Acetonitril (LC/MS grade, 99,95 %)	Biosolve, Nizozemí
Deionizovaná voda Milli-Q (HPLC/UHPLC)	Millipore, USA
Glukosa (≥ 99 %)	Lach-Ner, ČR
Heptahydrát síranu hořečnatého (99,5 %)	Merck, Německo
Heptahydrát síranu manganatého (99 – 101 %)	Merck, Německo
Heptahydrát síranu zinečnatého (99 %)	Lachema, ČR
Heptahydrát síranu železnatého (≥ 99 %)	Penta, ČR
Hydrogenfosforečnan draselný (99 %)	Lach-Ner, ČR
Hydroxid amonný (28 – 30 %)	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný (≥ 98 %)	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný (99,5 %)	Lachema, ČR
Kvasničný extrakt (≥ 99 %)	Oxoid, Velká Británie
Kyselina chlorovodíková (≥ 35 %)	Lach-Ner, ČR

Leucin-enkefalin acetát (≥ 95 %)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol (LC/MS grade, 99,95 %)	Biosolve, Nizozemsko
Mravenčí kyselina (≥ 99 %)	VWR, USA
Octová kyselina (99 %)	VWR, USA
SAM (≥ 75 %)	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný (≥ 99 %)	Lachema, ČR
Sladový extrakt (≥ 99 %)	Oxoid, ČR
Tris-acetát (99 %)	Sigma-Aldrich, USA
Uhličitan vápenatý (≥ 95 %)	Lachema, ČR

3.4 Pufry

- Mravenčan amonný – titrace mravenčí kyseliny roztokem hydroxidu amonného
- Octan amonný – titrace octové kyseliny roztokem hydroxidu amonného
- Reakční pufr – 1M Tris-acetát, 1M NaCl, úprava pH na 8,0 pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové

3.5 Kultivační média

V následující tab. 2 je uvedena příprava GYM média a v tab. 3 AVM média pro kultivaci bakteriálních kmenů.

Tab. 2. Příprava GYM média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
Glukosa	4
Kvasničný extrakt	4
Sladový extrakt	10
Deionizovaná voda*	do objemu 1000 ml

*Po doplnění do objemu 1000 ml bylo pH média upraveno na hodnotu 7,2.

Tab. 3. Příprava AVM média o objemu 1000 ml.

Název látky	Hmotnost [g]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
Kvasničný extrakt	2
NaCl	2
K_2HPO_4	0,5
CaCO_3	5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
Deionizovaná voda*	do objemu 880 ml
25% glukosa**	120 ml

*Po doplnění do objemu 880 ml bylo pH média upraveno na hodnotu 7,4.

**25% glukosa byla přidána až po sterilizaci média.

3.6 Instrumentace

- Acquity UPLC (Waters, USA), spojený s detektorem diodového pole DAD 2996 operujícím v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm a s hmotnostním detektorem LCT Premier XE. Jako iontový zdroj využívá ESI a jako analyzátor TOF.
- HPLC systém (Waters, USA), spojený s absorpčním spektrofotometrickým detektorem UV 2487, operujícím v rozmezí vlnových délek 194 – 600 nm.
- pH metr HANNA; kalibrační roztoky o pH 4,01; 7,01 a 10,01 (Hanna instruments, USA)
- Rotační inkubační třepačka (Infors, Švýcarsko)
- Centrifuga minispin (Eppendorf, Německo)
- Chlazená centrifuga Jouan MR23i (Thermo Scientific, USA)
- Sonikátor Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Parmer, USA)
- Rotační vakuová odparka R-215 (Büchi Labortechnik AG, Švýcarsko)
- Vakuový evaporátor Concentrator Plus (Eppendorf, Německo)

3.7 Výpočetní technika a software

- Mass LynxTM V4.1 (Waters) – vyhodnocení MS dat z UHPLC systému
- Empower 3 (Waters) – interpretace dat z HPLC systému
- ACD/ChemSketch 12.01 – tvorba chemických vzorců a rovnic

3.8 Metody

3.8.1 Příprava intermediátů 1 a 2

Substrát pro enzymatickou reakci, intermediát **1**, byl připraven pracovníky laboratoře Biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. podle publikace [35], a to inkubací L-DOPA s buňkami *Escherichia coli* s vloženým vektorem kódujícím protein LmbB1. Rekombinantní protein LmbW byl připraven Mgr. Lucíí Steiningerovou podle dříve popsaného postupu [7].

Intermediát **1** byl částečně převeden na intermediát **2** pomocí proteinu LmbW v přítomnosti SAM jako donoru methylové skupiny. V negativních reakcích byl v reakčním roztoku protein LmbW nebo SAM nahrazen reakčním pufrem.

Enzymatická reakce o celkovém objemu 200 μ l obsahovala 126 μ l vodného roztoku intermediátu **1**, 50 μ l LmbW (100 μ M), 20 μ l SAM (40 mM) a 4 μ l reakčního pufru (1 M). Následovala inkubace této směsi (1 h, 30 °C). Reakce byla poté ukončena přidáním 2 μ l koncentrované mravenčí kyseliny. Reakční roztok byl promíchán, protein z něho byl oddělen pomocí membránových centrifugačních kolonek Microcon 10 kDa (Millipore, USA). K chromatografickým analýzám byla směs intermediátů **1** a **2** smíchána s acetonitrilem v poměru 1:1 (v/v), sonikována a centrifugována (14000 RPM, 10 min, 25 °C).

3.8.2 Testování stability intermediátů 1 a 2

Pro testování stability intermediátů **1** a **2** byla připravena směs intermediátů stejným postupem z kap. 3.8.1 ve třech paralelních reakcích. Po oddělení proteinu byl směsný vzorek obou analytů umístěn při teplotě 30 °C po dobu dalších 2, 4, 8 a 24 h.

Směs intermediátů byla k chromatografickým analýzám ředěna s acetonitrem v poměru 1:1 (v/v), sonikována a centrifugována (14000 RPM, 10 min, 25 °C).

Po integraci ploch píků obou intermediátů z DAD chromatogramu se k vyhodnocení výsledků použil Deanův-Dixonův test odlehlosti. Byly vyloučeny odlehlé výsledky a určen medián hodnot. Následně byly mediány přepočteny na procentuální zastoupení daného intermediátu ve směsi v určitém časovém úseku.

3.8.3 Příprava intermediátu DH-EPL

Spory bakteriálního kmene *S. purpureus* byly očkovány z Petriho misky sterilní smyčkou nejprve do GYM média. Kultura byla inkubována při 28 °C v rotační inkubační třepačce (180 RPM) po dobu 24 h. Následně byly 2 ml této kultury použity k inokulaci AVM média. Kultura byla inkubována za stejných podmínek a v časových intervalech z ní bylo odebíráno 5 ml média pro extrakci a následnou chemickou analýzu DH-EPL.

3.8.4 Extrakce intermediátu DH-EPL (analytický mód)

Odebrané kultivační médium bylo nejprve centrifugováno (4000 RPM, 15 min, 4 °C). Supernatant byl extrahován (SPE) pomocí kolonek Oasis MCX 3cc (60 mg). Sorbent MCX (z angl. „Mixed cation exchange“) je založen na bázi hybridního kationtového iontoměniče obsahujícího záporně nabitou sulfonovou skupinu.

Vhodným okyselením kultivačního média (pH 2 až 3) vznikne kladný náboj na aminové skupině DH-EPL. Náboj aminové skupiny interaguje se sulfonovou skupinou a dochází k zachycení analytu na této kolonce [7].

Extrakce probíhala podle následujícího protokolu:

- Kondicionace: 3 ml methanolu
- Ekvilibrace: 3 ml 2% vodného roztoku mravenčí kyseliny
- Vzorek: 3 ml kultivačního média, okyseleno na pH 2 – 3 koncentrovanou mravenčí kyselinou
- Promytí: 3 ml 2% vodného roztoku mravenčí kyseliny
- Eluce: 1,5 ml NH₄OH:voda:methanol = 1,4:3,6:95,0 (v/v)

Eluát byl odpařen na vakuovém evaporátoru při teplotě 30 °C a poté resuspendován v 300 µl 20% vodného roztoku methanolu, sonikován, centrifugován (14000 RPM, 10 min, 25 °C) a následně chromatograficky analyzován.

3.8.5 Extrakce intermediátu DH-EPL (semi-preparativní mód)

V rámci optimalizace extrakční metody byly na kolonkách Oasis MCX 20cc (1 g) testovány tři eluční protokoly (SPE-1, SPE-2 a SPE-3), což je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4. Optimalizace elučního profilu při extrakci DH-EPL.

Optimalizace	SPE-1	SPE-2	SPE-3
Sorbent	Oasis MCX 20cc (1 g)		
Kondicionace	50 ml methanolu		
Ekvilibrace	50 ml 2% vodného roztoku mravenčí kyseliny		
Vzorek	100 ml kultivačního média; pH 2 – 3*		
Promytí I	100 ml 2% vodného roztoku mravenčí kyseliny		
Promytí II	neprovedeno	100 ml methanolu	100 ml methanolu
	50 ml	50 ml	50 ml
Eluce	NH ₄ OH:voda: :methanol =	NH ₄ OH:voda: :methanol =	NH ₄ OH:voda: :methanol =
	=1,4:53,6:45,0 (v/v)	= 1,4:53,6:45,0 (v/v)	= 1,4:3,6:95,0 (v/v)

*Před nadávkováním na kolonku byl vzorek okyselen koncentrovanou mravenčí kyselinou.

Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce (140 RPM, 35 °C), poté resuspendován v 10 ml deionizované vody, sonikován, centrifugován (14000 RPM, 10 min, 25 °C) a následně chromatograficky analyzován.

3.8.6 UHPLC-DAD-MS analýzy (analytický mód)

V tab. 5 jsou uvedeny nastavené parametry na hmotnostním spektrometru. DAD detekce byla monitorována v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm.

Tab. 5. Nastavené parametry na hmotnostním spektrometru.

Nastavený parametr	Hodnota
Rozsah měřených hodnot	m/z 100 – 1000
Referenční látka (leucin-enkefalin)	2 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Průtok referenční látky	5 $\mu\text{l min}^{-1}$
Doba skenu	0,1 s
Doba mezi skeny	0,01 s
Doba mezi skeny pro referenční látku	0,1 s
Doba mezi skeny při změně polaritý látky	0,3 s
Napětí vložené na kapiláru	+2800 V nebo –2500 V
Napětí vložené na vstup do analyzátoru	+40 V nebo –40 V
Průtok dusíku (desolvatační plyn)	800 l h^{-1}
Průtok dusíku při vstupu do analyzátoru	50 l h^{-1}
Teplota dusíku	350 °C
Teplota bloku iontového zdroje	120 °C

Pro UHPLC-DAD-MS analýzy intermediátů **1**, **2** a prekursoru DH-EPL byly použity tyto společné chromatografické podmínky:

- Průtok mobilní fáze: 0,4 ml ml^{-1}
- Dávkovaný objem vzorku: 5,0 μl
- Teplota termostatu kolony: 30 °C

Intermediáty 1 a 2

- Kolona Acquity BEH-Amide (50 mm × 2,1 mm; 1,7 μm) (Waters, USA)
- Mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný (pH 8,0):acetonitril v poměru 1:1 (v/v) (složka B)
- Lineární gradientová eluce: 0/99,0; 2,5/99,0; 8,5/20,6; 8,5/1,0; 9,5/1,0; 9,5/99,0 (čas [min]/obj. % složky A), následovala ekvilibrace kolony 1,5 min (99,0 obj. % složky A)

DH-EPL

- Kolona Acquity CSH-C₁₈ (50 mm × 2,1 mm; 1,7 μm) (Waters, USA)
- Mobilní fáze: methanol (složka A) a 0,1% mravenčí kyselina (složka B)
- Lineární gradientová eluce I (extrakce DH-EPL pomocí SPE): 0/5,0; 3,5/5,0; 3,5/99,0; 4,5/99,0; 4,5/5,0 (čas [min]/obj. % složky A); následovala ekvilibrace kolony 1,5 min (5,0 obj. % složky A)
- Lineární gradientová eluce II (izolovaný vzorek DH-EPL): 0/5,0; 1,5/5,0; 15,0/70,0; 18,0/99,0; 19,0/99,0; 19,0/5,0 (čas [min]/obj. % složky A); následovala ekvilibrace kolony 1,0 min (5,0 obj. % složky A)

3.8.7 HPLC-UV analýzy (semi-preparativní mód)

Na preparativní koloně Triart HILIC-Diol (250 mm × 20 mm; 5 μm) (YMC, Japonsko) byly pro intermediáty **1**, **2** a prekursor DH-EPL (případně standardy PPL, EPL a DH-PPL) vytvořeny tyto chromatografické podmínky:

- Průtok mobilní fáze: 8,0 ml ml⁻¹
- Dávkovaný objem vzorku: 100 – 200 μl
- Teplota termostatu kolony: 30 °C

Intermediáty 1 a 2

- Mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0 (složka B)
- Lineární gradientová eluce: 0/95; 5/95; 40/50; 40/95 (čas [min]/obj. % složky A), následovala ekvilibrace kolony 8,0 min (95,0 obj. % složky A)

DH-EPL

- Testované složení mobilní fáze v isokratické eluci:
 - a) Acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 80:20 (v/v); 83:17 (v/v); 86:14 (v/v); 89:11 (v/v); 92:08 (v/v)
 - b) Acetonitril (složka A) a 5; 20; 100 či 500 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)

- c) Acetonitril (složka A) a 50; 100 mM mravenčan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)
- d) Acetonitril (složka A) a 50 mM mravenčan amonný, pH 8,0 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)
- e) Acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)
- f) Acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2:methanol = 1:1 (v/v) (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)
- g) Acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0:methanol = 1:1 (v/v) (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v)

4 Výsledky a diskuse

4.1 Analýza a izolace intermediátů 1 a 2

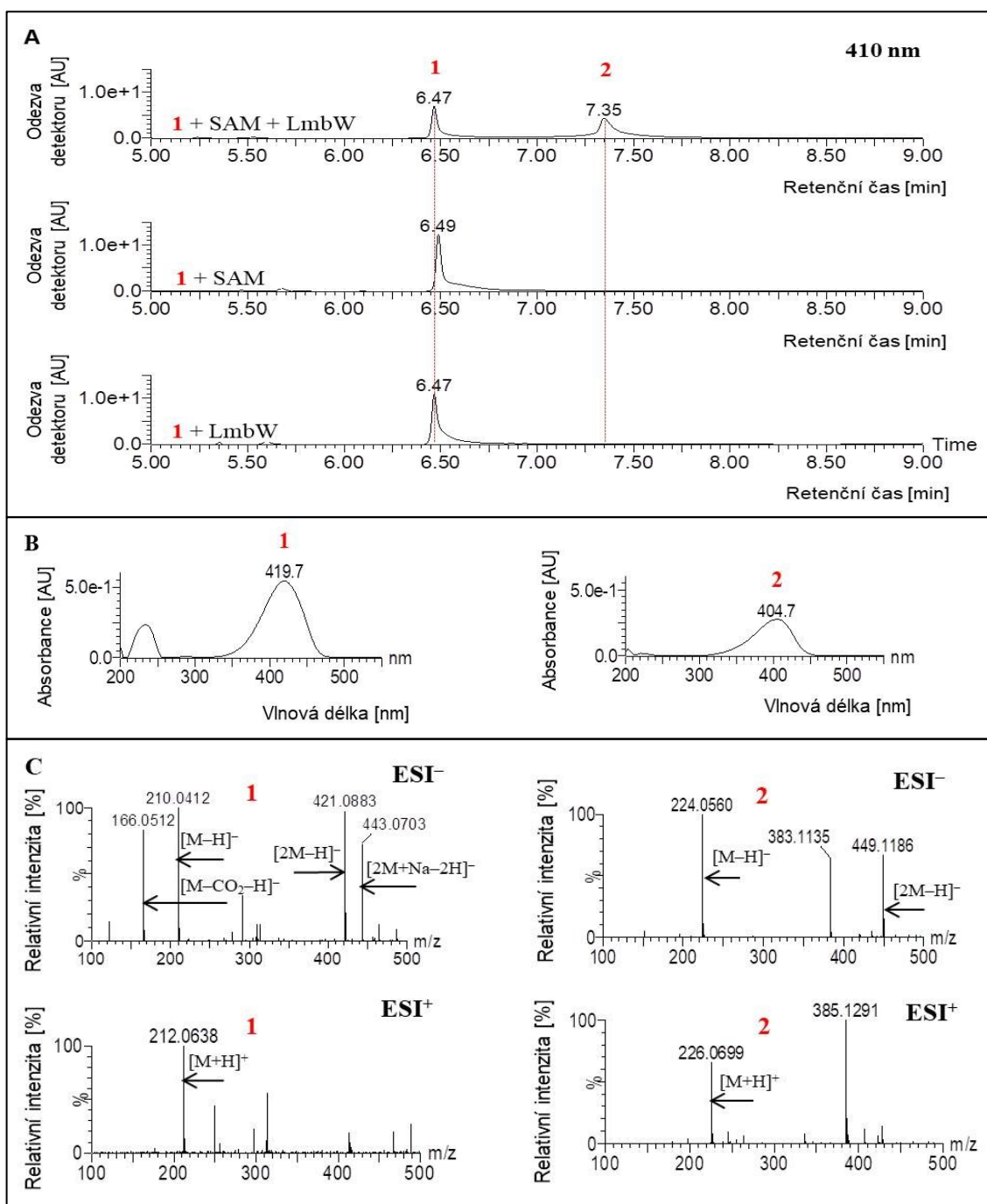
Jedním z dosud ne zcela objasněných kroků biosyntézy PPL, prekursoru linkomycinu, je methylace intermediátu **1**. Přestože bylo prokázáno, že protein LmbW methyloje **1**, produkt reakce intermediát **2** dosud nebyl dostatečně strukturně charakterizován. Konkrétně nebyla jednoznačně lokalizována poloha methylové skupiny přenesené ze SAM a dále není zřejmá podoba konjugovaného systému dvojných vazeb – v současné době jsou navrženy formy **2a** a **2b**, zobrazené na obr. 6 (str. 20). V rámci této diplomové práce byla připravena směs intermediátů **1** a **2** a byla vyvinuta chromatografická metoda pro izolaci těchto intermediátů.

4.1.1 Analýza enzymatické reakční směsi s LmbW

DAD chromatogramy na obr. 10A potvrzují, že v přítomnosti LmbW a methylačního činidla SAM se intermediát **1** podařilo částečně přeměnit na intermediát **2**. DAD chromatogramy byly extrahovány pro vlnovou délku 410 nm, která je v blízkosti absorpčních maxim obou analytů. Intermediát **1** eluuje z kolony v nižším retenčním čase ($t_R = 6,5$ min) než intermediát **2** ($t_R = 7,4$ min).

Na obr. 10B jsou znázorněny DAD absorpční spektra obou intermediátů lišící se svými absorpčními maximy; pro intermediát **1** – 420 nm a pro intermediát **2** – 405 nm. Rozdílnost absorpčních maxim může být dána buď pouhým připojením methylové skupiny nebo také změnou konjugovaného systému dvojných vazeb.

Identita obou analytů byla potvrzena na základě hmotnostních spekter v kladném i záporném ESI módu (obr. 10C). V záporném ESI módu byly identifikovány deprotonované pseudomolekulární ionty, dále dekarboxylované fragmenty a dimery vznikající v iontovém zdroji. Hmotnostní spektra v kladném ESI módu se vyznačují ionty odpovídající protonovaným pseudomolekulárním iontům. Oba intermediáty ionizují výrazně lépe v záporném ESI módu. Přesto je schopnost analytů ionizovat v obou módech limitovaná a vzhledem k velmi dobré absorpci ve viditelné oblasti jsou analyty lépe detekovány pomocí DAD detekce.

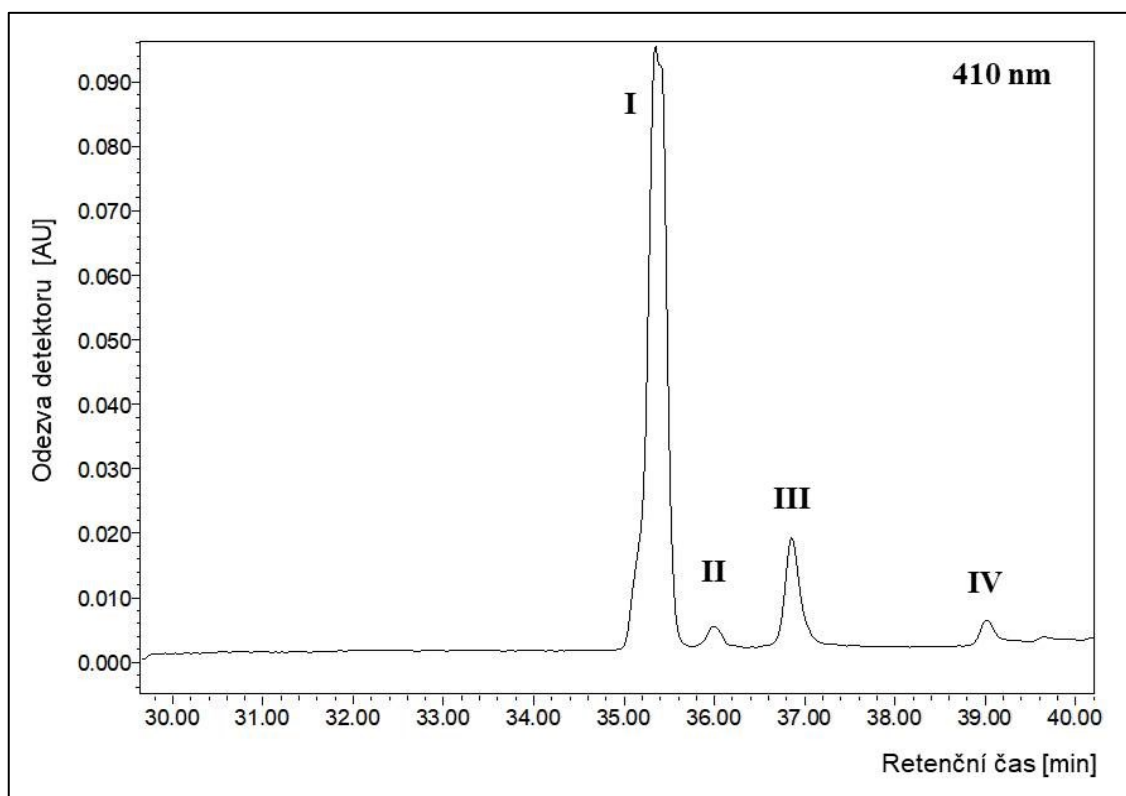


Obr. 10. Analýza intermediátů **1** a **2** v reakčním roztoku. **A**: DAD chromatogramy ($\lambda = 410$ nm) – úplná reakce s LmbW a SAM, negativní kontrola bez LmbW a negativní kontrola bez SAM; **B**: DAD absorpční spektra; **C**: Hmotnostní spektra v záporném a kladném ESI módu. Chromatografické podmínky: kolona BEH-Amide, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0:acetonitril v poměru 1:1 (v/v) (složka B); lineární gradientová eluce.

4.1.2 Izolace z enzymatické reakční směsi s LmbW

Po identifikaci intermediátů **1** a **2** v enzymatické reakční směsi následoval vývoj semi-preparativní chromatografické metody pro jejich izolaci (obr. 11). Vzhledem k nežádoucí hydrolýze analytů v kyselých podmínkách na analytické koloně BEH-C₁₈ byla vyzkoušena pro izolaci analytů preparativní kolona HILIC-Diol v alkalické mobilní fázi. Vlnová délka pro detekci obou intermediátů byla nastavena na 410 nm.

Z kolony byly eluovány čtyři látky odpovídající píkům zobrazených na obr. 11. Byly tak do zkumavek odebrány čtyři frakce (I – IV). Je předpokládáno, že frakce I je intermediátem **1**, ale není zřejmé, který pík odpovídá intermediátu **2**. Získané frakce byly odpařeny a rekonstituovány v 50 μ l 50% acetonitrilu. Prekoncentrované frakce byly analyzovány UHPLC-DAD-MS metodou v off-line analýze.



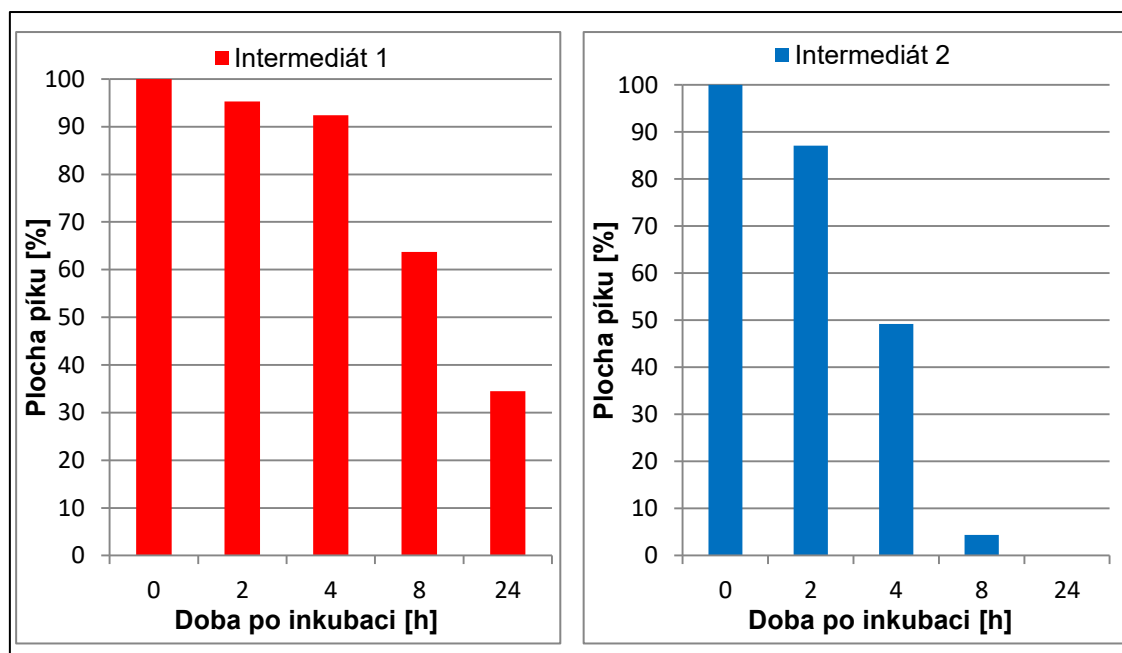
Obr. 11. UV/VIS chromatogram izolace intermediátů **1** a **2** v reakčním roztoku. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0 (složka B); lineární gradientová eluce. Detekce UV/VIS ($\lambda = 410$ nm).

Intermediát 1 byl detekován v DAD záznamu frakce I, ale intermediát 2 se nepodařilo detekovat v žádné z frakcí. Stejný výsledek byl dosažen v opakovaných experimentech. Intermediát 1 byl detekován v nižší koncentraci než by odpovídalo prekoncentrovanému vzorku.

Nižší než očekávaná výtěžnost intermediátu 1 může být způsobena nízkou stabilitou tohoto analytu. Dříve byly testovány kinetické parametry rozpadu intermediátu 1, které potvrzují tuto značnou nestabilitu [41]. Neúspěšná detekce intermediátu 2 by pak mohla mít analogickou příčinu, alternativně by mohl být problém v nevhodnosti chromatografických podmínek pro tento analyt.

4.1.3 Testování stability intermediátů 1 a 2

Z důvodu nižší výtěžnosti intermediátu 1 a především neúspěšné detekci intermediátu 2 byla testována stabilita obou analytů (obr. 12). Byly připraveny tři paralelní reakce se SAM a LmbW, které byly po 1 h inkubace ukončeny oddělením proteinu. Roztok byl dále inkubován a ve stanovených časových intervalech (0, 2, 4, 8 a 24 h) byla část reakce analyzována pomocí kapalinové chromatografie.



Obr. 12. Grafy stability intermediátů 1 a 2

Experiment potvrzuje, že intermediát **1** je pouze omezeně stabilní – po 8 h ho zůstává ve směsi přes polovinu, po 24 h přibližně jedna třetina. V porovnání s intermediátem **1** je ovšem intermediát **2** výrazně méně stabilní – po 8 h je téměř kompletně rozložen a po 24 h již vůbec nebyl detekován. Plocha píku na grafech pro 100 % odpovídá době 0 h – pro intermediát **1**: $4,5 \cdot 10^5$ AU a pro intermediát **2**: $6,2 \cdot 10^5$ AU.

4.1.3.1 Stabilita intermediátů **1** a **2**

Několikrát rychlejší rozklad intermediátu **2** lze v zásadě vysvětlit jeho chemickou strukturou, a to změnou rozložení (delokalizací) elektronů kladným indukčním efektem připojené methylové skupiny. Otázkou pro další experimenty zůstává, která forma intermediátu **2** (**2a** nebo **2b**) je méně stabilizovaná např. rozložením elektronů, a zda by bylo možné určit převažující formu tohoto intermediátu pomocí NMR.

Velmi nízká stabilita intermediátu **2** plně vysvětluje, proč analyt nebylo možné detegovat, jelikož chromatografická separace a odpařování odebraných frakcí trvá minimálně 8 hod. Stabilita byla studována při hodnotě pH 8, což jsou nejen dříve popsané optimální podmínky pro *in vitro* methylaci proteinem LmbW, ale také kultivační podmínky, při kterých dochází k biosyntéze *in vivo* včetně reakce katalyzované proteinem LmbW.

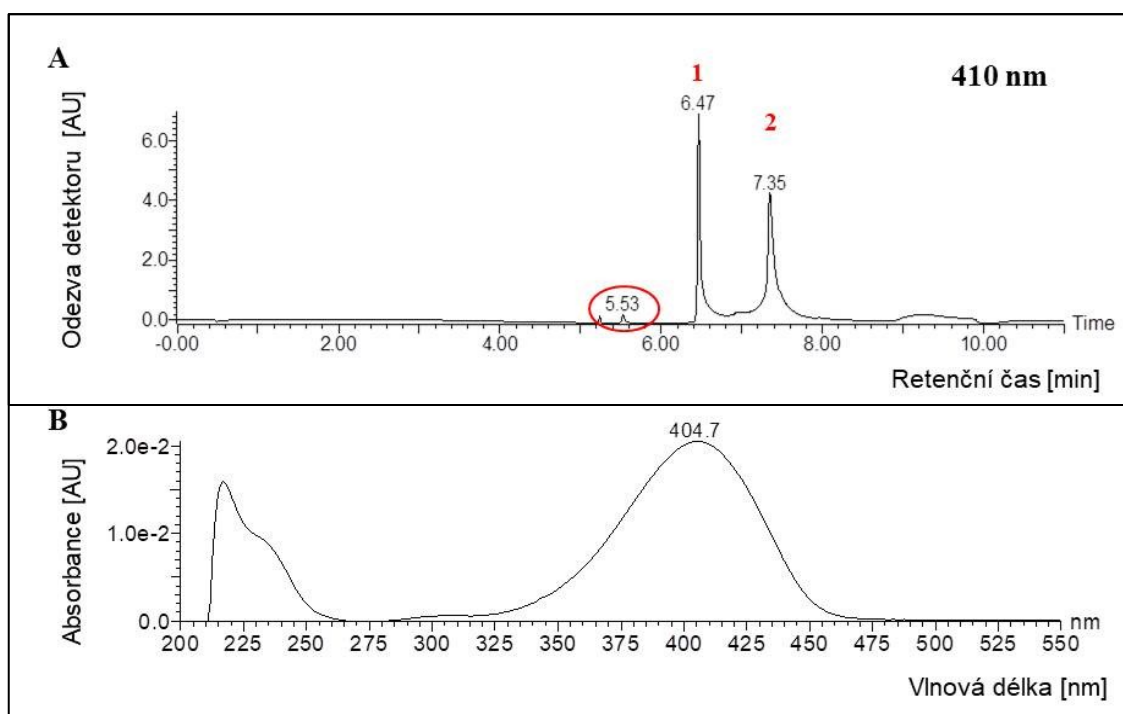
V producentu linkomycinu s inaktivovaným genem $\Delta lmbA$ by se podle biosyntézy PPL (obr. 5, str. 17) měl hromadit intermediát **2**. Dodnes však nebylo zřejmé, proč je tato akumulace pozorována pouze v některých případech s velmi nízkým výtěžkem [26]. Nízká stabilita intermediátu **2** však tato pozorování plně vysvětluje a navíc činí méně pravděpodobnými jiné hypotézy, podle kterých je během *in vivo* biosyntézy nejprve odštěpen oxalát proteinem LmbA, a až poté dochází k methylaci proteinem LmbW. Nepředpokládá se tak, že by nestabilita intermediátu **2** činila problémy při biosyntéze *in vivo*, kdy dochází k přeměně intermediátů rychleji v řádu několika desítek vteřin.

V rámci dřívějších experimentů bylo prokázáno, že k dlouhodobějšímu uchování intermediátu **1** bez výrazného rozkladu je nutné snížit teplotu alespoň na -80 °C, avšak intermediát **2** je nestabilní i při této teplotě.

4.1.4 Neznámé látky v enzymatické reakční směsi

V enzymatické reakční směsi obou intermediátů byla detekována neznámá látka v retenčním čase $t_R = 5,5$ min v DAD chromatogramu, extrahovaného pro vlnovou délku 410 nm (obr. 13A). Absorpční maximum je velmi podobné intermediátu **2** – absorpční spektrum při 405 nm (obr. 13B). Může se pravděpodobně jednat o látku strukturně podobnou intermediátu **2** (isomer).

Neznámá látka byla detekována i v negativních reakcích bez LmbW či bez SAM. Vzhledem k velmi nízké koncentraci této sloučeniny není možné s přesností určit strukturu této sloučeniny.

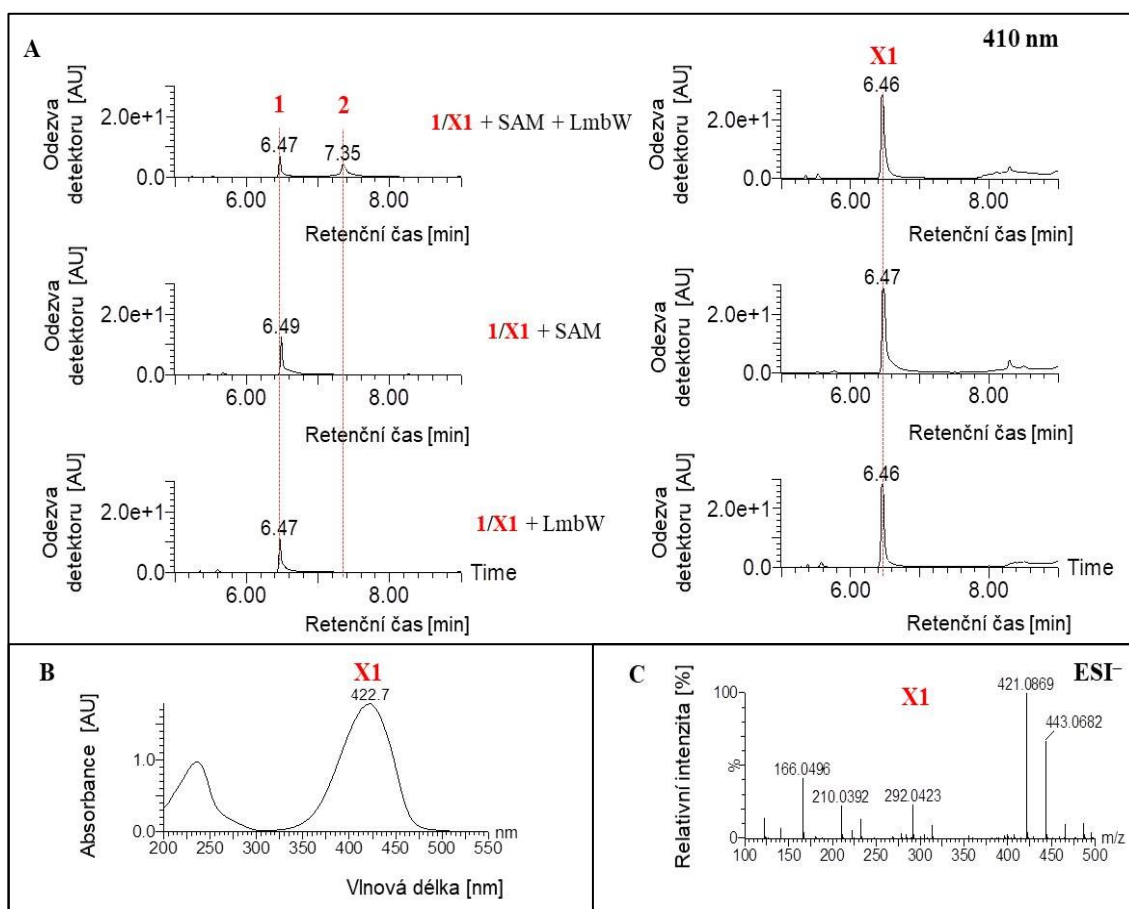


Obr. 13. Neznámá látka vyskytující se v reakčním roztoku intermediátů **1** a **2**. **A**: DAD chromatogram ($\lambda = 410$ nm); **B**: DAD absorpční spektrum neznámé látky. Chromatografické podmínky: kolona BEH-Amide, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0:acetonitril v poměru 1:1 (v/v) (složka B); lineární gradientová eluce.

4.1.5 Existence isomeru intermediátu 1

Během testování dříve připravených vzorků, které by měly obsahovat intermediát 1, byl zřejmě objeven isomer tohoto intermediátu (označení X1), který není akceptován proteinem LmbW jako substrát pro methylační reakci. Stejného výsledku bylo dosaženo i v opakovaných experimentech. Porovnání DAD chromatogramů směsí, které se liší tím, zda intermediát 2 vznikl či nikoliv, je ukázáno na obr. 14A.

Látka X1 vykazuje identické fyzikálně-chemické vlastnosti jako intermediát 1, disponuje velmi podobným DAD absorpčním (obr. 14B) a MS spektrem v záporném ESI módu (obr. 14C), avšak není proteinem LmbW převedena na intermediát 2.



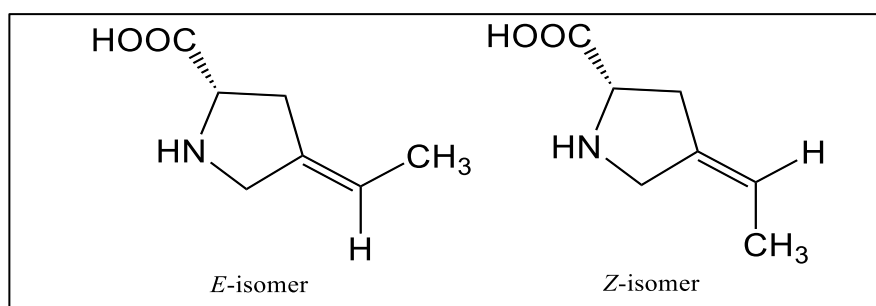
Obr. 14. Možný isomer intermediátu 1 (látka X1). **A**: DAD chromatogramy ($\lambda = 410$ nm) – reakce se vznikem intermediátu 2 (vlevo) či bez jeho vzniku (vpravo); **B**: DAD absorpční spektrum látky X1; **C**: MS spektrum látky X1. Chromatografické podmínky: kolona BEH-Amide, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 8,0:acetonitril v poměru 1:1 (v/v) (složka B), lineární gradientová eluce.

4.2 Analýza a izolace DH-EPL

Chemická struktura tomaymycinu produkovaného *S. achromogenes* byla dostatečně charakterizována. V laboratoři, ve které byla vypracována tato diplomová práce, se podařilo získat další dva producenty tomaymycinu, *S. purpureus* a *Streptomyces regensis*. Zatímco biosyntetický genový shluk pro produkci tomaymycinu ve *S. regensis* a *S. achromogenes* je prakticky identický, shluk ve *S. purpureus* se odlišuje tím, že neobsahuje gen kodující tautomerasu [18].

Pomocí NMR se v případě tomaymycinu izolovaného z kultivačního média *S. purpureus* nepodařilo jednoznačně určit, zda konfigurace na dvojně vazbě inkorporovaného DH-EPL je *E* nebo *Z* (obr. 15). Jednou z možností, jak tento strukturní aspekt objasnit, je izolovat z kultivačního média přímo intermediát DH-EPL a pokusit se přesně charakterizovat jeho strukturu, zejména zmíněnou *E/Z* isomerii ještě před inkorporací do výsledného metabolitu.

Z literatury je možné dohledat, že kvůli absorpci DH-EPL v nízkých vlnových délkách pro jeho izolaci by bylo možné využít HPLC s fluorimetrickou detekcí, ale za podmínky nutnosti derivatizace analytu vhodným činidlem [9]. Tento způsob detekce v tomto případě není možný, jelikož je nutné izolovat původní strukturu DH-EPL z kultivačního média *S. purpureus* pro následné určení konfigurace vazby pomocí NMR.



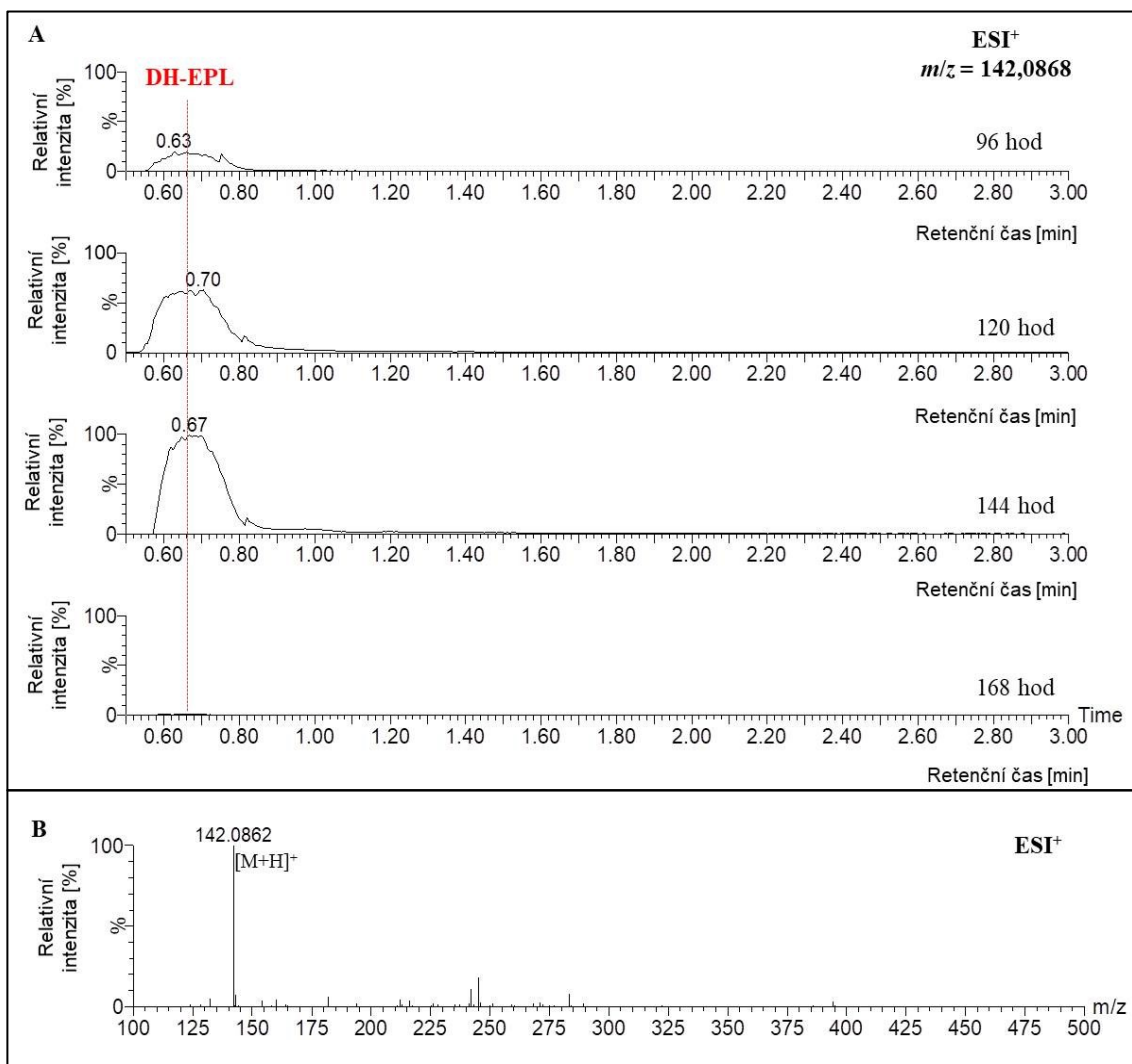
Obr. 15: *E/Z* isomery prekursoru DH-EPL

4.2.1 Analýza DH-EPL v kultivačním médiu

Pro zjištění produkce akumulujícího se DH-EPL v kultivačním médiu byla zvolena technika SPE s následnou chromatografickou analýzou. Výsledky odebíraných

vzorků kultivačního média *S. purpureus* po 96 hod, 120 hod, 144 hod a 168 hod od začátku kultivace jsou zobrazeny na obr. 16.

Iontově extrahové chromatogramy DH-EPL pro $m/z = 142,0868$ jsou znázorněny na obr. 16A v kladném módu ESI. Vzhledem k nedostatečné UV/VIS absorpci analytu byla provedena výhradně MS detekce (obr. 16B). Byly identifikovány pseudomolekulární protonované ionty analytu vznikající v iontovém zdroji.



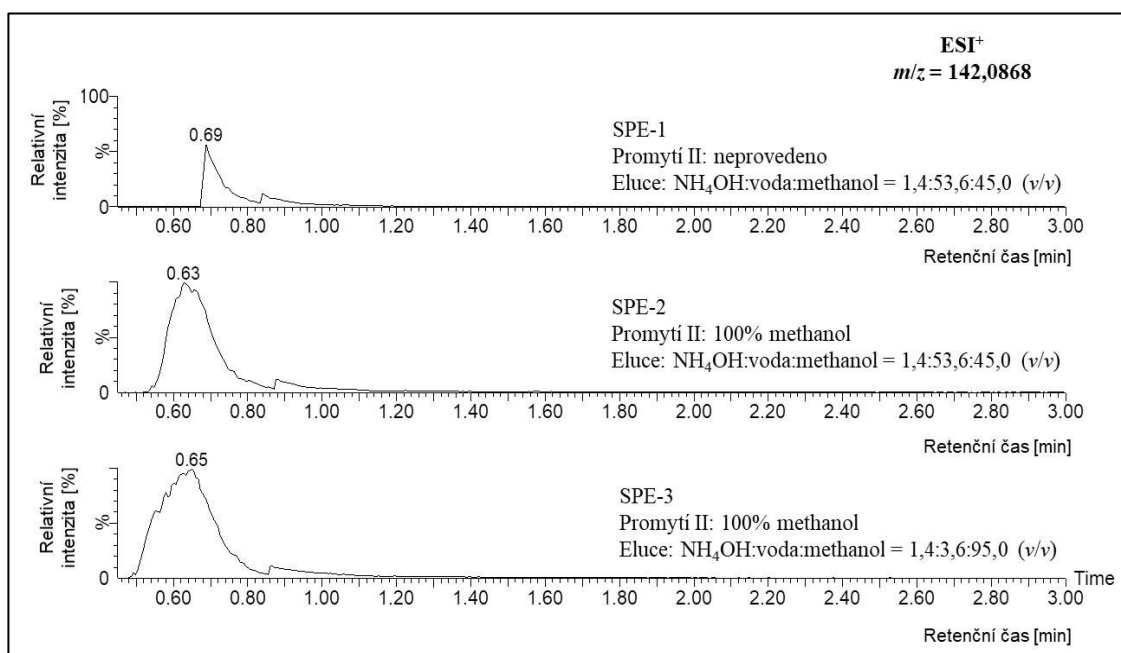
Obr. 16. Extrakce DH-EPL z kultivačního média v časových podmínkách. **A:** Iontově extrahované chromatogramy ($m/z = 142,0868$) v době kultivace: 96 h; 120 h; 144 h a 168 h. Relativní intenzita 100% odpovídá $1,5 \cdot 10^4$ detekovaných iontů; **B:** Hmotnostní spektrum DH-EPL. Chromatografické podmínky: kolona CSH-C₁₈, mobilní fáze: methanol (složka A) a 0,1 % HCOOH (složka B); lineární gradientová eluce I.

DH-EPL byl v extraktu kultivačního média detekován již po 96 h, jeho dostatečně vysoká koncentrace byla pozorována až po 144 h. Kultivace kultury byla v tomto čase ukončena centrifugací (4000 RPM, 15 min, 4 °C). Malá část živé kultury o objemu asi 20 ml byla ještě inkubována do 168 h, kdyby došlo k dalšímu významnému zvýšení koncentrace analytu. Analyt však v tomto čase nebyl detekován.

4.2.2 Optimalizace elučního kroku v extrakci DH-EPL

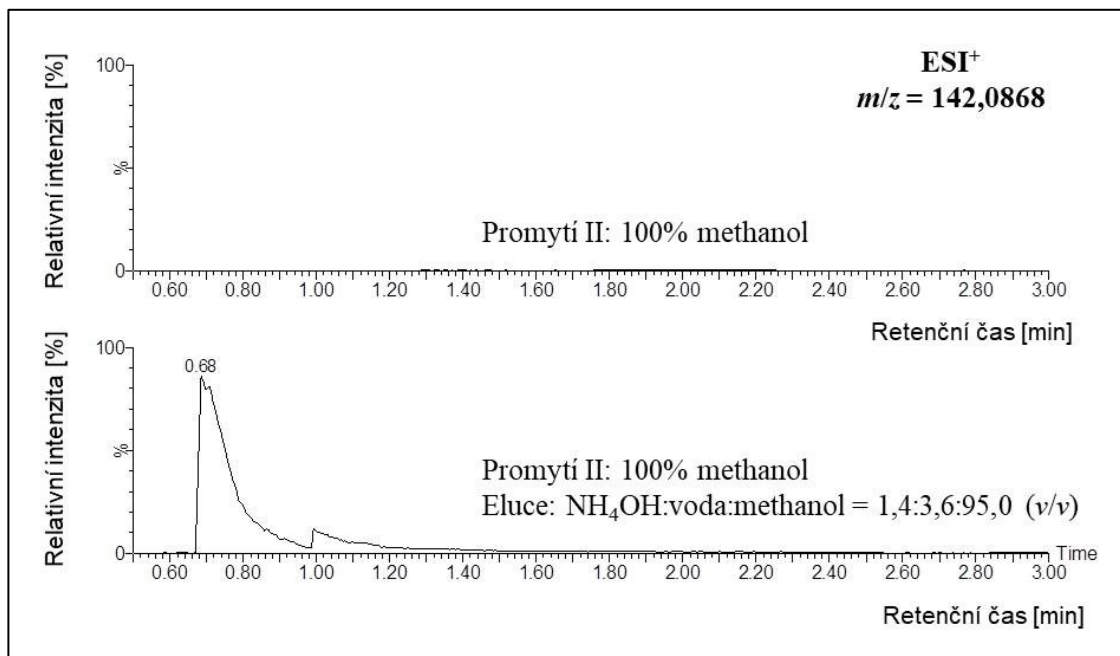
Extrakce DH-EPL z kultivačního média *S. purpureus* probíhala technikou SPE, jejíž eluční krok byl hodnocen metodou UHPLC-DAD-MS, převážně z iontově extrahovaných chromatogramů ($m/z = 142,0868$).

Nejvhodnějším elučním protokolem byl zvolen SPE-3, který tak bude používán pro další extrakce DH-EPL z této poměrně složité matrice v analytickém i semi-preparativním módu (obr. 17). Promytí methanolem pomůže tak lépe přecistit vzorek, přičemž toto promytí nemá vliv na výtěžnost analytu. Eluce methanolem oproti 50% vodnému roztoku methanolu má výhodu lepšího odpařování rozpouštědla za účelem prekoncentrace.



Obr. 17. Optimalizace elučního kroku extrakce DH-EPL. Iontově extrahované chromatogramy ($m/z = 142,0868$) pro SPE-1, SPE-2 a SPE-3. Relativní intenzita 100% odpovídá $1,5 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Chromatografické podmínky stejné z obr. 16.

Z výsledků na obr. 18 lze tvrdit, že DH-EPL se u SPE-3 při promytí methanolem z kolonky neuvolňuje. Analyt se uvolňuje až v alkalickém prostředí vzhledem k jeho kladně nabitě aminové skupině a záporně nabitě sulfonové skupině zabudované v kolonce.



Obr. 18. Vliv promytí a eluce extrakce DH-EPL. Iontově extrahované chromatogramy ($m/z = 142,0868$) – při samotném promývacím kroku II a při promývacím kroku II s následnou alkalickou elucí. Relativní intenzita 100 % odpovídá $1,5 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Chromatografické podmínky stejné jako u obr. 16.

4.2.3 Vývoj semi-preparativní metody izolace DH-EPL

Izolace DH-EPL byla provedena pomocí preparativní chromatografie. Jak je vidět z předchozích obr. 16, 17 a 18, v analytickém módu analyt eluuje za mrtvým objemem jako většina látek ze směsi. Z toho lze usoudit, že nebude možné pro izolaci použít kolonu s ligandem C₁₈, jelikož by získaný analyt k následné charakterizaci pomocí NMR nebyl dostatečně čistý. Proto byla pro izolaci tohoto analytu zvolena preparativní kolona založena na módu HILIC (HILIC-Diol).

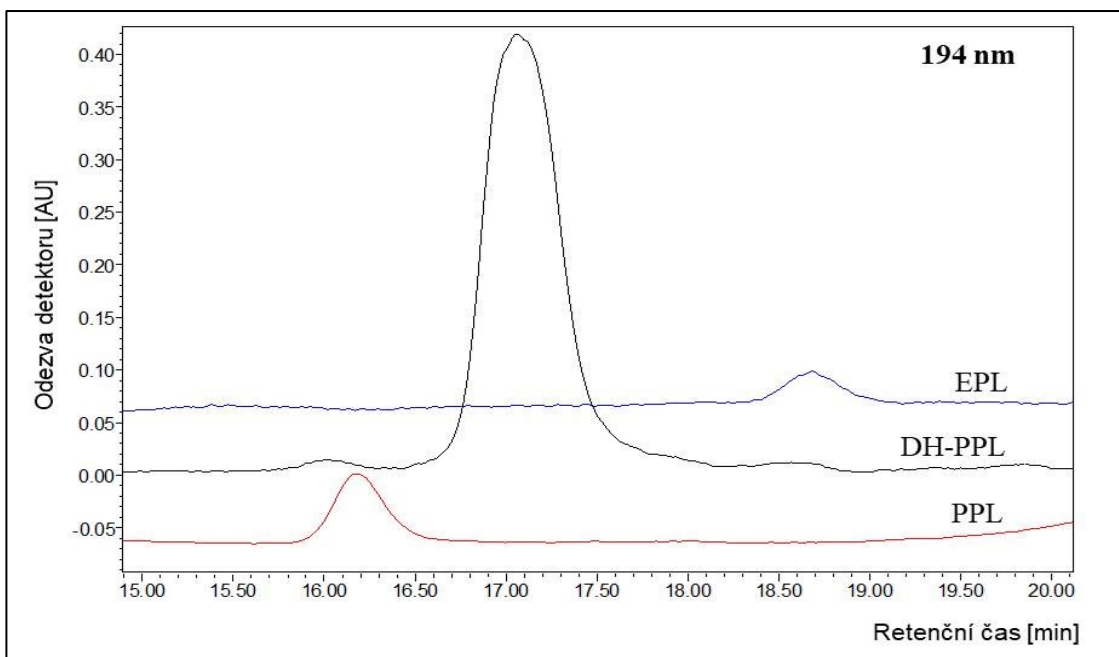
Ve vývoji semi-preparativní metody izolace DH-EPL byla testována isokratická eluce pomocí metody HPLC-UV. Standard DH-EPL není však komerčně dostupný a jeho příprava je velice časově náročná. Proto byly k určení retence použity látky, které

jsou dostupné a strukturou velice podobné DH-EPL, jedná se o EPL, PPL a DH-PPL. Z výsledků retenčních vlastností těchto látek je možné určit přibližnou retenci DH-EPL, který bude pravděpodobně eluovat z kolony podobně jako tyto pomocné standardy.

Mobilní fázi pro vývoj izolační metody byla zvolena směs organického modifikátoru a vodné složky mobilní fáze. Jako organický modifikátor byl testován acetonitril kvůli jeho silné eluční síle a dobrým rozpouštěcím schopnostem analytu. Vodnými složkami mobilní fáze byly zvoleny mravenčan či octan amonný (i ve směsi s methanolem) o různých iontových silách a hodnotách pH.

4.2.3.1 Určení retenčních časů standardních látek

K empirickému určení retenčních časů standardů EPL, PPL a DH-PPL byla zvolena mobilní fáze s acetonitrilem (složka A) a 50 mM octanem amonným, pH 4,2 (složka B) v poměru 80:20 (obr. 19). Standard PPL eluuje v $t_R = 16,2$ min, poté DH-PPL ($t_R = 17,2$ min) a nakonec EPL ($t_R = 18,7$ min). Poté by pravděpodobně následovala eluce DH-EPL.



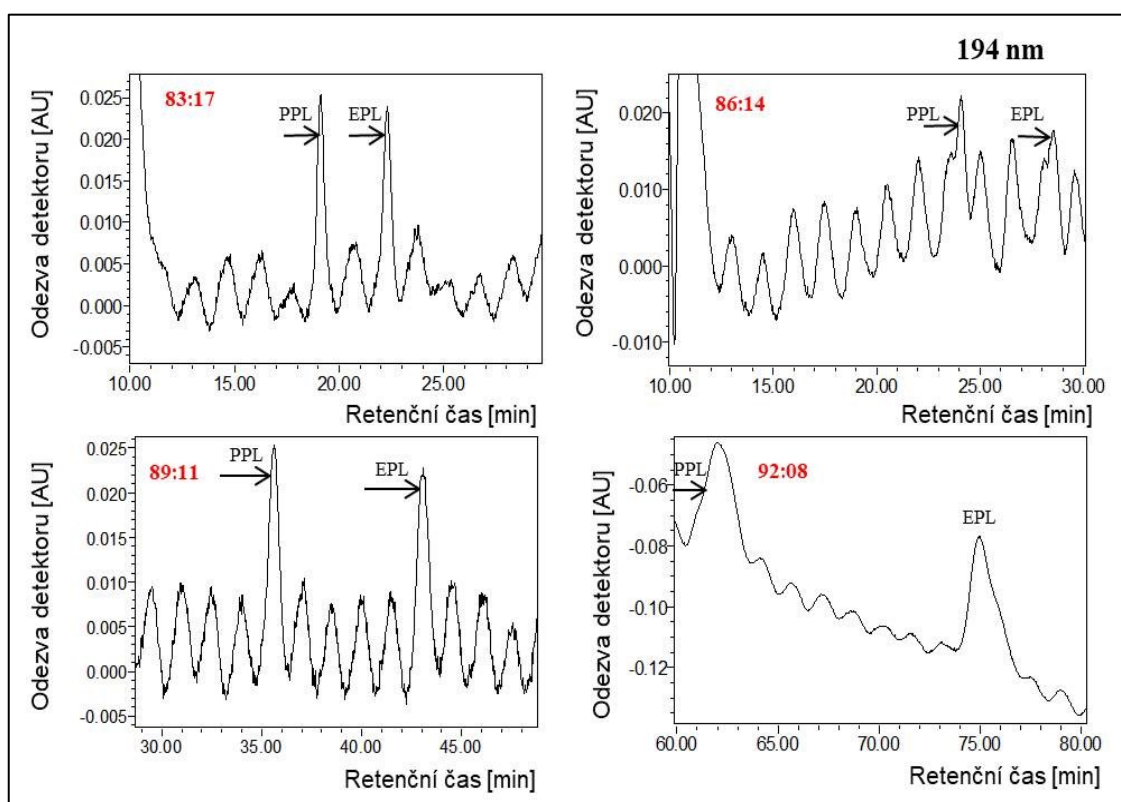
Obr. 19. Určení retenčních časů standardů EPL, PPL a DH-PPL. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 80:20 (v/v). UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm).

4.2.3.2 Výběr poměru acetonitrilu k vodné složce mobilní fáze

Vodnou složkou mobilní fáze s acetonitrilem (složka A) byl pro testování zvolen 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B), kdy byly proměřeny retenční časy standardů EPL a PPL v mobilní fázi A:B = 83:17; 86:14; 89:11 nebo 92:08 (v/v). Všechny UV/VIS chromatogramy jsou ukázány na obr. 20 – UV/VIS detekce při $\lambda = 194$ nm.

V mobilní fázi s 83 obj. % acetonitrilu je poměrně malá vzdálenost mezi EPL a PPL. Naopak s 92 obj. % acetonitrilu je velká vzdálenost mezi analyty (dlouhé retenční časy).

Je důležité poznamenat, že analyty mají nízké odezvy, a vzhledem k jejich malému množství, které je dispozici, není možné dávkovat vzorek o vyšší koncentraci. V případě nejasné identifikace daného analytu bylo provedeno porovnání s analýzou samotného rozpouštědla.

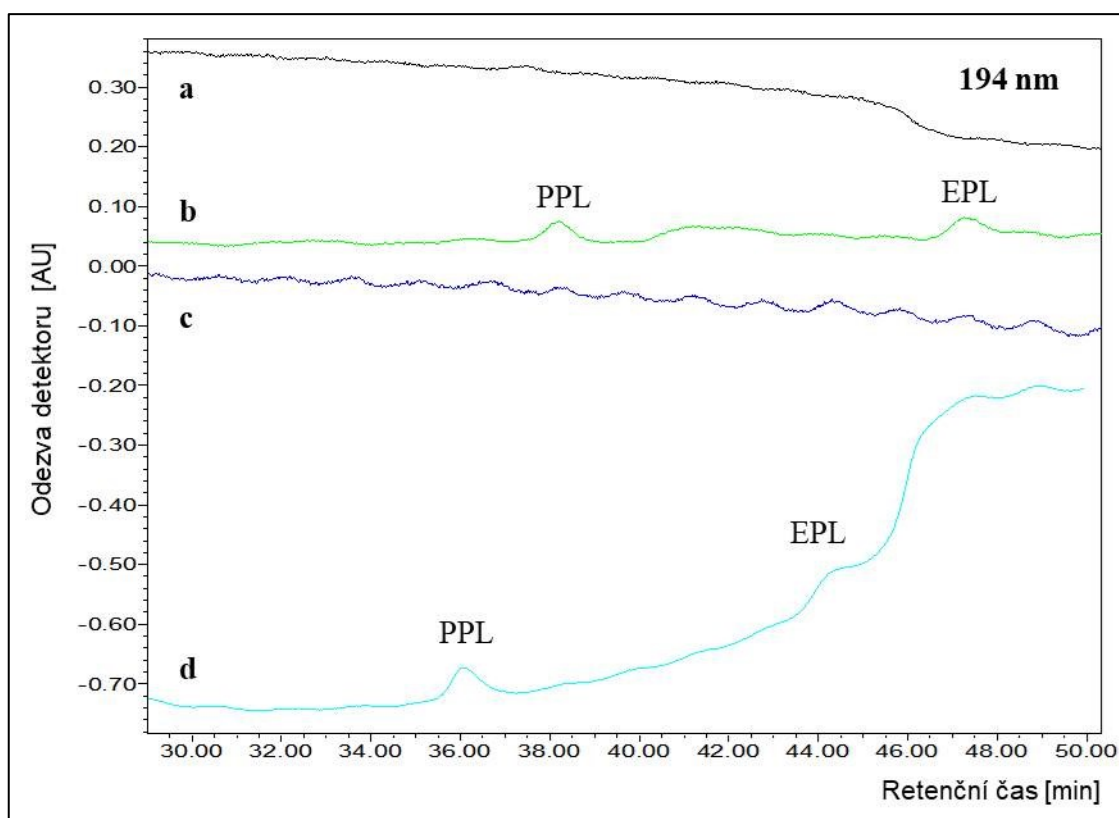


Obr. 20. UV/VIS chromatogramy vývoje izolační metody pomocí standardů EPL a PPL. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) o různém poměru složek mobilní fáze A:B (v/v) – 83:17; 86:14; 89:11 a 92:08. UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm).

Jako nejvhodnější z hlediska retenčních časů a rozlišení píků byla vybrán acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v) zejména kvůli dostatečné vzdálenosti mezi oběma píky s nepříliš dlouhými retenčními časy. Tento poměr A:B byl používán pro další vývoj izolační metody.

4.2.3.3 Výběr vodné složky mobilní fáze (pH, iontová síla či přídavek methanolu)

Pro výběr vodné složky mobilní fáze s parametry pH a iontové síly (či přídavku methanolu) byl nejprve testován octan amonný, pH 4,2 o jeho různých koncentracích, konkrétně 5 mM; 20 mM; 100 mM a 500 mM (obr. 21).

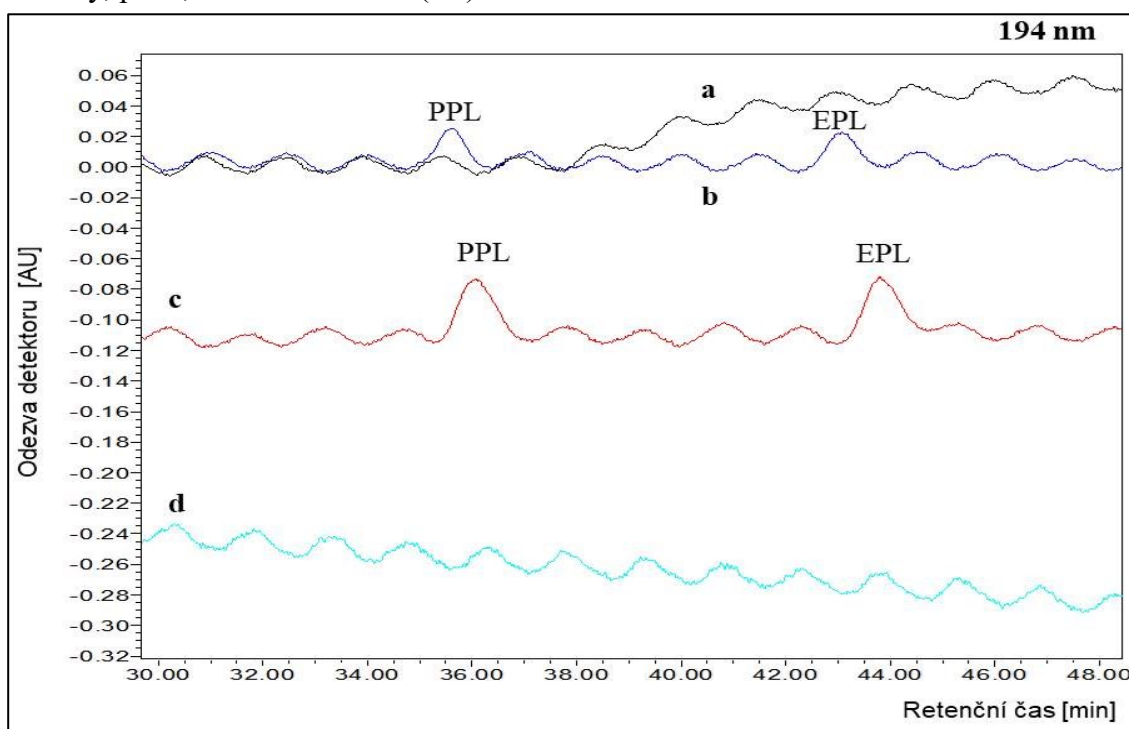


Obr. 21. UV/VIS chromatogramy vývoje izolační metody DH-EPL pomocí standardů EPL a PPL. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a octan amonný, pH 4,2 o jeho různých koncentracích (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v). a: 5 mM; b: 100 mM; c: 500 mM; d: 20 mM. UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm).

Z výsledků je zřejmé, že při testování 5 mM či 500 mM octanu amonného nejsou rozeznatelné signály analytů od šumu. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o nevhodné chromatografické podmínky pro separaci těchto analytů. Mezi dalšími testovanými koncentracemi octanu amonného (20 mM a 100 mM) nebyl výrazný rozdíl v separaci, a proto byl zatím vývoj izolační metody zachován na použití 50 mM octanu amonného, pH 4,2 (s 89 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi).

Dalším kritériem bylo testování vhodného pH vodné složky. Konkrétně byl testován 50 mM octan amonný, pH 8,0, v obr. 22 srovnán s již testovaným 50 mM octanem amonným, pH 4,2.

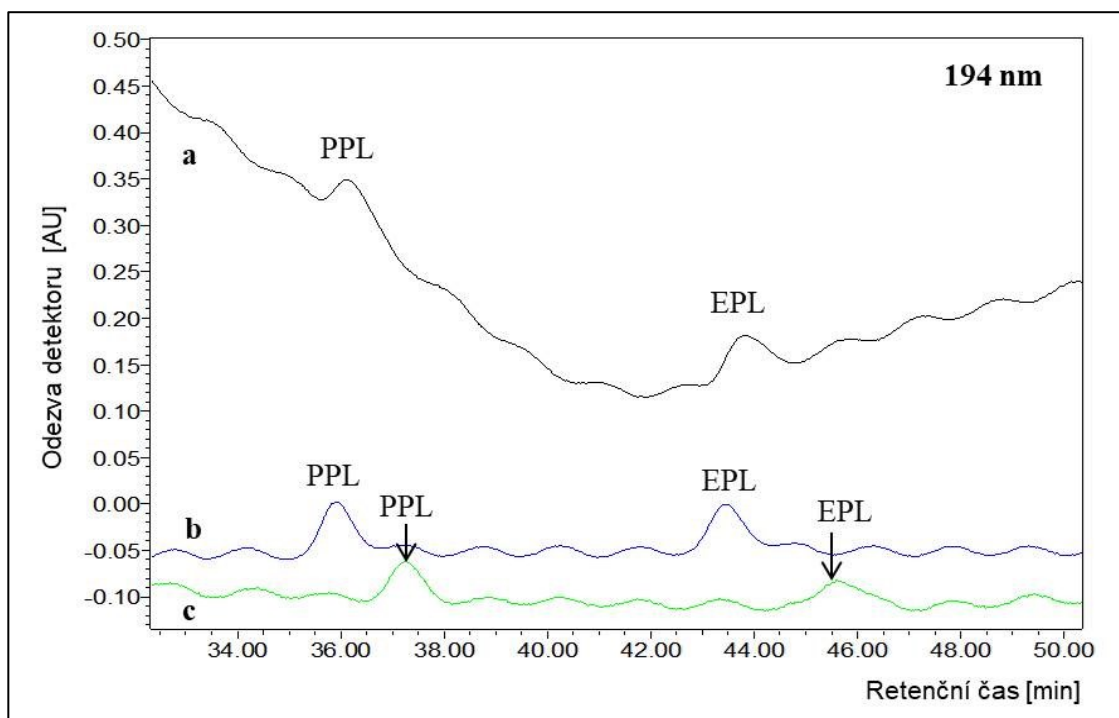
Poté byl testován přídavek methanolu do vodné složky mobilní fáze (obr. 22). Byly testovány 50 mM octan amonný, pH 4,2:methanol = 1:1 (v/v) a 50 mM octan amonný, pH 8,0:methanol = 1:1 (v/v).



Obr. 22. UV/VIS chromatogramy vývoje izolační metody DH-EPL pomocí standardů EPL a PPL. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a vodná složka (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v). Testované vodné složky – **a**: 50 mM octan amonný, pH 8,0:methanol = 1:1 (v/v); **b**: 50 mM octan amonný, pH 4,2; **c**: 50 mM octan amonný, pH 8,0; **d**: 50 mM octan amonný, pH 4,2:methanol = 1:1 (v/v). UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm).

Z výsledků plyne, že alkalické pH vodné složky však nepřineslo výrazné zlepšení, proto jako nevhodnější pro separaci bylo zvoleno kyselé pH. Dále po přidání methanolu k vodné složce v poměru 1:1 (v/v) nebyly detekovány oba standardy ani v kyselé ani v alkalické vodné složce.

Nakonec byl testován 50 mM mravenčan amonný, pH 4,2; 50 mM mravenčan amonný, pH 8,0 a 100 mM mravenčan amonný, pH 4,2 (obr. 23). Z výsledků separace je zřejmé, že použití mravenčanu amonného nepřineslo také žádné významné zlepšení.



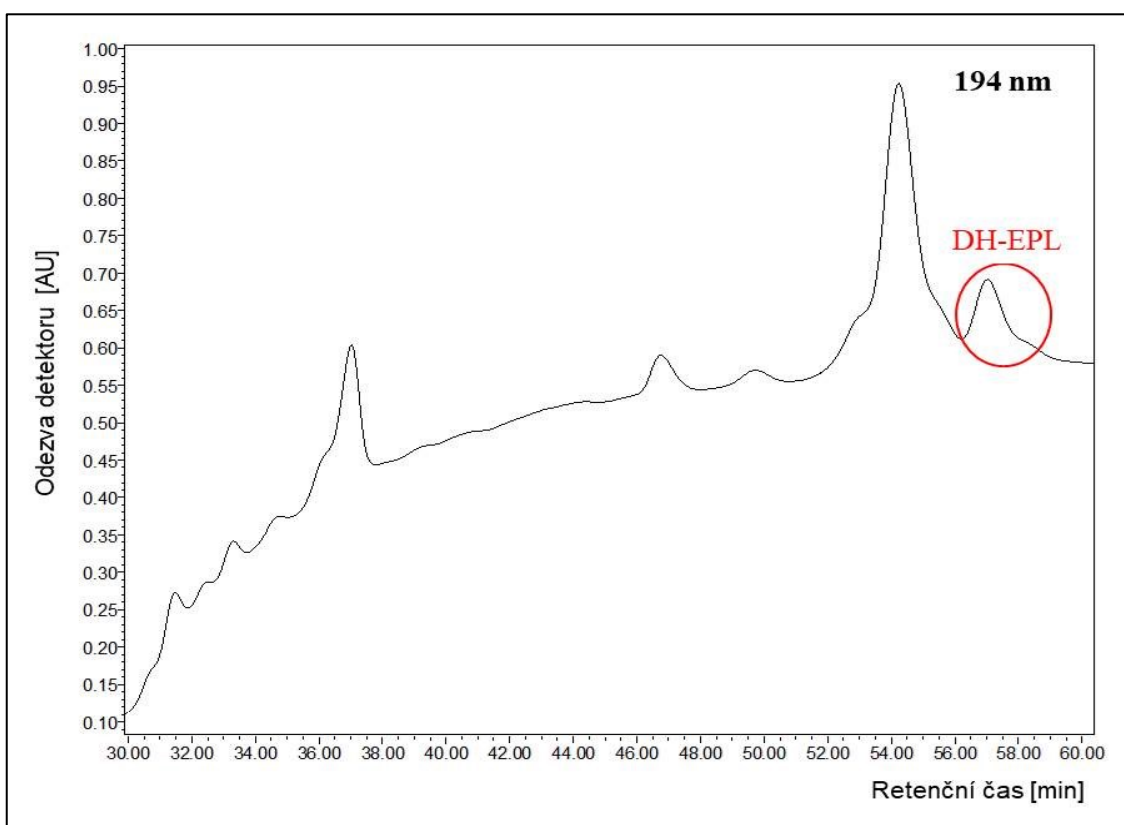
Obr. 23. UV/VIS chromatogramy vývoje izolační metody DH-EPL pomocí standardů EPL a PPL. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a mravenčan amonný o různém pH a iontových silách (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v). **a**: 50 mM mravenčan amonný, pH 4,2; **b**: 50 mM mravenčan amonný, pH 8,0; **c**: 100 mM mravenčan amonný, pH 4,2. UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm)

V testované isokratické eluci vývoje semi-preparativní chromatografické metody pro izolaci DH-EPL pomocí standardů EPL a PPL, případně DH-PPL, byly vyhodnoceny všechna testovaná kritéria a jako nejvhodnější mobilní fází byl zvolen: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B) v poměru A:B = 89:11 (v/v).

4.2.4 Izolace DH-EPL z kultivačního média s off-line LC-MS analýzou

Prekoncentrovaný extrakt kultivačního média v acetonitrilu, ve kterém je přítomen analyt, byl nadávkován na preparativní kolonu v metodě HPLC-UV (obr. 24). Byly následně odebrány frakce v rozmezí retenčních časů 20,0 – 60,0 min (každá po jedné minutě). Vlnová délka pro UV/VIS detekci byla nastavena na 194 nm.

Na základě UHPLC-DAD-MS metody v off-line analýze bylo zjištěno, že většina DH-EPL se nachází ve frakcích mezi retenčními časy $t_R = 56,0 - 58,0$ min.



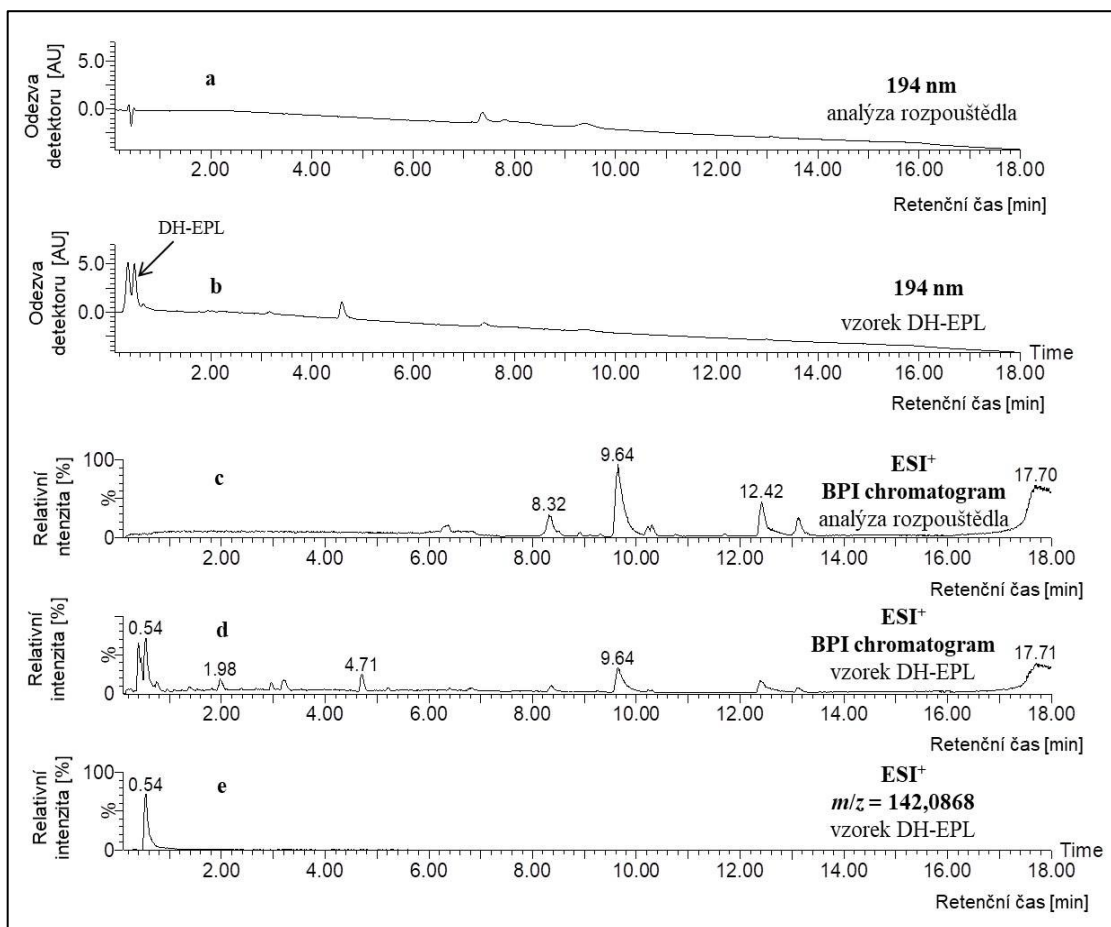
Obr. 24. UV/VIS chromatogram izolace DH-EPL z kultivačního média. Chromatografické podmínky: kolona HILIC-Diol, mobilní fáze: acetonitril (složka A) a 50 mM octan amonný, pH 4,2 (složka B), A:B = 89:11. UV/VIS detekce ($\lambda = 194$ nm).

4.2.5 Finální vzorek DH-EPL k analýze NMR

Získaný vzorek DH-EPL k analýze NMR byl izolován přibližně z objemu 900 ml kultivačního média *S. purpureus*. Izolace ve vytvořené metodě semi-

-preparativního módu HPLC-UV byly několikrát opakovány. Vybrané frakce obsahující analyt z obr. 24 byly spojeny a po odpaření bylo celkem získáno 0,7 mg DH-EPL pro NMR analýzu, jehož čistota byla ještě ověřena UHPLC-DAD-MS metodou.

Na obr. 25 je znázorněna analýza rozpouštědla (slepého vzorku) a vzorku izolovaného DH-EPL. DAD chromatogramy byly extrahovány při vlnové délce 194 nm. BPI chromatogramy (při základní linii) a iontově extrahované chromatogramy ($m/z = 142,0868$) byly měřeny v kladném módu ESI. Na obr. 25b se pravděpodobně vedle eluovaného analytu vyskytuje i systémový pík.



Obr. 25. Finální vzorek DH-EPL k analýze NMR. **a**: DAD chromatogram rozpouštědla ($\lambda = 194$ nm); **b**: DAD chromatogram vzorku ($\lambda = 194$ nm); **c**: BPI chromatogram rozpouštědla; **d**: BPI chromatogram vzorku; **e**: Iontově extrahovaný chromatogram vzorku ($m/z = 142,0868$). Relativní intenzita 100% odpovídá $4,0 \cdot 10^4$ detekovaných iontů. Chromatografické podmínky: kolona CSH-C₁₈, mobilní fáze: methanol (složka A) a 0,1% HCOOH (složka B); lineární gradientová eluce II.

Z výsledků chromatogramů plyne, že čistota DH-EPL k analýze NMR je dostatečná. Vzorek DH-EPL byl odeslán Mgr. Markovi Kuzmovi, Ph.D, do laboratoře NMR, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. k následnému určení konfigurace *E/Z* na exocyklické dvojně vazbě. Je však velice pravděpodobné, že množství vzorku nebude dostatečné pro tento požadavek, a tak bude v budoucnu potřebné izolovat analyt z vyššího objemu kultivačního média.

5 Závěr

- Podařilo se připravit intermediát **2** z intermediátu **1** v přítomnosti proteinu LmbW a methylačního činidla SAM v *in vitro* enzymatické reakční směsi.
- Identita intermediátů **1** a **2** byla potvrzena pomocí UHPLC-DAD-MS metody.
- Byla vyvinuta semi-preparativní chromatografická metoda (lineární gradientová eluce) pro izolaci obou intermediátů.
- Byla zjištěna výrazně nižší stabilita intermediátu **2** ve srovnání s intermediátem **1** v *in vitro* enzymatické reakční směsi.
- Nízká stabilita intermediátu **2** vysvětluje dříve obtížně interpretovatelné *in vivo* experimenty v rámci studia biosyntetické dráhy PPL.
- Byla zjištěna existence isomerů intermediátu **1**, které není možné pomocí LmbW a SAM methylovat na intermediát **2**.
- Byla vyvinuta chromatografická metoda v semi-preparativním módu (isokratická eluce) pro izolaci DH-EPL z kultivačního média *S. purpureus*.
- Podařilo se připravit 0,7 mg DH-EPL k určení konfigurace *E/Z* na exocyklické dvojné vazbě pro analýzu NMR. Tuto látku bude také možné dále využít pro studium biosyntézy APD.
- Tato diplomová práce přispěla současným snahám, které jsou vynakládány na vývoj nových účinnějších derivátů s lepšími farmakologickými parametry.

6 Použitá literatura

- [1] Bérdy J.: Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* **58**, 1 – 26 (2005).
- [2] Demain A. L.: Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 455 – 463 (1999).
- [3] Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A.: Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology* **7**, 373 – 390 (2012).
- [4] Rossolini G. M., Arena F., Pecile P., Pollini S.: Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology* **18**, 56 – 60 (2014).
- [5] Demain A. L., Sanchez S.: Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* **62**, 5 – 16 (2009).
- [6] Niu G., Tan H.: Biosynthesis and regulation of secondary metabolites in microorganisms. *Science China Life Sciences* **56**, 581 – 583 (2013).
- [7] Jiraskova P., Gazak R., Kamenik Z., Steiningerova L., Najmanova L., Kadlcik S., Novotna J., Kuzma M., Janata J.: New concept of the biosynthesis of 4-alkyl-L-Proline precursors of lincomycin, hormaomycin, and pyrrolbenzodiazepines: Could a γ -glutamyltransferase cleave the C-C Bond? *Frontiers in Microbiology* **7** (2016).
- [8] Ulanová D., Novotná J., Smutná Y., Kameník Z., Gažák R., Šulc M., Sedmera P., Kadlčík S., Plháčková K., Janata J.: Mutasyntesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 927 – 930 (2010).
- [9] Kameník Z., Kopecký J., Marečková M., Ulanová D., Novotná J., Pospíšil S., Olšovská J.: HPLC-fluorescence detection method for determination of key intermediates of the lincomycin biosynthesis in fermentation broth. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 1779 – 1787 (2009).
- [10] Janata J., Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Najmanova L.: Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products. *Natural Product Reports* **35**, 257 – 289 (2018).

- [11] Magerlein B. J.: Modification of lincomycin. *Advances in Applied Microbiology* **14**, 185 – 229 (1971).
- [12] Hoeksema H.: Celesticetin IV. The structure of celesticetin. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 4224 – 4225 (1964).
- [13] Birkenmayer R. D, Kagan F.: Synthesis and structure of clindamycin. A potent antibacterial agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **13**, 616 – 619 (1970).
- [14] Lell B., Kremsner P. G.: Clindamycin as an antimalarial drug: Review of clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2315 – 2320 (2002).
- [15] Tenson T., Ehrenberg M.: Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel *Cell* **108**, 591 – 594 (2002).
- [16] Gerratana B.: Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Medicinal Research Reviews* **32**, 254 – 293 (2012).
- [17] Mantaj J., Jackson P. J. M., Rahman K. M., Thurston D. E.: From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD) – containing antibody-drug conjugates (ADCs), *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 462 – 488 (2017).
- [18] Kamenik Z., Kadlcik S., Gazak R., Vobruba S., Palanova L., Kuzma M., Janata J.: Diversity of alkylproline moieties in pyrrolobenzodiazepines arises from postcondensation modifications of a unified building block. *ACS Chemical Biology* **12**, 1993 – 1998 (2017).
- [19] Arima K., Kohsaka M., Tamura G., Imanaka H., Sakai H.: Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I Isolation and properties of tomaymycin. *The Journal of Antibiotics* **25**, 437 – 444 (1972).
- [20] Kariyone K., Yazawa H., Kohsaka M.: The structures of tomaymycin and oxotomaymycin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **19**, 2289 – 2293 (1971).
- [21] Tsunakawa M., Kamei H., Konishi M., Miyaki T., Oki T., Kawaguchi H.: Porothramycin, a new antibiotic of the anthramycin group: Production, isolation, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **41**, 1366 – 1373 (1988).
- [22] Andres N., Wolf H., Zähler H.: Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in including cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. *Zeitschrift für Naturforschung C* **45**, 851 – 855 (1990).

- [23] Cho J. Y., Williams P. G., Kwon H. C., Jensen P. R., Fenical W.: Lucentamycins A–D, cytotoxic peptides from the marine-derived Actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. *Journal of Natural Products* **70**, 1321 – 1328 (2007).
- [24] Cha J. W., Park J., Sim T., Nam S., Kwon H. C., Valle J. R. D., Fenical W.: Structure assignment of lucentamycin E and revision of the olefin geometries of the marine-derived lucentamycins. *Journal of Natural Products* **75**, 1648 – 1651 (2012).
- [25] Cain Ch. F., Howard E. H., Goodwin J. A., Valle J. R. D.: Synthetic studies toward elegance A. *Archive for Organic Chemistry* (v přípravě, 2019).
- [26] Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Steiningerova L., Rynd V., Janata J.: C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation. *Nature Communications* **9** (2018).
- [27] Argoudelis A.D., Eble T. E., Fox J. A., Mason D. J.: Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry* **8**, 3408 – 3411 (1969).
- [28] Witz D. F., Hessler E. J., Miller T. L.: Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* **10**, 1128 – 1133 (1971).
- [29] Peschke U., Schmidt H., Zhang H., Piepersberg W.: Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology* **16**, 1137 – 1156 (1995).
- [30] Hu Y., Phelan V., Ntai I., Farnet C. M., Zazopoulos E., Bachmann B. O.: Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology* **14**, 691 – 701 (2007).
- [31] Li W., Khullar A., Chou S., Sacramo A., Gerratana B.: Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2869 – 2878 (2009b).
- [32] Höfer I., Crüsemann M., Radzom M., Geers B., Flachshaar D., Cai X., Zeeck A., Piel J.: Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chemistry & Biology* **18**, 381 – 391 (2011).

- [33] Novotna J., Olsovska J., Novak P., Mojzes P., Chaloupkova R., Kamenik Z., Spizek J., Kutejova E., Mareckova M., Tichy P., Damborsky J., Janata J.: Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS ONE* **8** (2013).
- [34] Neusser D., Schmidt H., Spizek J., Novotna J., Peschke U., Kaschabeck S., Tichy P., Piepersberg W.: The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Archives of Microbiology* **169**, 322 – 332 (1998).
- [35] Novotná J., Honzátko A., Bednář P., Kopecký J., Janata J., Spížek J.: L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3678 – 3683 (2004).
- [36] Colabroy K. L., Hackett W. T., Markham A. J., Rosenberg J., Cohen D. E., Jacobson A.: Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **479**, 131 – 138 (2008).
- [37] Pang A., Du L., Lin C., Qiao J., Zhao G.: Co-overexpression of *lmbW* and *metK* led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Applied Microbiology* **119**, 1064 – 1074 (2015).
- [38] Zhong G., Zhao Q., Zhang Q., Liu W.: 4-alkyl-L-(dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of γ -glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage. *Nature Communications* **8** (2017).
- [39] Zhong G., Chen H., Liu W.: Reply to “C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation”. *Nature Communications* **9** (2018).
- [40] Steiningerova L., Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Bashiri G., Man P., Pavlikova M., Janata J.: Different reaction specificities of F₄₂₀H₂-dependent reductases facilitate pyrrolbenzodiazepines and lincomycin to fit their biological targets. *Journal American Chemical Society* (v přípravě, 2019).

- [41] Saha S., Li W., Gerratana B., Rokita S. E.: Identification of the dioxygenase-generated intermediate formed during biosynthesis of the dihydropyrrole moiety common to anthramycin and sibiromycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**, 449 – 454 (2015).
- [42] Colabroy K. L., Smith I. R., Vlahos A. H. S., Markham A. J., Jakubik M. E.: Defining a kinetic mechanism for L-DOPA 2,3 dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from *Streptomyces lincolnensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* **1844**, 607 – 614 (2014).
- [43] Rynd V.: Vývoj LC-MS metody ke stanovení dikarboxylových prekurzorů linkomycinu. Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. Diplomová práce (2017).
- [44] Fifield F. W., Kealey D.: Principles and practice of analytical chemistry. *Blackwell Science Ltd*, Oxford (2000).
- [45] Kazakevich Y., LoBrutto R.: HPLC for pharmaceutical scientists. *Wiley*, New Jersey (2007).
- [46] Harvey D.: Modern analytical chemistry. *McGraw-Hill*, New York (2000).
- [47] Zotou A.: An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry* **10**, 554 – 569 (2012).
- [48] Nguyen D. T., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J.: Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science* **29**, 1836 – 1848 (2006).
- [49] Fekete S., Beck A., Veuthey J., Guillarme D.: Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**, 43 – 55 (2015).
- [50] Buszewski B., Noga S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 231 – 247 (2012).
- [51] Gonzalo E. R., Gómez D. G.: Hydrophilic interaction chromatography: Current trends and applications: *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, 100 – 107 (2019).

- [52] Jandera P., Janás P., Škeříková V., Urban J.: Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **40**, 1434 – 1448 (2017).
- [53] Karatapanis A. E., Fiamegos Y. C., Stalikas C. D.: Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on diol column. *Chromatografia* **71**, 751 – 759 (2010).
- [54] Swartz M. E.: UPLCTM: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **28**, 1253 – 1263 (2005).
- [55] Wren S. A. C., Tchelitcheff P.: Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A* **1119**, 140 – 146 (2006).
- [56] Mellors J. S., Jorgenson J. W.: Use of 1,5- μm porous ethyl-bridged hybrid particles as a stationary-phase support for reversed-phase ultrahigh-pressure liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **76**, 5441 – 5450 (2004).
- [57] Tylová T., Kameník Z., Flieger M., Olšovská J.: Comparison of LC columns packed with 2.6 μm core-shell and sub-2 μm porous particles for gradient separation of antibiotics. *Chromatographia* **74**, 19 – 27 (2011).
- [58] Grumbach E. S., Wheat T. E., Kele M., Mazzeo J. R.: Developing columns for UPLC: Design considerations and recent developments. *LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists* **22**, 40 – 44 (2005).
- [59] Fekete S., Oláh E., Fekete J.: Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A* **1228**, 57 – 71 (2012).
- [60] Girolamo F. D., Lante I., Muraca M., Putignani L.: The role of mass spectrometry in the „omics“ era. *Current Organic Chemistry* **17**, 2891 – 2905 (2013).
- [61] Fedeniuk R. W., Shand P. J.: Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *Journal of chromatography A* **812**, 3 – 15 (1998).
- [62] Kadlčík S., Kučera T., Chalupská D., Gažák R., Koběrská M., Ulanová D., Kopecký J., Kutejová E., Najmanová L., Janata J.: Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis *PLoS ONE* **8** (2013).