

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Mgr. Lucie Steiningerová

Úloha $F_{420}H_2$ -závislých reduktas v biosyntéze bioaktivních mikrobiálních metabolitů
inkorporujících 4-alkyl-L-prolinový derivát

The role of $F_{420}H_2$ -dependent reductases in the biosynthesis of microbial bioactive
metabolites incorporating a 4-alkyl-L-proline derivative

Dizertační práce

Vedoucí práce: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne 20. 06. 2020

.....
Mgr. Lucie Steiningerová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za odborné vedení dizertační práce, cenné rady, připomínky a komentáře, laskavý přístup a obecně za všechny zkušenosti, které jsem v oblasti vědy po celou dobu působení v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu získala.

Zvláštní poděkování patří mému konzultantovi Mgr. Zdeňku Kameníkovi, Ph.D. za edukaci, odborný dohled a konzultace, zajímavé příležitosti a přátelský přístup.

Děkuji také všem členům laboratoře Biologie sekundárního metabolismu za přátelskou pracovní atmosféru, kterou po celou dobu vytvářeli.

Děkuji Prof. Ikuro Abe (The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences) za příležitost stát se na několik týdnů členem Laboratory for Natural Product Chemistry a získat tak cenné zkušenosti a dovednosti v oblasti determinace proteinových struktur.

Dále velmi děkuji všem kolegům, se kterými jsem dostala příležitost spolupracovat:

RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a RNDr. Petru Pompachovi Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR) za spolupráci při získávání a zpracování dat z nativní hmotnostní spektrometrie.

RNDr. Marku Kuzmovi, Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR) za spolupráci při získávání a zpracování dat z nukleární magnetické rezonance.

RNDr. Tomášovi Ettrychovi, Ph.D. (Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR) za možnost využití spektrofluorometru.

RNDr. Jiřímu Pavlíčkovi, Ph.D. a Ing. Janu Stránskému, Ph.D. (Biotechnologický ústav, AV ČR) za spolupráci a cenné rady při krystalizaci proteinů a determinaci proteinových struktur.

Ghader Bashirimu, Ph.D. (School of Biological Sciences, University of Auckland) za poskytnutí kofaktoru F₄₂₀.

Poděkování také patří Literárnímu fondu, nadaci Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových a Federation of European Microbiological Societies za poskytnuté finanční prostředky, které byly použity k hrazení cestovních nákladů spojených se zahraničními konferencemi.

Závěrem bych chtěla poděkovat celé své rodině a nejbližším, kteří mě po celou dobu studia usilovně a upřímně podporovali.

Tato práce byla podpořena v rámci projektů:

- Grantové agentury České republiky – projekty 17-13436Y a 20-09811Y
- Grantové agentury Univerzity Karlovy – projekt 966217
- Akademie věd České republiky – mobilita VAJVA-19-46, program LQ200202002
- BIOCEV (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy) – projekt CZ.1.05/1.1.00/02.0109, Evropský fond pro regionální rozvoj

Tato práce vznikla v letech 2015 – 2020 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.í., v laboratoři Biologie sekundárního metabolismu a je založena na publikacích, jejichž kopie tvoří přílohu této práce. Dílčí části práce byly prezentovány na níže uvedených mezinárodních konferencích.

Přehled absolvovaných mezinárodních konferencí

The Chemistry and Biology of Natural Products, 2016, Warwick – Velká Británie

18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2017, Jeju – Jižní Korea

The Chemistry and Biology of Natural Products, 2018, Warwick – Velká Británie

Microbial Genetics & Molecular Microbiology, 2018, Chicago – USA

2nd Synthetic Biology for Natural Products Conference, 2019, Puerto Vallarta – Mexiko

Abstrakt

Protinádorové pyrrolbenzodiazepiny (PBD), linkosamidová antibiotika, bakteriální signální molekula hormaomycin a protituberkulózní griselimycin jsou strukturně i funkčně diverzifikovaná skupina aktinobakteriálních metabolitů, jejichž společným strukturním znakem je inkorporace 4-alkyl-L-prolinového derivátu (APD) vznikajícího specializovanou biosyntetickou dráhou z L-tyrosinu či L-leucinu. APD dráhy se účastní sada až šesti homologních proteinů, dle jejich předpokládaného pořadí v biosyntéze modelového APD, 4-propyl-L-prolinu (APD linkosamidu linkomycinu), byly označeny jako Apd1 – Apd6. Tato práce cílí na objasnění funkce Apd6 proteinů katalyzujících poslední předpokládaný krok specializované APD dráhy, $F_{420}H_2$ -závislou redukci.

Heterologní nadprodukcí a *in vitro* testováním šesti Apd6 homologů bylo demonstrováno, že Apd6 z biosyntézy PBD a hormaomycinu jsou schopné v přítomnosti $F_{420}H_2$ redukovat pouze endocyklickou iminovou vazbu 4-substituované Δ^1 -pyrrolin-2-karboxylové kyseliny. Na druhou stranu Apd6 LmbY z biosyntézy linkomycinu a částečně GriH z biosyntézy griselimycinu redukuje také více inertní exocyklickou dvojnou vazbu stejného substrátu. V tomto kontextu se LmbY a GriH reduktasy vyznačují dosud nepopsanou aktivitou, která má navíc biologickou relevanci, neboť přispívá k rozmanitosti struktur APD prekurzorů.

Dvojnásobná $F_{420}H_2$ -závislá redukce probíhá hydridovým přenosem s unikátním mechanismem, který byl v rámci práce navržen i experimentálně prokázán. Dále práce cílí na objasnění podstaty rozdílné specifity Apd6 homologů. Bylo predikováno aktivní místo Apd6 proteinů a stanoveny byly klíčové aminokyselinové zbytky, které byly cíleně mutovány. Pro získání přímého důkazu objasňujícího neobvyklou reakční specifitu byly vyvinuty podmínky pro krystalizaci proteinů.

V závěru práce bylo bioinformatickou analýzou Apd6 proteinů ukázáno, že bioaktivní metabolity nesoucí ve své struktuře APD motiv nejsou tak vzácné, jak se dosud předpokládalo. Apd6 a jejich homology zřejmě hrají roli ve formaci nových, dosud neobjevených přírodních látek i centrálním metabolismu bakterií a archaea.

Apd6 reduktasy objasněné v rámci této práce představují první charakterizované $F_{420}H_2$ -závislé enzymy z LLHT rodiny (z angl. luciferase-like hydride transferase) ze streptomycet a v biosyntéze bioaktivních molekul vůbec. Univerzálním přínosem této práce je rozšíření dosud velmi omezeného chápání úlohy F_{420} -závislých enzymů v Actinobacteria, které kontrastuje s významně pokročilejší znalostí těchto enzymů v Archaea.

Klíčová slova

specializované metabolity, Actinobacteria, kofaktor F_{420} , oxidoredukční reakce, reakční specifita, linkomycin, pyrrolbenzodiazepiny, hormaomycin, griselimycin

Abstract

Antitumor pyrrolobenzodiazepines (PBDs), lincosamide antibiotics, quorum sensing molecule hormaomycin, and antituberculosic griselimycin are structurally and functionally diverse groups of actinobacterial metabolites. The common feature of these compounds is the incorporation of L-tyrosine- or L-leucine-derived 4-alkyl-L-proline derivatives (APDs) in their structures. APD biosynthesis involves a set of up to six homologous proteins. According to their proposed order in the biosynthesis of 4-propyl-L-proline, a model APD of lincosamide lincomycin, the homologous proteins were named Apd1 – Apd6. Here, we report that the last reaction in the biosynthetic pathway of APDs, catalyzed by $F_{420}H_2$ -dependent Apd6 reductases, contributes to the structural diversity of APD precursors.

Specifically, the heterologous overproduction and *in vitro* tests of six Apd6 enzymes demonstrated that Apd6 from the biosynthesis of PBDs and hormaomycin can reduce only an endocyclic imine double bond, whereas Apd6 LmbY and partially GriH from the biosyntheses of lincomycin and griselimycin, respectively, also reduce the more inert exocyclic double bond of the same 4-substituted Δ^1 -pyrroline-2-carboxylic acid substrate, making LmbY and GriH unusual, if not unique, among reductases.

The two successive $F_{420}H_2$ -dependent reduction steps proceeds through hydride transfer by a unique mechanism, which has not been described in the literature. In this work, we proposed and experimentally confirmed this mechanism. Furthermore, the work aimed to elucidate the nature of the different specificity of Apd6 homologs. The active site of the Apd6 proteins was proposed, then key amino acid residues were predicted and mutated. To obtain a direct evidence explaining the unusual distinction in the Apd6 protein reaction specificity, conditions for protein crystallization were developed.

Finally, a bioinformatic analysis of the Apd6 proteins revealed that bioactive metabolites bearing the APD motive in their structure are not as rare as previously presumed. It seems that Apd6 and their homologues play a role in the formation of new, yet undiscovered natural substances, and in the central metabolism of Bacteria and Archaea.

Apd6 reductases elucidated in this work establish the first $F_{420}H_2$ -dependent enzymes from the luciferase-like hydride transferase protein superfamily from *Streptomyces* and in the biosynthesis of bioactive molecules at all. The universal contribution of this work is the extension of the still very limited understanding of the role of F_{420} -dependent enzymes in Actinobacteria, which contrasts with a significantly more solid knowledge in Archaea.

Key words

specialized metabolites, Actinobacteria, cofactor F_{420} , redox reactions, reaction specificity, lincomycin, pyrrolobenzodiazepines, hormaomycin, griselimycin

Obsah

1	ÚVOD	14
1.1	Přírodní látky jako „nevyčerpatelný“ zdroj terapeutických substancí.....	14
2	PŘEHLED LITERATURY	16
2.1	5-deazaflavinové kofaktory	16
2.1.1	Struktura, fylogenetická distribuce a role 5-deazaflavinů v biologii.....	17
2.1.2	Elektrochemické a spektrální vlastnosti kofaktoru F ₄₂₀	18
2.1.3	Biosyntéza kofaktoru F ₄₂₀	19
2.1.4	F ₄₂₀ /F ₄₂₀ H ₂ -závislé enzymy	22
2.2	Aktinobakteriální komplexní metabolity s alkylnprolinovým derivátem.....	26
2.2.1	Linkosamidy: linkomycin a intervencin	27
2.2.2	Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny.....	30
2.2.3	Hormaomycin	33
2.2.4	Griselimycin.....	35
2.3	Komplexní metabolity s 4-methyl-L-prolinem vyskytující se mimo Actinobacteria.....	37
2.3.1	Metabolity s inkorporovaným MPL produkované sinicemi	37
2.3.2	Metabolity s inkorporovaným MPL produkované houbami	39
2.4	Genový základ pro biosyntézu aktinobakteriálních APD látek.....	40
2.4.1	BGS producenta linkomycinu	41
2.4.2	BGS producentů intervencinu, PBD, hormaomycinu a griselimycinu	42
2.5	Dvě cesty vedoucí k aktinobakteriálním APD prekurzorům.....	43
2.5.1	Alkylnprolinová dráha	44
2.5.2	Methylprolinová dráha	51
2.6	Methylprolinová dráha u sinic a hub – evoluční předchůdce aktinobakteriální MPL dráhy?.....	53
2.6.1	Methylprolinová dráha u sinic.....	54
2.6.2	Methylprolinová dráha u hub.....	55
3	CÍLE PRÁCE	56
4	MATERIÁL A METODY	57
4.1	Materiál.....	57
4.1.1	Chemikálie.....	57
4.1.2	Enzymy.....	59
4.1.3	Antibiotika	59
4.1.4	Standardy, referenční látky	59
4.1.5	Kity.....	60
4.1.6	Syntetické oligonukleotidy	60
4.1.7	Přístrojové vybavení, aparatury, chromatografické kolony	62
4.1.8	Softwarové vybavení, on-line databáze a nástroje	63
4.1.9	Bakteriální kmeny.....	64
4.1.10	Vektory	65
4.1.11	Média a půdy pro kultivaci bakterií.....	65
4.1.12	Pufry, roztoky.....	66
4.2	Metody.....	67
4.2.1	Kultivace bakterií	67

4.2.2	Práce s DNA.....	69
4.2.3	Práce s rekombinantními proteiny.....	78
4.2.4	Příprava substrátů pro enzymatické stanovení aktivity Apd6 proteinů.....	84
4.2.5	Příprava kofaktoru F ₄₂₀	86
4.2.6	Stanovení biochemických vlastností Apd6 proteinů.....	86
4.2.7	Příprava krystalů Apd6 proteinů.....	89
5	VÝSLEDKY.....	92
5.1	Příprava rekombinantních proteinů.....	92
5.1.1	Expresní konstrukty pro heterologní produkci proteinů Apd6 a FGD.....	92
5.1.2	Rekombinantní Apd6 proteiny.....	93
5.1.3	Rekombinantní protein FGD.....	95
5.2	Charakterizace purifikovaných Apd6 proteinů a FGD.....	96
5.2.1	MS analýza LmbY, Por15 a FGD za nativních podmínek.....	97
5.2.2	MS analýza LmbY, Por15 a FGD za ne-nativních podmínek.....	97
5.2.3	„Bottom-up“ validace MS stanovení LmbY, Por15 a FGD.....	98
5.2.4	Determinace kofaktor-vazebných schopností proteinu LmbY.....	100
5.3	Purifikace prekursoru 5a z kultivačního média <i>S. lincolnsis</i> Δ <i>lmbY</i>	100
5.4	<i>In vitro</i> testování enzymové aktivity Apd6 v přítomnosti F ₄₂₀	101
5.4.1	Enzymová aktivita LmbY.....	103
5.4.2	Enzymová aktivita SibT, Por15, Lim12.....	103
5.4.3	Enzymová aktivita HrmD.....	105
5.4.4	Enzymová aktivita GriH.....	105
5.4.5	Kontrolní <i>in vitro</i> reakce – vyloučení F ₄₂₀ a FGD.....	106
5.5	Redukční mechanismus Apd6 proteinů.....	109
5.5.1	Postulace hypotézy rozdílného mechanismu hydridového transferu.....	109
5.5.2	Přímý průkaz mechanismu hydridového transferu katalyzovaného LmbY.....	111
5.6	Analýza molekulární podstaty rozdílné reakční specifity Apd6.....	115
5.6.1	Sekvenční analýza Apd6 proteinů.....	115
5.6.2	Formulace hypotézy o místě vazby substrátu a kofaktoru ve struktuře Apd6.....	116
5.6.3	Cílená mutageneze předpokládaného aktivního místa.....	119
5.7	Příprava a analýza krystalů LmbY a Por15 pro strukturní studii.....	126
5.7.1	Příprava rekombinantních proteinů LmbY, Por15 pro krystalizaci.....	126
5.7.2	Stanovení optimálních krystalizačních podmínek proteinu LmbY.....	128
5.7.3	Stanovení optimálních krystalizačních podmínek proteinu Por15.....	130
5.8	Bioinformatická analýza Apd6 proteinů.....	133
5.8.1	Sekvenčně-podobnostní síť LmbY-homologních proteinů.....	134
5.8.2	Fylogenetická analýza.....	137
6	DISKUZE.....	140
6.1	Zhodnocení nadprodukce, purifikace a charakterizace Apd6 proteinů.....	143
6.1.1	Obtížnost nadprodukce Apd6 zřejmě odráží nepřítomnost F ₄₂₀ v <i>E. coli</i>	143
6.1.2	Vyloučení vazby kofaktoru v purifikovaných proteinech, či jiných proteinových modifikací, před <i>in vitro</i> testy.....	145
6.2	Katalytický mechanismus hydridových reduktas v přírodě vs. Apd6 proteiny.....	146
6.2.1	Asymetrická redukce iminů.....	146

6.2.2	Reduktasy izolovaných/konjugovaných C=C vazeb	148
6.2.3	Strukturní základ a katalytický mechanismus vybraných NADPH- a F ₄₂₀ H ₂ -závislých reduktas	150
6.2.4	Mechanismus Apd6 reduktas v porovnání se známými redukčními mechanismy	154
6.3	Aktivní místo LLHT proteinů vs. predikované aktivní místo Apd6 reduktas	155
6.3.1	Výběr LLHT proteinu pro vytvoření schémat aktivních míst Apd6 proteinů	155
6.3.2	Konzervované interakce v aktivních místech proteinů z LLHT rodiny	156
6.3.3	Predikce Apd6 aktivního místa a jeho cílená mutageneze	157
6.4	Odlíšná reakční specifita homologních proteinů	158
6.4.1	Biologický význam odlišné reakční specifity Apd6 proteinů	158
6.4.2	Jiné homologní enzymy s rozdílnou reakční specifitou	159
6.5	Evoluce funkce Apd6 proteinů z centrálních metabolických LLHT	160
6.6	Obecné přínosy práce	161
6.6.1	Apd6 v kontextu F ₄₂₀ /F ₄₂₀ H ₂ -závislých oxidoreduktas a LLHT proteinů	161
6.6.2	F ₄₂₀ H ₂ -závislé reduktasy v biotechnologickém průmyslu	161
7	SOUHRN	163
8	SEZNAM LITERATURY	164
9	PŘÍLOHY	176

Abecední seznam použitých zkratk a triviálních názvů chemikálií:

(3-Ncp)Ala	(1'R,2'R)-3-(2'-NitroCykloPropyl)-L-ALAnin
(4-Pe)Pro	(2S,4R)-4-(Z)-PropEnyl-L-PROlin
1-C	methylový (řetězec)
2-C	ethylový (řetězec)
2-PL	<u>2</u> -fosfoLaktát (P)
3-C	propylový (řetězec)
4VCR	divinyl chlorofylid a 8-vinyl reduktasa
5PC	NADH-závislá Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát reduktasa
A	Absorbance
Adf	<u>E</u> ₄₂₀ -závislá Alkohol Dehydrogenasa
APD	4-Alkyl-L-Prolinový Derivát
Apd1-6	jednotné označení homologních proteinů účastnících se APD biosyntetické dráhy
APS	<u>P</u> eroxodiSírán Amonný
ATP	<u>A</u> denosin <u>T</u> rifosfát (P)
BGS	<u>B</u> iosyntetický <u>G</u> enový <u>S</u> hluk
Bisakrylamid	N,N'-methylenbisakrylamid
Bis-Tris	2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2', 2''-nitrilotriethanol
BLASTP	<u>P</u> rotein <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BVR	<u>B</u> iliverdin <u>R</u> eduktasa
COSY	korelační spektroskopie (z angl. <u>C</u> orrelated <u>S</u> pectroscopy)
CP	přenašečový protein (z angl. <u>C</u> arrier <u>P</u> rotein)
CV	objem kolony (z angl. <u>C</u> olumn <u>V</u> olume)
dH ₂ O	<u>D</u> estilovaná <u>H</u> ₂ O
DHCR7	<u>7</u> - <u>D</u> eHydroCholesterol <u>R</u> eduktasa
DHFR	<u>D</u> iHydroFolát <u>R</u> eduktasa
DMSO	<u>D</u> iMethylSulfOxid
dNTP	<u>D</u> eoxyNukleosid <u>T</u> rifosfátová (P) směs
DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
DRR	<u>D</u> ihydroRetikulin <u>R</u> eduktasa
DTT	<u>D</u> iThioTreitol
EDTA	<u>E</u> thylDiaminoTetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát
EGR4	sterol C-24(28)reduktasa
EPL	4-Ethyl-L-ProLin
EPPA	<u>E</u> noPyruvyl-difosfo-5'- <u>A</u> denosin (P)
EPPG	<u>E</u> noPyruvyl-difosfo-5'- <u>G</u> uanosin (P)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. <u>E</u> lectro <u>S</u> pray <u>I</u> onization)
FAD	<u>F</u> lavin <u>A</u> denin <u>D</u> inukleotid
FCC	„Face-Centered-Cubic“ krystalizace (metoda používaná v chemické syntéze)
FDOR	<u>F</u> lavin/ <u>D</u> eazaflavinové <u>O</u> xido <u>R</u> eduktasy
FGD	<u>E</u> ₄₂₀ -závislá <u>G</u> lukosa-6-fosfát <u>D</u> ehydrogenasa
<i>fgd</i>	gen kódující <u>E</u> ₄₂₀ -závislou glukosa-6-fosfát dehydrogenasu
FMN	<u>F</u> lavin <u>M</u> ono <u>N</u> ukleotid
g	tíhové zrychlení
<i>gri</i>	gen pro biosyntézu griselimycinu
H ₄ MPT	tetraHydroMethanoPTerin
His-kotva	<u>H</u> istidinová <u>k</u> otva
HMBC	heteronukleární několikanásobná vazebná korelační spektroskopie (z angl. <u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation Spectroscopy)
<i>hrm</i>	gen pro biosyntézu hormaomycinu
HSQC	heteronukleární kvantová koherenční spektroskopie (z angl. <u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence Spectroscopy)
imidazol	1,3-diazoacyklopenta-2,4-dien
IPTG	IsoPropyl- β -D-1-ThioGalaktopyranosid
IRED	<u>R</u> EDuktasa asymetrických <u>I</u> minů
K _D	disociační konstanta
<i>lim</i>	gen pro biosyntézu limazepinu
LLHT	hydridové transferasy odvozené od luciferasy (z angl. <u>L</u> uciferase- <u>L</u> ike <u>H</u> ydrid <u>T</u> ransferase)
<i>lmb</i>	gen pro biosyntézu linkomycinu

<i>m/z</i>	hmotnost/náboj
Me-5PC	(2S,4S)-3-methyl- Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylová kyselina
Mer	<u>M</u> ethylen <u>t</u> etrahydro <u>m</u> ethano <u>p</u> terin <u>R</u> eduktasa
MFP	(3S)- β - <u>M</u> ethyl <u>E</u> nyl <u>P</u> yruvát
MPL	4- <u>M</u> ethyl-L- <u>P</u> ro <u>L</u> in
MS	hmotnostní spektrometrie/hmotnostní spektrum
Mtd	<u>M</u> ethenyl <u>T</u> etrahydro <u>p</u> terin <u>D</u> ehydrogenasa
NAD	<u>N</u> ikotinamid <u>A</u> denin <u>D</u> inukleotid
NADP	<u>N</u> ikotinamid <u>A</u> denin <u>D</u> inukleotid <u>f</u> osfát (<u>P</u>)
NMP	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl <u>P</u> yrrolidin-2-on
NMR	<u>N</u> ukleární <u>M</u> agnetická <u>R</u> ezonance
NRPS	<u>N</u> e <u>R</u> ibozomální <u>P</u> eptidová <u>S</u> ynthetasa
OD	<u>O</u> ptická <u>D</u> enzita
OD ₆₀₀	<u>O</u> ptická <u>D</u> enzita při 600 nm
PBD	<u>P</u> yrrolo-1,4- <u>B</u> enzo <u>D</u> iazepiny
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
Pd(dba) ₂	Bis(dibenzylideneaceton)palladium(0)
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen]dichloropalladium(II)
PEG	<u>P</u> oly <u>E</u> thylen <u>G</u> lykol
PEP	(<u>P</u>) fosfo <u>E</u> no <u>L</u> Pyruvát
PKS	<u>P</u> olyketid <u>S</u> ynthasa
<i>por</i>	gen pro biosyntézu porothramycinu
PPL	4- <u>P</u> ropyl-L- <u>P</u> ro <u>L</u> in
PTC	<u>P</u> eptidyl <u>T</u> ransferasové <u>C</u> entrum
QDH	chinát <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenasa
RP	reverzní fáze (<u>R</u> everse <u>P</u> hase)
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>M</u> ethionin
SDH	<u>Š</u> ikimát <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenasa
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecylsulfát <u>S</u> odný
SDS-PAGE	<u>SDS</u> - <u>P</u> oly <u>A</u> krylamidová <u>G</u> elová <u>E</u> lektroforéza
<i>sib</i>	gen pro biosyntézu sibiromycinu
SLiCE	<u>S</u> eamless <u>L</u> igation <u>C</u> loning <u>E</u> xtract (metoda ligace DNA fragmentů)
SM	<u>S</u> pecializovaný <u>M</u> etabolit
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. <u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction)
SSN	sekvenčně-podobnostní síť (z angl. <u>S</u> equence <u>S</u> imilarity <u>N</u> etwork)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED	N, N, N',N'-tetramethylendiamin
THF	<u>T</u> etra <u>H</u> ydro <u>F</u> olát
TOCSY	totální korelační spektroskopie (z angl. <u>T</u> otal <u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)
<i>t_R</i>	<u>R</u> etenční čas (<u>t</u>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSP	3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteropropionová kyselina
UHPLC	ultra vysoce-účinná kapalinová chromatografie (z angl. <u>U</u> ltra <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
α -MTL	α - <u>M</u> ethyl <u>T</u> hio <u>L</u> inkosamid
γ -GT	γ - <u>G</u> lutamyl <u>T</u> ranspeptidasa

1 ÚVOD

1.1 Přírodní látky jako „nevyčerpatelný“ zdroj terapeutických substancí

Mikroorganismy v přírodě produkují široké spektrum specializovaných metabolitů (SM, dříve nazývaných „sekundární metabolity“) s rozmanitými, často komplexními chemickými strukturami, které dávají základ jejich biologické aktivitě. Za syntézu, složení a regulaci produkce SM v producentech zodpovídají geny, které jsou zpravidla fyzicky uskupené do biosyntetického genového shluku (BGS).^{1,2} Přírodní produkty s biologickou aktivitou představují kritický zdroj terapeutik pro humánní medicínu. Bylo publikováno, že až 70 % anti-infekčních léčiv je odvozeno právě od produktů nalezených v přírodě.³ Bez jejich objevu by mnoho dnes běžně používaných léčiv, zejména těch k léčbě bakteriálních infekcí, nebylo dostupných.

Narůstající problém antimikrobiální rezistence zdůrazňuje důležitost objevování přírodních látek, především hledání nových alternativ současně užívaných antibiotik. Neustále zdokonalující se technologie přispívají k posunu paradigmatu od tradičních kultivačních a „screeningových“ metod k „omik“ technologiím (zejména ke genomice a metabolomice) a bioinformatickým nástrojům, které umožňují identifikovat mikrobiální taxony s dosud nepopsanými BGS kódujícími potenciálně zajímavé metabolity, či transkripčně tiché BGS (shrnutí v Bachmann et al. 2015 a Chen et al. 2019).^{4,5}

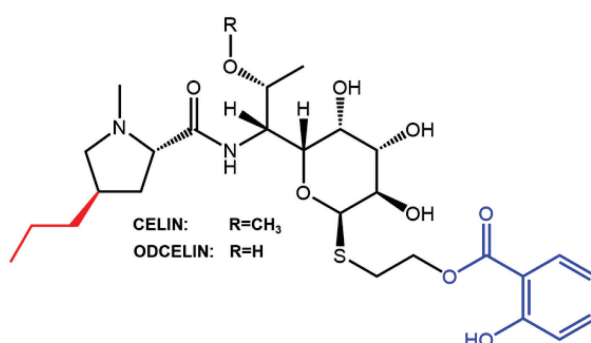
Dalším přístupem je programovaná manipulace genů, které kódují enzymy zapojené do biosyntetických drah již známých SM. Manipulace má vést ke strukturní změně, která moduluje biologickou aktivitu SM, a tedy má problém existující rezistence tímto způsobem elegantně obejít. Tento přístup, nazývaný kombinatoriální syntéza, se vyvíjí již od 80. let a od té doby se podařilo připravit desítky nových látek. Nejznámější jsou manipulace v genech kódujících biosyntetické systémy pro produkci komplexních SM polyketidů – polyketid synthasy (PKS) a neribozomálních peptidů – neribozomální peptidové synthetasy (NRPS), v obou případech jde o velké modulární enzymy.⁶ Výměnou jednotlivých modulů, či dokonce podjednotek, byla například připravena řada účinných látek odvozených od erytromycinu či daptomycinu (shrnutí v Baltz 2019).⁷ Kromě genů kódujících enzymy zodpovídající za vystavění základní kostry komplexního metabolitu (jednotlivých stavebních bloků a jejich spojení) jsou důležité i geny kódující enzymy katalyzující následné postkondenzační připojení různých funkčních skupin, jak bylo ukázáno například na zmíněném daptomycinu,⁸ ale také třeba u malé skupiny antibiotik linkosamidů.⁹

Základní kostru linkosamidů tvoří aminokyselinová a aminocukerná podjednotka, které jsou kondenzovány v neobvyklé reakci představující kombinaci NRPS- a mykothiol/ergothionein závislých elementů.^{10,11} Recentní přípravou hybridního linkosamidu

bylo demonstrováno, že postkondenzační úpravy základní kostry jsou jednou z příčin rozdílné biologické aktivity dvou přirozeně produkovaných zástupců této skupiny – linkomycinu, běžně užívaného v klinické praxi, a celesticetinu, jehož nízká biologická aktivita je nevhodná pro klinické využití.⁹ Konkrétně, *in vitro* se podařilo připravit nový účinný linkosamid, nazvaný CELIN, a zároveň jeho demethylovaný analog ODCELIN (Obr. 1.1), který je kombinací aminokyselinové jednotky linkomycinu a celesticetinového aminocukru s navázaným salicylátem.⁹ Nejen CELIN a ODCELIN, ale i jejich další odvozené deriváty, které se v současné době testují, mají obrovský potenciál budoucího využití jako léčiva (neveřejná data z důvodu ochrany duševního vlastnictví). Linkosamidy tak představují ideálního kandidáta pro přípravu hybridního producenta.

I když se může zdát, že kombinatoriální syntéza poskytuje „nekonečné“ množství kombinací, ať už modulů tvořících velké modulární enzymy, či jednotlivých genů z BGS, a tedy „nekonečné“ množství látek, které čekají na objevení, v praxi se setkáváme s problémem, jak jednotlivé stavební bloky spojit. Najít takovou kombinaci substrátů a enzymu katalyzujícího jejich propojení není rychlou a rutinní záležitostí, neboť tyto enzymy obvykle mají specificky definované substrát-vazebné místo, což určuje jejich substrátovou specifitu (shrnutí ve Fischbach et al. 2008 a Medema a Fischbach 2015).^{2,12} Důležitou prerekvizitou kombinatoriální syntézy je proto detailní charakterizace jednotlivých proteinů zapojených do biosyntetických drah SM, často včetně krystalové struktury. Linkosamidy jsou ukázkovým příkladem – bez znalosti rozdílné reakční specifity homologních enzymů katalyzujících postkondenzační modifikace (LmbF/CcbF), ale i znalosti funkce enzymů katalyzujících kroky před ní, by nebyl CELIN připraven.¹³

Cílem této práce je přinést další díl do linkosamidové „skládačky“, konkrétně charakterizovat funkci $F_{420}H_2$ -závislé reduktasy v biosyntéze aminokyselinové jednotky linkomycinu a dále funkci jejích homologů vystupujících v biosyntéze strukturně odlišných látek, jako např. pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (PBD). Podobně jako v případě enzymů LmbF/CcbF, předpokládá se, že reduktasy mají v linkomycinu vs. PBD odlišnou reakční specifitu. Této rozdílnosti společně se znalostí strukturně-aktivitních vztahů by mohlo být využito při konstrukci hybridních producentů těchto látek.

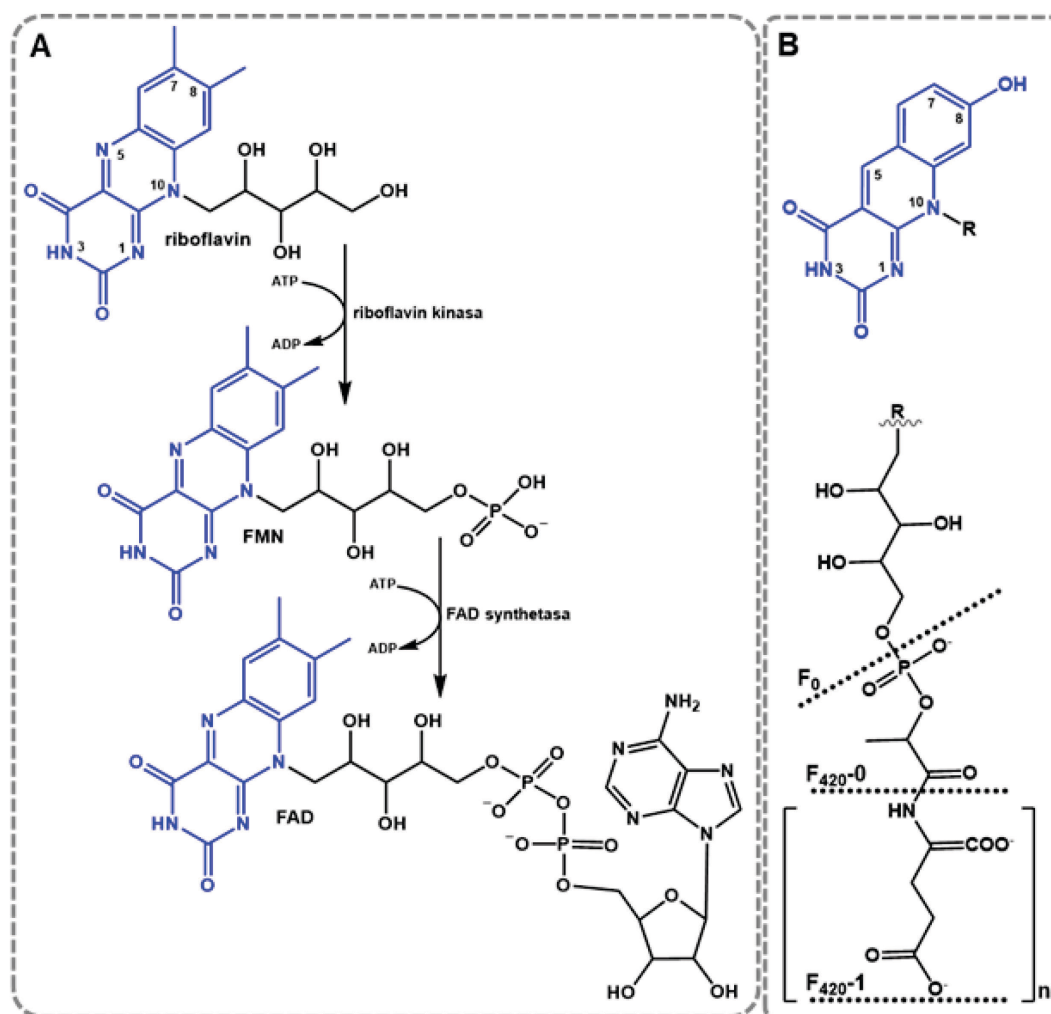


Obr 1.1. Chemická struktura hybridních linkosamidů – CELINu a ODCELINu. Černě – kostra linkosamidů, červeně – propylový řetězec (strukturní motiv linkomycinu), modře – salicylát (strukturní motiv celesticetinu; převzato a upraveno⁹).

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 5-deazaflavinové kofaktory

Flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD) představují v biologických systémech univerzálně rozšířené redoxně aktivní látky (souhrnně nazývané flaviny), které vznikají z riboflavinu jeho fosforylací (FMN) a následnou adenylací (FAD, Obr. 2.1A).^{14–16} Flaviny mají společně s nikotinamidy (nikotinamidadenindinukleotid, NAD; nikotinamidadenindinukleotidfosfát, NADP) primární roli v redoxních reakcích jak základního, tak i specializovaného metabolismu, kde slouží jako akceptory (podléhají oxidaci), či v reverzní reakci jako donory (podléhají redukci) elektronů.^{17,18} V 80. letech byly z archeálního kmene *Methanobacterium* poprvé izolovány flavinům strukturně velmi podobné, též redoxně aktivní látky, označované jako 5-deazaflaviny (Obr. 2.1B).¹⁹



Obr. 2.1. **Chemické struktury redoxně aktivních látek.** (A) Riboflavin a z něj odvozené flavinové kofaktory (FMN, FAD) a (B) 5-deazaflavin F₀ a z něj odvozený F₄₂₀. Modře zvýrazněn je redoxně aktivní deaza-/isoalloxazinový (5-deazaflaviny/flaviny) systém (převzato a upraveno²⁰).

2.1.1 Struktura, fylogenetická distribuce a role 5-deazaflavinů v biologii

Základní strukturální jednotkou 5-deazaflavinů je, stejně jako u flavinových látek, tricyklický systém, zde nazývaný deazaisalloxazin (modře zvýrazněn v Obr. 2.1B), jehož konjugované dvojně vazby jsou důvodem charakteristického žlutého zabarvení. Čtyři klíčové modifikace v tricyklickém systému odlišují 5-deazaflaviny od flavinů: substituce dusíku v pozici 5 za atom uhlíku, demethylace v pozicích C-7 a C-8 a dále hydroxylace na C-8. Tyto modifikace neodlišují 5-deazaflaviny od flavinů pouze strukturně, ale jsou také příčinou jejich rozdílných elektrochemických a fotochemických vlastností (kap. 2.1.2).²¹

Dosud byly nejvíce studovány dva přirozeně produkované 5-deazaflaviny (Obr. 2.1B). 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, označovaný jako kofaktor F₀, je tvořen deazaisalloxazinovým jádrem s připojenou ribitolovou jednotkou v pozici N-10.^{22,23} F₀ lze nalézt napříč všemi doménami života (Bacteria,^{24–26} Archaea,^{27,28} jednobuněčná Eukaryota^{29,30}), kde slouží výlučně jako světlo-sběrná anténa DNA fotolyas, enzymů opravujících pyrimidinové dimery vznikající po vystavení molekuly DNA UV záření (200 – 300 nm).³¹ Z tohoto důvodu je F₀ spíše považován za chromofor, než za kofaktor. 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-5'-fosforyllactyl(glutamyl)_n, označovaný jako kofaktor F₄₂₀, je modulární 5-deazaflavin obsahující jako základ molekulu F₀ s dalšími přidavnými funkčními skupinami.^{22,23} K boční ribitolové jednotce F₀ je připojena fosfátová a laktylová skupina, které dohromady tvoří F₄₂₀-0. Na konci bočního řetězce je dále navázán polyglutamátový řetězec, jehož délka se liší v závislosti na konkrétním druhu, který kofaktor produkuje (F₄₂₀-1 – F₄₂₀-7).^{32,33} Fyziologický význam a biochemický základ rozdílů v délce polyglutamátového řetězce nebyly dosud zcela objasněny.³⁴ Na rozdíl od F₀, F₄₂₀ představuje vzácný 5-deazaflavin s velmi limitovanou taxonomickou distribucí.^{19,35,36} F₄₂₀ byl původně objeven ve striktně anaerobních Archaea, kde slouží jako hlavní katabolický kofaktor ve dvou centrálních methanogenních drahách.³⁷ Později byl také identifikován v několika nemethanogenních rodech, jako jsou sulfát redukující *Archaeoglobales*,³⁸ nebo fotosyntetické *Halobacteriales*.³⁹ U Bacteria byl výskyt F₄₂₀ potvrzen u některých aktinobakteriálních rodů jako jsou *Mycobacteria*,^{40,41} *Streptomyces*,^{40,42} *Nocardia*,^{40,41} nebo *Nocardioides*.⁴³ Tedy převážně u heterotrofních půdních aerobních bakterií. Relativně málo je známo o roli F₄₂₀ v těchto rodech bakterií, kde bývá studován spíše v souvislosti se specializovaným, než základním metabolismem, jeho syntéza tedy pro Bacteria není esenciální.⁴⁴ Nicméně, existuje několik důkazů, že F₄₂₀ například přispívá ke schopnosti patogenních mykobakterií (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium lepreae* a *Mycobacterium bovis*) odolávat nepříznivým vlivům jako jsou oxidativní stres⁴⁵ nebo působení antibiotických a xenobiotických látek.^{46,47} Mimo Actinobacteria byl recentně, na základě detekce genů kódujících biosyntézu F₄₂₀, tento kofaktor identifikován také u Proteobacteria, Chloroflexi a Firmicutes, též významných zástupců půdního ekosystému.^{36,48}

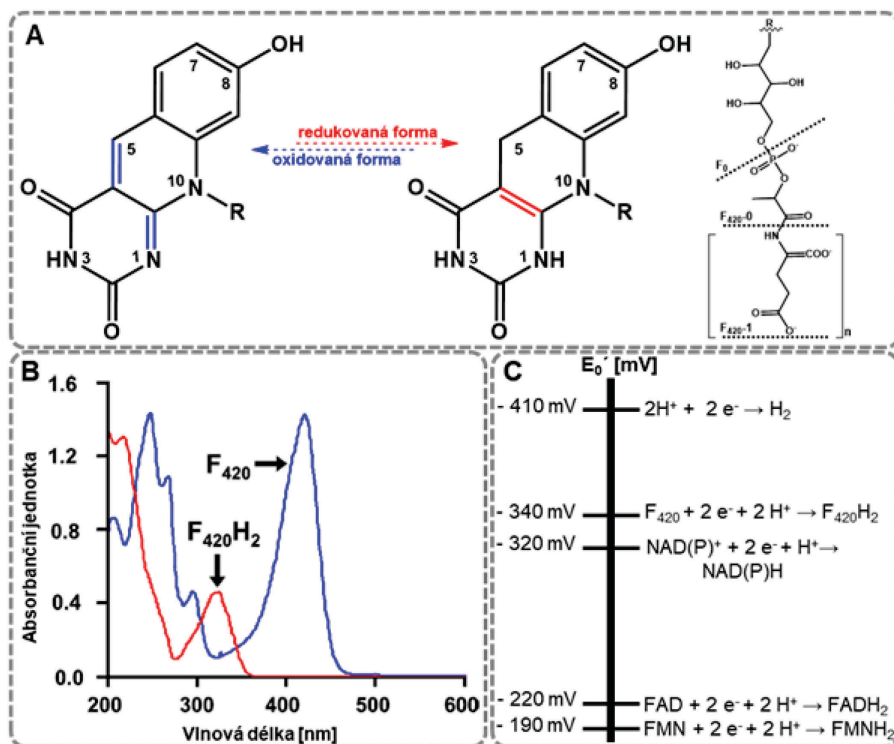
Kromě F_0 a F_{420} byly v některých rodech methanogenních bakterií (*Methanothermobacter*,⁴⁹ *Metanobacterium*,⁵⁰ *Methanosacrina*,⁵¹ *Methanobrevibacter*⁵²) identifikovány dva purinované deriváty F_{420} , souhrnně nazývané jako kofaktory F_{390} , konkrétně F_{390-A} a F_{390-G} . Strukturně se jedná o F_{420} , ke kterému je přes hydroxylovou skupinu v pozici C-8 deazaisoalloxazinového kruhu připojený adenosin-5'-fosfát (F_{390-A}), resp. guanosin-5'-fosfát (F_{390-G}).⁵³ Kofaktory F_{390} jsou syntetizovány z F_{420} v případě, že je methanogen vystaven kyslíku, přičemž k produkci dochází v reakci na opětovné navození anaerobiózy.⁵⁴ Fyziologická role kofaktorů F_{390} však doposud nebyla objasněna.

2.1.2 Elektrochemické a spektrální vlastnosti kofaktoru F_{420}

Přes strukturní podobnost k flavinům, kofaktor F_{420} je elektrochemicky podobný nikotinamidům a slouží výhradně jako dvou-elektronový nosič. Substituce dusíku v pozici 5 za atom uhlíku je důvod nízké stability F_{420} ve formě semichinonu, proto se kofaktor F_{420} účastní pouze reakcí, kde se uplatňuje hydridový mechanismus. Redoxně aktivní místo se nachází v pozicích C-5 a N-1 deazaisoalloxazinového chromoforu (Obr. 2.2A).⁵⁵

Kofaktor F_{420} získal název dle svých spektrálních vlastností. Po absorpci světla vhodné vlnové délky podléhá delokalizovaný náboj na deazaisoalloxazinovém kruhu $\pi \rightarrow \pi^*$ tranzici s následnou expozicí UV záření do viditelné oblasti světla. Absorpčního maxima je u oxidovaného F_{420} dosaženo při 420 nm (při pH vyšším než 6).^{22,56} Redukovaný $F_{420}H_2$, který ve srovnání s oxidovanou formou obsahuje méně konjugovaných dvojných vazeb, má posunuté absorpční maximum k 325 nm (Obr. 2.2B).¹⁹ Ve srovnání s flaviny jsou absorpční i emisní spektra 5-deazaflavinů posunuta směrem do modré oblasti viditelného světla. Specifického absorpčního profilu F_{420} je využíváno při studování kinetických parametrů $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých enzymů, přičemž je monitorována právě absorbance kofaktoru při 420 nm.^{57,58}

Substituce v pozici 5 je také příčinou nižšího redoxního potenciálu kofaktoru F_{420} (- 340 mV),⁵⁶ ve srovnání s flaviny i nikotinamidy (Obr. 2.2C). Nízký redoxní potenciál F_{420} , který může být dále ještě modulován v závislosti na fyziologických podmínkách,⁵⁹ umožňuje energeticky efektivní redukci například klíčových kofaktorů methanogeneze, jako jsou NADP a tetrahydromethanopterinové deriváty.⁶⁰ 5-Deazaflavinové kofaktory obecně zvyšují metabolickou flexibilitu mikroorganismů, neboť umožňují redukci širokého spektra organických látek jinak netečných k aktivaci.



Obr. 2.2. **Elektrochemické a spektrální vlastnosti kofaktoru F₄₂₀.** (A) Oxidovaná a redukovaná forma 5-deazaflavinu: barevně zvýrazněné je redoxně aktivní místo. (B) UV-absorpční spektra oxidovaného F₄₂₀ (modře) a redukovaného F₄₂₀H₂ (červeně; převzato a upraveno⁶¹). (C) Grafické srovnání redoxních potenciálů F₄₂₀ a dalších redoxně aktivních látek (převzato a upraveno⁶²).

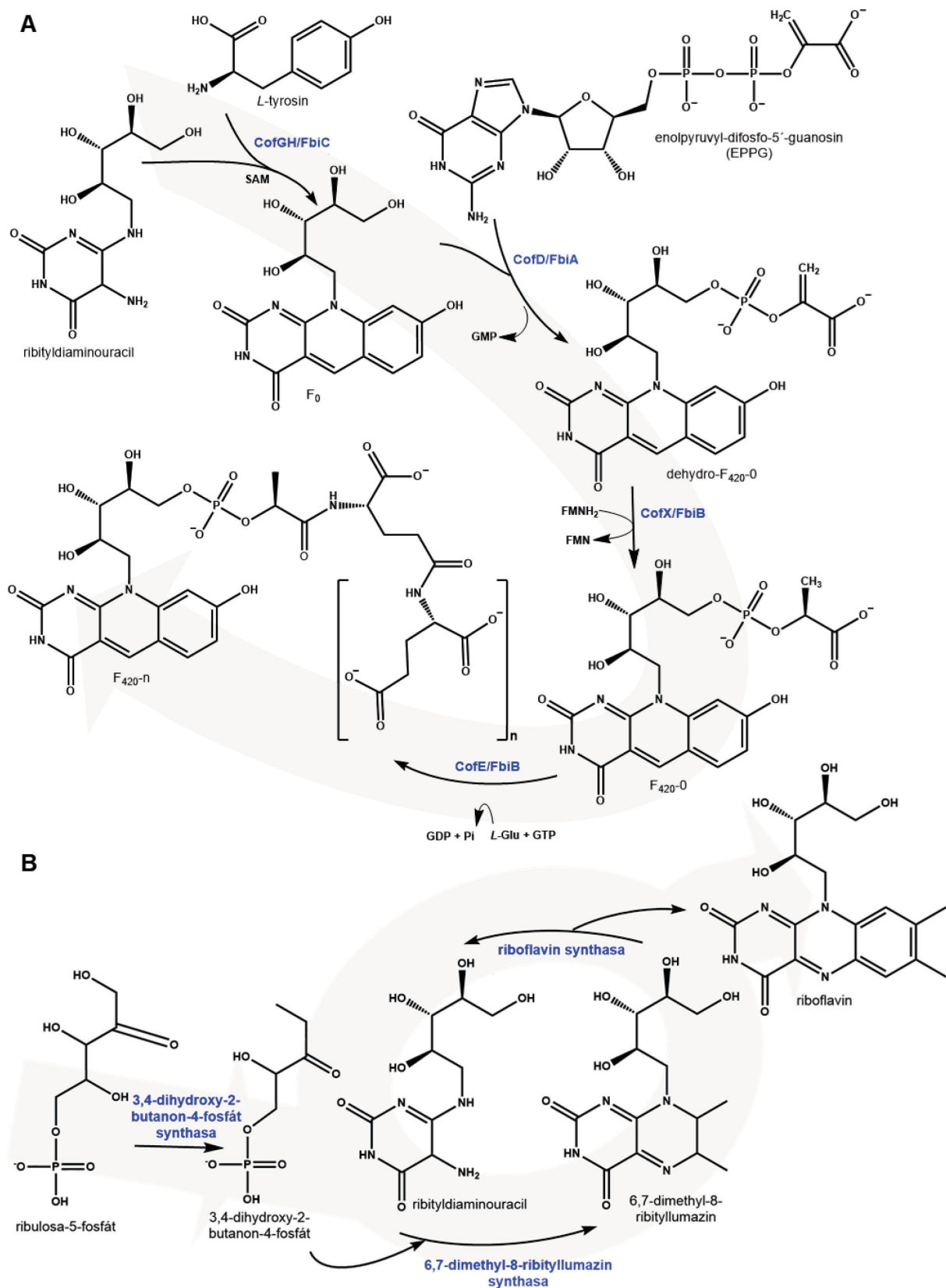
2.1.3 Biosyntéza kofaktoru F₄₂₀

Kofaktor F₄₂₀ představuje modulární látku složenou z několika prekurzorů, jeho biosyntéza tak zahrnuje několik dílčích biosyntetických drah individuálních stavebních jednotek. Biosyntetickou dráhu F₄₂₀ lze zjednodušeně popsat ve čtyřech krocích (Obr. 2.3A), přičemž v porovnání s flavinovou dráhou (Obr. 2.3B) sdílí obě dráhy pouze jeden meziprodukt.

V prvním kroku je riboflavinový prekurzor pyrimidin ribityldiaminouracil (5-amino-6-ribityl-amino-2,4[1H,3H]-pyrimidinedion) kondenzován s L-tyrosinem za vzniku molekuly F₀ (Obr. 2.3A).⁶³ Tato reakce je katalyzována S-adenosylmethionin (SAM)-závislou F₀ synthasou, enzymem, který je kódován buď jako dva polypeptidové řetězce (Archaea; CofGH),⁶³ případně jako jeden fúzní protein tvořený dvěma doménami (Bacteria; FbiC).⁴⁴ Následuje konverze F₀ na F₄₂₀. F₀ je kondenzován s enolpyruvyl-difosfo-5'-adenosinem (EPPA; Archaea) či enolpyruvyl-difosfo-5'-guanosinem (EPPG; Actinobacteria) za vzniku dehydro-F₄₂₀-0.⁶⁴ Reakci katalyzuje EPPG/EPPA:F₀ fosfoenolpyruvát transferasa (CofD v Archaea; FbiA v Actinobacteria).⁶⁴⁻⁶⁶ V posledních dvou krocích je nejprve v reakci katalyzované FMNH₂-závislým neribozomálním proteinem CofX (Archaea)/FbiB (Actinobacteria) generován F₄₂₀-0 (F₄₂₀ neobsahující v bočním řetězci žádný glutamátový zbytek), ke kterému je následně v případě Actinobacteria pomocí stejného enzymu v GTP-závislé reakci připojen γ-polyglutamátový řetězec, v případě Archaea připojení katalyzuje

CofE.^{64,66,67} Zatímco funkce CofX a CofE je jen hypotetická, navrhovaná funkce FbiB byla *in vitro* prokázána. FbiB je dvou-doménový protein,⁶⁸ jehož C-koncová doména má adoptovaný FMN-vázací nitroreduktašový motiv a katalyzuje redukční reakci a tedy vznik F₄₂₀-0. N-koncová doména, která je homologní k proteinům z F₄₂₀: γ -L-glutamyl ligasové rodiny, katalyzuje připojení γ -polyglutamátového řetězce.⁶⁴

Pro porovnání, biosyntéza riboflavinu, ze kterého následně vznikají flaviny FMN a FAD, je zcela odlišná v meziproduktech i enzymech katalyzujících jednotlivé kroky (Obr. 2.3B). Dráha také vychází z ribityldiaminouracilu (jediný společný prekurzor), který je kondenzován s 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-fosfátem za vzniku lumazinového derivátu (6,7-dimethyl-8-ribityllumazin), reakci katalyzuje 6,7-dimethyl-8-ribityllumazin synthasa. Dvě molekuly lumazinového derivátu jsou následně kondenzovány, čímž dochází k regeneraci výchozího ribityldiaminouracilu a jako vedlejší produkt vzniká riboflavin, reakci katalyzuje riboflavin synthasa (shrnutí v Fischer a Bacher 2006).⁶⁹



Obr. 2.3. Zjednodušené schéma biosyntézy redoxně aktivních látek. (A) Biosyntéza kofaktoru F_{420} v Actinobacteria – modře zvýrazněné jsou enzymy katalyzující jednotlivé kroky, vždy je uveden i homogní enzym z Archaea (kódovaný *cof* geny; převzato a upraveno⁶⁴) a (B) riboflavinu, prekursoru flavinů FMN a FAD. S 5-deazaflavinovou dráhou sdílí riboflavinová dráha pouze jeden meziprodukt – ribityldiaminouracil (převzato a upraveno⁶⁹).

2.1.4 F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislé enzymy

Současný stav poznání F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislých enzymů je ve srovnání s flavin-závislými enzymy značně omezený. Přehled nejvýznamnějších, funkčně, případně i strukturně anotovaných F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislých enzymů, je souhrnně uveden v Tab. 2.1.

Tab. 2.1. Přehled nejvýznamnějších anotovaných F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislých enzymů.

DOMÉNA	ENZYM	RODINA (STRUKTURNÍ MOTIV)	FYZIOLOGICKÁ ROLE
Archaea	Frh : F ₄₂₀ -redukující hydrogenasa ⁷⁰ (enzymový komplex; FrhB : redukující F ₄₂₀ -závislá doména)	FrhB: F ₄₂₀ -vázájící proteinová rodina (FrhB-odvozený motiv) ^{71,72}	methanogeneze
	Fpr : F ₄₂₀ H ₂ -závislá oxidasa ⁷³	FDP ^a (Flavodoxin- a β-laktamasa-odvozený motiv) ⁷⁴	detoxifikační procesy
	Mer : F ₄₂₀ -závislá methylenetra- hydromethanopterin reduktasa ⁷⁵	LLHT ^b (TIM barel) ⁷⁵	methanogeneze
	Mtd : F ₄₂₀ -redukující methenyltetra- hydromethanopterin dehydrogenasa ⁷⁶	LLHT (Mtd-odvozený motiv) ⁷⁶	methanogeneze
	Adf : F ₄₂₀ -redukující sekundární alkohol dehydrogenasa ⁷⁷	LLHT (TIM barel) ⁷⁷	redukce acetonu
Bacteria	fHMAD : F ₄₂₀ -redukující dehydrogenasa kyseliny hydroxymykolové ⁷⁸	LLHT (TIM barel) ⁷⁸	biosyntéza buněčné stěny
	FGD : F ₄₂₀ -redukující glukosa-6- fosfát dehydrogenasa ⁵⁷	LLHT (TIM barel) ^{57,79}	zdroj F ₄₂₀ H ₂
	Fht : F ₄₂₀ H ₂ -závislá pikrát reduktasa ⁴³	LLHT (struktura nebyla charakterizována)	biodegradace nitrofenolových sloučenin
	Ddn : deazaflavin-závislá nitroreduktasa ⁸⁰	FDOR ^c (dělený β-barel) ⁸⁰	nitroimidazolová aktivace, redukce exogenních látek
	OxyR : F ₄₂₀ H ₂ -závislá oxidoreduktasa ⁴²	FDOR (struktura nebyla charakterizována)	biosyntéza tetracyklinu
	TpnL : F ₄₂₀ H ₂ -závislá oxidoreduktasa ⁸¹	FDOR (struktura nebyla charakterizována)	biosyntéza thiostreptonu Aa

^a z angl. flavodiiron

^b flavin/deazaflavinové oxidoreduktasy

^c z angl. luciferase-like hydride transferase

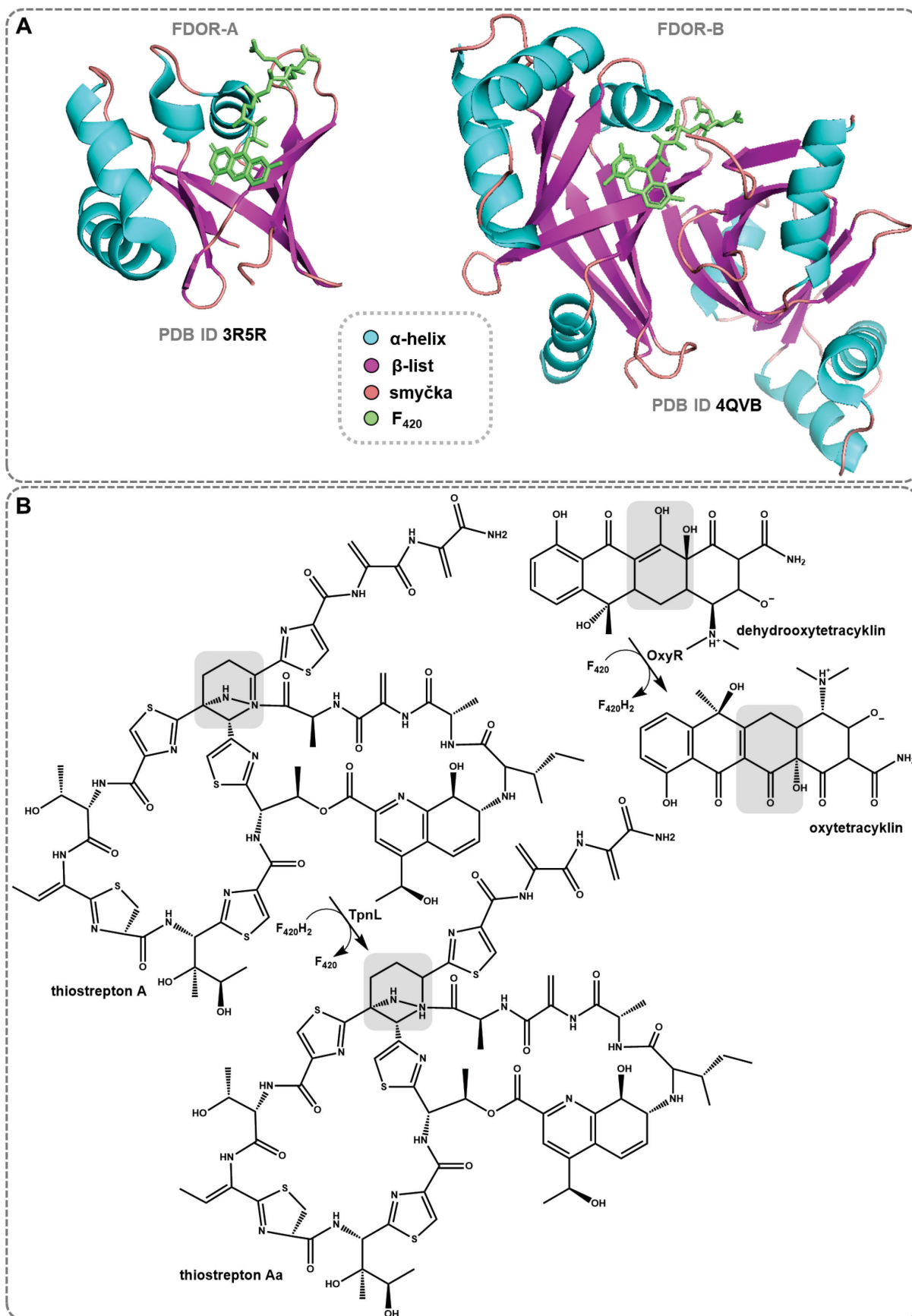
Většina známých 5-deazaflavin-závislých enzymů váže F₄₂₀/F₄₂₀H₂ uvnitř TIM-barelu (př. Adf, Mer, fHMAD, FGD),^{57,75,77} děleného β-barelu (př. Ddn) či FrhB-odvozeného motivu (př. FrhB).^{71,72} Výjimku pak představuje například F₄₂₀-redukující methenyltetrahydromethanopterin dehydrogenasa (Mtd) adoptující nový Mtd-odvozený motiv⁸²

či $F_{420}H_2$ -závislá oxidasa (Fpr) obsahující ve své struktuře flavodoxin- a β -laktamasa-odvozený motiv.⁷⁴ Zatímco popsané F_{420} -vázající proteiny obsahující ve své struktuře TIM-barel či dělený β -barel sdílejí strukturní homologii s proteiny vázajícími FMN a FAD,^{75,83} Mtd- a FrhB-odvozené motivy byly nalezeny pouze u proteinů vázajících F_{420} .^{71,82} Následující podkapitoly se dále zaměřují na nejvýznamnější rodiny $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých proteinů s TIM-barelovým a děleným β -barelovým motivem.

2.1.4.1 Flavin/deazaflavinové oxidoreduktasy (FDOR)

FDOR jsou malé proteiny (~150 aminokyselinových zbytků), obsahující ve své struktuře charakteristický dělený β -barel, jenž tvoří základ pro kofaktor- i substrát- vazebné místo.⁸³ Tato rodina proteinů je velmi diverzifikovaná z hlediska aktivit (reduktasy, oxidasy, oxygenasy), kofaktorové specifity (F_{420} , FMN, FAD, hem) i substrátů.⁸⁴ Dělí se dále na dvě podskupiny (FDOR-A, FDOR-B), které s menší než 30% sekvenční podobností sdílejí stejný strukturní motiv (Obr. 2.4A).⁸⁵

Mezi funkčně charakterizované zástupce této rodiny proteinů z biosyntézy bioaktivních látek patří reduktasy OxyR a TpnL. OxyR ze *Streptomyces rimosus* katalyzuje redukci alkenu dehydroxytetracyklinu, finálního kroku v biosyntéze tetracyklinových antibiotik.⁴² TpnL ze *Streptomyces tateyamensis* katalyzuje redukci ketoiminu thiostreptonu A v biosyntéze thiostreptonu Aa (Obr. 2.4B).⁸¹



Obr. 2.4. **Flavin/deazaflavinové oxidoreduktasy.** (A) Krystalové struktury reprezentativních proteinů z FDOR rodiny. Struktura deazaflavin-závislé nitroreduktasy Ddn (FDOR-A; PDB ID 3R5R⁸⁰) a proteinu Rv1155 (FDOR-B; PDB ID 4QVB⁸⁶). (B) Schéma reakcí katalyzovaných enzymy OxyR a TpnL, šedě podbarvené je místo, kde dochází k redukci (převzato a upraveno^{42,81}).

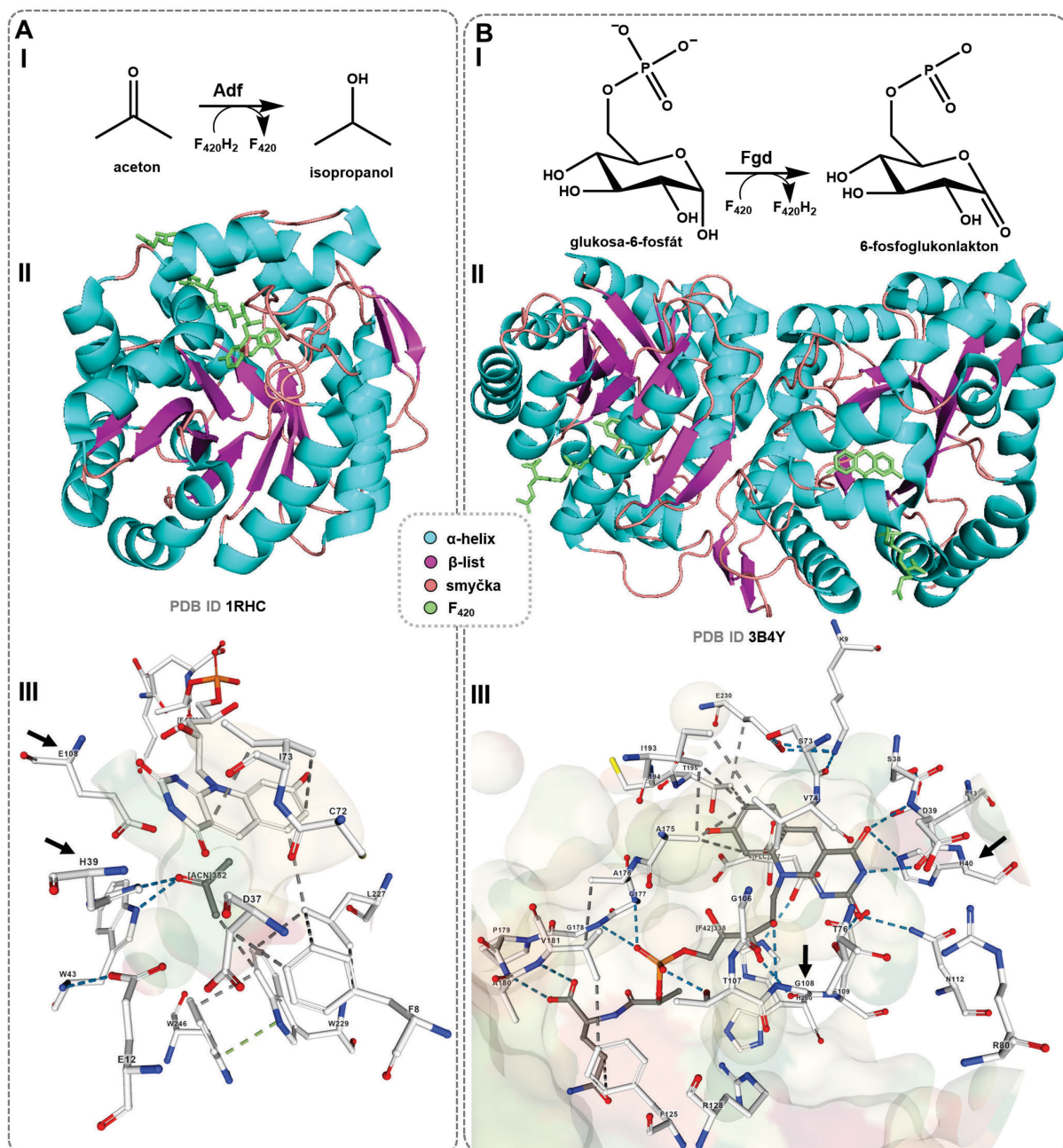
2.1.4.2 Hydridové transferasy odvozené od luciferas (LLHT)

LLHT (z angl. luciferase-like hydride transferase) jsou součástí větší monooxygenasové rodiny proteinů podobné luciferasám (PFAM PF00296). Recentní fylogenetická rekonstrukce dále dělí LLHT na dvě podskupiny – F_{420} -závislé reduktasy a F_{420} -závislé dehydrogenasy.⁸⁷ Stejně jako FDOR, LLHT jsou taktéž skupinou diverzifikovanou z hlediska katalytických aktivit (oxidasy, reduktasy, oxygenasy) i kofaktorové preference (F_{420} , FMN, FAD).^{57,88,89} Nicméně, F_{420} -závislé enzymy z této skupiny lze odlišit přítomností konzervovaného glycinového zbytku uvnitř aminokyselinové sekvence proteinu, který váže fosfátovou skupinu kofaktoru F_{420} bez stérických překážek.⁷⁵ Přes vzájemnou nízkou sekvenční podobnost sdílí LLHT podobný TIM-barel motiv – $(\alpha,\beta)_8$ a neobvyklou ne-prolyl *cis* peptidovou vazbu ve své struktuře. Nejlépe charakterizovanými proteiny z této rodiny jsou archaeální methylenetetrahydromethanopterin reduktasa (Mer; *Methanopyrus kandleri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkeri*),^{75,90} archaeální alkohol dehydrogenasa (Adf; *Methanoculleus thermophilicus*)⁷⁷ a aktinobakteriální glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (FGD; *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus jostii*).^{57,79}

Adf slouží u methanogenních bakterií k získávání energie redukcí sekundárních alkoholů na ketony (Obr. 2.5A-I). V reakci dochází k současné redukci F_{420} na $F_{420}H_2$, který dále vstupuje do CO_2 -redukčních drah či jiných buněčných reduktivních procesů.⁹¹ Krystalová struktura komplexu Adf-aceton (substrát)- F_{420} ukázala, že Adf je dimer obsahující ve své struktuře jak TIM-barel, tak i ne-prolyl *cis* peptidovou vazbu, která tvoří esenciální část výdutě a slouží jako zarážka deazaisoalloxazinového kruhu F_{420} (z *R*-strany), čímž umožňuje jeho vazbu v charakteristické ohnuté konformaci (tzv. motýlí konformace). Polyglutamátový konec F_{420} směřuje do prostoru (Obr. 2.5A-II). Aceton je umístěn z protilehlé strany F_{420} (*S*-strany) a je zanořen hlouběji do proteinu. Předpokládaný mechanismus katalýzy predikuje účast dvou klíčových zbytků, H39 a E108 (Obr. 2.5A-III).^{77,92}

FGD má roli v primárním metabolismu mykobakterií, kde oxiduje glukosu-6-fosfát za současné redukce F_{420} (Obr. 2.5B-I) v rámci pentosa-fosfátové dráhy.^{57,93} Role FGD v této dráze je jakousi nadstavbou, neboť většina mykobakterií také kóduje běžnou NADP-závislou glukosa-6-fosfát dehydrogenasu.^{41,94} V tomto smyslu FGD tedy představuje spíše ekvivalent ke konzervované F_{420} -redukující NADPH-závislé dehydrogenase, enzymu, který je zodpovědný za regeneraci oxidovaného F_{420} u většiny aktinobakteriálních rodů. Krystalová struktura FGD nese stejné znaky jako struktura Adf a i zde, stejně jako v případě Adf, se při přenosu hydridu uplatní konzervované H a E zbytky (Obr. 2.5B – II; III).^{57,77}

V literatuře dosud nebyl funkčně popsán žádný LLHT enzym z biosyntézy bioaktivních látek. Nicméně, role $F_{420}H_2$ -závislých reduktas byla predikována v biosyntéze aktinobakteriálních metabolitů inkorporujících neobvyklý 4-alkyl-L-prolinový derivát (kap. 2.2).



Obr. 2.5. Krystalové struktury reprezentativních proteinů z LLHT rodiny a schéma reakcí, které katalyzují. (A) Homodimer Adf (PDB ID 1RHC)⁷⁷ a (B) monomerní jednotka FGD (PDB ID 3B4Y)⁵⁷: (I) reakční schéma; (II) struktura LLHT s navázaným F₄₂₀; (III) detail interakce F₄₂₀ s klíčovými aminokyselinovými zbytky, včetně konzervovaných H a E zbytků (zvýrazněny černou šipkou; převzato a upraveno^{57,77}).

2.2 Aktinobakteriální komplexní metabolity s alkylnolprolinovým derivátem

Přírodní produkty, které vznikají ve specializovaných biosyntetických drahách, často představují komplexní látky složené z několika stavebních jednotek. V nejjednodušším případě jsou těmito jednotkami proteinogenní aminokyseliny, běžné sacharidy, či acetyl koenzym A, jejichž specializovaná biosyntéza není vyžadována, neboť jsou v buňce běžně dostupné.⁹⁵ Nicméně, poměrně často se ve strukturách přírodních látek objevují také

neobvyklé stavební bloky, jejichž biosyntéza je podmíněna přítomností specifických biosyntetických genů, které jsou v genomu konkrétního producenta zpravidla lokalizovány do genových podshluků. Podshluky jsou nezávislými evolučními entitami, které podléhají horizontálnímu přenosu genů. BGS komplexních látek si můžeme představit jako mozaiku několika podshluků, které jsou vzájemně evolučně nezávislé.^{2,12} To je důvod, proč jsou v BGS kódujících strukturně velmi rozdílné komplexní látky nalézány evolučně příbuzné podshluky. Je zřejmé, že molekulární evoluce je účinným nástrojem diverzity struktur SM. O této diverzitě však nerozhoduje pouze kombinace podshluků kódujících jednotlivé prekursorů v BGS, neboť každý individuální prekursor může být inkorporován do finálního metabolitu v odlišném kontextu a to v závislosti na systému, kódovaném též v rámci BGS, který zprostředkovává spojení jednotlivých prekursorů.

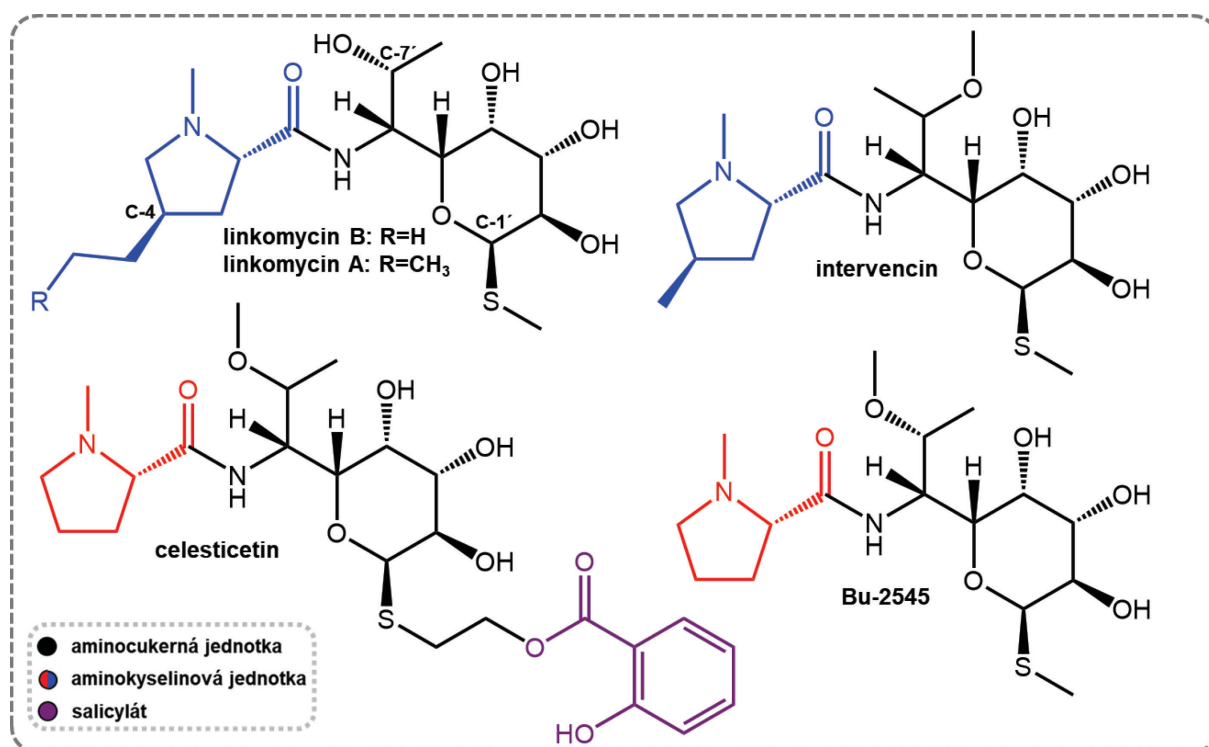
Evoluční propojení biosyntetických drah lze vystopovat také u producentů linkosamidů, PBD, hormaomycinu a griselimycinu, v jejichž BGS, které jsou jinak zcela odlišné, byly nalezeny homologní geny kódující biosyntézu prekursoru jejich sdílené stavební jednotky: 4-alkyl-L-prolinového derivátu (APD).¹³ Ve všech případech se jedná o komplexní metabolity se zajímavou biologickou aktivitou. Detailní znalost významu inkorporace a biosyntézy APD proto představuje nutný předpoklad k přípravě geneticky modifikovaných kmenů produkujících odvozené látky s lepšími biologickými vlastnostmi.

2.2.1 Linkosamidy: linkomycin a intervencin

Linkomycin A⁹⁶ (dále, není-li specifikováno, jen „linkomycin“) a intervencin⁹⁷ (produkované *Streptomyces lincolnensis*, resp. *Rhodococcus sp.* 06-235-1A) jsou zástupci skupiny látek nazývané linkosamidy, kteří mají do své struktury inkorporovaný APD (Obr. 2.6). Linkosamidy představují malou skupinu látek, která zahrnuje pouze dva další přirozeně produkované metabolity: celesticetin⁹⁸ a Bu-2545⁹⁹ (produkované *Streptomyces caelestis*, resp. *Streptomyces sp.* H230-5), tyto látky ovšem nemají ve své struktuře inkorporovaný APD, ale základní prolinovou jednotku. Nicméně, v kultivačních médiích producentů linkosamidů bylo detekováno i několik dalších minoritních produktů,¹⁰⁰ z nichž nejvýznamnější je linkomycin B (též inkorporující APD) produkovaný *S. lincolnensis*.¹⁰¹

Linkosamidy jsou komplexní metabolity, které tvoří charakteristická aminocukerná jednotka, která je amidovou vazbou připojená k aminokyselinové jednotce. Aminocukernou jednotkou linkomycinu je neobvyklá aminooktosa triviálním názvem označovaná α -methylthiolinkosamid (α -MTL; methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-galaktopyranosid),¹⁰² aminocukr v Bu-2545 a intervencinu se liší minimálně, a to pouze methylací hydroxyly v pozici C-7'. K aminocukerné části celesticetinu je navíc ještě připojen salicylát přes dvou-uhlíkatý alifatický řetězec a thio-skupinu v pozici C-1'.¹⁰³ Zatímco aminokyselinovou jednotkou celesticetinu a Bu-2545 je proteinogenní L-prolin, v linkomycinu

a intervencinu je to speciálně biosyntetizovaný APD – *N*-methyl-4-propyl-L-prolin (linkomycin A),^{103,104} respektive *N*-ethyl-4-methyl-L-prolin (linkomycin B)¹⁰⁵ a *N*-methyl-4-methyl-L-prolin (intervencin).⁹⁷



Obr. 2.6. **Chemické struktury přírodních linkosamidů.** Společným základem linkomycinu, intervencinu, celesticetinu a Bu-2545 je aminokyselinová jednotka (červeně – odvozená z proteinogenního L-prolinu; modře – speciálně biosyntetizovaný APD), která je amidovou vazbou připojena k aminocukerné jednotce (černě). K aminocukru celesticetinu je dále přes dvou-uhlíkatý alifatický řetězec a thio-skupinu v pozici C-1' připojen salicylát (fialově).

2.2.1.1 Biologická aktivita linkosamidů

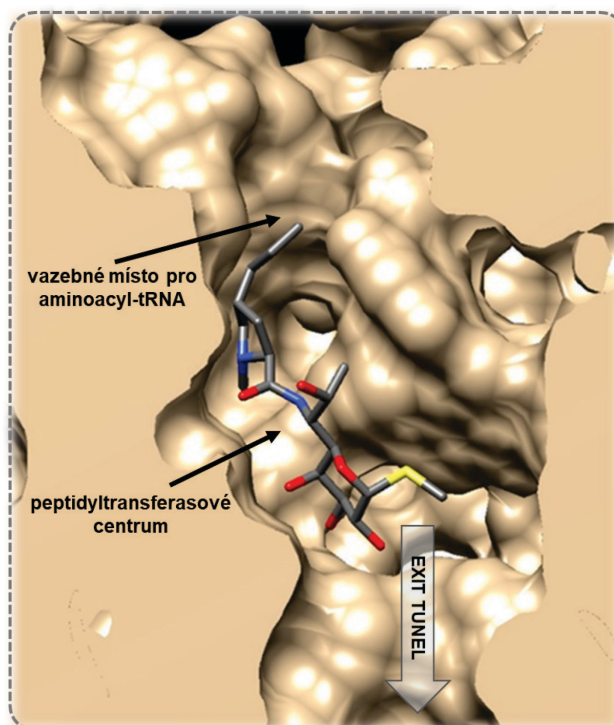
Linkomycin je klinicky významné antibiotikum, používané proti Gram-pozitivním bakteriím, včetně patogenních druhů *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Mycoplasma*, či anaerobním mikroorganismům.¹⁰⁰ Do současné doby bylo připraveno několik semisyntetických derivátů, chlorovaný analog linkomycinu nazývaný klindamycin (7-chloro-7-deoxylinkomycin) je však jediným semisyntetickým linkosamidem užívaným v humánní medicíně.^{106–110} Klindamycin má podobné spektrum účinku jako linkomycin, je však účinnější, s prokazatelnou superioritou, proto fakticky vytěsnil linkomycin z humánní medicíny. Klindamycin navíc vykazuje i aktivitu proti některým protozoa. Vzhledem k jeho nízké toxicitě se doporučuje užívání klindamycinu společně s chininem pro léčbu malárie, jejímž původcem je *Plasmodium falciparum*, a to u rizikových pacientů, a dokonce jako kombinace první volby u žen v prvním trimestru těhotenství.¹¹¹ Klindamycin bývá také často využíván v rámci profylaktické léčby jako prevence vzniku endokarditid během léčby zubních infekcí.¹¹² Pro svoji

schopnost pronikat efektivně do tkání, včetně kostí, je považován za cennou antimikrobiální látku.

Molekulární podstatou antimikrobiální aktivity linkosamidů je inhibice proteosyntézy vazbou do peptidyltransferasového centra (PTC) 50S ribozomální podjednotky bakteriálního ribozomu.¹¹³ Detailní orientace a interakce funkčních skupin linkosamidů byly popsány na krystalové struktuře 50S podjednotky ribozomu *Staphylococcus aureus* v komplexu s linkomycinem (Obr. 2.7)¹¹⁴ a 50S podjednotky ribozomu *Deinococcus radiodurans* v komplexu s klindamycinem.¹¹⁵ Jádro antibiotika, tj. α -MTL i heterocyklus APD jsou umístěny v PTC, alkylový řetězec APD pak prodlužuje molekulu antibiotika směrem k ribozomálnímu místu, v němž se váže aminoacyl-tRNA. Prodloužený alkylový řetězec (ethyl-, propyl, nebo i delší) tedy navíc interferuje s vazbou aminoacyl-t-RNA na ribozom, což zvyšuje antimikrobiální aktivitu. Z modelů je zřejmá také důležitost atomu síry α -MTL části, která je směřována opačným směrem, tj. k exit tunelu, neboť interaguje s 23S rRNA a má v aminocukerné jednotce zřejmě kruciální roli, ve výsledku významně přispívá k celkové biologické aktivitě linkosamidů.^{115,116}

Biologická aktivita linkosamidů úzce souvisí se strukturou. Markantní rozdíl v aktivitě najdeme mezi celesticetinem a linkomycinem (celesticetin vykazuje zhruba 25 – 50 % biologické aktivity linkomycinu¹¹⁷), což vzhledem k rozdílům v jejich strukturách není překvapivé. Ovšem podstatný rozdíl v aktivitě lze také najít mezi linkomycinem A a linkomycinem B (linkomycin B vykazuje asi 25 % aktivity linkomycinu A¹¹⁸), které se liší pouze délkou bočního alkylového řetězce v pozici C-4. Na základě chemických modifikací linkomycinu byla determinována čtyři „hot-spot“ místa, která výrazně moduluji biologickou aktivitu linkosamidů.¹¹⁷ První pozicí je C-7' v aminocukerné jednotce. Halogenový derivát linkomycinu, již zmíněný klindamycin, je konkrétním příkladem úspěšné modifikace C-7' místa. Obecně bylo ukázáno, že substituce hydroxyly v pozici C-7' za halový prvek zvyšuje aktivitu linkosamidů.¹⁰⁶ Recentně bylo demonstrováno, že i přítomnost salicylátu připojeného na aminooktosu v pozici C-1' je z hlediska aktivity významná, u *in vitro* připravených hybridních linkosamidů salicylát aktivitu významně zvyšoval.⁹ Další dvě „hot-spot“ místa se nacházejí v aminokyselinové části. Přítomnost methylové skupiny v pozici N-1 je u některých derivátů, ve srovnání s demethylovanými protějšky, důvodem jejich nižší aktivity.¹¹⁷ Vůbec nejdůležitější se zdá pozice C-4. Právě délka bočního alkylového řetězce v pozici C-4 má na celkovou aktivitu linkosamidů významný vliv.¹¹⁷ Již zmíněný linkomycin B, obsahující v pozici C-4 ethylový řetězec, je jedinou zjevnou příčinou jeho nízké aktivity nevhodné pro klinické využití. Podobně je tomu i u intervencinu, obsahujícímu v bočním řetězci ještě o uhlík kratší methyl.⁹⁷ Naopak, semi-synteticky připravené analogy linkomycinu s prodlouženým alkylovým řetězcem vykazují vyšší aktivitu než přirozený linkomycin s propylovým bočním řetězcem. Vůbec

nejlepšího biologického účinku bylo dosaženo u analogů linkomycinu obsahujících jako boční řetězec pentyl a hexyl.¹¹⁹



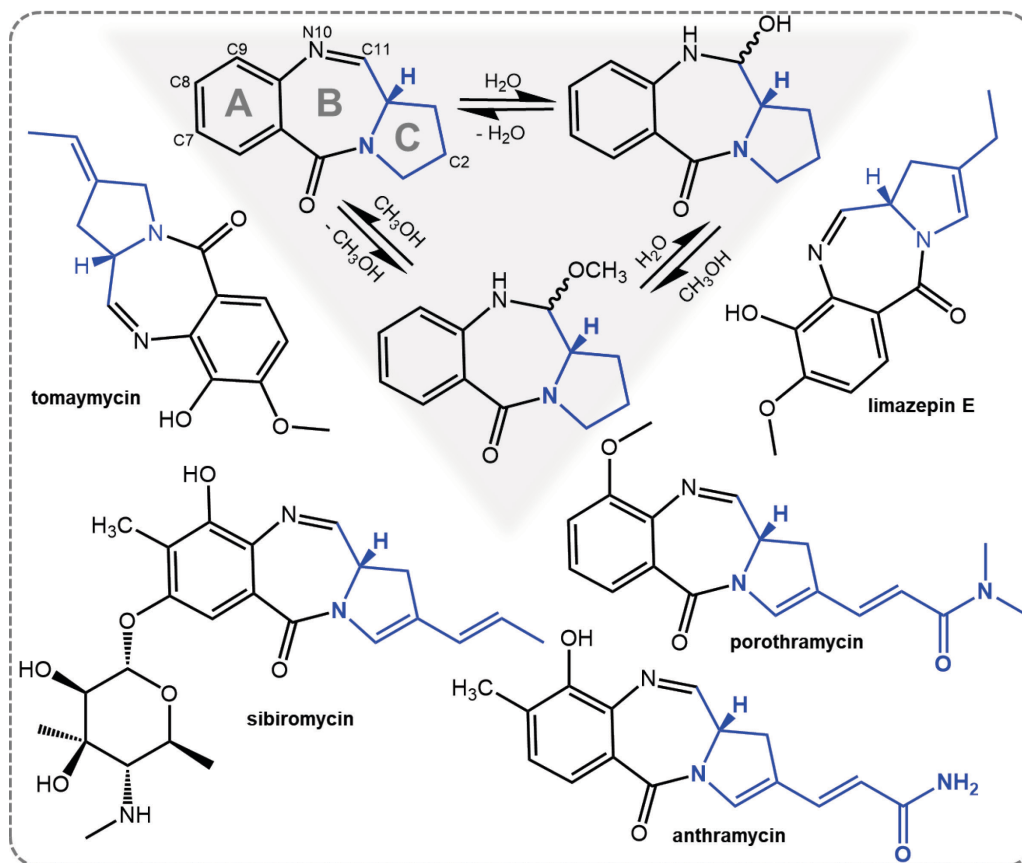
Obr. 2.7. Interakce linkomycinu s 50S ribozomálním komplexem *Staphylococcus aureus*. Aminocukerná část a heterocyklus APD jednotky jsou orientovány v peptidyltransferasovém centru ribozomu tak, že zatímco atom síry α -MTL části směřuje k exit tunelu, kde interaguje s 23S rRNA, alkylový řetězec APD jednotky směřuje na opačnou stranu, kde interferuje s místem vazby aminoacyl-tRNA (převzato a upraveno¹¹⁴).

2.2.2 Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny

PBD představují početnou skupinu komplexních látek sdílejících stejný strukturní základ – tricyklický systém složený z anthranilátového (A), diazepinového (B) a hydroxypyrrolového kruhu (C; Obr. 2.8). Substituce kruhů v různých pozicích jsou příčinou chemické různorodosti PBD. Byly popsány PBD se substitucemi A-kruhu jako jsou methylace, hydroxylace či glykosylace (pozice C-7, C-8, C-9).¹²⁰ Významná je substituce B-kruhu v pozici C-11. Iminová forma (N-10–C-11) je považována za biologicky aktivní, snadno však může, například podmínkami chemické analýzy či skladování, reverzibilně přecházet v methoxy- nebo hemiaminal- formu.^{121–123} Další častou modifikací je ireverzibilní oxidace C-11 vedoucí k formaci stabilních oxo-derivátů. C-kruh může být modifikován hydroxy- a methoxy-skupinami, endocyklickými dvojnými vazbami a v neposlední řadě variabilním uhlíkovým řetězcem v pozici C-2.¹²⁰ Je to právě přítomnost alkylu v pozici C-2, která odlišuje PBD se speciálně biosyntetizovanými APD od PBD, jejichž C-kruh je odvozen od proteinogenního L-prolinu (analogicky jako u linkosamidů celesticetinu a Bu-2545).^{124,125}

Dosud byly popsány BGS pěti PBD, které inkorporují speciální APD (Obr. 2.8).^{126–131} Anthramycin, produkovaný bakterií *Streptomyces refuineus*, je vůbec první izolovanou PBD

látkou.¹³² Ve své struktuře má jako APD jednotku inkorporovaný dehydroprolinakrylamid.¹³³ Anthramycinu strukturně podobný prothramycin, jehož producentem je *Streptomyces albus*,¹³⁴ obsahuje ve své struktuře ještě výrazněji modifikovanou APD jednotku – dehydroprolinakryl-(*N',N'*-demethyl)amid.¹³⁵ Sibiromycin, metabolit bakterie *Streptosporangium sibiricum*,¹³⁶ je zástupce obsahující jako jednu z modifikací glykosylaci na C-7 a jeho APD jednotkou je propylidendehydroprolin.¹³⁷ Poslední dva zástupci, tomaymycin a limazepin E (pokud není blíže specifikováno, dále jen „limazepin“), jejichž producenty jsou *Streptomyces achromogenes*,¹³⁸ respektive *Streptomyces* ICBB 1877,^{139,140} se strukturou liší jen minimálně, konkrétně pozicí dvojné vazby v C-kruhu. V případě limazepinu je dvojná vazba endocyklická a APD jednotkou je ethylidendehydroprolin,¹³⁹ u tomaymycinu je dvojná vazba součástí bočního alkylového řetězce a APD jednotkou je tak ethylidenprolin.¹⁴¹



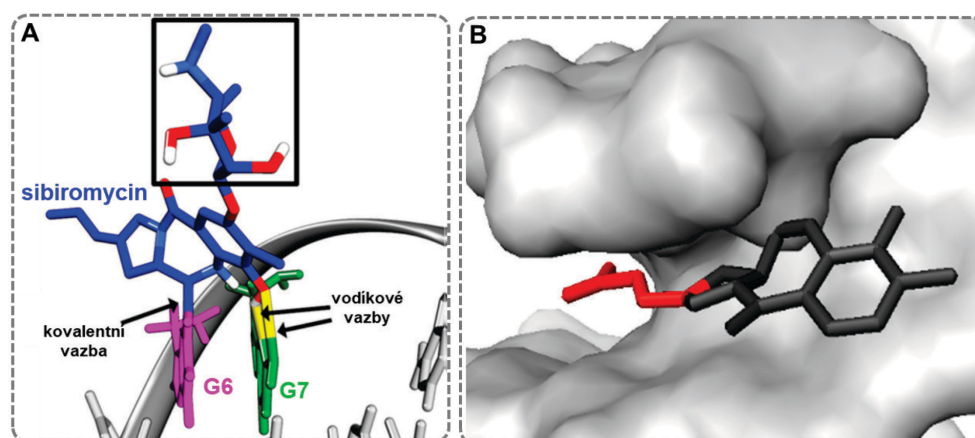
Obr. 2.8. **Chemické struktury PBD.** Šedě podbarvená plocha: přechody mezi imino-hemiaminal-methoxy formami;¹²² A – anthranilátový, B – diazepinový a C – hydroprolylový kruh, které tvoří základ struktury PBD. Dále jsou zobrazeny struktury PBD inkorporujících APD (APD jednotka je zvýrazněna modře): tomaymycin, limazepin E, sibiromycin, anthramycin a prothramycin.

2.2.2.1 Biologická aktivita pyrrolo-1,4-benzodiazepinů

PBD jsou látky sice se slabou antibakteriální aktivitou, do popředí zájmu se však dostávají zejména díky pozoruhodné protinádorové aktivitě.¹²³ PBD působí jako sekvenčně-selektivní alkylační látky. S-chirální centrum v pozici C-11 mezi B- a C-kruhy poskytuje ideální

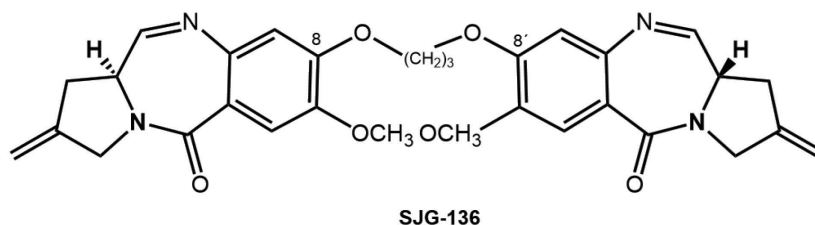
3D konformaci pro kovalentní vazbu ke guaninu do malého žlábků DNA (preferenčním motivem je buď purin-guanin-purin;¹⁴² recentní data uvádějí preferenci spíše pro pyrimidin-guanin-pyrimidin;¹⁴³ Obr. 2.9).^{144,145} Vazba do DNA probíhá ve dvou krocích, první zahrnuje rozpoznání favorizovaného nízko-energetického vazebného místa rychlou reverzibilní nekovalentní asociací molekuly PBD s DNA. V tomto kroku se uplatní slabé vodíkové můstky, van der Waalsovy síly a elektrostatické interakce. Pokud jsou tyto interakce příliš slabé, dojde k disociaci a PBD re-asociuje na jiném místě. Toto se opakuje, dokud není nalezeno vhodné nízko-energetické místo obsahující guanin. Poté, co je PBD dostatečně silně asociován k DNA, může být vytvořena kovalentní vazba mezi uhlíkem C-11 a C-2-NH₂ guaninu.¹⁴⁶ Vytvoření PBD-DNA komplexu jednak brání navázání specifických transkripčních faktorů,¹⁴⁷ ale přímo také ovlivňuje funkci RNA polymerasy,¹⁴⁸ působí letální DNA zlomy,¹⁴⁹ či moduluje různé signální dráhy.¹⁵⁰ Mnoho proteinů a signalizačních drah, které jsou působením PBD negativně ovlivňovány, jsou v nádorových buňkách, ve srovnání se zdravými buňkami, nad-regulovány, což může částečně vysvětlovat protinádorovou aktivitu PBD.¹⁵¹

Je známo, že protinádorová aktivita PBD je modulována v závislosti na substitucích kruhů. Například bylo prokázáno, že oxo-skupina v pozici C-11 aktivitu výrazně snižuje.^{123,152} Naopak, cukerná jednotka v pozici C-7 k biologické aktivitě významně přispívá.^{153,154} Analogicky jako u linkosamidů, také u PBD má prodloužený alkylový řetězec v pozici C-2 (C-kruh) pozitivní vliv na vazbu k cílové struktuře a to vzhledem k tomu, že prostor vazby v molekule DNA je celkem jasně definovaný.^{153,155} Kromě délky alkylového řetězce připojeného k C-2 je v této pozici také důležitá přítomnost dvojných vazeb. PBD látky s C-2 endo/exocyklickou dvojnou vazbou mají ve srovnání s PBD s plně nasyceným C-kruhem výrazně vyšší protinádorovou aktivitu.¹⁵⁶ Vůbec nejlepší biologické vlastnosti však mají PBD látky obsahující ještě jednu přídatnou dvojnou vazbu v postranním řetězci (např. sibiromycin). Dvojně vazby zřejmě zajišťují optimální tvar pro efektivní vazbu do DNA.¹⁵³



Obr. 2.9. Interakce PBD s malým žlábkem DNA. (A) Kovalentní vazba sibiromycinu prostřednictvím C-11 (B-kruh) ke guaninu 6 (G6; sekvence 5'-TATAAGGTATA-3'). Vazbu dále stabilizují vodíkové vazby mezi C-9-OH a N-3 G6 a dále C-9-O a exocyklickým C-2-NH₂ guaninu 7 (G7). Sibirosaminový cukr (černý rámeček) je umístěn nad rovinou malého žlábků. (B) Krystalová struktura anthramycin–DNA (sekvence 5'-CCAACGTTGG-3'). Dvojná vazba v bočním alkylovém řetězci (červeně) je pro efektivní vazbu esenciální (převzato a upraveno¹⁵⁴).

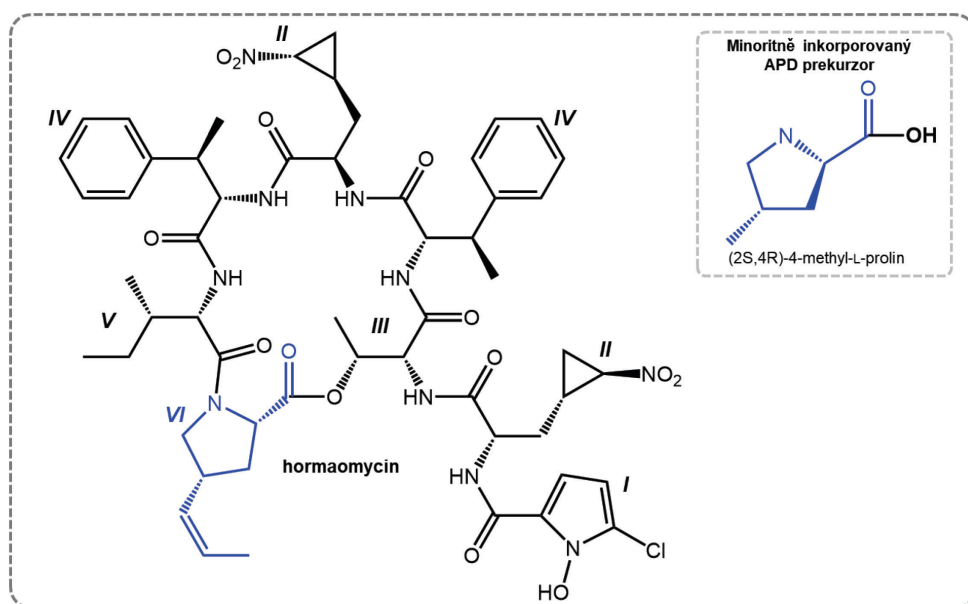
Výzkum PBD cílí zejména na modifikaci funkčních skupin, hlavním nástrojem je chemická syntéza nových PBD analogů. Například, modifikací v C-8 pozici se podařilo připravit nové účinné látky s označením GWL-78¹⁵⁷ a KMR-28-39.¹⁵⁸ Jako velmi efektivní modifikace se ukázalo být spojování monomerních jednotek PBD přes C-7/C-7'¹⁵⁹ či C-8/C-8' pozice. Spojením přes C-8 byly připraveny například dimery DSB-120¹⁶⁰ a SJG-136,¹⁶¹ přičemž druhý jmenovaný (Obr. 2.10) je v druhé fázi klinických testů pro léčbu rakoviny vaječnicků a leukemie. Obecně, C-8/C-8' propojené PBD dimery mají ve srovnání s PBD monomery vyšší cytotoxickou,¹⁶⁰ protinádorovou¹⁶² i antibakteriální aktivitu.¹⁶³ Připraveny byly i dimery spojené přes C-8/C-2'a C-2/C-2' pozice, tyto dimery se však nedostatečně vážaly k DNA, což ve výsledku vedlo k poklesu cytotoxicity.¹⁶⁴ Výzkum PBD intenzivně pokračuje i v současné době, několik syntetických derivátů, včetně PBD-konjugátů a PBD-dimerů je v současné době v I., II., nebo III. fázi klinických testů a představují tak slibné kandidáty nových protinádorových léčiv.^{165–168}



Obr. 2.10. **Chemická struktura PBD dimeru SJG-136.** Tato slibná protinádorová látka byla připravena spojením dvou PBD monomerů přes C-8/C-8' pozice.

2.2.3 Hormaomycin

Hormaomycin představuje vysoce komplexní látku (Obr. 2.11). Jedná se o makrocyclický peptidový lakton, jehož absolutní konfigurace byla potvrzena totální chemickou syntézou.¹⁶⁹ Hormaomycin se skládá z (S)-L-isoleucinu ((S)-Ile), jako jediné proteinogenní aminokyseliny, a dále z neobvyklých aminokyselin obsahujících cyklopropyl-, nitro- a chlor skupiny, navzájem spojené esterovou či amidovou vazbou.¹⁶⁹ Konkrétně dále obsahuje dvě jednotky (2S,3R)-3-methyl-L-fenylalaninu ((βMe)Phe), jednu jednotku (R)-allo-L-threoninu (α-Thr), dvě jednotky (1'R,2'R)-3-(2'nitrocyclopropyl)-L-alaninu ((3-Ncp)Ala), jednu jednotku APD (2S,4R)-4-(Z)-propenyl-L-prolinu ((4-Pe)Pro) a boční řetězec je ukončen 5-chloro-1-hydroxypyrrulo-2-karboxylovou kyselinou (Chpca). Producentem hormaomycinu je *Streptomyces griseoflavus*.¹⁷⁰ V kultivačním médiu uvedeného producenta byl také kromě hormaomycinu nalezen ještě jeden vedlejší produkt biosyntézy (nazvaný hormaomycin A7), jehož APD není (4-Pe)Pro, ale 4-methyl-L-prolin (MPL).¹⁷¹ Deriváty hormaomycinu, jmenovitě hormaomycin B a C, se podařilo izolovat z kmene *Streptomyces* SNM 55, jedná se však pouze také o vedlejší produkty biosyntézy hormaomycinu lišící se jen nepřítomností methylové skupiny na fenylalaninové jednotce.¹⁷²



Obr. 2.11. **Chemická struktura hormaomycinu.** Římskými čísly jsou označeny jednotlivé stavební jednotky (I: Chpca; II: (3-Ncp)Ala; III: α-Thr; IV: (βMe)Phe; V: (S)-Ile; VI: (4-Pe)Pro – APD jednotka, zvýrazněna modře). Dále je zobrazena struktura (2S,4R)-4-methyl-L-prolinu (MPL; vpravo nahoře), APD jednotky minoritně zastoupeného vedlejšího produktu biosyntézy hormaomycinu, hormaomycinu A7.

2.2.3.1 Biologická aktivita hormaomycinu

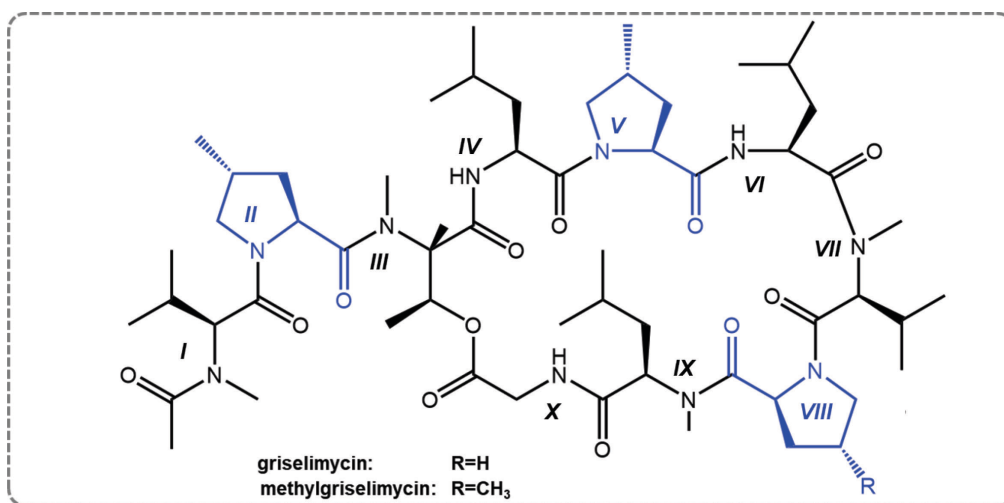
Hormaomycin je zajímavou látkou nejen strukturně, ale také svoji biologickou aktivitou. Hormaomycin vykazuje antimikrobiální účinky zahrnující aktivitu proti patogennímu druhu *P. falciparum*,¹⁷³ velmi efektivní je také proti koryneformním bakteriím (*Corynebacterium*, *Azthrobacter*).¹⁷⁴ Kromě antimikrobiálních účinků působí také například jako stimulant produkce SM různých druhů streptomycet.¹⁷⁵ Hormaomycin je tedy příkladem přírodního produktu, který může regulovat bakteriální chování a zároveň samostatně fungovat v roli antibiotika.

I přes to, že cílová biologická struktura a molekulární základ biologické aktivity hormaomycinu nebyly dosud popsány, existují studie zaměřující se na objasnění vztahu mezi strukturou a aktivitou, a tedy logicky i na přípravu biologicky aktivnějších analogů hormaomycinu. Ve studiích zaměřených na přípravu nových analogů se uplatňují dva základní přístupy – totální syntéza a prekurzorem-řízená biosyntéza. Například, experimenty založenými na přidávání různých aminokyselin, které by mohly nahradit jednotku (3-Ncp)Ala, do kulturačního média producenta hormaomycinu, již vedlo k úspěšné přípravě několika nových analogů.¹⁷⁶ Podařilo se dokonce připravit látku, která měla oproti hormaomycinu pozměněné biologické vlastnosti a její účinek byl nově namířen proti patogenní *Candida albicans*, což nikdy dříve u hormaomycinu pozorováno nebylo.¹⁷⁷ Chemickou syntézou byly dále připraveny například čtyři nové aza-analogy, modifikací však došlo ke ztrátě biologické aktivity.¹⁷⁸ V rámci studie zaměřené na regulaci produkce hormaomycinu bylo připraveno několik analogů hormaomycinu, které obsahovaly modifikace v jednotce I, II (jedné či obou

zároveň), V či VI (hormaomycin A7).¹⁷¹ Nicméně, biologická aktivita u žádného z nich nebyla modifikací zlepšena. U hormaomycinu A7 se zkráceným bočním řetězcem APD jednotky z propenylu na methyl a se změněnou konfigurací byla aktivita proti testovanému mikrobiálnímu druhu *Arthrobacter crystallopoietes* ATCC 15481 na stejné úrovni jako u nemodifikovaného hormaomycinu. To je zajímavé, neboť jak již bylo uvedeno, analogická modifikace u linkosamidů, tedy zkrácení bočního řetězce APD jednotky, má na aktivitu významný vliv.

2.2.4 Griselimycin

Griselimycin, poprvé izolovaný v roce 1960 ze *Streptomyces* DSM 40835,¹⁷⁹ je cyklický depsipeptid, který se skládá z deseti aminokyselin řazených v následujícím pořadí: *N*-methyl-L-valin (I), (*R*)-4-methyl-L-prolin (II), *N*-methyl-L-threonin (III), L-leucin (IV), (*R*)-4-methyl-L-prolin (V), L-leucin (VI), *N*-methyl-L-valin (VII), L-prolin (VIII), *N*-methyl-D-leucin (IX) a L-glycin (X; Obr. 2.12).¹⁸⁰ Peptidový řetězec je uzavřen esterovou vazbou mezi C-koncem L-glycinu a bočním řetězcem *N*-methyl-L-threoninu, což vede k uvolnění prvních dvou aminokyselin ze sekvence, které tak tvoří boční řetězec. Kromě osmi proteinogenních aminokyselin jsou v griselimycinu integrovány dvě speciálně biosyntetizované APD jednotky – MPL (II, V).¹⁸¹ Z kultivačního média producenta griselimycinu však byl izolován také minoritní produkt, nazývaný methylgriselimycin, který namísto L-prolinu (VIII) obsahuje další MPL jednotku.

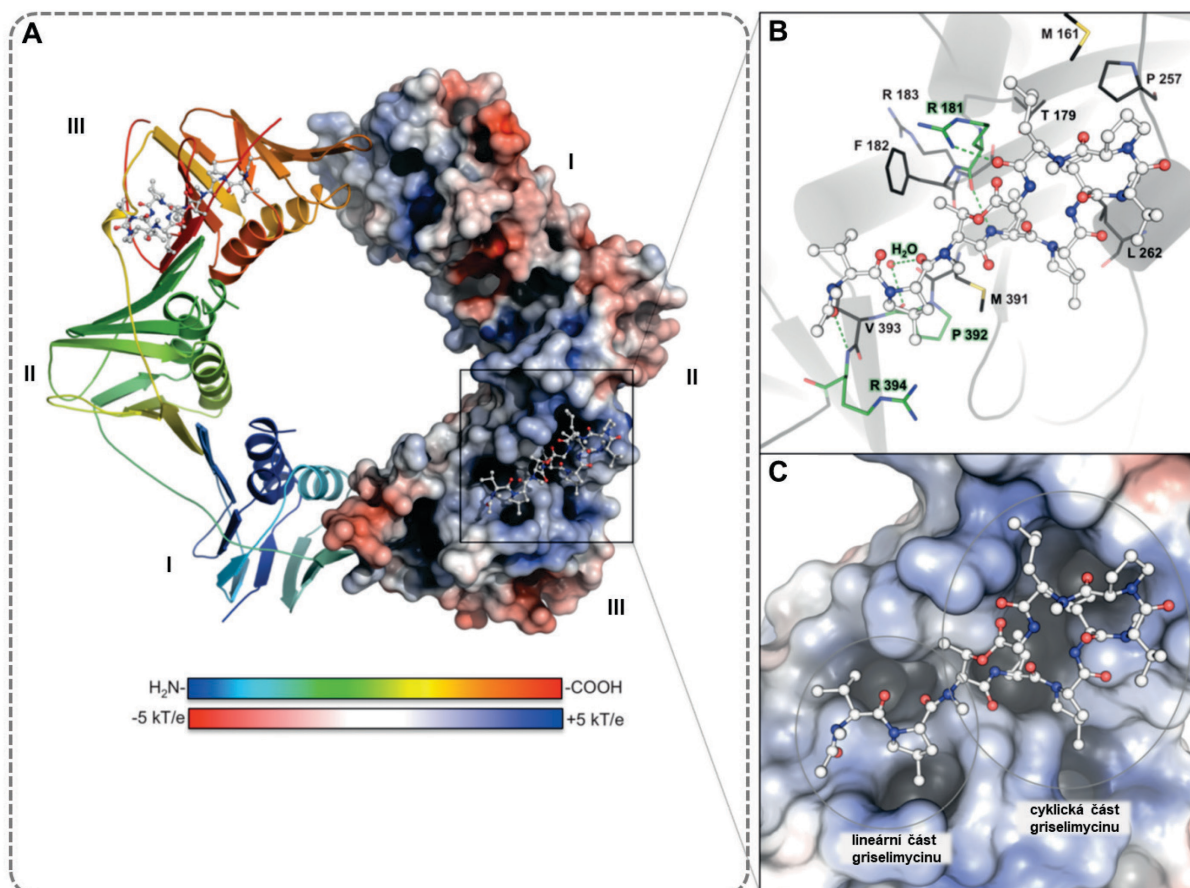


Obr. 2.12. **Chemická struktura griselimycinu a methylgriselimycinu.** Římskými čísly jsou označeny jednotlivé stavební aminokyselinové jednotky – I: *N*-methyl-L-valin, II: (*R*)-4-methyl-L-prolin, III: *N*-methyl-L-threonin, IV: L-leucin, V: (*R*)-4-methyl-L-prolin, VI: L-leucin, VII: *N*-methyl-L-valin, VIII: L-prolin/(*R*)-4-methyl-L-prolin, IX: *N*-methyl-D-leucin, X: L-glycin (APD jednotky jsou zvýrazněny modře).

2.2.4.1 Biologická aktivita griselimycinu

Molekulárním cílem griselimycinu je protein DnaN, posuvná svorka DNA polymerasy.¹⁸² Griselimycin se s vysokou selektivitou váže pouze na bakteriální DnaN. Na komplexu proteinu DnaN z *Mycobacterium smegmatis* s griselimycinem bylo ukázáno, že vazbou griselimycinu do hydrofobní kapsy mezi doménou II a III proteinu DnaN je znemožněna interakce svorkového proteinu s DNA polymerasou, čímž je inhibována replikace bakteriální DNA (Obr. 2.13).

Vzhledem ke specifické antibakteriální aktivitě proti *Corynebacterineae*, zejména proti *Mycobacterium*, včetně multirezistentní *Mycobacterium tuberculosis*, byl griselimycin zprvu považován za slibného kandidáta v boji proti tuberkulóze. Nicméně, klinické studie na počátku 70. let odhalily jeho nepříznivé farmakokinetické vlastnosti, což vedlo k ukončení dalšího výzkumu.^{183,184} Nedávno obnovené studie zaměřující se na zlepšení těchto vlastností, především metabolické stability a penetraci griselimycinu do mykobakteriální buněčné stěny, nově ukazují, že minoritně přirozeně produkovaný methylgriselimycin (griselimycin obsahující tři jednotky MPL) a jeho optimalizované, chemicky syntetizované deriváty (např. cyklohexylgriselimycin) jsou *in vitro* i *in vivo* vysoce aktivní antituberkulózní látky se slibným potenciálem pro zařazení do preklinických testů.¹⁸² Podobně jako je tomu u linkosamidů, i zde je zcela evidentní, že inkorporace APD namísto L-prolinu má pozitivní vliv na biologickou aktivitu. Výměna L-prolinové jednotky (VIII, Obr. 2.12) za jednotku APD v molekule griselimycinu vede k výraznému zlepšení stability. Příčinou nestability v případě inkorporace L-prolinu namísto MPL je snadná oxidace vedoucí v biologickém systému k degradaci tohoto metabolitu. První testy ukazují, že alkylace L-prolinu (VIII) prokazatelně zlepšuje stabilitu při inkubaci s lidskými jaterními mikrozomy.¹⁸²



Obr. 2.13. **Krystalová struktura proteinu DnaN *M. smegmatis* v komplexu s griseлимycinem.** (A) Griseлимycin se váže do hydrofobní kapsy mezi doménami II a III homodimeru DnaN. Levá část: stužkový model, barevně je rozlišen C- a N-konec proteinu. Pravá část: barevné znázornění povrchu proteinu na základě elektrostatického potenciálu (k , Boltzmanova konstanta; T , teplota; e , náboj). (B) Detailní interakce ligandu s proteinem: aminokyselinové zbytky účastníci se hydrofobních (šedě) a vodíkových interakcí (zeleně), vodíkové vazby (přerušovaná zelená čára). (C) Povrchové znázornění vazebné kapsy (převzato a upraveno¹⁸²).

2.3 Komplexní metabolity s 4-methyl-L-prolinem vyskytující se mimo Actinobacteria

Specializovaná biosyntéza a inkorporace neproteinogenního MPL do komplexních přírodních látek není tak vzácná, jako v případě inkorporace alkylnprolinů obsahujících v bočním řetězci delší řetězce, jak například ethyl či propyl. Produkce látek s inkorporovaným MPL byla dosud popsána například i u některých sinic a hub.

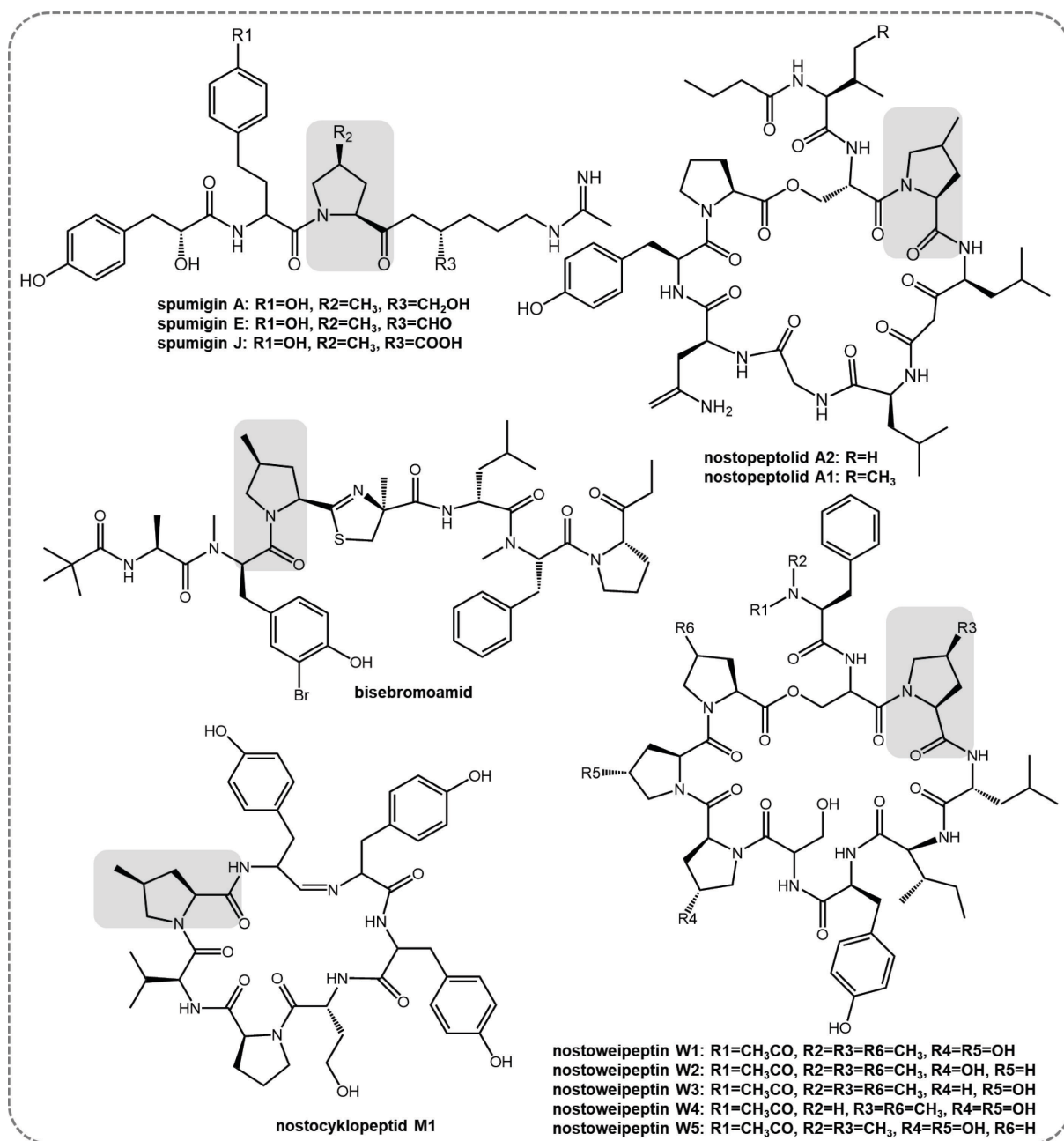
2.3.1 Metabolity s inkorporovaným MPL produkované sinicemi

Sinice jsou známými producenty SM s rozmanitými chemickými strukturami (Obr. 2.14) i biologickými vlastnostmi.¹⁸⁵

MPL jednotka byla v sinicích poprvé identifikována jako součást struktury **spumiginu A** produkovaného kmenem *Nodularia spumigena* AV1.¹⁸⁶ Později byla také determinována jako součást struktury dalších spumigenů produkovaných kmeny *Nodularia spumigena*, resp. *Anabaena compacta*, jmenovitě spumiginu E a spumiginu J. Ze strukturního hlediska se jedná o lineární tetrapeptidy, které působí jako inhibitory proteas. Konkrétně, spumigin E inhibuje trypsinové proteasy, spumiginy J a A jsou trombinové inhibitory.¹⁸⁷

Nostopeptolidy jsou cyklické hybridní přírodní látky, které byly izolovány z fotosyntetických sinic rodu *Nostoc*.¹⁸⁸ Jedná o komplexní metabolity skládající se z aminokyselinových zbytků, butyrové kyseliny a acetát-odvozených jednotek, které jsou spojené peptidovými a esterovými vazbami.¹⁸⁹ Nostopeptolidy A, produkované druhem *Nostoc* sp. GSV224,¹⁸⁹ a nostopeptolidy L, produkované druhem *Nostoc* sp. UK2alm1,¹⁹⁰ představují zástupce s inkorporovanou MPL jednotkou. MPL jednotka byla determinována i jako součást struktury látek podobných nostopeptolidům – **nostocyklopeptidů A** a **M1**, produkované druhem *Nostoc* sp. ATCC53789,¹⁸⁹ resp. *Nostoc* sp. XSPORK 13A¹⁹¹ a také **nostoweipeptinů**, produkovaných *Nostoc* sp. XSPORK 5A.¹⁹⁰ Shodně, tyto látky působí jako antitoxiny proti mikrocystinům, sinicovým hepatotoxinům.^{190,191}

MPL je součástí struktury i nového cytotoxického peptidu, nazývaného **bisebromoamid**, který byl izolován z mořské sinice *Lyngbya* sp. a který vykazuje antiproliferativní aktivitu.¹⁹² Lineární struktura bisebromoamidu zahrnuje kromě MPL dalších šest jednotek, které jsou navzájem spojené amidovými vazbami – L-leucin, L-alanin a dále neobvyklé jednotky *N*-methyl-3-bromo-L-tyrosin, *N*-methyl-L-fenylalanin, 2-(1-oxopropyl)pyrrolidin a 2-thiazolin-4-methyl-4-karboxylovou kyselinu.



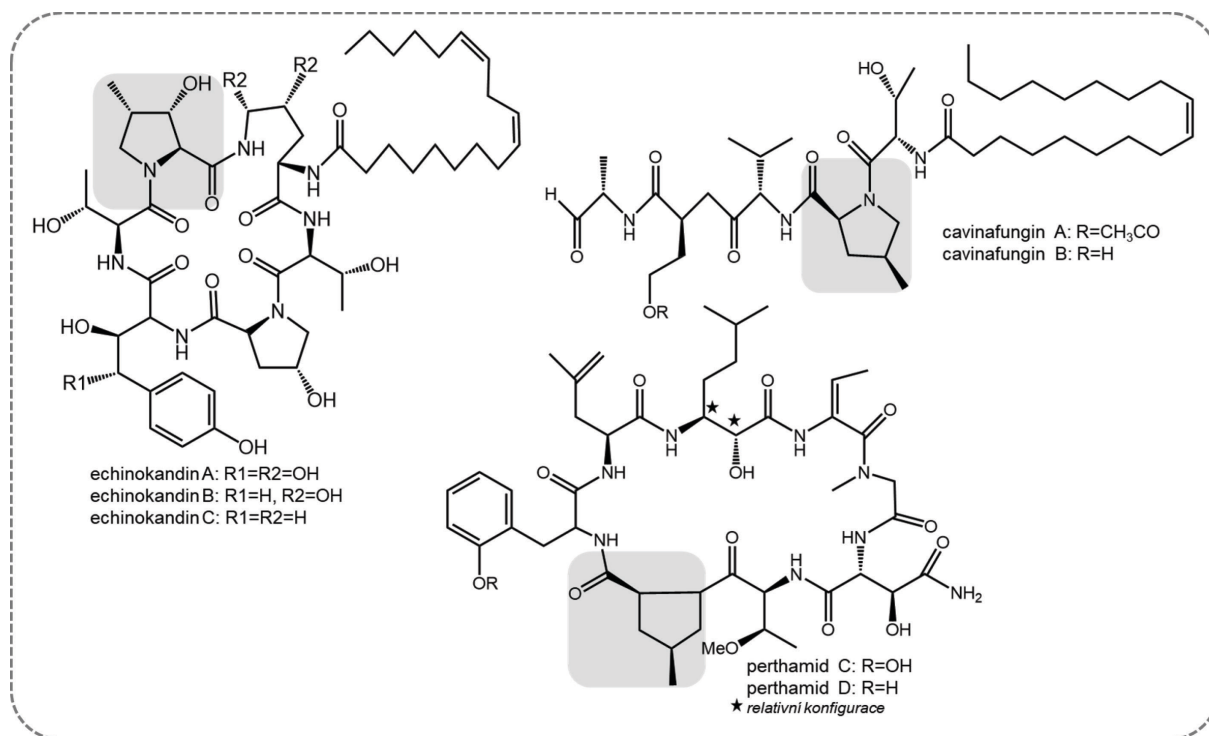
Obr. 2.14. Chemické struktury vybraných metabolitů produkovaných sinicemi inkorporujících MPL (MPL jednotka je zvýrazněna šedým podbarvením; převzato a upraveno^{187,190–193}).

2.3.2 Metabolity s inkorporovaným MPL produkované houbami

Echinokandiny (Obr. 2.15) jsou malou skupinou fungálních lipopeptidů, které byly poprvé izolovány z *Aspergillus nidulans*¹⁹⁴ var. *echinulatur* a *Aspergillus nidulans* var. *roseus* NRRL 1140 (nedávno přejmenované na *Emericella rugulosa*).¹⁹⁵ Echinokandiny mají fungicidní účinky na rod *Candida*.¹⁹⁶ Z biosyntetického pohledu jsou to látky vznikající spojením osmi odlišných biosyntetických prekurzorů tvořících peptidové jádro, které je dále modifikováno přidávanými skupinami, jako například acylovým bočním řetězcem či hydroxylovými skupinami.^{197,198} Do struktury je inkorporovaný i MPL obsahující navíc hydroxylovou skupinu, tedy 3-hydroxy-MPL.

Lineární peptidy **cavinafunginy A a B** byly izolovány z kulturačního média houby *Colispora cavincola* (Ascomycota).¹⁹⁹ I tyto látky vykazují antifungální aktivitu proti rodu *Candida* a také proti rodu *Aspergillus*. Jejich struktura je tvořena pěti aminokyselinami, včetně jedné MPL jednotky, které jsou spojené amidovou vazbou.

Perthamidy C a D jsou cyklické peptidy izolované z mořské houby *Theonella swinhoei*, které jsou zajímavé pro svoje protizánětlivé účinky demonstrovány *in vivo*.²⁰⁰ Strukturně se jedná o uzavřený kruh sedmi aminokyselin a jedné jednotky MPL.



Obr. 2.15. Chemické struktury vybraných metabolitů produkovaných houbami inkorporujících alkylnolinový derivát: MPL (cavinafunginy, perthamidy) či 3-hydroxy-MPL (echinokandiny; alkylnolinové jednotky jsou zvýrazněny šedým podbarvením; převzato a upraveno^{197,199,200}).

2.4 Genový základ pro biosyntézu aktinobakteriálních APD látek

Ze strukturního hlediska jsou APD jednotky do jednotlivých aktinobakteriálních metabolitů inkorporovány v rozmanitém kontextu. Tricyklický PBD systém složený z APD a různě substituované anthranilové kyseliny vzniká kondenzací řízenou NRPS.^{126,201} Podobně, také v biosyntéze komplexních cyklických laktonů, hormaomycinu a griselimycinu, se uplatní NRPS-řízená kondenzace.^{202,203} Zcela odlišná je biosyntéza linkomycinu, kde se uplatní neobvyklý kondenzační systém založený na kombinaci NRPS- a mykothiol/ergothionein-závislých elementů.^{10,204} V případě biosyntézy PBD a linkomycinu následují bezprostředně po kondenzační reakci další enzymaticky-řízené modifikační reakce (methylace, hydroxylace, isomerační či redukční reakce).^{11,123,205}

Následující kapitola detailně popisuje BGS producenta linkomycinu, neboť se jedná o vůbec první publikovaný BGS kódující biosyntézu metabolitu s inkorporovaným APD a tedy, funkce většiny kódovaných biosyntetických proteinů nejsou jen predikované na základě podobností s jinými popsány BGS, ale byly již experimentálně objasněny. Jak se postupně ukazuje, geny v linkomycinovém BGS často kódují proteiny s neobvyklou aktivitou, recentní studie dokonce přinesly zajímavé poznatky také o jednom z regulačních genů. Navazující kapitoly poté popisují BGS producentů intervencinu, griselimycinu, PBD a hormaomycinu. Tyto kapitoly jsou už omezeny jen na stručný popis biosyntetických genů, se zaměřením na geny kódující biosyntézu APD prekurzorů.

2.4.1 BGS producenta linkomycinu

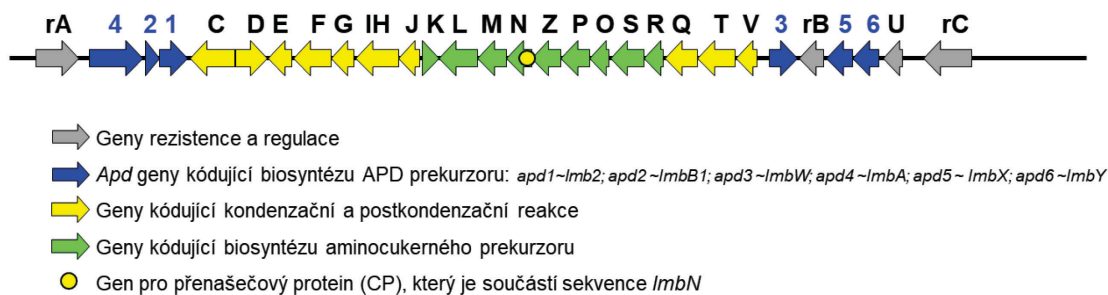
Sekvence BGS průmyslového kmene *S. lincolnesis* byla poprvé publikována před 25 lety.²⁰⁶ O něco později byla doložena i sekvence BGS typového kmene *S. lincolnesis* ATCC 25466 (Obr. 2.16).²⁰⁷ Z biosyntetických genů (*Imb* geny) nese BGS producenta linkomycinu sadu genů, která kóduje biosyntézu prekurzoru jeho aminocukerné části, sadu genů kódujících biosyntézu 4-propyl-L-prolinu (PPL), prekurzoru aminokyselinové APD jednotky, a dále jsou také přítomny geny kódující kondenzaci obou těchto prekurzorů a jejich následné postkondenzační modifikace.

Biosyntézu PPL plně zajišťuje šestice genů *ImbB2*, *ImbB1*, *ImbW*, *ImbA*, *ImbX* a *ImbY*.²⁰⁷ Recentní práce zavedla pro tyto geny přehlednou a zjednodušující terminologii – geny jsou jednotně nazývány jako *apd* geny, přičemž dle předpokládaného pořadí funkce jejich genových produktů (Apd proteinů) v biosyntéze PPL jsou označeny jako *apd1* – *apd6* (analogicky, proteiny jsou označeny Apd1 – Apd6).¹³ *Apd1* ~ *ImbB2*, *apd2* ~ *ImbB1*, *apd3* ~ *ImbW*, *apd4* ~ *ImbA*, *apd5* ~ *ImbX*, *apd6* ~ *ImbY*. Popisu biosyntetické dráhy, které tyto geny kódují, se detailně věnuje celá kap. 2.5. Jak bude uvedeno dále, homology většiny z šestice *apd1* – *apd6* genů byly dle očekávání nalezeny v BGS producentů APD inkorporujících PBD i hormaomycinu, ale poněkud překvapivě po jednom z *apd* genů bylo nalezeno i v BGS producentů intervencinu a griselimycinu.

Biosyntézu prekurzoru aminocukru plně kóduje sada genů *ImbR*, *ImbN*, *ImbP*, *ImbK*, *ImbO*, *ImbL*, *ImbM*, *ImbS* a *ImbZ*, přičemž funkce proteinů kódovaných prvními pěti uvedenými geny již byla experimentálně prokázána.^{208,209} Také funkce většiny proteinů kódovaných geny související s kondenzací aminokyselinového a aminocukerného prekurzoru byla již určena. V kondenzaci byla potvrzena účast genového produktu genu *ImbC* a genu pro přenašečový protein (z angl. carrier protein; CP), který je součástí sekvence *ImbN*,²¹⁰ dále také funkce proteinů kódovaných *ImbT*, *ImbD*, *ImbV*, *ImbE*.¹⁰ K funkci CP je pravděpodobně nutný ještě jeden genový produkt, který není součástí shluku, je ale přítomen v genomu.²⁰⁴ Protein LmbF

se pak uplatní společně s proteiny kódovanými *ImbJ*, *ImbG*, *ImbIH* a *ImbQ* v postkondenzačních reakcích.^{9,11,211–213}

Kromě biosyntetických genů byly v BGS producenta linkomycinu identifikovány geny kódující regulační proteiny a proteiny udělující rezistenci (*ImrA*, *ImrB*, *ImrC*, *ImbU*).²⁰⁷ Velmi zajímavý je především gen *ImbU*, který kóduje transkripční regulátor.²¹⁴



Obr. 2.16. **Biosyntetický genový shluk producenta linkomycinu.** Modře zvýrazněny jsou *apd* geny (označeny čísly 1 – 6, přičemž 1 znamená *apd1*), kódující biosyntézu PPL, prekurzoru APD jednotky. Dále jsou barevně rozlišeny geny kódující biosyntézu prekurzoru aminocukru, kondenzaci a postkondenzační reakce a dále pak geny rezistence a regulace (převzato a upraveno²⁰⁷).

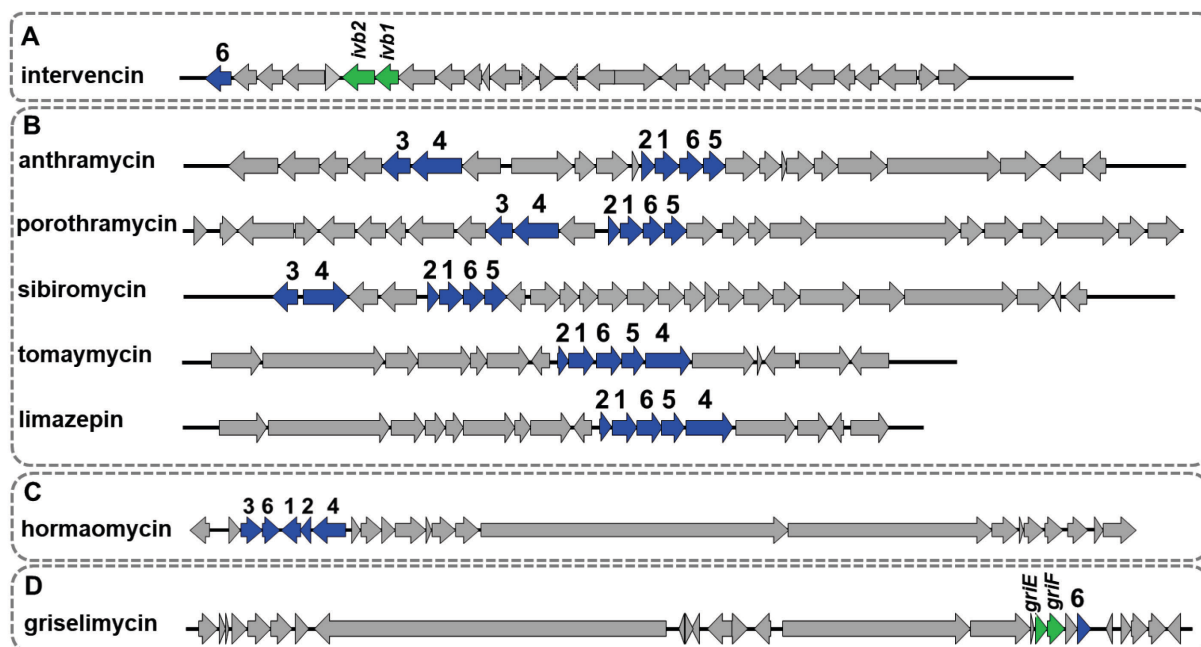
2.4.2 BGS producentů intervencinu, PBD, hormaomycinu a griselimycinu

BGS producenta intervencinu se složením genů velmi podobá linkomycinovému BGS. Na rozdíl od linkomycinu se však předpokládá, že intervencinový APD prekurzor (MPL) vzniká v odlišné biosyntetické dráze. V BGS uvedeného producenta byl totiž nalezen pouze jeden *apd* homolog, *apd6*, a dále další dva geny, *ivb1* a *ivb2*, které nejsou *apd* genům podobné. Jejich kombinace plně objasňuje biosyntézu MPL (Obr. 2.17A).⁹⁷

Biosyntéza PBD je v příslušných producentech kódovaná v BGS, které z biosyntetických genů nesou sadu genů pro biosyntézu anthranilátové podjednotky – tato sada se liší v závislosti na tom, zda podjednotka vzniká kynureninovou dráhou či chorismátovou/trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilovou dráhou (dráhy se shodně uplatňují v biosyntéze PBD hydroxylovaných v pozici C-9), případně chorismátovou dráhou (v biosyntéze PBD bez hydroxyly v pozici C-9),¹²⁸ dále pak geny kódující NRPS, geny kódující postkondenzační modifikace a také, pouze v případě PBD inkorporujících APD, geny kódující biosyntézu prekurzoru APD jednotky. BGS byly popsány u pěti známých PBD, které APD jednotku inkorporují.^{126–128,130,131} V BGS sibiromycinu, anthramycinu a prothramycinu je přítomna kompletní šestice *apd* homologních genů, v BGS producenta tomaymycinu a limazepinu je přítomno pět *apd* homologů (Obr. 2.17B).

V BGS producenta hormaomycinu byly z biosyntetických genů mimo geny kódujících NRPS dále identifikovány různé sady genů kódujících biosyntézu jednotlivých stavebních bloků, a to včetně prekurzoru APD jednotky. Sada obsahuje pět *apd* homologů (Obr. 2.17C).

Biosyntéza griselimycinu je kódována v BGS obsahujícím biosyntetické geny nezbytné pro výstavbu základního depsipeptidu a NRPS. Biosyntéza APD jednotky je, podobně jako v případě intervencinu, kódována podshlukem tří genů – i zde byl nalezen homolog *apd6*, zbývající dva geny, *griE* a *griF*, jsou pak homologní k intervencinovým genům *ivb1* a *ivb2*.²⁰³ Předpokládá se tak, že APD griselimycinu vzniká analogickou dráhou jako APD intervencinu.



Obr. 2.17. Biosyntetické genové shluky producentů (A) intervencinu, (B) PBD – anthramycinu, porothramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu a limazepinu, (C) hormaomycinu a (D) griselimycinu. Modře zvýrazněny jsou *apd* geny (označeny čísly 1 – 6, přičemž 1 znamená *apd1*), kódující speciální biosyntetickou dráhu prekurzorů APD jednotek. V případě intervencinového a griselimycinového BGS jsou navíc zeleně zvýrazněny *apd*-nehomologní geny (názvy genů jsou uvedeny nad šipkami) kódující enzymy taktéž zapojené do biosyntézy APD prekurzorů.

2.5 Dvě cesty vedoucí k aktinobakteriálním APD prekurzorům

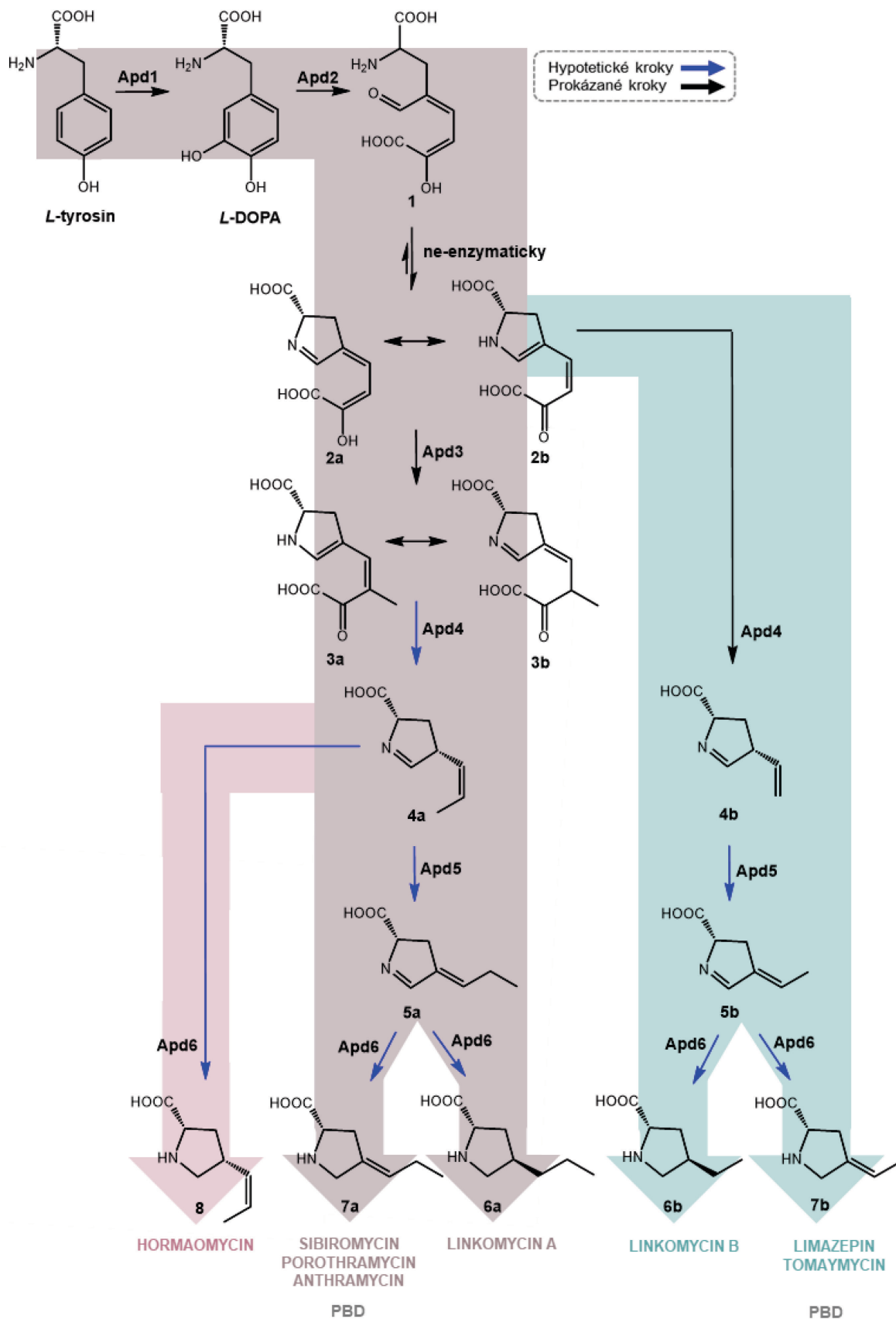
V aktinobakteriích byly dosud popsány dvě dráhy pro biosyntézu prekurzorů APD. Dráha vycházející z L-tyrosinu vede k biosyntéze prekurzorů APD obsahujícím jako C-4 boční řetězec ethyl (2-C) či propyl (3-C), tedy linkomycinu, hormaomycinu a PBD sibiromycinu, porothramycinu, anthramycinu, limazepinu a tomaymycinu a v textu je dále označována jako „**alkylprolinová dráha**“. V BGS příslušných producentů je alkylprolinová dráha kódovaná sadou 5 – 6 *apd* homologních genů (Tab. 2.2).¹³ Dráha vycházející z L-leucinu vede k biosyntéze prekurzorů APD obsahujících v bočním řetězci methyl (1-C), tedy intervencinu a griselimycinu a v textu je dále označována jako „**methylprolinová dráha**“. Tato dráha je v BGS příslušných producentů kódovaná jedním *apd* homologem, *apd6*, a dalšími dvěma geny, které k *apd* genům nejsou homologické.

Tab. 2.2 Geny v BGS producentů linkosamidů (linkomycinu, intervencinu), griselimycinu, PBD (sibiromycinu, anthramycinu, porothramycinu, limazepinu, tomaymycinu) a hormaomycinu, které kódují proteiny zapojené do biosyntézy prekurzorů jejich APD. Dráha vycházející z L-tyrosinu je kódovaná sadou 5 – 6 *apd* homologních genů, dráha vycházející z L-leucinu je kódovaná *apd6* homologem a dalšími dvěma geny, které nejsou k *apd* genům homologické.

BIOSYNTÉZA VYCHÁZEJÍCÍ Z:	JEDNOTNÉ OZNAČENÍ HOMOLOGŮ	LINKOMYCIN	INTERVENCIN	GRISELIMYCIN	SIBIROMYCIN	ANTHRAMYCIN	POROTHRAMYCIN	LIMAZEPIN	TOMAYMYCIN	HORMAOMYCIN
L-tyrosin	<i>apd1</i>	<i>lmbB2</i>	-	-	<i>sibU</i>	<i>orf13</i>	<i>por14</i>	<i>lim11</i>	<i>tomI</i>	<i>hrmE</i>
	<i>apd2</i>	<i>lmbB1</i>	-	-	<i>sibV</i>	<i>orf12</i>	<i>por13</i>	<i>lim10</i>	<i>tomH</i>	<i>hrmF</i>
	<i>apd3</i>	<i>lmbW</i>	-	-	<i>sibZ</i>	<i>orf5</i>	<i>por10</i>	-	-	<i>hrmC</i>
	<i>apd4</i>	<i>lmbA</i>	-	-	<i>sibY</i>	<i>orf6</i>	<i>por11</i>	<i>lim14</i>	<i>tomL</i>	<i>hrmG</i>
	<i>apd5</i>	<i>lmbX</i>	-	-	<i>sibS</i>	<i>orf15</i>	<i>por16</i>	<i>lim13</i>	<i>tomK</i>	-
	<i>apd6</i>	<i>lmbY</i>	<i>ivb3</i>	<i>griH</i>	<i>sibT</i>	<i>orf14</i>	<i>por15</i>	<i>lim12</i>	<i>tomJ</i>	<i>hrmD</i>
L-leucin	-	-	<i>ivb2</i>	<i>griF</i>	-	-	-	-	-	-
	-	-	<i>ivb1</i>	<i>griE</i>	-	-	-	-	-	-

2.5.1 Alkylprolinová dráha

Základní koncept biosyntézy APD prekurzorů odvozených z L-tyrosinu,^{152,215–217} který byl postaven na modelu biosyntézy PPL,²⁰⁶ prekurzoru APD linkomycinu, a který byl recentně revidován v souladu s nejnovějšími poznatky,²¹⁸ předpokládá zapojení kompletní sady šesti APD biosyntetických proteinů: Apd1 – Apd6 (Obr. 2.18).¹³ Kompletní sada Apd proteinů je kromě biosyntézy linkomycinu také vyžadována v biosyntéze porothramycinu, anthramycinu a sibiromycinu. Pět Apd proteinů je vyžadováno v biosyntéze limazepinu, tomaymycinu, linkomycinu B (biosyntézy se u všech shodně neúčastní Apd3) a dále také hormaomycinu (biosyntézy se neúčastní Apd5).



Obr. 2.18. Předpokládané schéma alkylnorprolinové dráhy vycházející z L-tyrosinu. Kompletní sada Apd1 – Apd6 proteinů je vyžadována v biosyntéze precursoru APD s 3-C bočním řetězcem, který je inkorporován do linkomycinu a PBD sibiromycinu, anthramycinu a prothramycinu. Nekompletní sada pěti Apd proteinů postačuje k formaci APD hormaomycinu (chybí Apd5, APD s 3-C bočním řetězcem) a APD s 2-C bočním řetězcem, který je inkorporován do linkomycinu B a PBD limazepinu a tomaymycinu (chybí Apd3; převzato a upraveno^{13,218}).

2.5.1.1 *Iniciační kroky: role enzymů Apd1, Apd2*

První dva kroky alkylprolinové dráhy jsou katalyzovány Apd1 hydroxylačním proteinem^{219–222} a Apd2 dioxygenasou,^{219–221,223,224} které konvertují L-tyrosin přes L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) na látku **1**, která podléhá cyklizaci na dikarboxylovou kyselinu **2**.

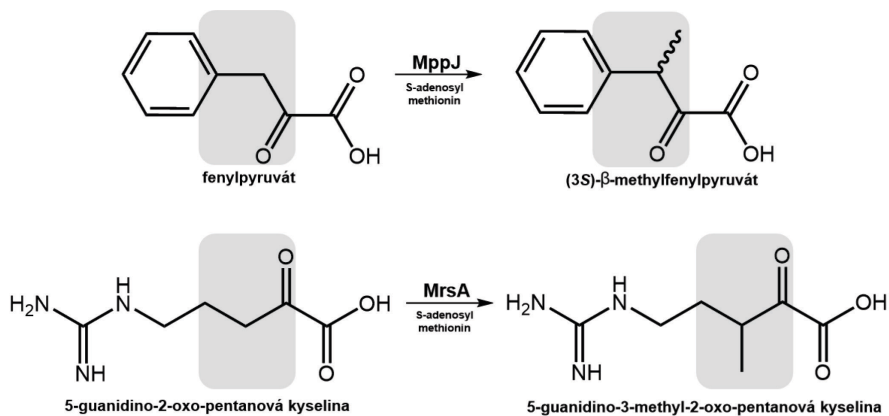
Apd1 je neobvyklým enzymem obsahujícím jako prostetickou skupinu hem B, jehož reakční mechanismus nebyl dosud zcela objasněn. Orf13,²²¹ Apd1 z biosyntézy anthramycinu, v reakci využívá peroxid vodíku jako oxidant. Jeho homolog z biosyntézy linkomycinu, LmbB2, je *in vitro* schopný katalyzovat stejnou reakci bez přídavku jakéhokoliv oxidantu. Nicméně, zároveň bylo ukázáno, že přídavek (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterinu enzymovou aktivitu LmbB2 významně zvyšuje.²²²

Apd2 patří do rodiny jedno-doménových extradiolových dioxygenas typu I. Enzymy z této rodiny váží nehemové železo (Fe(II)), které se účastní vazby a aktivace atomů molekulárního kyslíku. Ty jsou v případě Apd2, při současném štěpení aromatického kruhu L-DOPA, následně inkorporovány.²²³

2.5.1.2 *Biochemické uspořádání reakcí katalyzovaných enzymy Apd3 a Apd4*

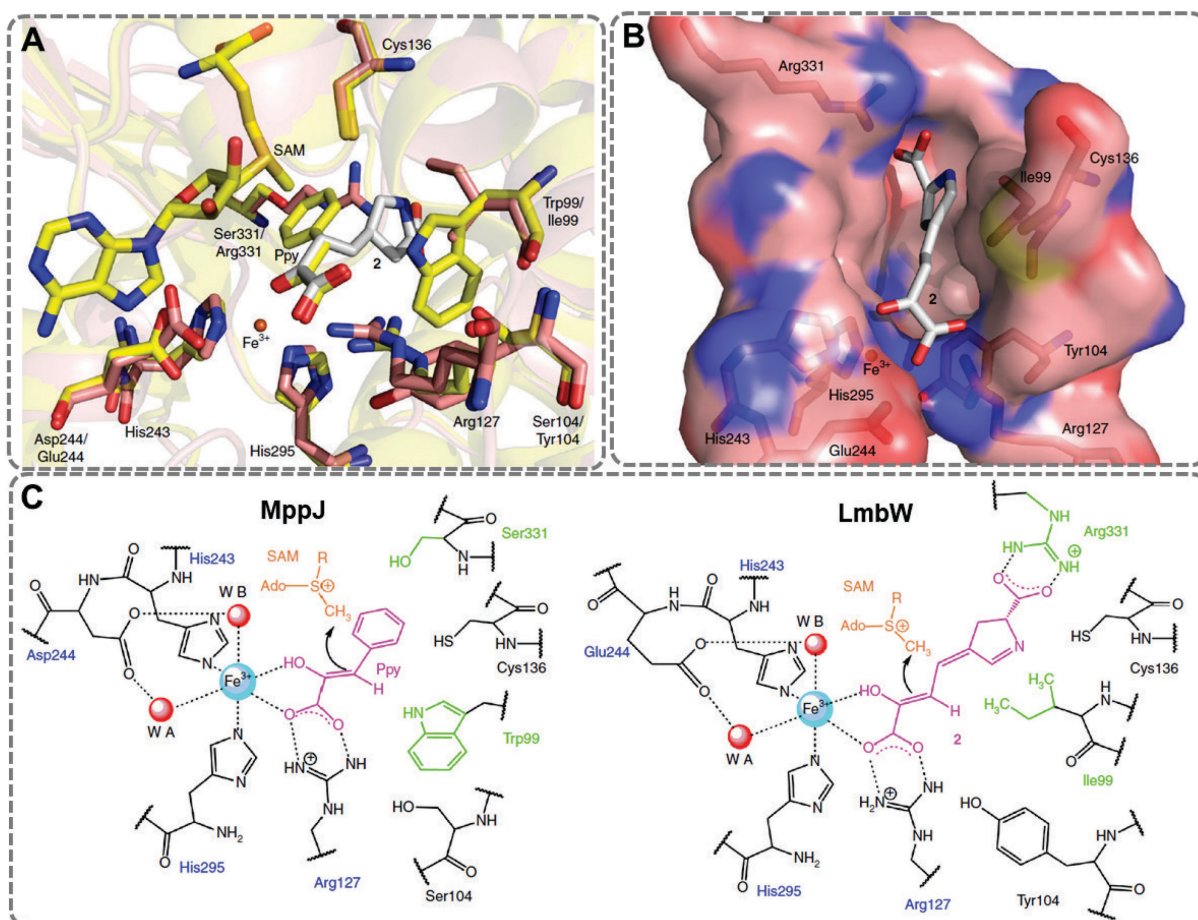
Pořadí následujících dvou kroků, katalyzovaných proteiny Apd3 a Apd4, je stále předmětem vědeckých diskuzí.^{225–227} Navrhovaná C-methyltransferasová aktivita proteinu LmbW, Apd3 z biosyntézy linkomycinu, byla experimentálně *in vitro* prokázána na substrátu **2**, který byl LmbW v přítomnosti methylového donoru (SAM) přeměněn na látku **3**.²¹⁸ Identita látky **3** byla potvrzena na základě determinace přesné hmoty, struktura této látky pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) však prozatím nebyla doložena.

Dosud byly funkčně charakterizovány dva LmbW homology (Obr. 2.19), ovšem ne z biosyntézy APD-inkorporujících látek. Jedná se o protein MrsA z biosyntézy rostlinného toxinu 3-methyl-argininu, jehož substrátem je 5-guanidino-2-oxo-pentanová kyselina a který má k LmbW sekvenční homologii 26 % (pokrytí 80 %).²²⁸ Druhým charakterizovaným proteinem je MppJ účastnící se biosyntézy manopeptinomycinů, látek s antibiotickou aktivitou.²²⁹ MppJ sdílí s LmbW 27% sekvenční identitu (pokrytí 84 %) a jeho substrátem je fenylypyruvát. V obou případech (MrsA i MppJ) se jedná o substráty nesoucí stejné strukturní znaky, jako nese látka **2**.



Obr. 2.19. **Methylační reakce katalyzované LmbW-homologními proteiny.** MppJ (biosyntéza manopeptinomycinů) a MrsA (biosyntéza 3-methylargininu; šedě podbarvené je místo, kde dochází k methylaci; převzato a upraveno^{228,229}).

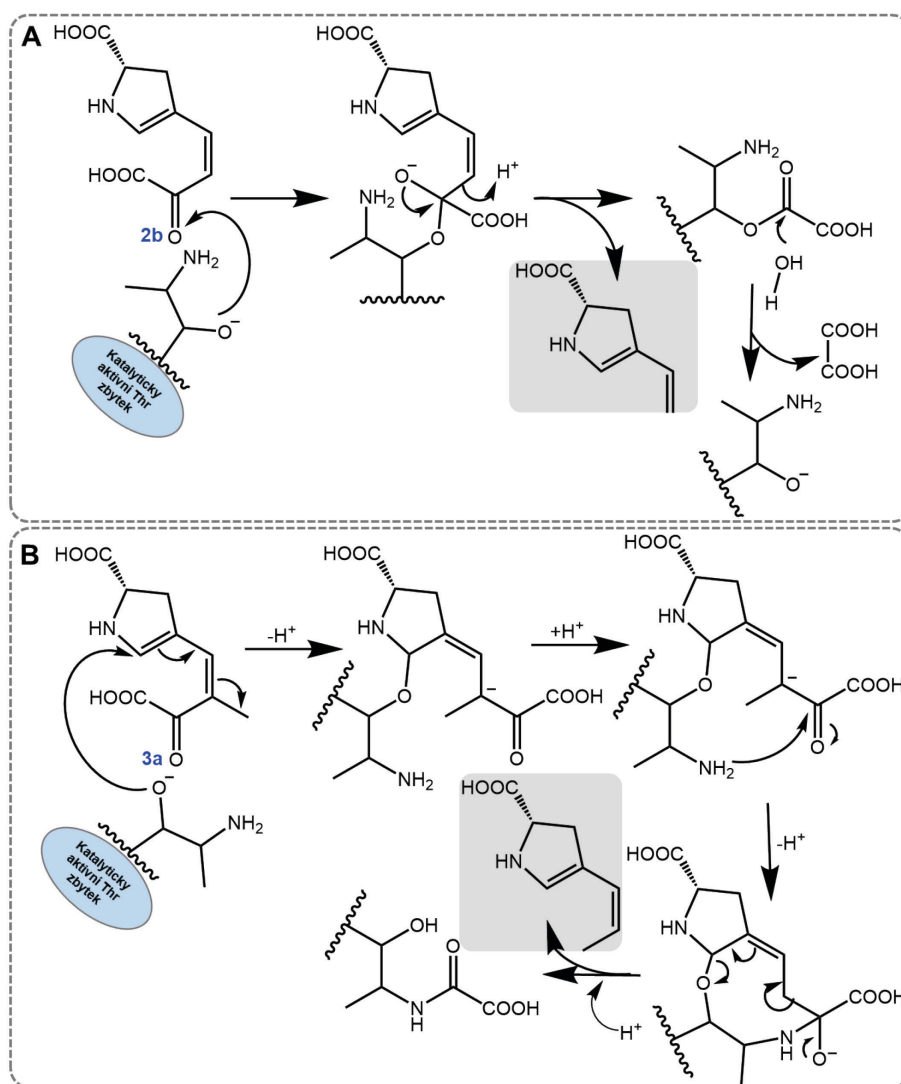
Na základě známé krystalové struktury MppJ²³⁰ byl vytvořen homologní model porovnávající MppJ-typ methyltransferasy s Apd3 proteiny (Obr. 2.20).²²⁶ Z modelu je zřejmá vysoká podobnost obou skupin proteinů, specificky v oblasti aktivního místa. Konkrétně, shodně u MppJ a Apd3 konzervované aminokyselinové zbytky H243 a H295 spolu s D/E244 váží nehemový železitý ion (Fe(III)), který je společně s R127 zodpovědný za fixaci α -oxo-karboxylových částí obou substrátů, látky **2** a fenylpyruvátu. V modelu Apd3 byl navíc determinován konzervovaný R331, u kterého se předpokládá účast ve fixaci druhé karboxylové skupiny látky **2**.^{231,232}



Obr. 2.20. **Modely aktivních míst MppJ a LmbW.** (A) Krystalová struktura aktivního místa MppJ (žlutě) s navázaným substrátem (fenylypyruvát; Ppy) a methylovým donorem (molekulou SAM) v překryvném modelu s LmbW (růžově) a jeho substrátem látkou **2** (bíle). (B) Homologní model substrát-vazebného místa LmbW. (C) Schématické znázornění aktivních míst MppJ a LmbW. Konzervované aminokyselinové zbytky jsou zvýrazněny modře (převzato a upraveno²²⁶).

Apd4 proteiny jsou sekvencně podobné γ -glutamyltranspeptidasám (γ -GT), enzymům hojně zastoupeným v metabolismu glutathionu, které katalyzují hydrolýzu/přenos γ -glutamyllové skupiny. γ -GT patří do nadřazené rodiny *N*-terminálních nukleofilních hydrolas, které jsou charakteristické autoproteolytickou aktivací, při které dochází k uvolnění katalytického zbytku (S, T nebo C) na *N*-terminálním konci proteinu, který pak působí jako nukleofil a zprostředkovává hydrolýzu amidové (C–N) vazby substrátu.²³³ Z genových databází je zřejmé, že tyto enzymy jsou hojně zastoupené i u Gram-pozitivních Actinobacteria, organismů, u kterých glutathionový metabolismus nebyl popsán a tedy jejich role se předpokládá spíše v specializovaném, než základním/centrálním metabolismu. Zhong a kol. recentně experimentálně prokázal neobvyklou hydrolasovou aktivitu Orf6²²⁵ (dle Zhong označovaný jako Ant6), Apd4 z biosyntézy anthramycinu, která již byla dříve navrhována,²¹⁸ a to štěpení C–C vazby. Substrátem v *in vitro* reakci byla látka **2**, která je ale dle současně navrženého konceptu předpokládána jako přirozený substrát Apd3, případně jako substrát Apd4, pouze ale u APD obsahujících v bočním řetězci dva uhlíkové atomy.²¹⁸ Mechanismus

Apd4 proteinů, který Zhong navrhuje (Obr. 2.21A), nevysvětluje posun elektronů v sp² valenční vrstvě C-atomu, které se od běžné β-eliminační reakce liší (posun elektronů při β-eliminaci nastává v sp³ valenční vrstvě). Nově navržený mechanismus zahrnující jiné pozice dvojných vazeb látek **2** a **3**, které jsou pro předpokládanou katalytickou aktivitu nezbytné, je aplikovatelný také pro látku **3**, tedy původně navrhovaný substrát Apd4 enzymů v biosyntéze APD, obsahujících v bočním řetězci tři uhlíkové atomy, který je uvedeným mechanismem konvertován na látku **4** (Obr. 2.21B).²²⁶



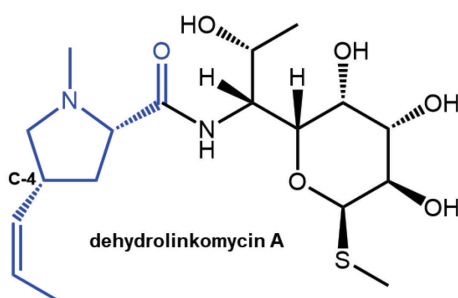
Obr. 2.21. **Předpokládaný katalytický mechanismus hydrolasy Apd4.** Pro γ-GT Apd4 je charakteristická autoproteolytická aktivace, při níž dochází k uvolnění katalyticky aktivního threoninového zbytku. (A) Mechanismus navržený dle Zhong et al.²²⁵ (B) Revidovaný návrh mechanismu dle Janata et al.¹³

2.5.1.3 Závěrečné kroky: role Apd5 a vliv Apd6 na diverzitu finálních APD prekurzorů

V dalším kroku dráhy se předpokládá konverze látky **4**, jejíž struktura dosud nebyla charakterizována, na látku **5**. V této reakci se navrhuje zapojení proteinu Apd5, který je sekvenčně podobný isomerasam z rodiny proteinů nazývané PhzC-PhzF (z angl. phenazin

biosynthesis-like proteins). Jediným funkčně charakterizovaným zástupcem této rodiny je protein PhzF z *Pseudomonas fluorescens*, který skutečně katalyzuje isomerační reakci.^{234,235} Isomerasová aktivita Apd5 je podporována i produkčním profilem mutantního kmene *S. lincolnsensis* $\Delta lmbX$, v jehož médiu byl detekován intermediát odpovídající chybějící aktivitě, tedy dehydrolinkomycin A (Obr. 2.22).²¹⁸ Jedná se o analogický případ jako v biosyntéze prekurzoru APD hormaomycinu, jehož producent v BGS *apd5* homolog nenese (*apd5* nebyl nalezen ani nikde jinde v genomu).²⁰² Chybějící isomerasová aktivita umožní v dalším kroku biosyntézy redukcí pouze endocyklické dvojně vazby látky **4**, v obou případech, v biosyntéze dehydrolinkomycinu A a hormaomycinu, vzniká tedy APD s dvojnou vazbou uprostřed 3-C bočního alkylového řetězce. Enzymová aktivita žádného Apd5 homologu z biosyntézy APD prekurzorů nebyla dosud prokázána přímým biochemickým průkazem.

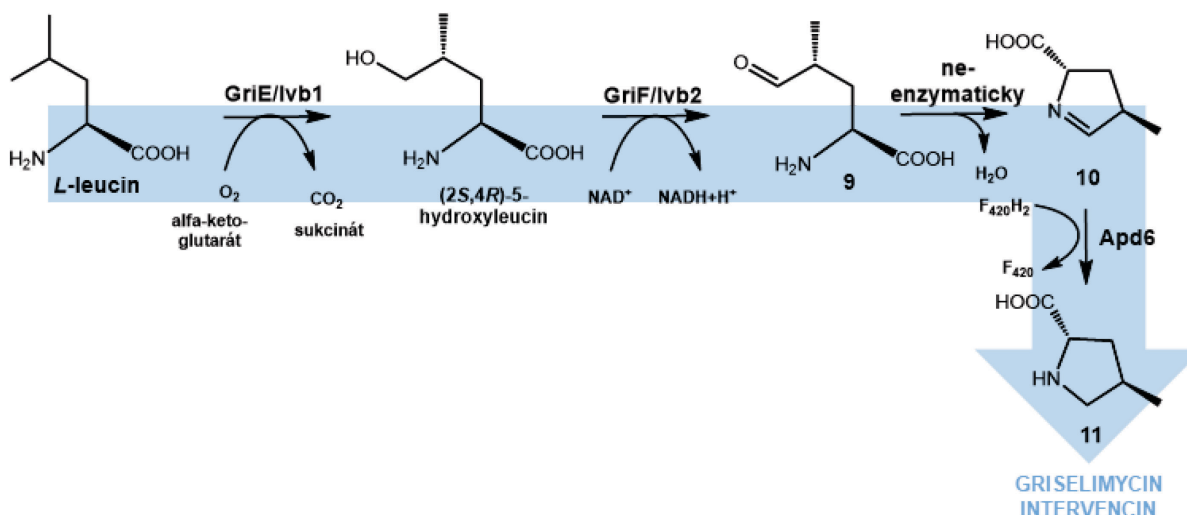
Jak již bylo naznačeno, přesun dvojných vazeb do konjugace je nezbytný pro závěrečný krok alkyloprolinové dráhy, který předpokládá zapojení Apd6, $F_{420}H_2$ -závislých reduktas katalyzujících redukcí látky **5** na finální APD prekurzory.^{206,218} Navrhovaná funkce Apd6 proteinů byla podpořena izolací meziprojektu **5a** z kultivačního média *S. lincolnsensis* UC8292, u kterého byla přerušena syntéza kofaktoru F_{420} .²³² Další podpůrný důkaz byl přinesen analýzou produkčních profilů mutantního kmene *S. lincolnsensis* $\Delta lmbY$, v jehož kultivačním médiu též dochází k hromadění meziprojektu **5a**.²¹⁸ Co je velmi zajímavé, recentní studie ukázala, že finální APD prekurzory, které jsou následně inkorporovány do koncových metabolitů, se liší z hlediska saturace vazeb.²³⁶ Bylo ukázáno, že zatímco do linkomycinu je inkorporován APD prekurzor **6** s plně saturevaným bočním řetězcem, do struktur PBD a hormaomycinu jsou inkorporovány prekurzory obsahující v postranním řetězci jednu dvojnou vazbu – prekurzory **7** a **8**. Mechanismus a podstata této diverzifikace dosud nebyla popsána a její objasnění je hlavním cílem této práce.



Obr. 2.22. **Chemická struktura dehydrolinkomycinu A**, hlavního produktu mutantního kmene *S. lincolnsensis* $\Delta lmbX$. Struktura APD jednotky (modře) odpovídá chybějící předpokládané isomerasové aktivitě LmbX, proto je uprostřed bočního alkylového řetězce v pozici C-4 dvojná vazba. V linkomycinu je boční řetězec plně nasycený (převzato a upraveno²¹⁸).

2.5.2 Methylprolinová dráha

Experimentálně bylo prokázáno, že APD inkorporovaný do griselimycinu vzniká z L-leucinu.²⁰³ Na základě sekvenční homologie genů kódujících biosyntézu APD griselimycinu s geny z BGS producenta intervencinu se stejná dráha předpokládá právě i v biosyntéze prekursoru APD intervencinu.⁹⁷ V porovnání s alkyprolinovou dráhou zahrnuje methylprolinová dráha pouze tři kroky a u Actinobacteria vede výhradně k (2S,4R)-MPL. Obě dráhy pak sdílejí pouze jeden homologní protein – Apd6 (Obr. 2.23).



Obr. 2.23. **Předpokládané schéma methylprolinové dráhy vycházející z L-leucinu.** První dva kroky katalyzují proteiny, které nejsou Apd proteinům podobné, v posledním kroku nastává redukce katalyzovaná Apd6 homology formující (2S,4R)-MPL (11), který je následně inkorporován do intervencinu a griselimycinu (převzato a upraveno⁹⁷).

Účast enzymů v biosyntéze APD griselimycinu byla navržena na základě inaktivačních experimentů, enzymatická funkce jednotlivých proteinů byla následně demonstrována *in vitro* a *in vivo*.²⁰³

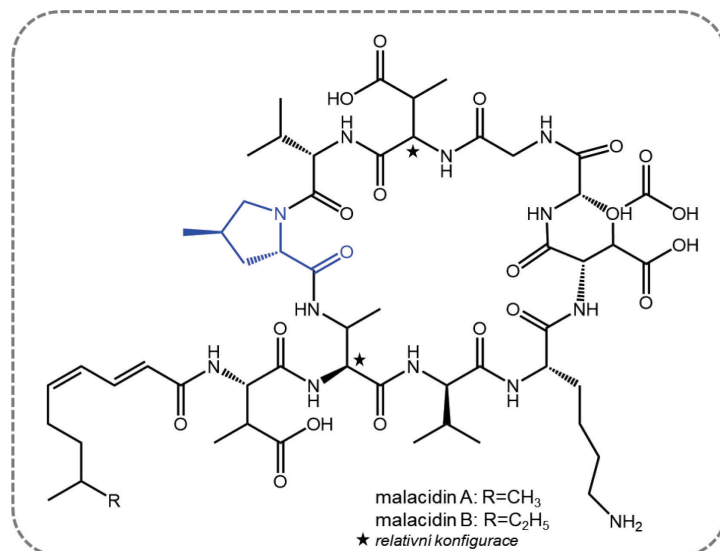
V prvním kroku dochází k hydroxylaci L-leucinu na (2S,4R)-5-hydroxy-leucin. Tato reakce je řízená GriE, enzymem z 2-oxoglutarát-Fe(II) oxygenasové rodiny. Enzymy z této rodiny spřahují dekarboxylaci α -keto-glutarátu s oxidací/hydroxylací substrátu za současné formace oxo-ferrylového meziprojektu. (2S,4R)-5-Hydroxy-leucin je v následující reakci konvertován na (2S,4R)-4-methylglutamát-5-semialdehyd (9), který podléhá spontánní cyklizaci na (2S,4R)-4-methyl- Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylovou kyselinu (10). Tato reakce je katalyzovaná Zn-závislou dehydrogenasou GriF. Poslední krokem je redukce 10 na finální (2S,4R)-MPL (11) katalyzovaná v přítomnosti $F_{420}H_2$ Apd6 homologem GriH.²⁰³ Stejná reakce byla popsána i v základním metabolismu, konkrétně v biosyntéze L-prolinu u *Escherichia coli*, kde ovšem reakci katalyzuje enzym NADH-závislá Δ^1 -pyrroline-5-karboxylát reduktasa (5PC) ProC.²³⁷ Jedná se však o zcela nepříbuzný enzym, jehož sekvenční identita ke GriH je pouhých 17 % (pokrytí 22 %). Nicméně, z inaktivačních experimentů se zdá, že ProC může v biosyntéze

komplementovat funkci GriH, neboť delece *griH* v producentovi plně nezastavila produkci MPL.²⁰³

Na základě sekvenční homologie griselimycinových proteinů GriE, GriF a Apd6 homologu GriH s proteiny z biosyntézy intervencinového APD: Ivb1 (sekvenční identita ke GriE 48 %, pokrytí 99 %) Ivb2 (sekvenční identita ke GriF 57 %, pokrytí 98 %), Apd6 homolog Ivb3 (sekvenční identita ke GriH 45 %, pokrytí 97 %) se stejná biosyntetická dráha předpokládá i pro biosyntézu MPL inkorporovaného do recentně objeveného linkosamidu intervencinu.⁹⁷ Funkce žádného homologu z intervencinové biosyntézy ovšem nebyla dosud potvrzena přímým biochemickým průkazem.

2.5.2.1 Biosyntéza MPL jednotky malacidinů – další MPL vznikající z L-leucinu?

Bioinformatickou analýzou dat z metagenomové studie byl recentně další *apd6* homolog identifikován v BGS neznámého producenta malacidinů (z angl. metagenomic acidic lipopeptide antibiotic-cidins), dosud necharakterizované skupiny antibiotik produkované nekultivovatelnými půdními mikroorganismy.²³⁸ Na základě metagenomických dat byl molekulárně-genetickými přístupy zkonstruován malacidinový BGS, který byl následně konjugován a exprimován v *Streptomyces albus*. Z kultivačního média tohoto mutantního producenta byly izolovány dva majoritní produkty, malacidin A a malacidin B, jejichž struktura byla následně objasněna pomocí NMR (Obr. 2.24). Jedná se o cyklické lipopeptidy, které jsou tvořeny makrocyklem složeným z osmi aminokyselin a dále poly-nenasyceného lipidu, přičemž malacidin A a B se vzájemně liší pouze methylenovou skupinou na konci jejich lipidového řetězce. Mezi aminokyselinami je přítomna i MPL jednotka, jejíž biosyntetický původ dosud nebyl objasněn, byla ovšem predikována trojice genů, *mlcP*, *mlcQ* a *mlcR*, která by mohla kódovat jeho biosyntézu. Dle BLASTP analýzy jsou genové produkty MlcP, MlcQ a MlcR sekvenční homology griselimycinových proteinů GriH, GriF a GriE. Konkrétně, MlcP má 42% sekvenční identitu ke GriH (pokrytí 98%), MlcQ má sekvenční identitu ke GriF 62% (pokrytí 93%) a MlcR má sekvenční identitu ke GriE 51% (pokrytí 99 %). Podobně jako u intervencinu, i zde tedy lze ze složení genů a konfigurace inkorporovaného (2*S*,4*R*)-MPL předpokládat, že MPL jednotka bude syntetizována dráhou vycházející z L-leucinu zobrazenou na Obr. 2.23.



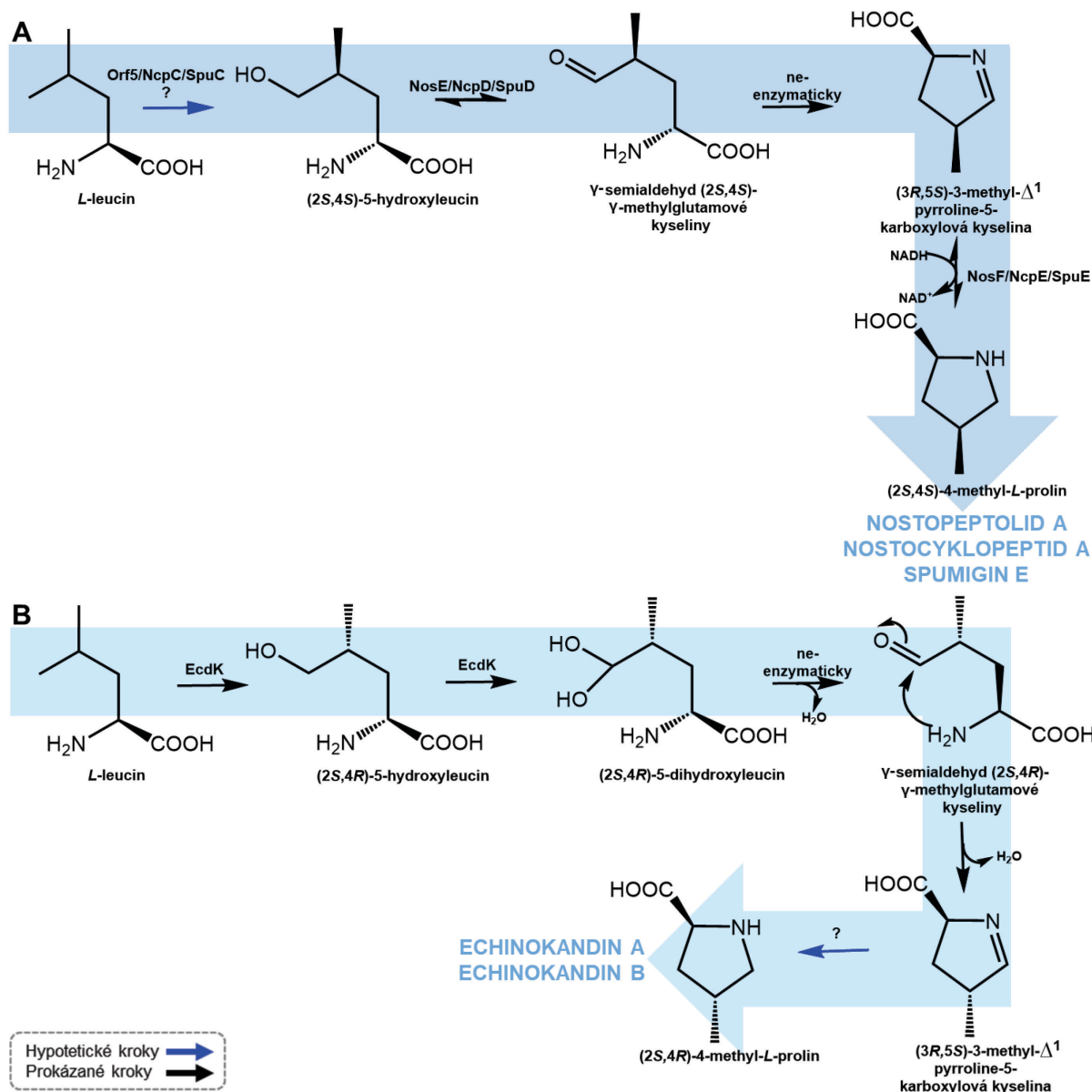
Obr. 2.24. **Chemická struktura malacidinu A a B.** Makrocyklus, který obsahuje osm aminokyselin, zahrnuje i MPL, který pravděpodobně vzniká stejnou dráhou jako MPL griselimycinu a intervencinu (MPL je zvýrazněn modře; převzato a upraveno²³⁸).

2.6 Methylprolinová dráha u sinic a hub – evoluční předchůdce aktinobakteriální MPL dráhy?

Predikovaná methylprolinová dráha uplatňující se v biosyntéze MPL-inkorporujících metabolitů produkovaných sinicemi a houbami vychází stejně jako u aktinobakteriální methylprolinové dráhy z L-leucinu, a dokonce zahrnuje identické (sinice) či velmi podobné (houby) biosyntetické reakce. Nicméně, podstatným rozdílem je závěrečný redukční krok, který u methylprolinové dráhy sinic a hub nekatalyzuje Apd6 homologní protein, ale reduktasa, která je homologní enzymu z centrálního metabolismu. Lze tedy předpokládat, že methylprolinová dráha uplatňující se v biosyntéze metabolitů inkorporujících MPL produkovaných sinicemi a houbami je evolučním předchůdcem methylprolinové dráhy zahrnující specializovaný Apd6 protein, která se uplatňuje v Actinobacteria.

Biosyntetická dráha (2S,4S)-MPL jednotky inkorporované do metabolitů sinic (Obr. 2.25A) byla objasněna na biosyntéze nostopeptolidu A produkovaného rodem *Nostoc* sp. GSV224 na genové úrovni,²³⁹ funkce některých zúčastněných proteinů byly dokonce prokázány *in vitro*.²⁴⁰ Později byly publikovány i sekvence BGS producentů dalších metabolitů sinic s inkorporovaným (2S,4S)-MPL – nostocyklopeptidů A (*Nostoc* sp. ATCC 53789)²⁴¹ a spumiginu E (*Nodularia spumigena* CCY9414).¹⁹³

Biosyntetická dráha (2S,4R)-MPL inkorporovaného do echinokandinů (Obr. 2.25B) se částečně liší od methylprolinové dráhy sinicových metabolitů a představuje tak třetí samostatnou větev biosyntézy MPL.^{197,242}



Obr. 2.25. Schéma methylprolinových drah vedoucích k MPL, které jsou inkorporovány do metabolitů produkovaných sinicemi a houbami. (A) Dráha (2S,4S)-MPL v biosyntéze nostopeptolidu A, nostocyklopeptidu A a spumiginu E (sinicové metabolity) a (B) dráha (2S,4R)-MPL v biosyntéze echinokandinů (houbové metabolity; převzato a upraveno^{240,242}). Ani v jedné dráze nevystupuje žádný z Apd homologů.

2.6.1 Methylprolinová dráha u sinic

V prvním kroku je L-leucin konvertován na (2S,4S)-5-hydroxyleucin. Enzym katalyzující tuto reakci v *Nostoc* sp. GSV224 nebyl na enzymatické úrovni determinován. Nicméně, na základě analýzy BGS producenta byl jako kandidát katalyzující tuto reakci predikován genový produkt *orf5*.²³⁹ Homology *orf5* byly nalezeny i v BGS producentů nostocyklopeptidů A a spumiginu E (*npcC*, resp. *spuC*).^{193,241} Zajímavé je, že proteiny kódované těmito geny nemají sekvenční homology k žádným anotovaným proteinům.

V následujícím kroku Zn-závislá dehydrogenasa (kódovaná *nosE*) z rodiny MDR (z angl. medium chain reductase/dehydrogenase) a Zn-závislých alkohol dehydrogenasam-

podobným proteinů, konvertuje (2S,4S)-5-hydroxyleucin na γ -semialdehyd kyseliny (3S,5S)- γ -methylglutamové, který spontánně cyklizuje do formy (2S,4S)-3-methyl- Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylové kyseliny (Me-5PC). Homology *nosE* byly opět identifikovány i v BGS producentů nostocyklopeptidů A i spumiginu E (*ncpD*, resp. *spuD*).^{193,241} Proteiny NosE/NcpD (sekvenční identita k NosE 98 %)/SpuD (sekvenční identita k NosE 91 %) nejsou sekvenčními homology proteinů z biosyntézy griselimycinu a intervencinu – GriF, resp. Ivb1.

Závěrečná redukce Me-5PC je katalyzována NADH-závislou reduktasou (kódovanou *nosF*) z pyrrolin-5-karboxylát reduktasové rodiny proteinů, jejíž homology taktéž byly identifikovány i v BGS producentů nostocyklopeptidů A a spumiginu E (*ncpE*, resp. *spuE*).^{193,241} NcpE má sekvenční identitu k NosF 92 %, SpuE má sekvenční identitu k NosF 81 %. Analogicky, taktéž se nejedná o Apd6, ale jde o homology proteinu ProC ze základního metabolismu. Co je podstatné, na rozdíl od MPL vznikajícího v methylprolinové dráze uplatňující se u Actinobacteria (s konfigurací (2S,4R)) má MPL vznikající v této dráze konfiguraci (2S,4S).

2.6.2 Methylprolinová dráha u hub

Biosyntéza MPL inkorporovaného do houbových metabolitů echinokandinů taktéž vychází z L-leucinu. V prvním kroku dochází stejně jako v methylprolinové dráze sinic k hydroxylaci. Reakci zde ovšem katalyzuje zcela odlišná hydroxylasa EcdK,²⁴² protein, který je podobný nehemovým Fe, α -ketoglutarát-závislým dioxygenasam.¹⁹⁷ Na rozdíl od jednonásobné hydroxylace L-leucinu pomocí Orf5/NcpC/SupC predikované v methylprolinové dráze sinicových metabolitů, EcdK katalyzuje tandemovou hydroxylaci L-leucinu, která vede k formaci γ -semialdehydu kyseliny (3S,5S)- γ -methylglutamové, který dále spontánně cyklizuje do formy 3-methyl- Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylové kyseliny.

Predikovaná závěrečná redukce by měla vést k formaci MPL v konfiguraci (2S,4R). Tuto reakci pravděpodobně katalyzuje, podobně jako v methylprolinové dráze sinic, protein z pyrrolin-5-karboxylát reduktasové rodiny proteinů, konkrétní gen kódující tento enzym však nebyl dosud determinován.¹⁹⁷

3 CÍLE PRÁCE

Tato práce cílí na objasnění role Apd6 proteinů v biosyntéze APD prekurzorů. Cílem je také jejich detailní charakterizace, neboť se jedná o proteiny patřící dle své sekvenční podobnosti k LLHT rodině proteinů, která do dnešního dne nikdy nebyla ve specializovaném metabolismu bakterií popsána. Dílčí cíle byly stanoveny následovně:

1. Příprava Apd6 rekombinantních proteinů

- Příprava expresních konstruktů pro heterologní produkci proteinů
 - o LmbY (Apd6 z biosyntézy linkomycinu)
 - o SibT, Por15, Lim12 (Apd6 z biosyntézy PBD)
 - o HrmD (Apd6 z biosyntézy hormaomycinu)
 - o GriH (Apd6 z biosyntézy griselimycinu)
- Heterologní produkce a purifikace Apd6 proteinů
- Základní charakterizace proteinů
 - o Určení přesné molekulové hmotnosti proteinů za účelem vyloučení vazby kofaktorů během exprese a purifikace, stanovení kvartérní struktury
 - o Determinace vazebných schopností ke kofaktoru

2. Přímý biochemický průkaz předpokládané enzymové aktivity Apd6 proteinů

- Příprava F₄₂₀-regeneračního systému a předpokládaného substrátu
- *In vitro* stanovení enzymové aktivity
 - o LmbY
 - o SibT, Por15, Lim12
 - o HrmD
 - o GriH

3. Objasnění redukčního mechanismu LmbY

- Návrh redukčního mechanismu LmbY
 - o Experimentální důkaz hypotézy o mechanismu redukce katalyzované LmbY

4. Objasnění podstaty rozdílné reakční specifity Apd6 homologů

- Stanovení hypotézy o vazbě substrátu a kofaktoru do aktivního místa Apd6 proteinů
 - o Cílená mutagenese předpokládaného aktivního místa
 - o Příprava krystalů pro stanovení 3D struktury LmbY a Por15

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
[1,1'-bis(difenylfosfino)ferocen]dichloropaladium(II) (Pd(dppf)Cl ₂)	Sigma-Aldrich
1,3-diazoacyklopenta-2,4-diene (imidazol)	Sigma-Aldrich
2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2', 2''-nitrilotriethanol (Bis-Tris)	Fluka
6× DNA vzorkový pufr (Gel Loading Dye Purple)	Bio-Labs
7H10 základ agaru	Middlebrook
7H9 základ média	Middlebrook
Acetonitril	Biosolve
Adenosin trifosfát (ATP)	Ferementas
Agar	Oxoid
Agarosa	Invitrogen
Akrylamid	Sigma-Aldrich
Betain	Sigma-Aldrich
Bis(dibenzylidenaceton)paladium(0) (Pd(dba) ₂)	Sigma-Aldrich
Bromfenolová modř	P-Lab
Cellytic™ B cell lysis reagent (lyzační roztok)	Sigma-Aldrich
Comassie brilliant blue G-250	Serva
Comassie brilliant blue R-250	Serva
Cyklohexan	VWR Chemicals
D ₂ O	VWR Chemicals
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dioxan	VWR Chemicals
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma-Aldrich
Ethidium bromid	Sigma-Aldrich
Ethyl acetát	Sigma-Aldrich
Ethyldiaminotetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát (EDTA)	Sigma-Aldrich
Flavinadeninukleotid (FAD)	Sigma-Aldrich
Flavinmononukleotid (FMN)	Sigma-Aldrich
Glukosa	Lach-ner
Glukosa-6-fosfát	Roche
Glycerol	Lachema
Glycin	VWR Chemicals
Hydrogenfosforečnan draselný (K ₂ HPO ₄)	Lach-ner
Hydrogenfosforečnan sodný (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich

Hydroxid amonný (NH ₄ OH)	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný (NaOH)	Lach-ner
Chlorid amonný (NH ₄ Cl)	Penta
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	Lachema
Chlorid sodný (NaCl)	Lach-ner
Chlorid zinečnatý (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Lachema
Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Jodid cesný (CsI)	Supelco
Kvasinkový extrakt	Oxoid
Kyselina chlorovodíková (HCl)	VWR Chemicals
Kyselina mravenčí (HCOOH)	Fluka
Kyselina octová (CH ₃ COOH)	Lachema
Manitol	Sigma-Aldrich
Merkaptoethanol	Serva
Methanol	Biosolve
Myoglobin	Supelco
N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED)	Serva
N,N'-methylenbisakrylamid (Bisakrylamid)	Icon Biomedicals
NebBuffer 4	New England BioLabs
N-methylpyrrolidin-2-on (NMP)	VWR Chemicals
Nonidet P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol	Amresco
Nukleosid trifosfátová směs (dNTP)	Fermetnas
Octan amonný (C ₂ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich
Oxid křemičitý (SiO ₂)	Sigma-Aldrich
Pepton	Amresco
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Sigma-Aldrich
Síran amonný (NH ₄) ₂ SO ₄	Lachema
Síran hořečnatý heptahydrát (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Merck
Síran manganatý heptahydrát (MnSO ₄ ·7H ₂ O)	Merck
Síran nikelnatý (NiSO ₄)	Sigma-Aldrich
Síran sodný (Na ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Síran zinečnatý heptahydrát (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	Lachema
Síran železnatý heptahydrát (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	Penta
Sladový extrakt	Thermo Fisher Scientific
Sójová mouka	Paleta
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-Aldrich
Tri(2-furyl)fosfin	Sigma-Aldrich
Tributyl(vinyl)tin	Sigma-Aldrich

Tricin	Sigma-Aldrich
Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Trypton	Difco
Tween 80	Sigma-Aldrich
Uhličitan cesný (Cs_2CO_3)	Sigma-Aldrich
Uhličitan vápenatý (CaCO_3)	Lachema
Vinyl trifluoroborát draselný	Sigma-Aldrich

4.1.2 Enzymy

Enzym	Výrobce
Alkalická fosfatasa CIP ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
DpnI ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
EcoRI-HF™ ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
Expand™ High Fidelity polymerasový mix ($3,5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	Roche
LA DNA polymerasový mix ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	Top-Bio
Lysozym (z kuřecích vaječných bílků, $40 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)	Sigma-Aldrich
NdeI ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
Q5® High-Fidelity DNA polymerasa ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
RNasa A (z hovězého pankreatu, $70 \text{ Kunitz U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Sigma-Aldrich
T4 DNA ligasa ($400 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs
XhoI ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	New England BioLabs

4.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Výrobce	Zásobní Koncentrace* / Selekcce vektoru
Chloramfenikol	Sigma-Aldrich	$34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ – rozpuštěn v ethanolu/ pGroESL
Kanamycin	Sigma-Aldrich	$30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ – rozpuštěn ve sterilní dH_2O / pET-28b(+), pET-42b(+)

*Antibiotika byla připravována jako 1000× koncentrovanější zásobní roztok.

4.1.4 Standardy, referenční látky

Standard/Referenční Látka	Výrobce	Specifikace
1kb Plus DNA Ladder (standard molekulových velikostí DNA)	Invitrogen	Velikost fragmentů [bp]: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000. Před použitím byl standard připraven dle návodu výrobce.

3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteropropionová kyselina (TSP)	Sigma-Aldrich	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{Na}$
Látka 6a	Připraveno dle Kameník et al. 2009 ²⁴³	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$
Látka 6b	Připraveno dle Kadlčík et al. 2013 ²¹⁰	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2$
Látka 7a	Připraveno dle Kameník et al. 2017 ²³⁶	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$
Leucin-Enkefalin acetát	Waters	$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot x\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (standard molekulových hmotností proteinů)	Thermo Fisher Scientific	Molekulové hmotnosti [kDa]: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

4.1.5 Kity

Název kitu	Výrobce
BCS Screen	Molecular Dimensions
JCSG+ Suite	Qiagen
PACT <i>premier</i> ™ HT-96/FX-96	Molecular Dimensions
Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel
SG1™ Screen	Molecular Dimensions
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega
Wizard® Plus SV Gel and PCR DNA Clean-Up System	Promega
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
XP Screen	Jena Bioscience

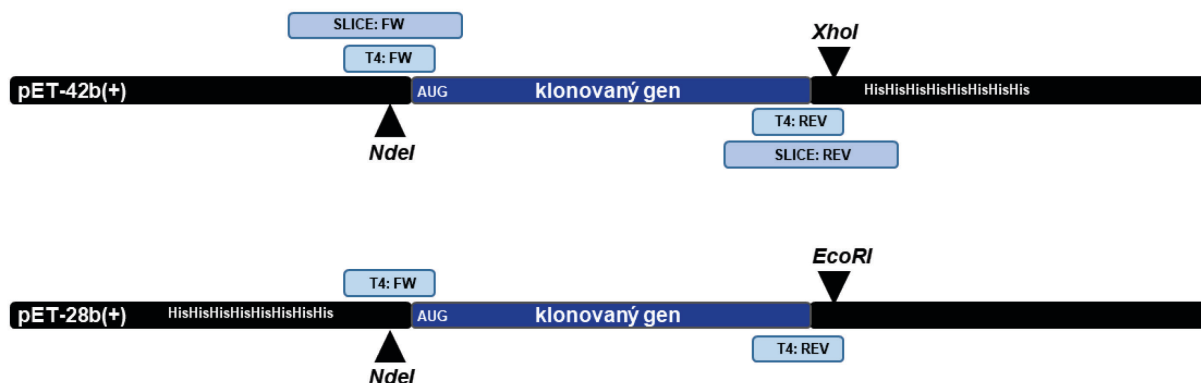
4.1.6 Syntetické oligonukleotidy

Syntetické primery použité v této práci byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich. Lyofilizované oligonukleotidy byly rozpuštěny v TE^{-1} pufru na zásobní koncentraci 100 μM . Pro PCR reakce byly primery ze zásobního roztoku dále 10 \times ředěny. Tab. 4.1 uvádí primery použité k amplifikaci genů pro klonování do expresních vektorů (kap. 4.2.2.9 a 4.2.2.10). Obr. 4.1 pak ukazuje zjednodušené schéma navrhovaných primerů. V Tab. 4.2 jsou uvedeny primery použité pro PCR zprostředkovanou cílenou bodovou mutagenезí *apd6* genů (kap. 4.2.2.6.3).

Tab. 4.1. Primery použité pro amplifikaci genů *lmbY*, *sibT*, *por15*, *lim12*, *hrmD*, *griH* a *fgd*. Restrikční místa užitá pro inzerci do vektorů jsou podtržena.

Gen	Přímý primer (5' → 3')	Zpětný primer (5' → 3')
<i>lmbY</i>	CAGCATATGCGCCACGGTGTCTGTA TCCTG	GAGCTCGAGTGCTTCCCTCCGGTGCG C
<i>sibT</i>	CTACATATGCGGCACGGAGTCCTGAT	CTGGAATTCTCATCCATCCCCCTGTA

<i>por15</i>	TTGCATATGAAGCACGGCATCGT	ATTCTCGAGTATGCATCGTTCCC
<i>lim12</i>	CTACATATGCGCCACGGGATCGTCAT	CTAGAATTCTCAGACATCCGGCCCTC
<i>hrmD</i>	AGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAA GGAGATATACATGTGCGCGTCGGAG TGGTGAT	TAATCAATTAGTGGTGGTGGTGGTGG TGGTGGTGGTCCGAGGAGTGC GCGCA CCCGCGGCA
<i>griH</i>	TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACATATGACTCGAAG GATGCGC	ATTAATCAATTAGTGGTGGTGGTGGT GGTGGTGGTGGTCCGAGCAATTTCCC TGGTGCGGT
<i>fgd</i>	CGGAAGCATATG GTGGCTGAATTGAA	ATATAGAATTCTCAGGCCAGCTTGCG CA



Obr. 4.1. Zjednodušené schéma klonování genů do vektorů pET-42b(+) a pET-28b(+). SLICE:FW – přímý primer pro ligaci metodou SLiCE (kap. 4.2.2.9), SLICE:REV – zpětný primer pro ligaci metodou SLICE, T4:FW – přímý primer pro ligaci T4 DNA ligasou (kap. 4.2.2.10), T4:REV – zpětný primer pro ligaci T4 DNA ligasou.

Tab. 4.2. Primery použité pro PCR zprostředkovanou cílenou mutagenезi *apd6* genů.

Mutovaný gen	Přímý primer (5' → 3')	Zpětný primer (5' → 3')
<i>lmbY_D38A</i>	CCACGCCTGGACCTACGCCACG TGAAGTGGCGC	GCGCCACTTCACGTGGGCGTAG GTCCAGGCGTGG
<i>lmbY_H39A</i>	CCTGGACCTACGACGCAGTGAAG TGGCGCTG	CAGCGCCACTTCACTGCGTCGTA GGTCCAGG
<i>lmbY_K41A</i>	ACCTACGACCACGTGGCGTGCC GCTGGCTGAGC	GCTCAGCCAGCGCCACGCCACG TGGTCGTAGGT
<i>lmbY_K41S</i>	CCTACGACCACGTGTCTTGGCGC TGGCTGAGCG	CGCTCAGCCAGCGCCAAGACAC GTGGTCGTAGG
<i>lmbY_K41V</i>	CCTACGACCACGTGGTTTGGCGC TGGCTGAGCG	CGCTCAGCCAGCGCCAACCACG TGGTCGTAGG
<i>lmbY_W42A</i>	CTACGACCACGTGAAGGCCCGCT GGCTGAGCGACC	GGTCGCTCAGCCAGCGGGCCTT CACGTGGTCGTAG
<i>lmbY_R43A</i>	CGACCACGTGAAGTGGGCCTGG CTGAGCGACCGCC	GGCGGTCGCTCAGCCAGGCCCA CTTACGTGGTCG
<i>lmbY_K41Q</i>	CCTACGACCACGTCAATGGCGCT GGCTGAGCG	CGCTCAGCCAGCGCCATTGCACG TGGTCGTAGG
<i>lmbY_K41M</i>	CCTACGACCACGTGATGTGGCGC TGGCTGAGCG	CGCTCAGCCAGCGCCACATCAGC TGGTCGTAGG
<i>por15_M41K</i>	CCTATGACCACCTGAAGTGGCGC TGGCTGGCC	GGCCAGCCAGCGCCACTTCAGGT GGTCATAGG
<i>griH_Q41K</i>	GGACATATGACCATTTGAAGTGG CGATGGCTGAGCG	CGCTCAGCCATCGCCACTTCAA TGGTCATATGTCC
<i>lmbY_H15K</i>	GGTGTGCTGATCCTGCCCGAGCA CAAATGGGCCAGAGCCCGTGAAT TATGG	CCATAATTCAGGGGCTCTGGCCC ATTTGTGCTCGGGCAGGATCAGC ACACC

<i>ImbY_A17K</i>	CCCGAGCACCCTGGAAGAGAG CCCGTGAATTA	TAATTCACGGGCTCTCTTCCAGT GGTGCTCGGG
<i>por15_K15H</i>	CTGCTCCCCGAGCACCCTGGAA GGCGGCGGCC	GGCCGCCGCTTCCAGTGGTGCT CGGGGAGCAG
<i>por15_K17A</i>	CCCGAGCACAAGTGGGCGGCGG CGGCCGAGCGC	GCGCTCGGCCGCCGCCGCCAC TTGTGCTCGGG
<i>ImbY_VK40,41LM</i>	TGGACCTACGACCACCTGATGTG GCGCTGGCTGAGC	GCTCAGCCAGCGCCACATCAGGT GGTCGTAGGTCCA
<i>por15_LM40,41VK</i>	TGGACCTATGACCACGTGAAGTG GCGCTGGCTGGCC	GGCCAGCCAGCGCCACTTACAGT GGTCATAGGTCCA
<i>ImbY_HA15,17KK</i>	GGTGTGCTGATCCTGCCCGAGCA CAAATGGAAGAGCCCGTGAAT TATGG	CCATAATTCACGGGCTCTTTTCCA TTTGTGCTCGGGCAGGATCACGA CACC
<i>por15_KK15,17HA</i>	GGCATCGTGCTGCTCCCCGAGCA CCATTGGGCAGCGGCGGCCGAG CGCTGG	CCAGCGCTCGGCCGCCGCTGCC CAATGGTGCTCGGGGAGCAGCA CGATGCC

4.1.7 Přístrojové vybavení, aparatury, chromatografické kolony

Přístroj/Aparatura/Kolona	Výrobce
15 Tesla Bruker Solarix FT-ICR (hmotnostní spektrometr)	Bruker
600 MHz Bruker AVANCE III (spektrometr NMR)	Rheinstetten
Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µM, 2,1 mm × 50 mm (chromatografická kolona)	Waters
Acquity UPLC System (kapalinový chromatograf)	Waters
Akta Purifier (kapalinový chromatograf)	GE Healthcare
BioFrac Fraction Collector (automatický sběrač frakcí)	GE Healthcare
D8 Venture (difraktometr)	Bruker
ENrich™ Q 5 × 50 mm (chromatografická kolona)	Bio-Rad
ENrich™ SEC 650 10 × 300 (chromatografická kolona)	Bio-Rad
Extraction Manifold (aparatura pro SPE)	Waters
Gryphon Dropsetter (krystalizační robot)	Art Robbins
Heraeus Biofuge Pico (mikrocentrifuga)	Heraeus
HILIC (chromatografická kolona)	Waters
HiTrap™ Chelating HP 1ml (chromatografická kolona)	GE Healthcare Life Sciences
HiTrap™ Chelating HP 5ml (chromatografická kolona)	GE Healthcare Life Sciences
Imobilizovaná pepsinová kolona (chromatografická kolona)	Připraveno dle Kadek et al. 2014 ²⁴⁴
Juan BR4i (multifunkční centrifuga)	Thermo Fisher Scientific
Krystalizační hotel RI1000	Formulatrix
LCT Premier XE (hmotnostní spektrometr)	Waters
IKA IKAMAG RH basic 2 (magnetická míchačka s ohřevem)	Verkon
Mini-Protean® Tetra Cell (aparatura pro SDS-elektroforézu)	Bio-Rad
Nanodrop ND-800 (spektrofotometr)	Thermo Scientific
Peristaltická Pumpa P-1	Pharmacia Biotech
Heating Bath B-491 (rotační vakuová odparka)	BUCHI
SPD1010 SpeedVac System	Thermo Savant

Spektrofotometr Hexios γ	Unicam
Synergy H1 Hybrid Reader (spektrofluorometr)	BioTek
TGradient Thermocycler 96	Biometra
Ultrasonic Homogenizer 4710 (ultrazvukový homogenizátor)	Cole-Parmer
Unitron (třepačka s rotačním pohybem)	Infors
J6MI (centrifuga)	Beckman Coulter
Waters Synapt G2Si (hmotnostní spektrometr)	Waters
ZORBAX 300SB-C18 (chromatografická kolona)	Agilent Technologies

4.1.8 Softwarové vybavení, on-line databáze a nástroje

Program/Nástroj	Poskytoval/On-line přístup	Specifikace
BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool)	National Center for Biotechnology Information (NCBI) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins	Algoritmus pro srovnávání proteinových informací sekvencí
Bruker Compass DataAnalysis 4.1	Bruker	Program na zpracování MS dat
Conserved Domains Database	NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	Databáze pro funkční anotaci proteinů, včetně vyhledávání konzervovaných domén
Cytoscape 3.5.0	Cytoscape Consortium ¹²⁹	Software pro vizualizaci molekulárních interakčních sítí
EFI-EST (Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool)	http://efi.igb.illinois.edu/efi-est/	On-line analyzátor sekvencí podobnosti proteinů
GenBank	NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Genová databáze
Geneious 5.5.9	Geneious Biologics	Bioinformatický software pro analýzu sekvencí dat
ChemDraw 13.0.2.3021	PerkinElmer	Kreslení chemických vzorců a schémat
Kaleidagraph 4.5.2	Synergy Software	Program na tvorbu grafů a analýzu dat
MAFFT 7 (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)	http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	Program na vytváření proteinových sekvencí srovnání
MASCOT	David Perkins, Darryl Pappin PBID: 10612281.	Software pro identifikaci proteinů na základě získaných MS dat z databází sekvencí peptidů
MassLynx™ 4.1	Waters	Vyhodnocování MS dat
MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	Ref. ²⁴⁵	Software pro tvorbu fylogenetických analýz
Mendeley 1.19.3	Mendeley	Citační software
PEAKS	Bioinformatics Solutions Inc.	Proteomický software pro identifikaci proteinů na základě MS/MS dat
TopSpin 3.5	Bruker	Software pro vyhodnocování NMR dat

4.1.9 Bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Původ	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene	<i>F</i> – <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (<i>rB</i> – <i>mB</i> –) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5</i> - <i>T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> +] _{K-12} (λ ^S)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)/pGroESL	Novagen	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) s vloženým plazmidem pGroESL
<i>Escherichia coli</i> XL ⁻¹ blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacIq ZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Mgr. Libor Krásný, Ph.D., (Akademie věd České republiky, v.v.i.)	Typový kmen
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 39897	The American Type Culture Collection (ATCC)	Typový kmen produkující porothramycin
<i>Streptomyces griseoflavus</i> TU4000	Prof. Joshua A. V. Blodgett, John D'Alessandro (Washington University in Saint Louis)	Typový kmen produkující hormaomycin
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	Typový kmen produkující linkomycin
<i>Streptomyces lincolnensis</i> ATCC 25466 Δ <i>ImbY</i>	Připraven v laboratoři ²¹⁸	Odvozen z typového kmene <i>S. lincolnensis</i> ; gen <i>ImbY</i> byl ze dvou třetin nahrazen inaktivační kazetou nesoucí gen kódující rezistenci k apramycinu
<i>Streptomyces muensis</i>	DSMZ	Typový kmen produkující griselimycin
<i>Streptomyces</i> sp. ICBB 1877	Prof. Taifo Mahmud (Oregon State University)	Typový kmen produkující limazepin
<i>Streptosporangium sibiricum</i> ATCC 29053	ATCC	Typový kmen produkující sibiromycin

4.1.10 Vektory

Vektor	Původ	Specifikace
pET-28b(+)	Novagen	5,4 kbp; expresní vektor obsahující T7 promotor, <i>lac</i> operátor, vazebné místo pro ribozom, gen kódující Lac represor (<i>lacI</i>) a polyklonovací místo; jako selekční znak nese rezistenci ke kanamycinu; lze vkládat geny pro produkci proteinů s C- či N-histidinovou kotvou, exprese vloženého genu je indukována přidáním IPTG, který se váže na represor uvolněný z <i>lac</i> operátoru; vektor byl použit pro produkci proteinů s N-histidinovou kotvou
pET-42b(+)	Novagen	5,9 kbp; expresní vektor obsahující T7 promotor, <i>lac</i> operátor, vazebné místo pro ribozom, gen kódující Lac represor (<i>lacI</i>) a polyklonovací místo; jako selekční znak nese rezistenci ke kanamycinu; lze vkládat geny pro produkci proteinů s C- či N-histidinovou kotvou, exprese vloženého genu je indukována přidáním IPTG, který se váže na represor uvolněný z <i>lac</i> operátoru; vektor byl použit pro produkci proteinů s C-histidinovou kotvou
pLK6	Připraven v laboratoři ²⁰⁷	46,1 kbp; kosmid nese sekvenci vektoru SuperCos I (Stratagene), do které je vložen linkomycinový BGS; jako selekční znak nese gen pro rezistenci ke kanamycinu a karbenicilinu

4.1.11 Média a půdy pro kultivaci bakterií

Název média/půdy	Chemické složení
2XYT	16 g trypton, 10 g kvasinkový extrakt, 5 g NaCl, dH ₂ O do objemu 1 000 ml; pH 7,2
50× M	3,6 g Na ₂ HPO ₄ , 3,4 g KH ₂ PO ₄ , 2,7 g NH ₄ Cl, 0,7 g Na ₂ SO ₄
7H10 agar	19 g 7H10 základu agaru, 0,2% glycerol, dH ₂ O do objemu 1 000 ml; pH neupravováno
7H9 médium	4,7 g 7H9 základu média, 0,2% glycerol, dH ₂ O do objemu 1 000 ml; pH neupravováno; po sterilizaci: 250 µl 20% Tween 80
AVM médium	2 g kvasinkový extrakt, 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 g CaCO ₃ , 2 g NaCl, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,05 g FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0,05 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,05 g MnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, dH ₂ O do 880 ml; pH 7,4; po sterilizaci: 120 ml 25% glukosa
LB agar	1 000 ml LB médium, 15 g agar; pH dále neupravováno
LB médium	10 g NaCl, 10 g trypton, 10 g kvasinkový extrakt, dH ₂ O do objemu 1 000 ml; pH 7,5
Médium pro přípravu kompetentních buněk A	1 000 ml LB médium, 2,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 2 g glukosa; pH neupravováno
Médium pro přípravu kompetentních buněk B	1 000 ml LB médium, 3 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 36% glycerol, 12% PEG 8000; pH neupravováno

MS agar	20 g manitol, 20 g sójová mouka, 20 g agar, vodovodní H ₂ O do 1 000 ml; pH neupravováno
Obohacené LB médium pro nárůst kultury do vysoké denzity	975 ml LB médium, 0,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5% glycerol, 20 ml 50× M; pH neupravováno
YEME médium	3 g kvasinkový extrakt, 5 g pepton, 3 g sladový extrakt, dH ₂ O do 980 ml; pH 7,2; po sterilizaci: 20 ml 50% glukosa, 2 ml 2,5 M MgCl ₂

4.1.12 Pufry, roztoky

PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ PRO HETEROLOGNÍ EXPRESI

Pufr/Roztok	Chemické složení
1kb Plus DNA standard molekulových velikostí DNA	100 µl standardu, 100 µl 10× vzorkového pufru, 800 µl TE ⁻¹ pufru
TAE elektrodový pufr	1 mM EDTA; 40 mM Tris-acetát; pH 8,0
TE ⁻¹ pufr	0,1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH 8,0

PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE PROTEINŮ

Pufr/Roztok	Chemické složení
Acetátový pufr	200 mM CH ₃ COOH; pH upraveno NH ₄ OH na 7,5
Glycinový pufr	250 mM glycin; pH 2,3
Octanový pufr (5 mM)	5 mM C ₂ H ₇ NO ₂ ; pH neupravováno
Octanový pufr (200 mM)	200 mM C ₂ H ₇ NO ₂ ; pH 7,5
Pufr A pro iontově výměnnou chromatografii	20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0
Pufr B pro iontově výměnnou chromatografii	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0
Pufr pro gelovou filtraci	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0
SDS-PAGE barvicí roztok	50% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; pH neupravováno
SDS-PAGE elektrodový pufr	15 mM Bis-Tris-HCl, 50 mM tricin, 0,0002% Coomassie blue G-250 (w/v); pH 7,0
SDS-PAGE odbarvovací roztok	10% methanol, 10% kyselina octová
SDS-PAGE Tris-HCl pufr A	1,875 M Tris-HCl; pH 8,9
SDS-PAGE Tris-HCl pufr B	1 M Tris-HCl; pH 6,9
SDS-PAGE vzorkový pufr, 2× koncentrovaný	125 mM Tris-HCl, 20% glycerol, 5% merkaptoethanol, 2% SDS, 0,002% bromfenolová modř; pH 6,8
Tris-HCl eluční pufr	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 250 mM imidazol; pH 8,0
Tris-HCl eluční pufr pro krystalizaci	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM imidazol, 5% glycerol; pH 8,0
Tris-HCl promývací pufry	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50/75/100 mM imidazol; pH 8,0

Tris-HCl promývací pufr pro krystalizaci	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 75 mM imidazol, 5% glycerol; pH 8,0
Tris-HCl pufr pro krystalizaci	20 mM Tris-HCl; pH 8,0
Tris-HCl reakční pufr	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 7,0
Tris-HCl sonikační pufr	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 8,0
Tris-HCl sonikační pufr pro krystalizaci	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM imidazol, 5% glycerol; pH 8,0

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace bakterií

4.2.1.1 Měření bakteriálního růstu stanovením optické hustoty

Spektrofotometrické stanovení optické hustoty (OD) bakteriální kultury je jednoduchá metoda stanovení koncentrace buněk v suspenzi. Jako pozadí je používán identický roztok (nejčastěji kultivační médium), ovšem neobsahující žádné buňky. Standardně používaná vlnová délka pro měření OD je ~ 600 nm (OD_{600}), tedy UV oblast světla, která jednak buňky neusmrcuje a zároveň pouze minimálně interferuje se žlutě zabarveným LB médiem, které je často při kultivacích používáno. Lineární závislost OD na skutečné hustotě závisí na konkrétním typu používaného spektrofotometru, většinou je jako hranice lineární závislosti považována hodnota OD 0,4 – 0,5. Vzhledem k tomu je nutné při měření bohatě narostlých kultur využít ředící řady a OD z naměřených hodnot kalkulovat.

OD_{600} kultur byly měřena při přípravě kompetentních buněk a při heterologních produkcích proteinů. K měření byl využit spektrofotometr Hexios γ (Unicam).

4.2.1.2 Kultivace *E. coli*

Všechny použité kmeny *E. coli* byly kultivovány na LB agarových plotnách či v LB médiu. Pro selekci transformantů byla do agaru/média přidána antibiotika (kanamycin, chloramfenikol) v odpovídající koncentraci. Standardní růstová teplota byla 37°C, proteiny byly nadprodukovány při postindukčních teplotách 17°C, 28°C a 37°C. Rychlost třepání byla udržována mezi 180 – 200 RPM. Kultury byly kultivovány v rotační třepačce Unitron (Infors).

4.2.1.2.1 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

E. coli byla z konzervy vyseta na LB agarovou plotnu, kde byla staticky kultivována ve 37°C přes noc. Poté byla jedna kolonie zaočkována do 2 ml LB média a kultivována v třepačce ve 37°C přes noc. Následující den byl 1 ml narostlé kultury přeočkován do média A,

na počátku kultivace byla $OD_{600} \sim 0,04$. Kultura rostla při 37°C do $OD_{600} 0,4 - 0,6$. Narostlá kultura byla na 10 min přemístěna do ledové lázně a následně centrifugována při 4 000× g, 10 min, 4°C (Juan BR4i, Thermo Fisher Scientific). Sediment byl šetrně resuspendován v 1 ml média A a následně byla homogenní buněčná suspenze naředěna 5 ml vychlazeného média B. Takto připravené kompetentní buňky byly rozděleny na 100- μ l alikvoty, které byly bezprostředně použity nebo uchovávány v -80°C pro pozdější použití.

4.2.1.2.2 Příprava buněčného lyzátu *E. coli* pro SLiCE ligaci

Bakteriální buněčný extrakt užívaný pro SLiCE ligaci (kap. 4.2.2.9) může být připraven z různých RecA-nezávislých laboratorních kmenů *E. coli*. V naší laboratoři je připravován extrakt z kmene *E. coli* JM109. *E. coli* JM 109 byla z konzervy vyseta na LB agarovou plotnu a staticky kultivována při 37°C přes noc. Následující den byla jedna kolonie inokulována do 25 ml 2XYT média a kultivována v třepačce při 37°C přes noc. Noční kultura byla přeočkována do 50 ml 2XYT média na počáteční $OD_{600} \sim 0,03$ a kultivována při 37°C do $OD_{600} \sim 5,0 - 5,5$. Po dosažení požadované hustoty nárůstu buněk byla kultura centrifugována při 4 000× g, 20 min, 4°C. Sediment byl promyt 100 ml sterilní destilované H₂O (dH₂O) a buňky byly opět sedimentovány při 4 000× g, 20 min, 4°C. Sediment byl resuspendován v 600 μ l lyzačního roztoku (CellLytic™ B Cell Lysis Reagent). Směs byla inkubována po dobu 10 min při laboratorní teplotě a poté centrifugována při 20 000× g, 2 min, při laboratorní teplotě. Supernatant byl opatrně oddělen od nerozpustných buněčných komponent a smíchan se stejným objemem sterilního 100% glycerolu. Takto připravený extrakt byl rozdělen na 50- μ l alikvoty a buď byl bezprostředně použit, případně byl pro pozdější použití uchováván v -80°C.

4.2.1.3 Kultivace bakterií rodů *Streptomyces* a *Streptosporangium*

Všechny použité kmeny streptomycet a streptosporangium byly kultivovány dle stejného protokolu. Nejprve byl kmen vyset z konzervy na MS agarovou plotnu, kde byl staticky kultivován při 28°C po dobu 72 - 120 h, dokud se neobjevily spóry. Ty byly následně klíčkovou inokulovány do 40 ml YEME média. První generace byla kultivována v třepačce v 500-ml Erlenmeyerových baňkách ve 28°C po dobu 24 h. Poté byly inokulovány 2 ml kultury první generace do 40 ml AVM média. Druhá generace byla kultivována za stejných podmínek po dobu 120 h. Biomasa byla sklizena centrifugací při 5 000× g, 15 min, 4°C. Buňky byly následně využity pro izolaci chromozomální DNA *S. albus* subsp. *albus*, *S. sibiricum*, *S. sp.* ICBB 1877, *S. griseoflavus* a *S. muensis*. Supernatant z kultivace *S. lincolnensis* Δ ImbY byl využit k extrakci linkomycinového prekurzoru **5a**.

4.2.1.4 Kultivace bakterií rodu *Mycobacterium*

Kmen *M. smegmatis* byl z konzervy vyset na 7H10 agarovou plotnu, kde byl staticky kultivován ve 37°C přes noc. Druhý den bylo 5 – 10 kolonií zaočkováno do 7H9 média s 0,2% glycerolem a 0,05% Tween 80, kultura byla kultivována v třepačce v 500-ml kulatých kultivačních baňkách po dobu 72 h. Biomasa byla sklizena centrifugací při 5 000× g, 5 min, 4°C a bezprostředně využita k izolaci chromozomální DNA.

4.2.2 Práce s DNA

4.2.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

NanoDrop je spektrofotometr pro měření koncentrace nukleových kyselin ve vzorku o objemu 1 µl. Na rozdíl od běžně užívaných spektrometrů, u přístroje NanoDrop není potřeba kyveta, vzorek je nanesen přímo na detekční povrch a díky povrchovému napětí dochází k vytvoření sloupce mezi konci optických vláken, který tak tvoří optickou cestu.

Pro práci byl použit Nanodrop ND-800 (Thermo Fisher Scientific), jehož spektrální rozsah je 220 – 750 nm. Koncentrace DNA byla měřena při vlnové délce 260 nm. Pro odečet pozadí byl použit stejný roztok, ve kterém byla koncentrace DNA stanovována, ovšem bez DNA.

4.2.2.2 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

Gelová agarová elektroforéza představuje nejčastěji používanou metodu pro separaci nukleových kyselin. Metoda je založena na schopnosti pohybu nabitých částic v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu závisí na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku. Nukleové kyseliny nesou záporný náboj a v neutrálním nebo zásaditém prostředí se v elektrickém poli pohybují od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě). Agarosa je lineární sacharidový polymer D-galaktosidasy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosy. Jednotlivé cukerné řetězce jsou vázány nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofobními interakcemi a tvoří tak tzv. molekulové síto. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu je nepřímo úměrná jejich velikosti, menší molekuly se pohybují rychleji.

DNA byla elektroforeticky separována v 1% agarosovém gelu připraveném rozpuštěním agarosy v TAE pufru, do kterého byl po zchlazení přidán 0,005% ethidium bromid (interkalační činidlo sloužící k vizualizaci DNA), pod napětím 3 – 5 V · cm⁻¹. DNA v gelu byla vizualizována pod UV lampou. Jako standard molekulových velikostí byl použit roztok 1kb Plus DNA standard molekulových velikostí DNA.

4.2.2.3 Transformace cizorodé DNA do *E. coli* metodou teplotního šoku

Jako kompetentní se označují bakteriální buňky schopné přijímat cizorodou DNA z prostředí. Buňka může dosáhnout stavu kompetence přirozeně, v molekulární biologii se však uplatňuje kompetence uměle navozená. Vysoce hydrofilní molekula DNA je v prostředí bohatém na $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ schopná vázat se na povrch kompetentní buňky prostřednictvím lipopolysacharidového receptoru (inkubace na ledu). Krátký teplotní šok (42°C) silně depolarizuje membránu. Pokles membránového potenciálu snižuje vnitřní záporný náboj buňky, což dovoluje přenos DNA do cytosolu. Následný krátký chladový šok (inkubace na ledu) obnoví membránový potenciál na původní hladinu.

Buňky byly transformovány následovně: Plazmidová DNA (1 – 50 ng) byla přidána ke 100- μl alikvotu kompetentních buněk *E. coli*. Následovala inkubace 30 min na ledu, poté byl proveden teplotní šok ponořením do vodní lázně či umístěním do termobloku, vytemperovaných na 42°C , po dobu 1 min. Poté byly buňky opět inkubovány na ledu 3 min. V dalším kroku byl přidán 1 ml LB média vytemperovaného na 37°C . Následovala inkubace v lázni ve 37°C po dobu 1 – 2 h a poté statická kultivace na LB agarových plotnách přes noc, v přítomnosti vhodných selekčních antibiotik.

4.2.2.4 Izolace plazmidové DNA

Metody izolace plazmidové DNA obecně zahrnují tři kroky: (1) růst bakteriální kultury, (2) oddělení a lyzi bakteriální biomasy a (3) purifikaci plazmidové DNA. Pro purifikaci jsou využívány komerční kity, které jsou zpravidla výrobcem pojmenovány dle požadavků na vstupní kultivační objem, s čímž z části souvisí i výsledný plazmidový výtěžek. Princip purifikace je založen na rozdílnosti v denaturaci a následné renaturaci chromozomální a plazmidové DNA s využitím alkalické lyze, následované rychlou částečnou neutralizací. Plazmidy byly izolovány pomocí komerčních kitů z nočních tekutých kultur transformovaných *E. coli* (kultivovaných při 37°C , v přítomnosti vhodných selekčních antibiotik).

Midiprep: Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macharey-Nagel)

Výchozí kultivační objem pro midiprep byl 100 ml. Tímto postupem lze standardně získat 100 – 350 μg plazmidové DNA. Po oddělení média od biomasy (4 000 \times g, 15 min, 4°C) bylo dále postupováno dle protokolu výrobce. Buňky byly resuspendovány v 8 ml resuspendačního roztoku a lyzovány 8 ml roztoku obsahujícím NaOH a SDS. Za občasného míchání bylo po 5 min inkubace v laboratorní teplotě přidáno 8 ml neutralizačního roztoku obsahujícího CH_3COOK , jehož přidání způsobí renaturaci plazmidové ccc-formy DNA, zatímco většina chromozomální DNA, stejně jako buněčné proteiny a RNA, precipitují v komplexu formovaném s SDS a draslíkem. Neutralizační roztok zároveň také vytváří vhodné podmínky pro následnou

vazbu negativně nabitě plazmidové DNA na kolonu, která je tvořena silikátovými kuličkami s navázaným kladně nabitým methyl-amino-ethanolem. Lyzát byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu s filtrem (12 ml ekvilibračního roztoku), buněčné komponenty zůstávají zachyceny na filtru, který je pro lepší výtěžek ještě promyt 5 ml ekvilibračního roztoku a následně odstraněn. Kontaminace (soli, metabolity či jiné rozpustné makromolekulární buněčné komponenty) jsou z kolony odstraněny přidáním 8 ml promývacího roztoku. Plazmidová DNA je z kolony uvolněna 5 ml elučního roztoku o vysoké iontové síle. Soli jsou z eluátu odstraněny finální alkoholovou precipitací, kdy je přidáno 3,5 ml isopropanolu a po inkubaci 2 min v pokojové teplotě je směs nanesená na kolonu s aktivovaným sklem. Zachycená DNA je v poslední kroku promyta 2 ml vychlazeného 70% ethanolu a prosátím vzduchu přes filtr pomocí stříkačky vysušena. DNA je z kolony uvolněna 250 – 700 μ l roztoku o nízké iontové síle.

Miniprep: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Výchozí kultivační objem pro miniprep byl 5 ml. Tímto postupem lze standardně získat 50 – 100 μ g plazmidové DNA. Po oddělení média od biomasy (4 000 \times g, 15 min, 4°C) byl dodržen protokol výrobce. Buňky byly resuspendovány v 250 μ l resuspendačního roztoku a lyzovány přidáním 250 μ l lyzačního roztoku obsahujícím NaOH a SDS, analogicky jako u midiprepu. Po 5 min inkubaci v laboratorní teplotě bylo přidáno 10 μ l alkalické proteasy, směs byla lehce promíchána převrácením a po dalších 5 min bylo přidáno 350 μ l neutralizačního roztoku. Buněčné komponenty byly odstraněny centrifugací (10 000 \times g, 10 min, pokojová teplota) a čistý lyzát byl nanesen na kolonu s aktivovaným sklem, kde dochází k vazbě DNA. Promývacími kroky (přidání 750 μ l promývacího roztoku, centrifugace 10 000 \times g, 1 min v pokojové teplotě a následné odstranění supernatantu, přidání 250 μ l promývacího roztoku, centrifugace 10 000 \times g, 1 min v pokojové teplotě a následné odstranění supernatantu, centrifugace 10 000 \times g, 2 min v pokojové teplotě) byly odstraněny nežádoucí kontaminanty, DNA byla z kolony uvolněna 100 μ l roztoku o nízké iontové síle.

4.2.2.5 Izolace chromozomální DNA

Pro izolaci chromozomální DNA byla využita komerční sada Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). 1 ml narostlé kultury byl centrifugován (16 000 \times g, 2 min, pokojová teplota) a DNA byla izolována ze sedimentu buněk. Ve všech případech se jednalo o izolaci DNA z Gram-pozitivních bakterií, proto byly buňky nejprve resuspendovány ve 480 μ l 50 mM roztoku EDTA (chelatační činidlo) a 120 μ l lysozymu (1 mg \cdot ml⁻¹) a následně inkubovány 1 h ve 37°C pro rozrušení buněčné stěny. Centrifugací (16 000 \times g, 2 min, pokojová teplota) byl odstraněn supernatant a sediment byl resuspendován v 600 μ l lyzačního roztoku. Buňky byly lyzovány po dobu 5 min v 80°C v termobloku. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly k lyzátu

přidány 3 µl RNasy A a směs byla inkubována 1 h ve 37°C. V dalším kroku dochází po přidání 200 µl srážecího roztoku, mícháním a inkubací 5 min na ledu ke srážení proteinů. Precipitát byl sedimentován (16 000× g, 3 min, pokojová teplota) a uvolněná DNA v supernatantu byla přečištěna alkoholovým srážením. 600 µl supernatantu bylo přeneseno do 600 µl isopropanolu, následovala centrifugace (16 000× g, 2 min, pokojová teplota). Supernatant byl odstraněn, sediment byl promyt 600 µl 70% ethanolu. Po centrifugaci (16 000× g, 2 min, pokojová teplota) byl veškerý supernatant odstraněn a DNA byla vysušena ve vakuu při 40°C (10 – 15 min; SPD1010 SpeedVac System). DNA byla rehydratována přidáním 100 µl rehydratačního roztoku a inkubací ve 4°C přes noc. Izolovaná DNA byly použita k amplifikaci pomocí PCR (kap. 4.2.2.6.1).

4.2.2.6 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR je základní metodou molekulární biologie, která *in vitro* využívá aktivity termostabilních DNA polymeras k množení (amplifikaci) specifického úseku DNA určeného dvojicí navržených oligonukleotidů (tzv. primerů). Polymerační reakce představuje cyklický proces, ve kterém se střídají 3 kroky: (1) Denaturace, při které dochází k rozvolnění řetězců DNA vlivem vysoké teploty (94 – 98°C) na jednořetězcové úseky, (2) hybridizace primerů s komplementárními úseky DNA (50 – 65°C) a (3) syntéza komplementárního řetězce (teplota závisí na druhu použité DNA polymerasy). Na konci cyklu je zařazován závěrečný polymerační krok, který zajišťuje dosyntetizování řetězců.

4.2.2.6.1 PCR pro amplifikaci genů určených pro klonování

Konkrétní podmínky a složení reakčních směsí pro amplifikaci genů určených ke klonování, použitých v této práci, jsou zobrazeny v Tab. 4.3. Přehled použitých primerů je souhrnně uveden v Tab. 4.1 (kap. 4.1.6).

Tab. 4.3. Složení reakčních směsí a podmínky PCR pro amplifikaci *lmbY*, *sibT*, *por15*, *lim12*, *hrmD*, *griH* a *fgd* genů.

PCR REAKČNÍ SMĚS			
PRO AMPLIFIKACI: <i>lmbY</i> , <i>sibT</i> , <i>por15</i> , <i>lim12</i> , <i>hrmD</i> , <i>fgd</i>		PRO AMPLIFIKACI: <i>griH</i>	
Složka	Objem	Složka	Objem
2,6 M betain	25 µl	5× Q5 reakční pufr	10 µl
5× Expand High Fidelity reakční pufr	10 µl	5× Q5 „zesilovač“	10 µl
dH ₂ O	8 µl	dH ₂ O	23,5 µl
DMSO	2,5 µl	100 ng · µl ⁻¹ templátová DNA	1 µl
100 ng · µl ⁻¹ templátová DNA	1 µl	Směs dNTP (10 mM každý)	1 µl

Směs dNTP (10 mM každý)	1 μ l	Primer přímý	2 μ l
Primer přímý	1 μ l	Primer zpětný	2 μ l
Primer zpětný	1 μ l		
3,5 U \cdot μ l ⁻¹ Expand™ High Fidelity polymerasový mix	0,5 μ l	2 U \cdot μ l ⁻¹ Q5® High-Fidelity DNA polymerasa	0,5 μ l

PCR PODMÍNKY

Teplota	Čas	Počet cyklů
94°C	2 min	1
68°C	pauza	1
94°C	45 s	
50/55/60°C	45 s	30
72°C	1,5 min	
72°C	7 min	1

4.2.2.6.2 Koloniová PCR

Koloniová PCR byla využita k rychlému ověření inserce genu do plazmidu. Princip metody je stejný jako u běžně používané PCR s rozdílem, že templátovou DNA v reakci není purifikovaná DNA, ale z kultivační plotny sterilně „odpíchnutá“ bakteriální kolonie. Do reakce je navíc přidáván nonidet P-40, detergent narušující bakteriální membránu. Konkrétní podmínky a složení reakčních směsí pro koloniovou PCR jsou zobrazeny v Tab. 4.4.

Tab. 4.4. Složení reakčních směsí a podmínky PCR pro ověřovací koloniovou PCR.

REAKČNÍ SMĚS PRO KOLONIOVOU PCR

Složka	Objem
10× LA reakční pufr	5 μ l
dH ₂ O	38 μ l
DMSO	2,5 μ l
Nonidet P-40	1 μ l
Směs dNTP (10 mM každý)	1 μ l
Primer přímý	1 μ l
Primer zpětný	1 μ l
Sterilně odpíchnutá bakteriální kolonie	
5 U \cdot μ l ⁻¹ LA DNA polymerasový mix	0,5 μ l

PODMÍNKY PRO KOLONIOVOU PCR		
Teplota	Čas	Počet cyklů
94°C	10 min	1
65°C	pauza	1
94°C	45 s	
55°C	45 s	30
68°C	1,5 min	
68°C	5 min	1

4.2.2.6.3 Místně-specifická mutagenese zprostředkovaná PCR

Místně-specifická mutagenese je metoda, která umožňuje cílenou modifikaci sekvence DNA (genu) za účelem pozměnění aminokyselinové sekvence v proteinu, který konkrétní gen kóduje. V mutantních variantách proteinu lze pak vyhodnocovat vliv této změny na jeho enzymovou funkci. Mutace jsou vnášeny pomocí PCR s využitím specifických primerů, které obsahují mutace pro požadovanou kodonovou změnu.^{246,247}

Seznam použitých primerů pro zavedení mutací je uveden v Tab. 4.2 (kap. 4.1.6). Troj- a čtyř-násobné mutanty byly připravovány následně z připravených jednoduchých či dvojitých mutant. Složení reakční směsi a použité PCR podmínky jsou uvedeny v Tab. 4.5. Po PCR byla ze směsi pomocí restrikčního enzymu DpnI odstraněna methylovaná templátová DNA (inkubace ve 37°C, 2 h), složení této reakční směsi je uvedeno v Tab. 4.6. Následně byl DpnI inaktivován inkubací v termobloku při 80°C po dobu 20 min. Restrikční směs byla poté bezprostředně transformována do kompetentních *E. coli* XL⁻¹, transformanty byly selektovány na LB agarové plotně s přídatkem vhodného selekčního antibiotika.

Tab. 4.5. Složení reakční směsi a podmínky pro PCR zprostředkovanou místně-specifickou mutagenesí *apd6* genů.

PCR REAKČNÍ SMĚS PRO CÍLENOU MUTAGENEZI	
Složka	Objem
5× Q5 reakční pufr	10 µl
5× Q5 „zesilovač“	10 µl
dH ₂ O	23,5 µl
100 ng · µl ⁻¹ plazmidová DNA	1 µl
Směs dNTP (10 mM každý)	1 µl
Primer přímý	2 µl
Primer zpětný	2 µl
2 U · µl ⁻¹ Q5® High-Fidelity DNA polymerasa	0,5 µl

**PCR PODMÍNKY
PRO CÍLENOU MUTAGENEZI**

Teplota	Čas	Počet cyklů
98°C	5 min	1
80°C	pauza	1
98°C	20 s	
60°C	20 s	35
72°C	3 min	
72°C	10 min	1

Tab. 4.6. Složení restrikční směsi pro odstranění methylované templátové DNA z PCR reakce.

**SLOŽENÍ RESTRIKČNÍ SMĚSI
PRO ODSTRANĚNÍ PCR TEMPLÁTU**

Složka	Objem
PCR reakční směs	35 μ l
10 \times NEB pufr 4	5 μ l
dH ₂ O	9 μ l
20 U \cdot μ l ⁻¹ Dpnl	1 μ l

4.2.2.7 Extrakce DNA z elektroforetického gelu

Metoda umožňuje izolovat ze směsi DNA fragment specifické velikosti. Základem je elektroforetická separace, následovaná manuálním vyříznutím požadovaného fragmentu z gelu pod UV lampou pomocí žiletky či skalpelu. DNA je z nízkotajícího agarosového gelu přečištěna komerčním kitem Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), který umožňuje extrahovat a purifikovat fragmenty (až 40 μ g) o velikosti 100 bp – 10 kbp. Systém je založený na vazbě DNA k silikátové membráně v přítomnosti chaotropních solí.

Bylo postupováno dle protokolu výrobce. Nejprve byl vyříznutý gel při teplotě 50 – 65°C rozpuštěn v roztoku guanidin-isothiokyanátu (Membrane Binding Buffer, 1 mg gelu je rozpuštěn v 1 μ l roztoku) a nanesen na kolonu, kde dochází k vazbě DNA. Ostatní složky směsi byly odděleny centrifugací (16 000 \times g, 1 min, pokojová teplota). Kolona byla promyta ve dvou krocích, kdy byl vždy přidán promývací roztok přímo na kolonu (Membrane Wash Solution, 700 μ l, resp. 500 μ l), s následnou centrifugací (16 000 \times g, 1 min, resp. 5 min, laboratorní teplota). DNA byla z kolony uvolněna 50 μ l roztoku o nízké iontové síle (Nuclease-Free Water).

4.2.2.8 Štěpení restrikčními endonukleasami a defosforylace volných konců DNA

Restrikční endonukleasy jsou přirozené enzymy bakterií, které rozpoznávají cílovou sekvenci na molekule DNA, v níž dokáží specificky štěpit fosfodiesterové vazby (protějščí

či vzdálené několik nukleotidů od centra symetrie). Restriktasy pro svoji aktivitu vyžadují optimální podmínky, které jsou zajištěny jednak pufrům, ve které *in vitro* reakce probíhá, ale také teplotou, ve které konkrétní restriktasa štěpí s nejvyšší aktivitou.

V práci byly použity endonukleasy XhoI, NdeI pro štěpení amplifikovaných genů *lmbY*, *por15* a endonukleasy NdeI, EcoRI pro štěpení amplifikovaných genů *sibT*, *lim12* a *fgd*, všechny určené pro ligaci do vektorů pomocí T4 DNA ligasy. Dále byly restriktázními enzymy linearizovány vektory pET-28b(+) (NdeI, EcoRI) a pET-42b(+) (XhoI, NdeI). Štěpení (v případě genů i vektorů) probíhalo ve 37°C po dobu 2 h, následně byly enzymy inaktivovány inkubací v termobloku v 65°C po dobu 20 min. V případě štěpení vektorů byl po štěpení do směsi přidán 1 µl alkalické fosfatasy (CIP, 10 U · µl⁻¹) odštěpující fosfátové skupiny z volných 3' OH konců, čímž lze zabránit re-cirkularizaci vektorů. Konce DNA byly defosforylovány při 37°C po dobu 1 h. Poté byla CIP inaktivována inkubací v termobloku v 75°C po dobu 10 min. Štěpená DNA byla elektroforeticky separována a požadované fragmenty byly vyříznuty a následně přečištěny z gelu. Složení reakční směsi a podmínky štěpení jsou uvedeny v Tab. 4.7.

Tab. 4.7. Složení restriktázní směsi pro přípravu DNA na ligaci.

Složka	Objem
0,2 – 1 µg DNA	X µl
10× CutSmart pufr	5 µl
dH ₂ O	X µl (do celkového objemu 50 µl)
20 U · µl ⁻¹ XhoI / 20 U · µl ⁻¹ EcoRI	1 µl
20 U · µl ⁻¹ NdeI	1 µl

4.2.2.9 Ligace DNA fragmentů metodou SLiCE

SLiCE (z angl. seamless ligation cloning extract) je restriktázně místně-nezávislá klonovací metoda, která je založená na *in vitro* rekombinaci mezi krátkými homologními úseky v bakteriálním buněčném extraktu.²⁴⁸ Tato metoda má oproti klasické ligaci několik výhod. Zahrnuje méně kroků, nevyžaduje užití restriktázních enzymů pro modifikace a nejzásadnější je vysoká efektivita této metody. Kromě přípravy samotného buněčného lyzátu (kap. 4.2.1.2.2) zahrnuje SLiCE tři další kroky: (1) přípravu linearizovaného vektoru a DNA inzertů s krátkými homologními úseky generovanými PCR pomocí specifických primerů obsahujících 5' přesahující sekvence. (2) SLiCE *in vitro* reakci a (3) transformaci do vhodného hostitele.

Pro PCR amplifikaci *hrmD* a *griH* byly navrženy primery s následujícími charakteristikami. 5' konec primeru musel obsahovat 15 – 52 bp komplementárních k jednomu konci DNA vektoru, 3' konec primeru musel obsahovat 15 – 24 bp, které jsou komplementární amplifikovanému DNA fragmentu. Primery byly syntetizovány a přečištěny (stupeň čistoty: HPLC) na externím servisním pracovišti a jejich přehled je uveden v Tab. 4.2 (kap. 4.1.6).

SLiCE reakce byla připravena v 500- μ l mikrozkušavkách dle rozpisu uvedeném v Tab. 4.8. Směs byla míchána a centrifugována krátkým pulsem. Reakce probíhala po dobu 1 h při 37°C. Následně byl 1 μ l směsi transformován do kompetentních *E. coli* XL⁻¹. Transformanty byly selektovány vysetím na LB agarovou plotnu s přidavkem vhodného selekčního antibiotika (statická kultivace ve 37°C, přes noc).

Tab. 4.8. Složení reakční směsi pro ligaci genů *hrmD* a *griH* do vektoru pET-42b(+) metodou SLiCE.

Složka	Množství/Objem
Vektorová DNA	50 – 100 ng
Inzert	1:1 – 50:1*
10 \times T4 DNA ligační pufr	1 μ l
SLiCE extrakt	1 μ l
dH ₂ O	do objemu 10 μ l

* Poměr koncentrace vektor:inzert byl upravován, nikdy však objem inzertové DNA nepřesáhl 1/5 celkového reakčního objemu.

4.2.2.10 Ligace DNA fragmentů pomocí DNA ligasy

Tradiční metoda ligace je založená na aktivitě enzymů z rodiny DNA ligas, které jsou schopné katalyzovat tvorbu kovalentní vazby mezi úseky DNA obsahující kohézní homologní přesahy. Nejčastěji využívaná je T4 DNA ligasa, získaná z buněk *E. coli* infikovaných fágem T4. Aby byl proces ligace úspěšný, je potřeba zajistit optimální poměr počtu volných konců vektoru k počtu konců inzertu. Nejčastěji je volen poměr 3:1 (inzert:vektor). Množství inzertu, které je potřeba do reakce dodat, lze vypočítat dle:

$$\text{množství inzertu (ng)} = \text{množství vektoru (ng)} \cdot \text{velikost inzertu (kbp)} / \text{velikost vektoru (kbp)}$$

Složení ligační směsi použité v této práci je uvedeno v Tab. 4.9. Ligační reakce byla ponechána 1 h při laboratorní teplotě, poté bylo 5 – 10 μ l směsi transformováno do kompetentních *E. coli* XL⁻¹. Transformanty byly selektovány vysetím na LB agarovou plotnu s přidavkem vhodného selekčního antibiotika.

Tab. 4.9. Složení reakční směsi pro ligaci genů do vektorů: pET-28b(+) – *sibT*, *lim12*, *fgd* a pET-42b(+) – *lmbY*, *por15*.

Složka	Množství
Vektorová DNA	50 – 100 ng
Inzert	X μ l (inzert:vektor = 3:1)
10 \times T4 DNA ligační pufr	1 μ l
10 mM ATP	1 μ l
5 U \cdot μ l ⁻¹ T4 DNA ligasa	1 μ l
dH ₂ O	do objemu 20 μ l

4.2.2.11 Ověření správnosti vložených sekvencí sekvenováním

Sekvence všech genů klonovaných do vektorů, včetně genů cíleně mutovaných prostřednictvím PCR, byly ověřeny sekvenováním na externím servisním pracovišti (Eurofins Genomics).

4.2.3 Práce s rekombinantními proteiny

4.2.3.1 Heterologní produkce proteinů

Prvním krokem heterologní produkce proteinů je vnesení expresního konstruktů (vektoru s vloženým genem kódujícím studovaný protein) do hostitele. Nejvýhodnějším a nejčastěji používaným expresním systémem jsou bakterie *E. coli*, jejichž kultivace je nenáročná, časově i nutričně, a zároveň poskytují relativně vysoké výtěžky rekombinantních proteinů. Produkce rekombinantních proteinů může být u *E. coli* řízena několika promotory, často je využíván silný promotor T7.

Proteiny byly produkovány v kmenech *E. coli* BL21 (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL, které byly transformovány expresním vektorem. Transformanty byly ponechány růst na LB agarové plotně přes noc ve 37°C v přítomnosti vhodných selekčních antibiotik a následující ráno byly zaočkovány za použití stejných antibiotik do LB média na OD₆₀₀ 0,1 – 0,2. Kultura byla třepána při 37°C do exponenciální fáze růstu (OD₆₀₀ 0,6 – 0,8), kdy byla indukována exprese vloženého genu přidáním IPTG do finální koncentrace 0,4 mM. Před indukcí byl odebrán alikvot sloužící jako negativní kontrola exprese. Rekombinantní proteiny byly exprimovány ve 37°C, 1 h; 28°C, 4 h či 17°C, 20 h. Kultura byla sedimentována (4 000× g, 15 min, 4°C) a buňky byly ihned dále zpracovány či zamrazeny v -20°C pro pozdější použití.

Pro produkci proteinů určených pro krystalizační studie byly proteiny produkovány v kmeni *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL, produkce probíhala v obohaceném LB médiu určeném pro nárůst kultury do vysoké OD. Po indukcí byly buňky kultivovány v 17°C po dobu 20 h.

4.2.3.2 Ultrazvuková extrakce proteinů z buněčných kultur

Ultrazvuková sonikace představuje jednoduchou a spolehlivou metodu dezintegrace buněk, při které jsou do roztoku s vhodnými podmínkami (pH, iontová síla) uvolněny intracelulární buněčné proteiny.

Pro dezintegraci byly buňky sklizené po expresi resuspendovány v sonikačním pufu (1/20 původního kultivačního objemu) a sonikovány ultrazvukovým homogenizátorem (Ultrasonic Homogenizer 4710; Cole-Parmer). Buněčná suspenze byla umístěna do ledové lázně a 250 µl – 1 ml suspenze byl sonikován 3× 10 s, mezi jednotlivými pulsy byl dodržován

odstup nejméně 30 s, 25 ml suspenze (vzorky určené pro následnou purifikaci) bylo sonikováno 3× 30 s a následně 1× 60 s, mezi jednotlivými pulsy byl dodržován odstup nejméně 1 min. Sonikované buňky byly centrifugovány (16 000× g, 30 min, 4°C). Supernatant, případně také buněčný lyzát před sedimentací, byly ihned dále zpracovány.

V případě purifikace proteinů určených pro krystalizaci byl použit sonikační pufr obsahující navíc 5% glycerol a 5 mM imidazol.

4.2.3.3 SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfát - polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) je elektromigrační biochemická metoda využívaná k separaci denaturovaných proteinů dle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny jsou denaturovány za pomoci denaturačního činidla (β -merkaptoethanolu), který redukuje inter- i intra-molekulové disulfidické můstky a SDS (dodecylsírany sodného), detergentu, který proteiny denaturuje a zároveň rovnoměrně obaluje, čímž jim uděluje negativní náboj. Komplex SDS-protein má pak jednotkový náboj na hmotnostní jednotku a pohybuje se gelem směrem k anodě. Po separaci lze proteiny vizualizovat a nespecificky identifikovat obarvením pomocí barviva, které se nespecificky váže na proteiny.

Pomocí SDS byly analyzovány proteiny nadprodukované transformanty *E. coli* a dále jednotlivé purifikační frakce rekombinantních proteinů. Vzorky byly smíchány s SDS-vzorkovým pufrem (2× koncentrovaný; tj. ke směsi dezintegrováných buněk, supernatantu získaného centrifugací dezintegrováných buněk a purifikačním frakcím bylo vždy přidáno ekvivalentní množství pufru). Směs byla denaturována v termobloku při 80°C pod dobu 20 min. Po zchlazení na pokojovou teplotu byly vzorky naneseny na polyakrylamidový gel (složení gelu je uvedeno v Tab. 4.10). Jako standard molekulových hmotností byl použit PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Proteiny byly elektroforeticky separovány v aparatuře Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) v SDS-elektrodovém pufru, konstantním napětí 90 V po dobu 15 – 20 min (do prostoupení migrujícího čela zaostřovacím gelem) s následným zvýšením na 200 V. Separace byla ukončena po dosažení migrujícího čela konce separačního gelu. Polyakrylamidový gel byl barven po dobu 15 – 20 min v barvicím roztoku obsahujícím Coomassie Brilliant Blue, nenavázaná barva byla odmyta v odbarvovacím roztoku v pokojové teplotě, který byl několikrát vyměněn.

Tab. 4.10. Složení SDS polyakrylamidového gelu pro separaci proteinů.

Složka	Množství	
	Zaostřovací gel	10% separační gel
Akrylamid	112 µl	1 250 µl
Tris-HCl pufr A	-	1 000 µl
Tris-HCl pufr B	126 µl	-
Deionizovaná H ₂ O	875 µl	2 625 µl
4% SDS	32 µl	125 µl
30% APS	2,5 µl	5 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

4.2.3.4 Purifikace proteinů chromatografickými metodami

4.2.3.4.1 Afinitní chromatografie

Metodou lze oddělit proteiny na základě reverzibilní interakce mezi proteinem a ligandem vázaným na sorbent. Promývacími kroky jsou odstraněny nečistoty a purifikovaný protein je eluován modifikací pH, iontové síly nebo zavedením kompetitivního ligandu. Technika má relativně vysokou selektivitu a vysoké čistoty lze často dosáhnout v jediném kroku.

Studované proteiny byly purifikovány metodou založenou na interakci přechodného kovu vázat sloučeniny obsahující atomy dusíku, síry a kyslíku. Proteiny jsou specificky produkovány s histidinovou kotvou (His-kotvou), díky které zůstávají zachycené na koloně naplněné iminooctovou kyselinou s navázanými Ni²⁺ ionty, sloužícími jako ligand. Pro práci byly využity kolony HiTrap™ Chelating HP 1ml, HiTrap™ Chelating HP 5ml (GE Healthcare Life Sciences), které byly promyty ½ objemu kolony (CV) 1 M roztokem NiSO₄. Poté byly kolony promyty 5 CV vody a ekvilibrovány 5 CV sonikačního pufru. Supernatant získaný dezintegrací exprimovaných buněk byl nanesen na kolonu, promyt 5 CV promývacího pufru a proteiny byly eluovány 5 CV elučního pufru. Promývací a eluční pufrы obsahovaly různé koncentrace imidazolu (50 – 300 mM). Změna iontové síly roztoku způsobí uvolňování nejprve nenavázaných proteinů (nízké koncentrace imidazolu), jako poslední jsou uvolňovány navázané rekombinantní proteiny (koncentrace imidazolu 250 mM zpravidla uvolní většinu navázaných proteinů). Eluční frakce byly dále pomocí Amicon® Ultra-15 centrifugačních filtrů (4ml/15ml, 30-kDa cut-off; Millipore) zakoncentrovány na objem 100 µl – 1 000 µl a dále pomocí stejné kolony převedeny do pufru dle požadavků na následující experiment (pro převedení byl vzorek vždy zakoncentrován na objem ~ 100 µl – 250 µl, nový pufr byl doplněn po rýsku kolony a následovala další centrifugace, postup byl proveden 3×; konkrétní pufrы jsou uvedeny dále v textu u popisu jednotlivých experimentů).

V případě purifikace proteinů určených pro krystalizaci byly použity pufrы obsahující navíc 5% glycerol.

4.2.3.4.2 Iontově výměnná chromatografie

Většina biomolekul je ve vodném prostředí nabitá (dáno přítomností iontových skupin v jejich struktuře). Princip separace této metody je založen na zachytávání iontů (proteinů) na sorbentu, kterým je makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Sorbované ionty difundují z okolního roztoku do ionexu, kde vytěsňují a vyměňují ionty vázané na funkční skupiny ionexu. Zachycené molekuly jsou z kolony uvolněny gradientovou elucí pufrem o zvyšující se iontové síle.

Iontově výměnou chromatografií byly purifikovány pouze proteiny určené pro krystalizaci. Proteiny purifikované afinitní chromatografií byly převedeny do pufru A pro iontově výměnnou chromatografii a zakoncentrovány ultracentrifugací na objem 1 ml pomocí Amicon® Ultra-15 centrifugačních filtrů. K purifikacím byl použit kapalinový chromatograf Akta Purifier (GE Healthcare Life Sciences). Separace proteinů probíhala na koloně ENrich™ Q 5 × 50 mm (GE Healthcare Life Sciences) s vnitřním objemem 1 ml, průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml · min⁻¹, pro nanášení proteinu byla rychlost nastavena na 0,5 ml · min⁻¹. Byla použita dvoukomponentová mobilní fáze, A (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0) a B (20 mM Tris, 1 M NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0). Nejprve byla kolona ekvilibrována 25 CV/20% B. Poté byl nanesen vzorek proteinu a následně byly zachycené proteiny lineární gradientovou elucí v intervalu 20% – 70% B z kolony postupně uvolňovány. Frakce byly jímány po 1 ml pomocí automatického sběrače frakcí (BioFrac Fraction Collector; Bio-Rad). Dle chromatogramu (záznam absorbance při 280 nm) byly určeny frakce obsahující proteiny, identita proteinů v jednotlivých frakcích byla stanovena pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující purifikované Apd6 proteiny byly zakoncentrovány a pomocí Amicon® Ultra-15 centrifugačních filtrů převedeny do pufru pro gelovou filtraci (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM TCEP; pH 8,0), konečný objem činil 1 ml.

4.2.3.4.3 Gelová filtrace

Pomocí gelové filtrace lze molekuly separovat dle jejich velikosti. Separace probíhá na koloně, která je naplněna porézními částicemi. Molekuly, které jsou příliš velké, než aby se dostaly do pórů, nejsou na koloně příliš zadržovány, protékají přes prostory kolem kuliček a eluují jako první. Menší částice do pórů snadno vstupují a procházejí tak skrze jejich vnitřky. V důsledku tak na koloně dochází k jejich zadržení a jsou proto eluovány na konci separace.

Gelovou filtrací byly purifikovány pouze proteiny určené pro krystalizaci, které byly přečištěny afinitní a iontově výměnou chromatografií. K purifikacím byl použit kapalinový

chromatograf Akta Purifier (GE Healthcare Life Sciences). Proteiny byly separovány na koloně ENrich™ SEC 650 10 × 300 mm (GE Healthcare Life Sciences) s vnitřním objemem 24 ml, průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml · min⁻¹, pro nanášení proteinu byla rychlost nastavena na 0,5 ml · min⁻¹. Kolona byla ekvilibrována 3 CV pufru pro gelovou filtraci, následovalo nanesení 1 ml vzorku (proteiny získané iontově výměnou chromatografií). Proteiny byly z kolony eluovány izokraticky, celkový eluční objem činil 2 CV. Frakce byly jímány po 1 ml pomocí automatického sběrače frakcí (BioFrac Fraction Collector; Bio-Rad). Dle chromatogramu (záznam absorbance při 280 nm) byly určeny frakce obsahující proteiny, identita proteinů v jednotlivých frakcích byly stanoveny pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující purifikované Apd6 proteiny byly dále zakoncentrovány a převedeny do pufru pro krystalizaci (20 mM Tris-HCl; pH 8,0).

4.2.3.5 Stanovení koncentrace proteinu z malého objemu

Nanodrop ND-800 umožňuje měřit koncentraci proteinů, které ve své struktuře obsahují aromatické aminokyseliny L-tryptofan, L-tyrosin nebo disulfidické cystein-cystein můstky, které zodpovídají za absorbanci při 280 nm. Používaný objem měřeného vzorku je 2 µl. Metoda byla popsána v kap. 4.2.2.1.

4.2.3.6 Hmotnostní spektrometrie proteinů

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, která umožňuje rozlišit ionty na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Analyty jsou nejprve vhodnou ionizační technikou v hmotnostním spektrometru převedeny na ionty. Nejčastěji se používají tzv. měkké techniky, např. elektrosprej (ESI), které nezpůsobují fragmentaci analytů. Jednotlivé ionty jsou následně usměřovány iontovou optikou a vstupují do analyzátoru, kde jsou separovány na základě různých fyzikálních principů. Po separaci dopadají ionty na detektor, nejčastěji elektronový násobič. Detekovanými ionty jsou obvykle tzv. pseudomolekulární ionty $[M+H]^+$ či $[M-H]^-$ (M představuje hmotnost analytu). V MS proteinů lze využít dvou přístupů, v „bottom-up“ analýze je protein nejprve enzymaticky naštípán a následně analyzován, v „top-down“ analýze se pracuje přímo s intaktními proteiny.

Pomocí MS byly analyzovány dva Apd6 proteiny (LmbY, Por15) a protein FGD.

4.2.3.6.1 MS za nativních podmínek

Čerstvě purifikované proteiny byly převedeny pomocí Zeba™ Spin odsolovací kolony (0,5 ml, 7-kDa cut-off; Thermo Fisher Scientific) do 200 mM octanu amonného (pH 7,5). Roztok proteinu byl nanesen na zkonstruovanou borosilikátovou sprejovací jehlu a vnesen do iontového

zdroje (nanoESI). Analýzy proteinů, včetně následného vyhodnocení, provedl RNDr. Petr Man, Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i.). Pro měření byl použit hmotnostní spektrometr Synapt G2Si (Waters). Klíčové parametry metody byly následující: sprejovací napětí 1,2 kV; napětí na vstupním kuželu 50 V, zdrojové napětí 20 V, průtok plynu v pasti 4 ml · min⁻¹, teplota zdroje 30°C, kolizní energie v pasti 30 V. Kalibrace stroje byla provedena externě pomocí Csl a nativní podmínky byly ověřeny analýzou myoglobinu. Data byla analyzována pomocí MassLynx 4.1.

4.2.3.6.2 MS za ne-nativních podmínek a „bottom-up“ analýza

Pro intaktní měření proteinů za ne-nativních podmínek byly proteiny odsoleny pomocí kolony Protein MicroTrap™ (1 × 8 mm; Optimize Technologies), naředěny v roztoku vody/0,4% HCOOH a nanášeny na chromatografickou kolonu ZORBAX 300SB-C18 (0,5 × 35 mm, 3,5 μm; Agilent Technologies), odsoleny stejným rozpouštědlem a eluovány vodným roztokem 70% acetonitrilu/0,4% HCOOH. Poté byly proteiny naředěny dH₂O do finální koncentrace 2 μM. Takto připravený protein byl ionizován (ESI) a ionty byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru 15T FT-ICR SolariX XR (Bruker Daltonics). K vyhodnocení byl využit program Bruker Compass DataAnalysis 4.1. Analýzy proteinů, včetně následného vyhodnocení, provedl RNDr. Petr Man, Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i.).

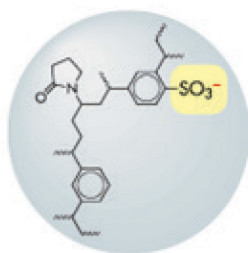
„Bottom-up“ analýza proběhla následovně: Každý protein byl naředěn 250 mM glycinovým pufrům (pH 2,3) a 100 pmol bylo nanášeno na imobilizovanou pepsinovou kolonu.²⁴⁴ Štěpení bylo regulováno průtokem 0,4% HCOOH (v H₂O) rychlostí 100 μl · min⁻¹. Jednotlivé peptidy byly on-line zachycovány na koloně Peptide MicroTrap™ (Optimize Technologies), kde byly po dobu 2 min odsolovány a následně ze záchytné kolony gradientově eluovány na analytickou kolonu ZORBAX 300SB-C18 (0,5 × 35 mm, 3,5 μm; Agilent Technologies), kde byly separovány. Jako mobilní fáze byly použity fáze A (2% acetonitril/0,4% HCOOH v H₂O) a fáze B (95% acetonitril/0,4% HCOOH v H₂O). Gradient měl následující parametry: 10 – 30% B během 20 min následované 30 – 90% B během 2 min. Výstup kolony byl přímo napojen na iontový zdroj (ESI) přístroje 15T FT-ICR operující v data-závislém MS/MS módu. Každý plný sken byl následován šesti MS/MS (kolizně indukovanými) skeny iontů s nejvyšší intenzitou. Data byla zpracována v Bruker Compass DataAnalysis 4.1. Mgf soubory byly vytvořeny a hledány s pomocí softwarů PEAKS a MASCOT oproti databázím obsahujícím sekvence studovaných proteinů a běžných kontaminant. Analýzy proteinů, včetně následného vyhodnocení, provedl RNDr. Petr Man, Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i.).

4.2.4 Příprava substrátů pro enzymatické stanovení aktivity Apd6 proteinů

4.2.4.1 Izolace aminokyselinového prekurzoru 5a z kultivačního média

Extrakt získaný extrakcí na pevné fázi (SPE; z angl. solid phase extraction) z kultivačního média mutantního kmene *S. lincolnsensis* $\Delta lmbY$ byl použit k přípravě předpokládaného substrátu Apd6 proteinů – látky **5a**. K extrakci byly využity kolony Oasis MCX 3cc 60 mg (Waters). Princip extrakce je založen na kationtové výměně mezi polymerním sorbentem (obsahuje SO_3^- skupiny, Obr. 4.2) a extrahovanou látkou, v tomto případě aminokyselinou, jejíž povrchový náboj může být lehce modulován pomocí pH (v pH nižším než je její pI získává aminokyselina kladný náboj). Neionizované složky směsi jsou odstraněny promývacím krokem, adsorbované látky jsou z kolony uvolněny roztokem o vysokém pH.

Kolona byla promyta 3 ml methanolu, ekvilibrována 3 ml 2% HCOOH a následně byly nanášeny 3 ml supernatantu kultivačního média *S. lincolnsensis* $\Delta lmbY$ (pH upraveno na 2,3 pomocí koncentrované HCOOH). Kolona byla promyta 3 ml 2% HCOOH a adsorbované látky byly eluovány 1,5 ml směsného roztoku methanol: H_2O : NH_4OH (50:48,5:1.5 v/v/v). Eluát byl odpařen pomocí vakuové odpařky při 30°C do sucha a rozpuštěn ve 100 μl dH_2O . Extrakt byl analyzován pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC; z angl. ultra high performance liquid chromatography) ve spojení s MS detekcí - UHPLC-MS (kap. 4.2.6.1). Na základě přesné hmoty byl určen retenční čas (t_R) píku korespondujícího látky **5a**. Následně byla provedena preparace látky **5a** následujícím způsobem: opakovaně bylo za stejných chromatografických podmínek dávkováno 10 μl extraktu a do zkumavky byl jímán eluát v intervalu t_R **5a** \pm 0,1 min. Mobilní fáze byla odpařena a preparát byl rozpuštěn v dH_2O . Pro dosažení požadované čistoty byla látka **5a** preparována dvakrát. Připravený substrát byl rozdělen na alikvoty, odpařen do sucha a v suchém stavu byl skladován v -20°C.



Obr. 4.2. **Struktura polymerního sorbentu kolony Oasis MCX 3cc 60 mg (Waters).** Zvýrazněná je SO_3^- skupina. Převzato a upraveno z www.waters.com.

4.2.4.2 Chemická syntéza prekurzoru 5a a 5b

Standard látky **5a** byl syntetizován dle již dříve popsaného protokolu.²²⁵ Metoda pro chemickou syntézu látky **5b** byla vyvinuta Ing. Radkem Gažákem, Ph.D. (Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i.) ve spolupráci se společností Santiago a postup je rozdělen do následujících tří bloků.

Metoda A – Stilleho reakce²⁴⁹

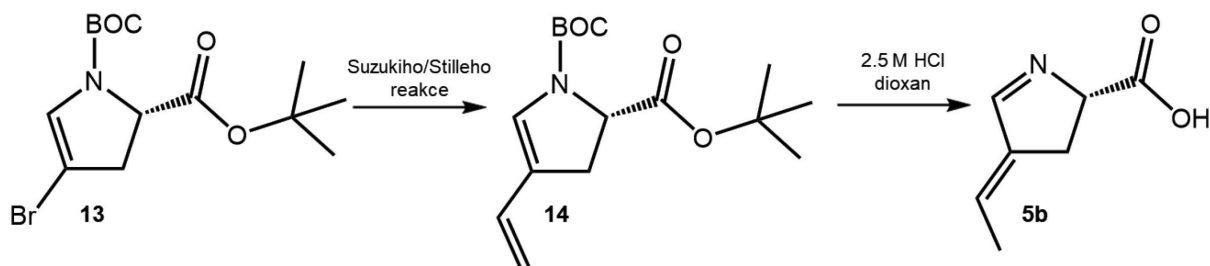
K roztoku látky **13** (200 mg, 0,574 mM; Obr. 4.3) v suchém deoxygenovaném NMP (4,8 ml) byl přidán Pd(dba)₂ (16,5 mg, 0,030 mM), tri(2-furyl)fosfin (13 mg, 0,057 mM) a ZnCl₂ (0,5 M v THF). Směs byla inkubována 10 min při pokojové teplotě a následně byl přidán vinyl tributyltin (0,185 ml, 0,631 mM) a reakční směs byla ponechána v 60°C, 16 h za stálého míchání. Pomocí UHPLC-MS byla potvrzena kompletní konverze výchozího substrátu. Reakční směs byla naředěna nasyceným vodným roztokem NH₄Cl (50 ml) a produkt byl extrahován pomocí ethyl acetátu (2× 50 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodným Na₂SO₄ (10 g) a produkt byl izolován pomocí „face-centred-cubic“ (FCC) krystalizace (SiO₂, ethyl acetát v cyklohexanu, 0 – 15 %). Tímto byla získána surová látka **14** obsahující tributyltinové zbytky společně s dalšími neidentifikovanými nečistotami, které ale byly přítomné již ve výchozí látce **13**. Surová látka **14** byla použita pro další krok bez jakýchkoliv dalších purifikací. NMR data látky **14** odpovídala dříve publikovaným výsledkům.²²⁵

Metoda B – Suzukiho reakce²⁵⁰

K roztoku vinyl trifluoroborátu draselného (100 mg, 0,746 mM) ve směsi dioxan-H₂O (4:1, 0,05 M, zbavená plynů) byla přidána látka **13** (200 mg, 0,574 mM), Cs₂CO₃ (561 mg, 1,722 mM) a Pd(dppf)Cl₂ (21 mg, 0,029 mM). Směs byla zahřívána na 60°C po dobu 2 h. Pomocí UHPLC-MS byla potvrzena kompletní konverze výchozího substrátu na produkt **14**. Reakční směs byla naředěna ethyl acetátem (50 ml) a promyta solankou (50 ml). Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodného Na₂SO₄ (10 g) a produkt byl izolován pomocí FCC krystalizace (SiO₂, ethyl acetát v cyklohexanu, 0 – 15 %). NMR data látky **14** odpovídala dříve publikovaným výsledkům.²²⁵

Závěrečná konverze na látku 5b

Látka **14** (40 mg, 0,135 mM) byla rozpuštěna v 2,5 M roztoku HCl v dioxanu (bezvodný) a míchána v pokojové teplotě. Po 30 min byla detekována směs Boc-deprotektovaného meziprojektu a produktu **5b**. Po dalších 30 min byla Boc-skupina kompletně odštěpena, zatímco tert-butylová skupina byla stále přítomna. Po 20 h obsahovala reakční směs téměř výlučně produkt hmotou odpovídající látce **5b**. Reakční směs byla adsorbována na silikátové kuličky a purifikována pomocí UHPLC (HILIC mód, 5 – 50% H₂O:acetonitril). NMR data látky **5b** korespondovala dříve publikovaným výsledkům.²²⁵



Obr. 4.3. Znázornění meziproduktů chemické syntézy látky 5b.

4.2.5 Příprava kofaktoru F₄₂₀

Kofaktor F₄₂₀ byl připravován skupinou G. Bashiri, Ph.D. (School of Biological Sciences, University of Auckland), která publikovala produkci a purifikaci F₄₂₀ v modifikovaném kmeni *M. smegmatis* mc² 4517.²⁵¹ Stručně, exprese *fbi* genů (*fbiA,B,C*) vnesených do producenta *M. smegmatis* mc² 4517 na plazmidu, probíhala v expresím médiu ve 37°C po dobu 4 dny. Nadprodukovaný kofaktor F₄₂₀ byl z buněk preparován dle Isabelle et al. 2002.²⁵²

4.2.6 Stanovení biochemických vlastností Apd6 proteinů

4.2.6.1 Ultra účinná kapalinová chromatografie spřažená s hmotnostně spektrometrickou detekcí

UHPLC je analytická separační metoda využívaná k rozdělení směsi látek na základě různé interakce jejich jednotlivých složek s mobilní a stacionární fází chromatografické kolony. Jako stacionární fáze jsou používány sorbenty s malou velikostí částic, což zvyšuje efektivitu rozdělení, ale zároveň je v důsledku vyžadováno, aby separace probíhala za vysokého tlaku. Kromě klasické adsorpční chromatografie, kdy stacionární fází je relativně polární materiál a mobilní fáze je nepolární, se v současné době využívají podstatně častěji chromatografie na obrácených (reverzních) fázích (RP), které jsou naopak založeny na užití nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Podstatou separace jsou hydrofobní interakce, nepolární látky eluují z kolony později než látky polární. Analyty eluované z kolony jsou monitorovány UV-VIS detektorem, v případě RP separací se s výhodou využívá též přímé spojení s MS (tzv. on-line analýza), které umožňuje analyt navíc identifikovat dle *m/z* jeho iontu.

K UHPLC měření byl využit chromatograf Acquity UPLC (Waters) s integrovaným DAD detektorem (detektor diodového pole 2996) s přímým zapojením spektrometru LCT Premier XE (ESI ionizace, analyzátor ToF měřící dobu letu iontů). Látky byly separovány na RP, na koloně Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm; Waters) za stálé teploty 40°C. Byla použita dvousložková mobilní fáze, 0,1% vodný roztok HCOOH (A) a methanol (B). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,4 ml · min⁻¹. Na kolonu bylo dávkováno 5 μl vzorku v případě analýzy látek *in vitro* reakcích, 10 μl vzorku v případě preparace

aminokyselinového prekurzoru **5a**. Pro analýzu *in vitro* reakčních směsí byl použit lineární gradientový program: (čas [min]/%B) - 0/5, 1,5/5, 10/45,9; 1,5-min výplach kolony (100% B); 1,5-min ekvilibrace kolony (5% B). Pro preparaci látky **5a** byl použit lineární gradientový program: (čas [min]/%B) - 0/5, 2,5/5, 3,5/99 1,5-min výplach kolony (5% B). Celkový čas analýzy byl 13 min, respektive 5 min. Podmínky hmotnostní detekce analytů jsou uvedeny v Tab. 4.11. Jako referenční látka byl využit leucin-enkefalin acetát ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Chyba analýzy MS detektoru byla udržována pomocí referenční látky pod 5 ppm. Data byla zpracována v MassLyns 4.1. Chromatogramy byly extrahovány pro $[\text{M}+\text{H}]^+$ ionty analytů s velikostí tolerančního okna 0,05 Da.

Tab. 4.11. Podmínky MS detekce látek separovaných pomocí UHPLC.

Podmínka MS detekce	Nastavená hodnota
Interval měřených hodnot: W^+ mód	80 – 1 000 m/z
Doba skenu	0,1 s
Pauza mezi skeny	0,01 s
Průtok referenční látky (leucin-enkefalin)	$5 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
Pauza mezi skeny pro referenční látku	0,1 s
Napětí vložené na kapiláru	2 800 V
Napětí vložené na vstup do analyzátoru	40 V
Teplota dusíku	350°C
Průtok dusíku (desolvatační plyn)	$800 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$
Průtok dusíku při vstupu do analyzátoru	$50 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$
Teplota bloku iontového zdroje	120°C

4.2.6.2 *In vitro* testování enzymatické aktivity Apd6 proteinů

Enzymatická aktivita Apd6 proteinů byla testována v 30- μl reakcích. Reakční směsi obsahující všechny reagenty, mimo Apd6, byly pre-inkubovány ve 25°C po dobu 10 min. Po následném přidání konkrétního Apd6 proteinu reakce probíhala 1 h ve 25°C . Aktivita Apd6 proteinů (konečná koncentrace v reakci 1 mM) byla testována v přítomnosti 5-dezaflavinu F_{420} (finální koncentrace 10 μM), substrátu **5a** nebo **7a**, F_{420} -regeneračního systému (0,1 mM FGD, 2,5 mM glukosa-6-fosfát) v 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,0. Reakce byly ukončeny přidáním HCOOH (finální koncentrace 2%), precipitát byl oddělen centrifugací ($13\,000 \times g$, 3 min, pokojová teplota) a supernatant ihned analyzován pomocí UHPLC-MS. Kontrolní reakce měly stejné uspořádání s tím, že Apd6 proteiny byly buď před reakcí inaktivovány inkubací v termobloku v 80°C po dobu 20 min, případně byla vynechána jedna

z komponent reakce (její objem byl v tomto případě nahrazen ekvivalentním přídavkem dH_2O). Reakce byly analyzovány jako triplikáty v náhodném pořadí.

4.2.6.3 Kofaktor-vazebná studie: spektrofluorometrické stanovení zhášení fluorescence tryptofanů

Přítomnost aromatických aminokyselin ve struktuře proteinu je příčinou vlastní vnitřní fluorescence proteinu, kterou lze selektivně měřit excitací při vhodné vlnové délce.²⁵³ Vzhledem k faktu, že L-fenylalanin, který sice lze excitovat, ale jeho kvantový výtěžek je velmi nízký, a L-tyrosin, jehož kvantový výtěžek je sice dostatečný, ale často je zhášen přirozeně, tyto dvě aminokyseliny k vnitřní fluorescenci významně nepřispívají. Největší příspěvek je dán tryptofanovými zbytky.²⁵⁴ L-tryptofan představuje velkou hydrofobní aminokyselinu, často částečně či plně zanořenou uvnitř proteinu, nebo vázající ligandy hydrofobními π - π interakcemi, která může být selektivně excitována. Strukturální změny v proteinu vyvolané například ligandovými interakcemi či konformačními změnami mohou zvyšovat hydrofobicitu kolem tryptofanů a tím měnit intenzitu vnitřní fluorescence. Výsledkem je pokles fluorescence a posun k nižším vlnovým délkám. Tento jev je popisovaný jako „zhášení fluorescence tryptofanů“ a lze ho využít k měření rovnovážné konstanty K_D .

V této práci byla metoda použita pro determinaci afinity vazby proteinu LmbY k různým kofaktorům (FMN, FAD, F_{420}). Postupováno bylo dle již dříve popsaného protokolu,⁸¹ který byl modifikován. 100- μl *in vitro* reakce obsahovaly 2 μM LmbY a 0 – 200 μM kofaktor (FMN, FAD, F_{420}). Reakce probíhaly v 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,0 a byly provedeny v triplikátech. Po přidání kofaktoru k LmbY byla směs inkubována 20 min ve tmě, následně byly vzorky bezprostředně analyzovány pomocí spektrofluorofotometru (Synergy H1 Hybrid Reader; BioTek). Vzorky byly excitovány při 280 nm, měřená emisní vlnová délka byla 340 nm. Z naměřených dat byla vynesena hyperbolická funkce pomocí Kaleidagraph 4.5.2 a byly dopočítány rovnovážné konstanty K_D pro jednotlivé kofaktory.

4.2.6.4 Studie redukčního mechanismu: NMR spektroskopické stanovení inkorporace atomů deuteria

Nukleární magnetická rezonance je fyzikálně-chemická metoda založená na interakci jader atomů majících magnetický moment (spin) s vnějším magnetickým polem. Radiofrekvenční záření působí přechody mezi jednotlivými spinovými stavy jader atomů, přičemž tyto přechody jsou doprovázeny absorpcí či vyzářením energie v radiofrekvenčním pásmu. Vztah mezi rezonanční frekvencí (frekvence energie emitované excitovanými jádery) a vnějším magnetickým polem je závislý na konkrétním typu rezonovaného jádra, čímž je možné nezávisle rozlišit jádra různých atomů.

Pro NMR experimenty byl objem *in vitro* reakce LmbY navýšen na 160 μ l a všechny reagensie (včetně proteinu LmbY) byly převedeny do deuterované vody (99,98% D₂O). V reakci byly použity reagensie v následujících koncentracích: LmbY (1 mM), **6b** (0,1 mg), F₄₂₀-regenerační systém (0,1 mM FGD, 2,5 mM glukosa-6-fosfát), 10 μ M F₄₂₀. Reakce probíhala v 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,0. Směs byla pre-inkubována po dobu 10 min ve 25 °C a poté přesunuta do 3-mm NMR kyvety a ihned analyzována. Po analýze byl přímo do kyvety přidán protein LmbY. Kyveta byla inkubována ve 25 °C po dobu 1 h a vzorek byl poté znovu analyzován. K NMR analýze byl využit spektrometr 600 MHz Bruker AVANCE III (Rheinstetten), s nastavenými parametry: 600,23 MHz pro ¹H, 150,93 MHz pro ¹³C, D₂O, 298,2 K. Realizovány byly následující experimenty: ¹H NMR, gCOSY, ¹H-¹³C gHSQC, ¹H-¹³C gHMBC, D-TOCSY. ¹H NMR spektrum a ¹H-¹³C gHSQC, ¹H-¹³C gHMBC byly externě přiřazeny pomocí signálu 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteropropionové kyseliny (TSP). Data byla analyzována pomocí TopSpin 3.5. Data z NMR analýzy získal a vyhodnotil RNDr. Marek Kuzma, Ph.D.(Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.í.).

4.2.7 Příprava krystalů Apd6 proteinů

4.2.7.1 Stanovení krystalizačních podmínek Apd6 proteinů

Princip krystalizace je založen na převedení systému do stavu snížené rozpustnosti, až dosažení limitního stupně přesycení postupnou modifikací vlastností systému (pH, teplota, složení roztoku). Proces krystalizace zahrnuje tři fáze. (1) Nukleaci, kdy dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul, resp. iontů, a po překročení limitu nasycenosti začíná tvorba submikroskopických jader. (2) Růst krystalů je dynamický proces. Stejně jako nukleace, i proces růstu je závislý na přesycení matečného roztoku. Přesycení je proměnná, která oba uvedené procesy řídí a určuje tak jejich vznik, rozsah a kinetiku. (3) K ukončení růstu dochází, pokud se dvojfázový roztok přiblíží hranici rozpustnosti proteinu, čehož je dosaženo množstvím molekul vyloučených do krystalické struktury. Navozená rovnováha zastaví další kumulaci (shrnutí v McPherson a Gavira 2014).²⁵⁵

Krystaly Apd6 proteinů byly připravovány metodou „sedící kapky“, která je založená na difúzi par rozpouštědla. Kapička s roztokem proteinu a srážecího činidla je umístěna do vzduchotěsné komůrky rezervoáru. Rozdíl mezi tlakem vodních par v rezervoáru a v kapce je hnací silou vyrovnávacího procesu. Zásadní podmínkou je, aby složky roztoku měly nižší tlak vody, než je v kapce, čehož je docíleno umístěním neředěného krystalizačního činidla do rezervoáru. Z kapky se odpařuje voda a sráží se na povrchu rezervoáru, dokud se tlak vodních par nevyrovná.²⁵⁵

Purifikované Apd6 proteiny (koncentrace 10 – 18 mg · ml⁻¹) byly roboticky nanášeny na 96-jamkovou krystalizační destičku pomocí Gryphon Dropsetter (Art Robbins). Testována

byla krystalizace v komerčních sadách krystalizačních činidel: JCSG+ Suite (Qiagen), XP Screen (Jena Bioscience), PACT *premier*TM (Molecular Dimensions), SG1TM Screen (Molecular Dimensions) a BCS Screen (Molecular Dimensions) ve třech různých ředěních protein:činidlo – 2:1, 1:1, 1:2, při velikosti kapky 300 nl. Nanesená krystalizační destička byla umístěna do krystalizačního hotelu RI1000 (Formulatrix), krystalizace probíhala při 20°C, přičemž průběh byl on-line sledován a průběžně vyhodnocován.

4.2.7.2 Rentgenová strukturní analýza

Rentgenová krystalografie představuje analytickou metodu založenou na interakci hmoty, v proteinové krystalografii krystalických částic, s rentgenovým zářením, která umožňuje určit absolutní strukturu molekul, tedy uspořádání atomů v krystalové mřížce. Princip metody je založen na schopnosti krystalů chovat se jako trojrozměrné difrakční mřížky, které rozptylují dopadající monochromatické rentgenové záření pouze určitými směry.

Při rozptylu dopadá vlna primárního rentgenového záření na atomy v krystalu, dochází k rozkmitávání elektronů, které se stávají zdrojem sekundárního záření šířícího se všemi směry. Interference těchto parciálních vlnění způsobuje v určitých směrech zrušení, či naopak zesílení rentgenového záření. Tento jev se nazývá difrakce a nastává za podmínek, které lze vyjádřit Braggovou rovnicí. Ta popisuje difrakci jako odraz rentgenového záření na strukturních rovinách krystalu: rovnoběžný svazek paprsků rentgenového záření o vlnové délce λ dopadá na osnovu mřížkových rovin pod úhlem θ vzdálených od sebe o hodnotu d . Difraktovaná záření se odráží od osnovy rovin pod stejným úhlem. K difrakci dojde, pokud se odražený paprsek od jedné roviny zpozdí vůči paprsku odraženému od vedlejší roviny o celý násobek jeho vlnové délky λ . Toto je splněno právě tehdy, pokud platí Braggova rovnice:

$$2d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

dmezirovinná vzdálenost

θdifrakční úhel

ncelé číslo vyjadřující zpoždění jednoho paprsku vůči druhému

λvlnová délka rentgenového záření

V určování struktury proteinů se obvykle využívá monochromatické záření, takže λ je konstanta, stejně jako mezirovinné vzdálenosti d . Při samotném měření dochází ke změnám orientace krystalu, dochází tedy k difrakci na jednotlivých souborech strukturních rovin pod příslušným úhlem θ . Známe-li tento úhel, lze z Braggovy rovnice vypočítat mezirovinnou vzdálenost příslušné osnovy rovin. Rozptyl paprsků je zaznamenáván na detektoru v podobě difrakčních skvrn.

V této práci byly měřeny krystaly proteinů LmbY a Por15 a to za účelem primárního ověření, zda se jedná o proteinové krystaly. Krystaly v dostatečné velikosti ($> 100 \mu\text{m}$) byly pomocí smyčky o průměru $100 \mu\text{m}$ (MiTeGen) vyjmuty z krystalizačního roztoku následujícím

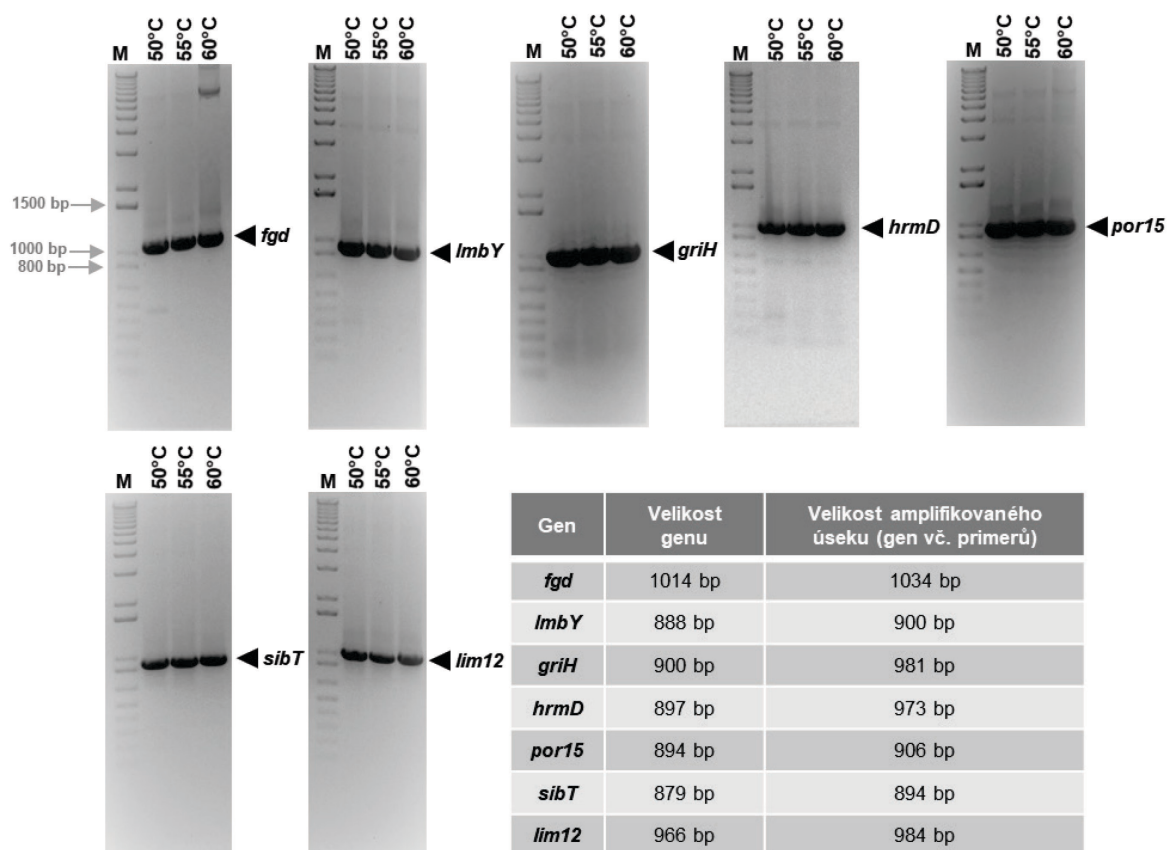
způsobem: krystalizační jamka s cílovým krystalem byla převrstvena kryoprotekčním olejem, krystal byl vyjmut pomocí smyčky. Olej nahrazuje roztok krystalizačního činidla v okolí krystalu a zabraňuje tak tvorbě krystalků ledu, které znehodnocují difrakční data a mohou poničit krystal proteinu. Následovalo okamžité umístění krystalu do výchozí pozice pro difrakční analýzu za současného chlazení krystalu v proudu par tekutého dusíku proudících z kryostatu ($t = 100 \text{ K}$). Difrakce byla měřena na difraktometru D8 Venture (Bruker) s rentgenovým zdrojem s anodou ze slitiny kapalného galia (MetalJet D2; Excillum), detektorem Photon II (Bruker) a čtyřkruhovým goniometrem. Měření prováděl RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D. (Biotechnologický ústav, AV ČR, v.v.i.).

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava rekombinantních proteinů

5.1.1 Expresní konstrukty pro heterologní produkci proteinů Apd6 a FGD

Gen *lmbY* byl amplifikován z kosmidu pLK6.²⁰⁷ Geny *por15*, *sibT*, *lim12*, *hrmD*, *griH* a *fgd* byly amplifikovány z chromozomální DNA *S. albus* subsp. *albus*, *S. sibiricum*, *S. sp.* ICBB 1877, *S. griseoflavus*, *S. muensis* a *M. smegmatis*. Při optimalizaci PCR podmínek byl testován vliv teploty na hybridizaci primerů s komplementárními úseky. Testován byl gradient teplot v rozmezí 50°C, 55°C a 60°C. Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly ve výtěžnosti PCR reakce (Obr. 5.1). PCR produkty byly vloženy do příslušných vektorů za použití metody SLiCE (*hrmD*, *griH*) nebo ligační reakcí řízenou T4 DNA ligasou (*lmbY*, *sibT*, *lim12*, *por15*, *fgd*). Správnost sekvence inzertu byla ověřena DNA sekvenováním.

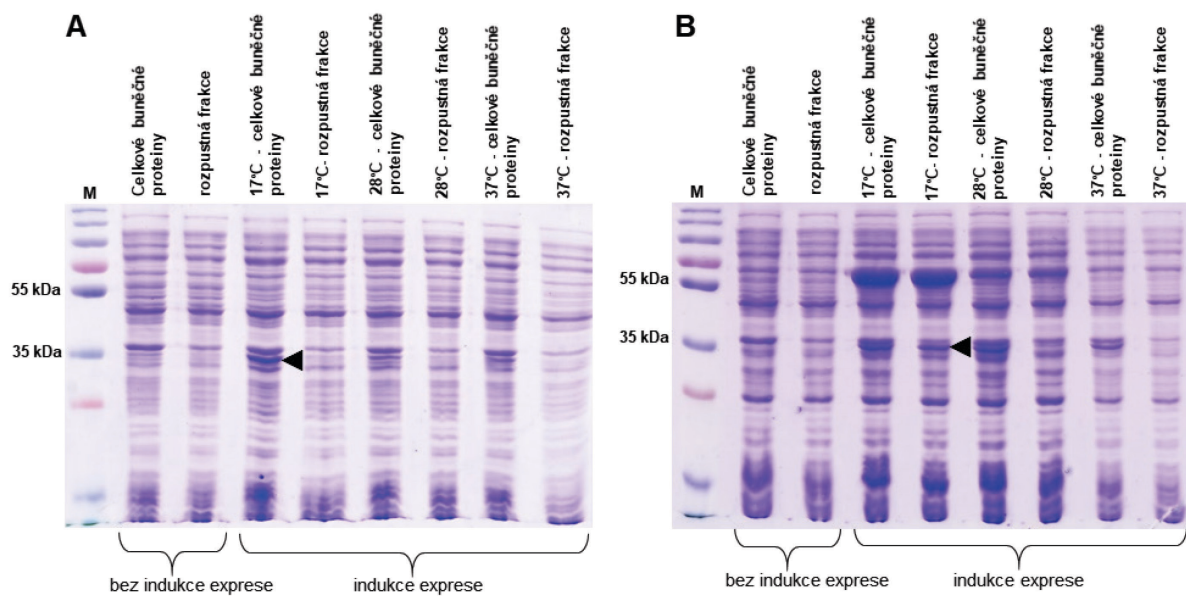


Obr. 5.1. Optimalizace podmínek PCR amplifikace genů *fgd*, *lmbY*, *griH*, *hrmD*, *por15*, *sibT* a *lim12*: testování vlivu teploty na hybridizaci primerů s komplementárními úseky DNA. Elektroforetická separace v 1% agarosovém gelu, M=standard molekulové velikosti DNA.

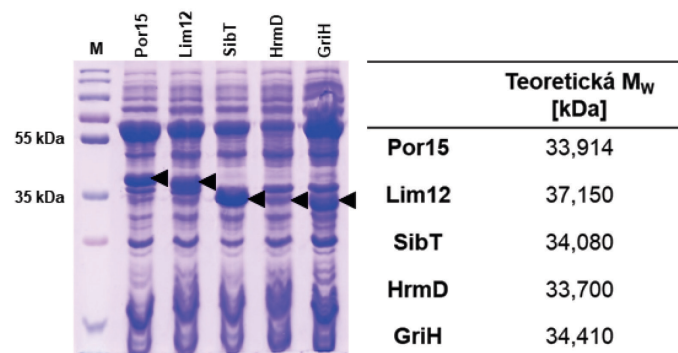
5.1.2 Rekombinantní Apd6 proteiny

5.1.2.1 Heterologní produkce Apd6 proteinů

Pro stanovení optimálních podmínek nadprodukce Apd6 proteinů byla testována exprese *lmbY* v kmenech *E. coli* BL21 (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL. Dle SDS analýzy je *LmbY* nejlépe produkován a skládán v 17°C v přítomnosti chaperoninů, nicméně většina rekombinantního *LmbY* byla produkována ve formě nerozpustných tělísek (Obr. 5.2). Bylo tedy zcela evidentní, že skládání proteinu *LmbY* neprobíhá optimálně. Proto byly všechny ostatní připravované Apd6 proteiny nadprodukčovány v 17°C s post-indukční dobou kultivace 20 h (Obr. 5.3). V těchto podmínkách je růst buněk oproti optimální kultivační teplotě *E. coli* (37°C) zpomalen, proteiny jsou tedy jednak pomaleji produkovány, ale především je tímto zajištěno více času pro jejich správné složení.



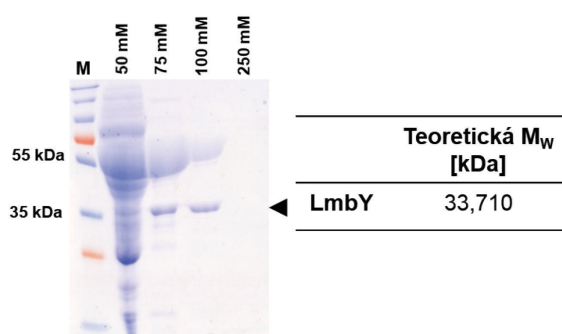
Obr. 5.2. Vliv přítomnosti chaperoninů a post-indukční kultivační teploty na expresi *lmbY*: *LmbY* produkováný v (A) *E. coli* BL21 (DE3) a (B) *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL. SDS-PAGE – teoretická M_w *LmbY*: 33,710 kDa; *LmbY* je znázorněn černou šipkou. M=standard molekulové velikosti proteinů.



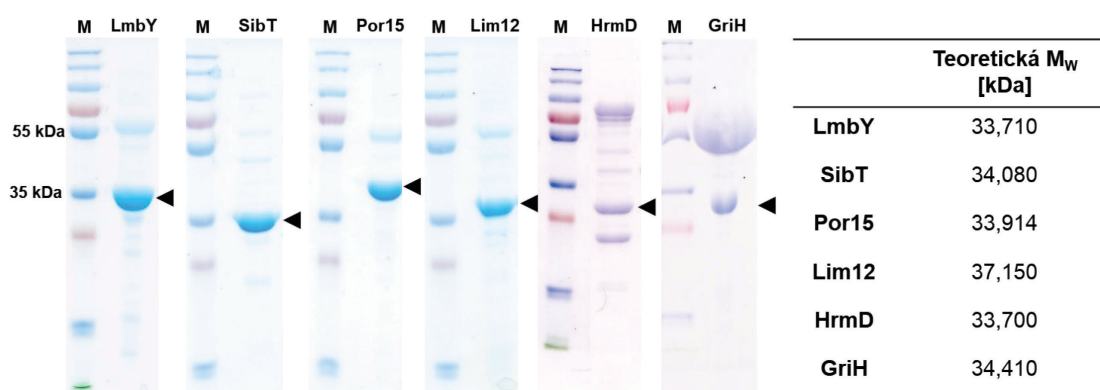
Obr. 5.3. Expresa *por15*, *lim12*, *sibT*, *hrmD* a *griH*. Expresa v *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL, post-indukční podmínky kultivace: 17°C, 20 h. SDS-PAGE – rozpustné buněčné proteiny; nadprodukované Apd6 proteiny jsou znázorněny černou šipkou. M=standard molekulové velikosti proteinů.

5.1.2.2 Metaloafinitní purifikace Apd6 proteinů

Podmínky purifikace byly optimalizovány pro LmbY (Obr. 5.4). Stanovené optimální podmínky byly následně aplikovány i na ostatní Apd6 proteiny. Po nanesení supernatantu na kolonu byly nezachycené proteiny odstraněny pufrům obsahujícím 75mM imidazol. Při této koncentraci imidazolu byla u většiny purifikovaných proteinů odstraněna majoritní část chaperoninů, přičemž protein byl na koloně stále zadržován. Zachycené proteiny byly z kolony uvolněny pufrům obsahujícím 250mM imidazol (Obr. 5.5). Z 1 l kultivace bylo průměrně možné získat 2,6 mg purifikovaného LmbY, 10,3 mg purifikovaného Por15, 2,5 mg purifikovaného Lim12, 2,2 mg purifikovaného SibT, 1,8 mg purifikovaného HrmD a 2,3 mg purifikovaného GriH.



Obr. 5.4. **Optimalizace purifikace nadprodukováného LmbY:** po nanesení supernatantu byla kolona postupně promyta pufrům se zvyšující se koncentrací imidazolu (50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM). Koncentrace imidazolu 75 mM v promývacím pufru se jeví jako optimální, neboť je odstraněna většina chaperoninů a zároveň je LmbY stále na koloně zadržován. SDS-PAGE – LmbY je znázorněn černou šipkou. **M**=standard molekulové velikosti proteinů.



Obr. 5.5. **Purifikované Apd6 rekombinantní proteiny.** SDS-PAGE – nadprodukované proteiny jsou znázorněny černou šipkou; aplikované množství proteinů – 10 μ g. **M**=standard molekulové velikosti proteinů.

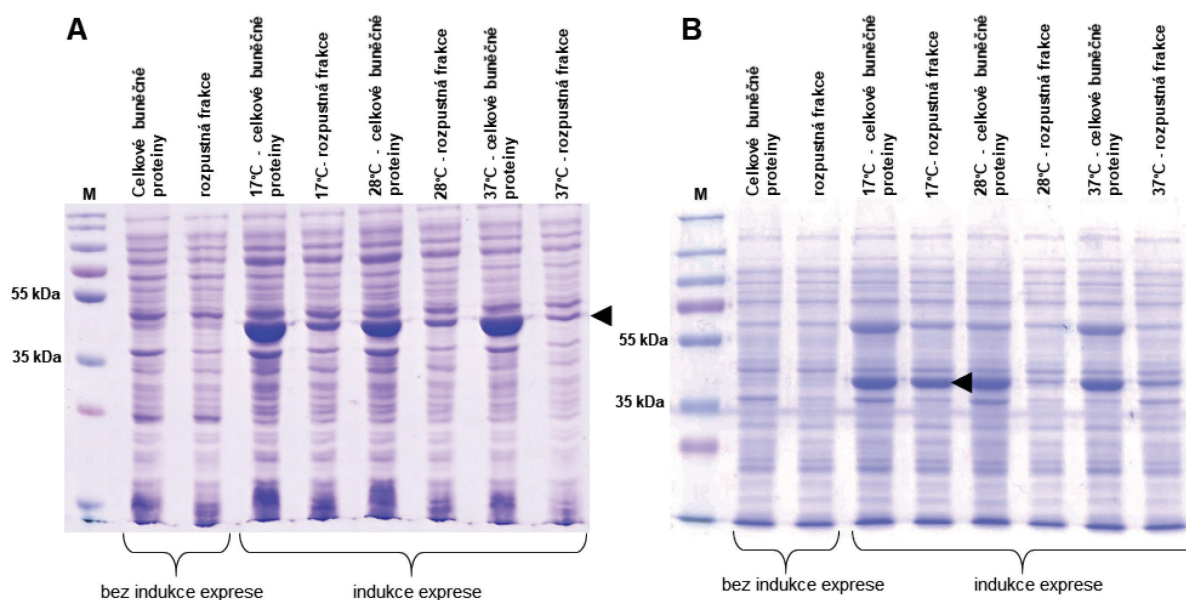
Příprava rekombinantních Apd6 proteinů představuje náročný proces. Hlavním problémem je již zmíněná produkce, kdy je většinová část rekombinantních proteinů produkována jako nerozpustná (Obr. 5.2). Purifikaci je proto nutné provádět z většího vstupního kultivačního objemu (běžně 1 l). Také stabilita purifikovaných proteinů představuje problém, neboť značná precipitace je pozorována při skladování ve +4°C i -20°C.

U purifikovaného GriH zůstává po purifikaci navázáno větší množství chaperoninů, které i přes další optimalizaci podmínek purifikace nebylo možné odstranit (Obr. 5.5). Chaperoniny se zřejmě ke GriH váží pevněji, než k ostatním purifikovaným Apd6 proteinům. Vůbec nejproblematictějším proteinem byl HrmD. I přes opětovné pokusy se nepodařilo nalézt podmínky, které by zvýšily čistotu purifikovaného HrmD.

5.1.3 Rekombinantní protein FGD

5.1.3.1 Heterologní produkce FGD

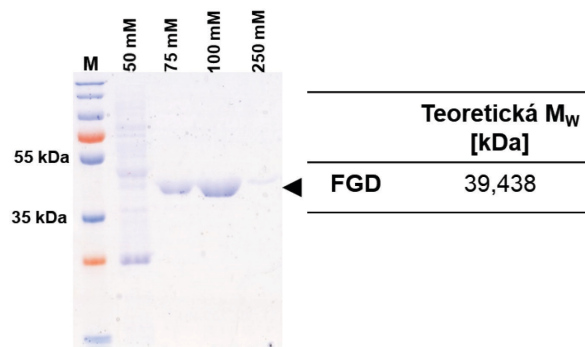
Pro stanovení optimálních podmínek nadprodukce FGD byla testována exprese *fgd* v kmenech *E. coli* BL21 (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL. Dle SDS analýzy je FGD nejlépe produkován a skládán v 17°C v přítomnosti chaperoninů (Obr. 5.6).



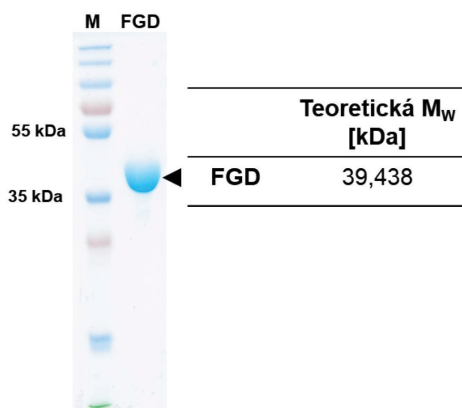
Obr. 5.6. Vliv přítomnosti chaperoninů a post-indukční kultivační teploty na expresi *fgd*: Fgd produkován v (A) *E. coli* BL21 (DE3) a (B) *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL. SDS-PAGE – teoretická M_w FGD: 39,438 kDa; FGD je znázorněn černou šipkou. M=standard molekulové velikosti proteinů.

5.1.3.2 Metaloafinitní purifikace FGD

Pro purifikaci byly jako optimální stanoveny následující podmínky: po nanesení supernatantu na kolonu byly nezachycené proteiny odstraněny puřem obsahujícím 75mM imidazol (Obr. 5.7). Při této koncentraci imidazolu byly odstraněny všechny chaperoniny. Zachycený FGD byl z kolony uvolněn puřem obsahujícím 250mM imidazol (Obr. 5.8). Ze 100 ml kultivace bylo průměrně možné získat 3,5 mg purifikovaného FGD.



Obr. 5.7. **Optimalizace purifikace nadprodukovaného FGD:** po nanesení supernatantu byla kolona promyta pufrům se zvyšující se koncentrací imidazolu (50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM). Koncentrace imidazolu 75 mM v promývacím pufru se jeví jako optimální, neboť jsou odstraněny všechny chaperoniny a FGD je stále na koloně zadržován. SDS-PAGE – FGD je znázorněn černou šipkou. **M**=standard molekulové velikosti proteinů.



Obr. 5.8. **Purifikovaný FGD.** SDS-PAGE – FGD je znázorněn černou šipkou; aplikované množství proteinu – 34 μ g. **M**=standard molekulové velikosti proteinů.

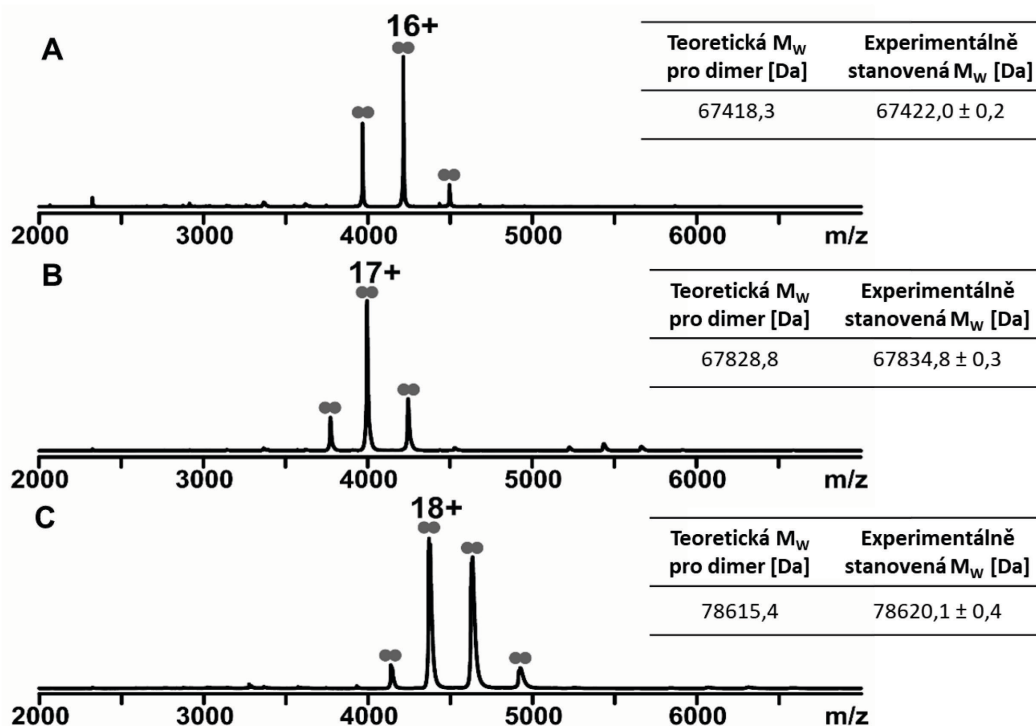
5.2 Charakterizace purifikovaných Apd6 proteinů a FGD

Z důvodu předpokládané oxidoreduktasové aktivity a zároveň 5-deazaflavinové závislosti Apd6 proteinů bylo pro správné stanovení jejich enzymové aktivity nezbytné: (1) vyloučit vazbu jakéhokoliv jiného kofaktoru (př. flavinů, nikotinamidů) k purifikovaným proteinům, a to včetně FGD, který je součástí *in vitro* reakce (k vazbě kofaktorů na proteiny by teoreticky mohlo docházet během exprese v producentovi *E. coli*). (2) Vyloučit modifikace v aminokyselinové sekvenci proteinů, které za určitých okolností mohou plnit roli redoxního kofaktoru.²⁵⁷ (3) Experimentálně ověřit předpokládanou, ovšem nepotvrzenou 5-deazaflavinovou závislost.

K takto rozsáhlé charakterizaci rekombinantních proteinů muselo být přistoupeno poté, co první *in vitro* testy ukazovaly nestandardní výsledky u negativních kontrol (kap. 5.4.5 a kap. 6.1.2).

5.2.1 MS analýza LmbY, Por15 a FGD za nativních podmínek

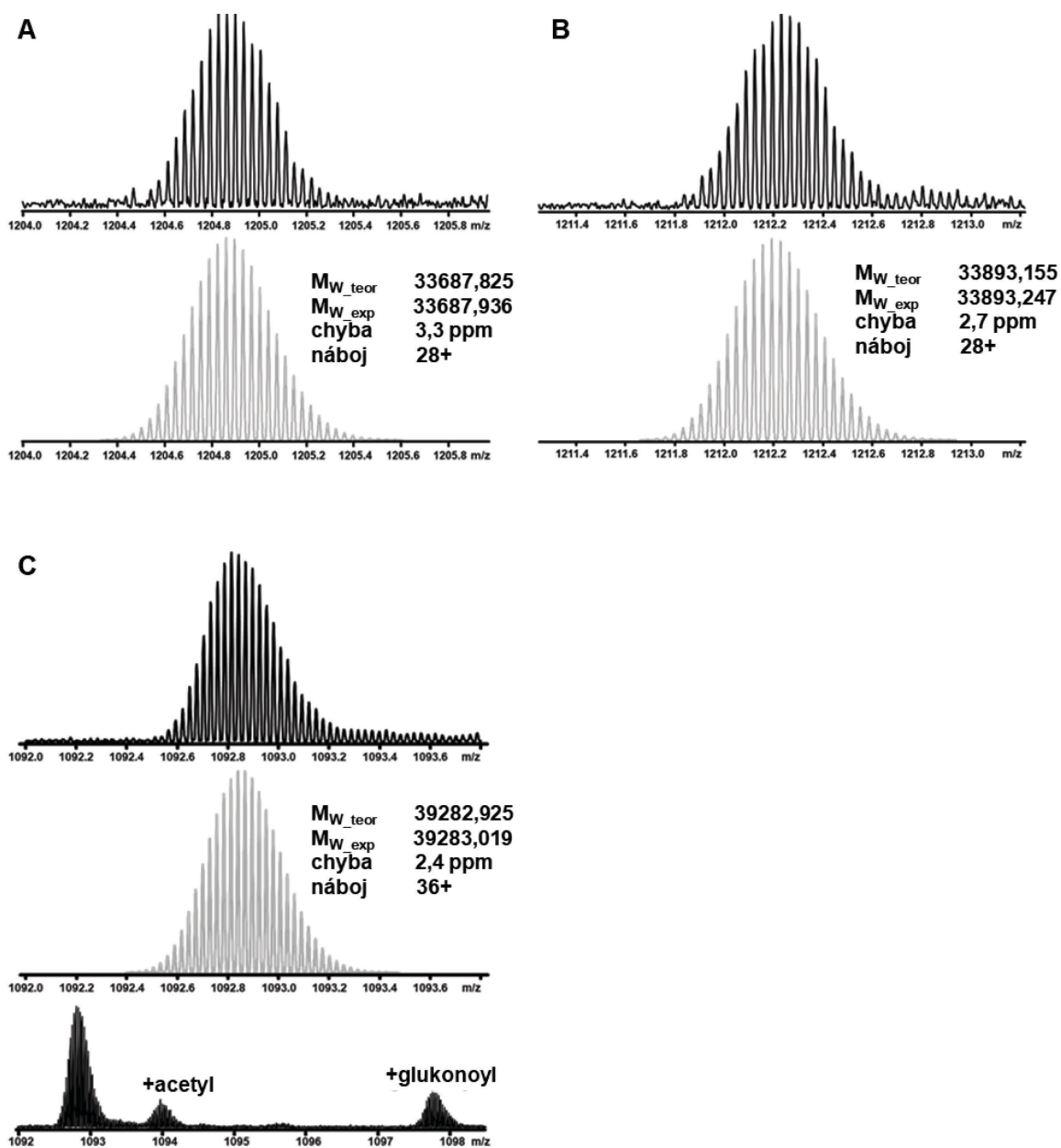
Purifikované proteiny LmbY, Por15 a FGD byly za nativních MS podmínek měření vyhodnoceny jako homodimerní. Na základě srovnání teoretických a experimentálně zjištěných hmotností proteinů vyplývá, že proteiny ve svém nativním stavu nevážou, kovalentně či nekovalentně, žádný kofaktor (Obr. 5.9).



Obr. 5.9. **Nativní MS analýza: (A) LmbY, (B) Por15 a (C) FGD.** Proteiny se ve své nativní konformaci vyskytují jako homodimery, zároveň dle dat nevážou žádné kovalentně či nekovalentně vázané kofaktory. Individuální nábojové stavy jsou číselně znázorněny nad šedou dvojtečkou.

5.2.2 MS analýza LmbY, Por15 a FGD za ne-nativních podmínek

Experimentální data získaná intaktním měřením proteinů LmbY, Por15 a FGD za ne-nativních podmínek ukázala, že proteiny LmbY a Por15 (Obr. 5.10A a 5.10B) neobsahují žádné kovalentní modifikace a zároveň, že aminokyselinová sekvence všech tří proteinů (LmbY, Por15, FGD) je bez jakýchkoliv mutací. V případě FGD (Obr. 5.10C) byly v aminokyselinové sekvenci detekovány dvě modifikace – *N*-terminální acetylace a glukonoylace.



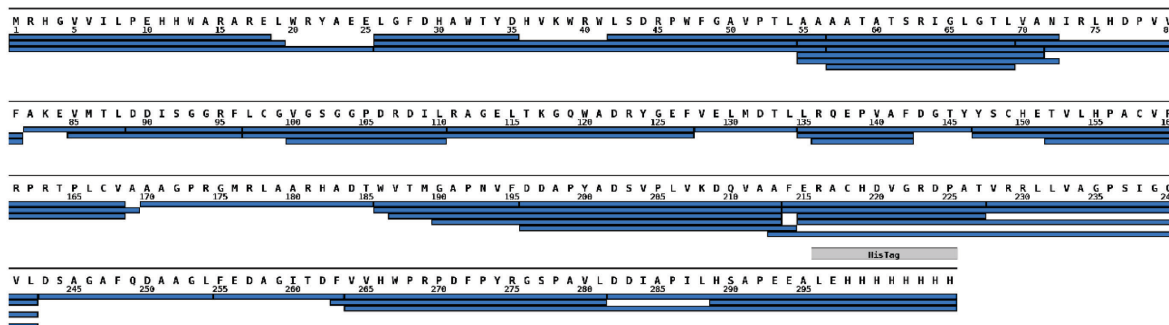
Obr. 5. 10. Intaktní měření proteinů: (A) LmbY, (B) Por15 a (C) FGD s využitím ESI-FT-ICR MS. Zobrazeny jsou vybrané nábojové stavy, černá spektra představují experimentální data, šedá spektra zobrazují modelovaný izotopický vzor. Proteiny shodně neobsahují žádné kovalentní modifikace ani mutace v jejich aminokyselinových sekvencích. V případě FGD (panel C) byla detekována *N*-terminální acetylace a glukonoylace. V jednotlivých panelech jsou zobrazeny teoretické a experimentální monoizotopické hmotnosti, chyba měření a nábojový stav proteinu.

5.2.3 „Bottom-up“ validace MS stanovení LmbY, Por15 a FGD

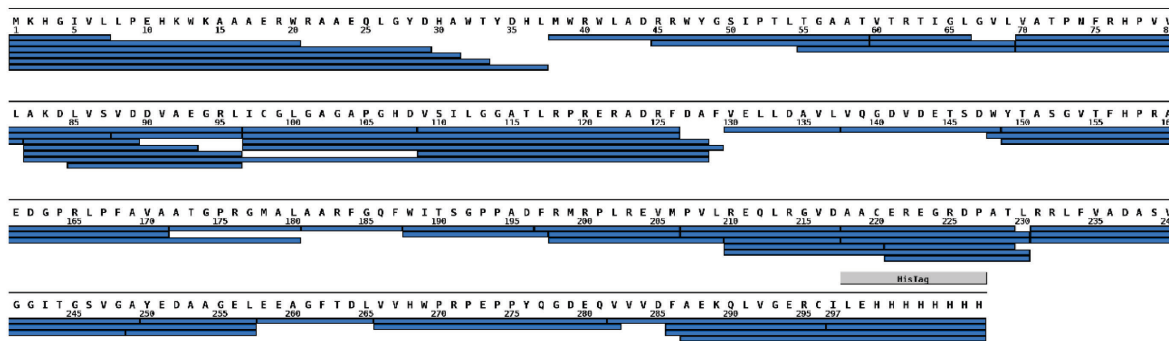
„Bottom-up“ validací byly na závěr ověřeny výsledky nativního a intaktního měření proteinů LmbY, Por15 a FGD. Proteiny byly on-line štěpeny na imobilizované pepsinové koloně, vznikající peptidy byly analyzovány pomocí LC-MS/MS a identifikovány hledáním oproti MASCOT databázi. Ve všech měřeních bylo dosaženo plného sekvenčního pokrytí a výsledky měření byly v souladu s naměřenými hodnotami získanými v obou předchozích měřeních (popsaných v kap. 5.2.1 a 5.2.2). Kromě již identifikované *N*-terminální acetylace

a glukonoylace proteinu FGD bylo dále zjištěno, že u proteinu FGD chybí *N*-terminální methionin (Obr. 5.11).

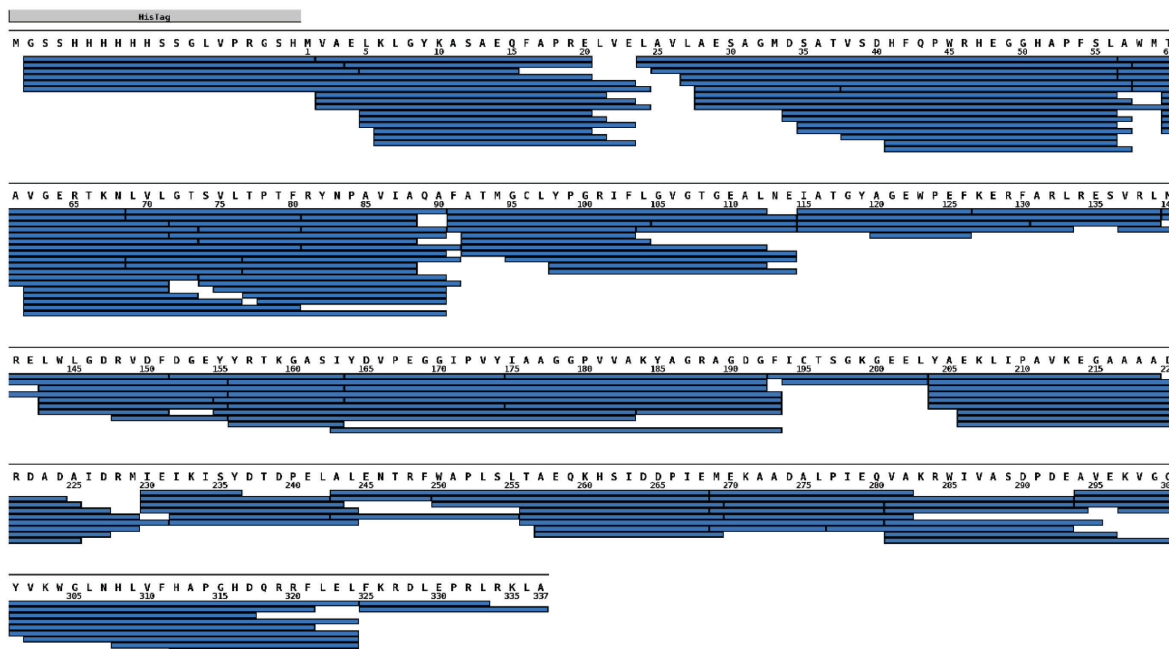
A



B



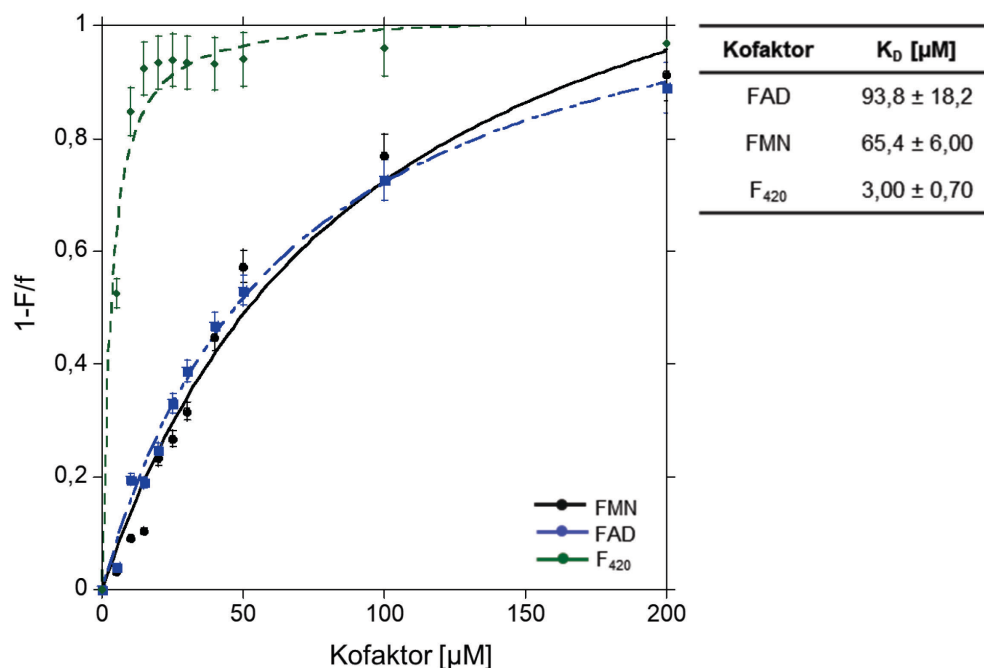
C



Obr. 5.11. **Sekvenční pokrytí rekombinantního (A) LmbY, (B) Por15 a (C) FGD.** Úsečky pod aminokyselinovou sekvencí představují individuální peptidy. His-kotva je znázorněna šedě. Ve všech případech bylo sekvenční pokrytí úplné. V případě FGD chybí *N*-terminální methionin a *N*-konec je částečně acetylován a glukonoylován.

5.2.4 Determinace kofaktor-vazebných schopností proteinu LmbY

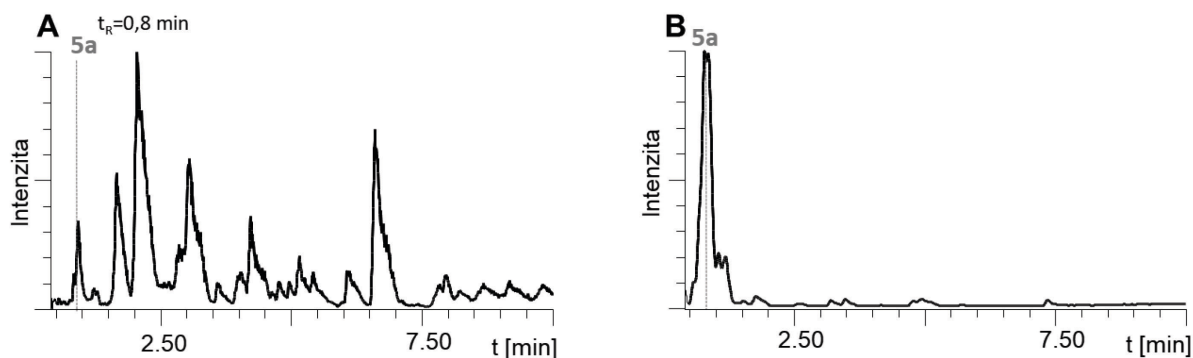
K určení kofaktorové preference Apd6 proteinů bylo spektrofluorometricky stanoveno zhášení fluorescence tryptofanů purifikovaného LmbY, jako reprezentativního zástupce, v přítomnosti flavinových kofaktorů FMN a FAD a 5-deazaflavinového kofaktoru F_{420} . Z naměřených dat byla vynesena hyperbolická funkce pomocí Kaleidagraph 4.5.2. Koncentrace kofaktoru byla vynesena proti hodnotě, která určuje frakci proteinu vázanou ke kofaktoru ($\frac{1-F}{f}$, kde F je fluorescence Trp_{LmbY} v přítomnosti určitého kofaktoru, f je fluorescence Trp_{LmbY} v nepřítomnosti kofaktoru). Pro jednotlivé kofaktory byly zjištěny následující rovnovážné konstanty K_D : $3,00 \pm 0,70 \mu\text{M}$ pro F_{420} , $93,8 \pm 18,2 \mu\text{M}$ pro FMN a $65,4 \pm 6,0 \mu\text{M}$ pro FAD. Přestože je předpokládáno, že nativním kofaktorem LmbY je s větší pravděpodobností redukovaný $F_{420}H_2$, než jeho oxidovaná forma F_{420} , výsledky indikují, že LmbY preferenčně váže F_{420} ve srovnání s testovanými flaviny (Obr. 5.12).



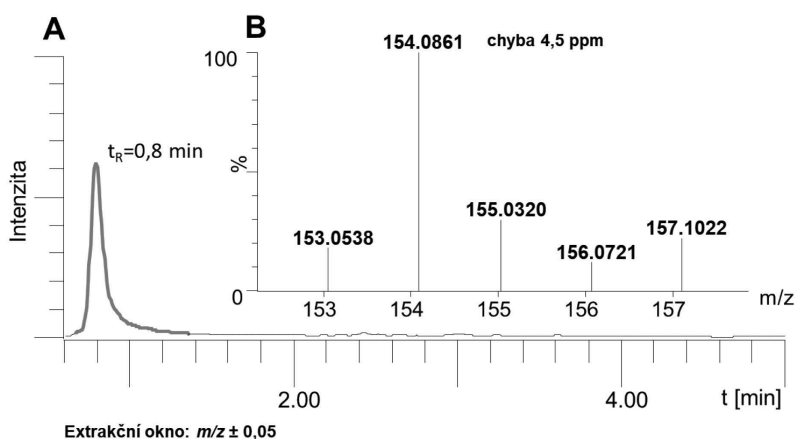
Obr. 5.12. Spektrofluorometrické stanovení zhášení fluorescence tryptofanů jako vazebná studie k monitorování LmbY konformačních změn – v přítomnosti F_{420} (zeleně), FAD (modře) a FMN (černě). Excitační vlnová délka: $\lambda=285 \text{ nm}$, emisní vlnové délka: $\lambda=340 \text{ nm}$.

5.3 Purifikace prekurzoru 5a z kultivačního média *S. lincolnsensis* ΔLmbY

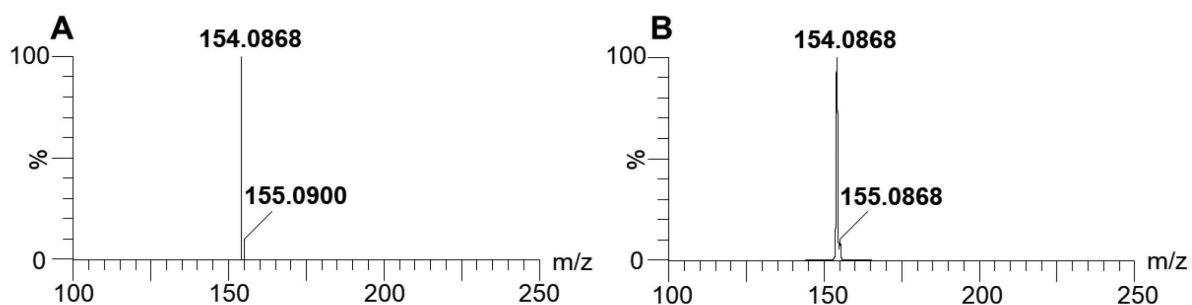
Pomocí SPE byl připraven extrakt z kultivačního média *S. lincolnsensis* ΔLmbY . Na základě přesné hmoty byl určen t_R píku korespondujícího látky **5a**, $t_R = 0,8 \text{ min}$ (Obr. 5.13A). Následně byla provedena preparace látky **5a** (Obr. 5.13B). Naměřené m/z purifikované látky **5a** odpovídalo teoretické hodnotě s chybou 4,5 ppm (Obr. 5.14). Naměřený poměr distribuce izotopických píků korespondoval s teoretickými hodnotami (Obr. 5.15).



Obr. 5.13. Srovnání čistoty látky **5a** před a po purifikaci. (A) Původní extrakt z kultivačního média *S. lincolnensis* $\Delta lmbY$ a (B) purifikovaná látka **5a**. BPI (base peak intensity) chromatogramy zobrazující intenzitu píku s nejvyšším signálem v daném t_R .



Obr. 5.14. Purifikovaná látka **5a**. (A) Chromatogram extrahovaný pro $[M+H]^+$ ion korespondující látce **5a** (m/z 154,0868). (B) Odpovídající hmotnostní spektrum a chyba měření.

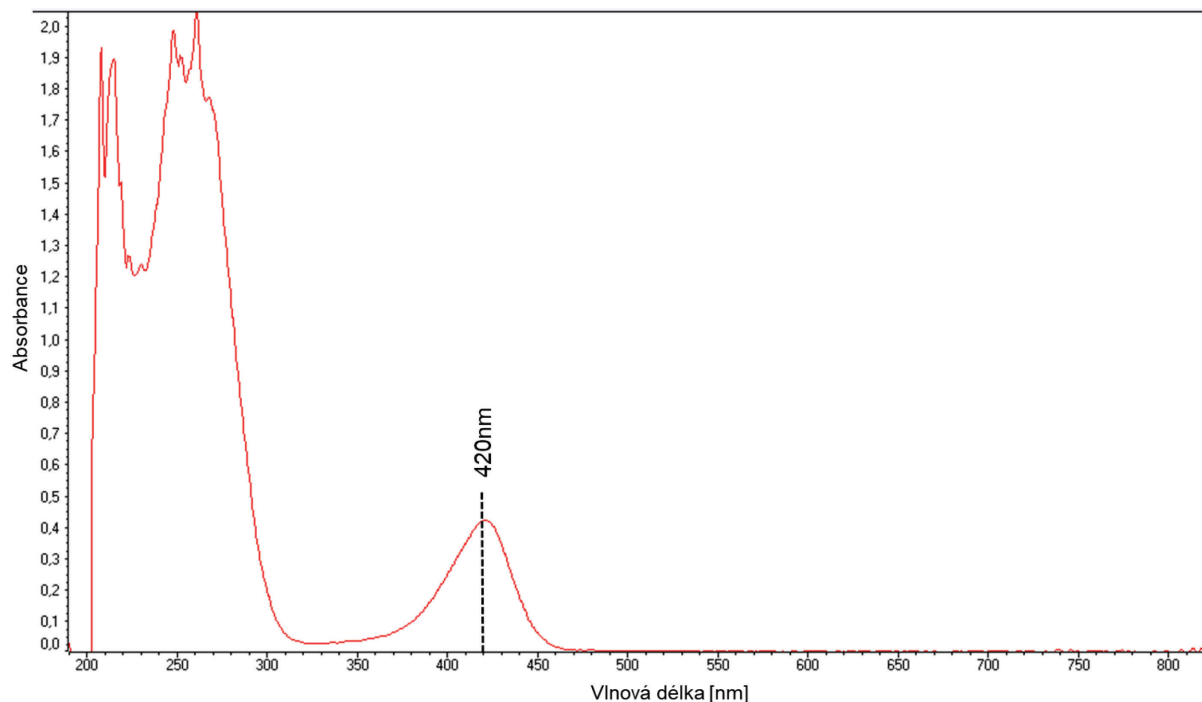


Obr. 5.15. Porovnání (A) experimentální a (B) teoretické izotopické distribuce látky **5a**. Hmotnostní spektra.

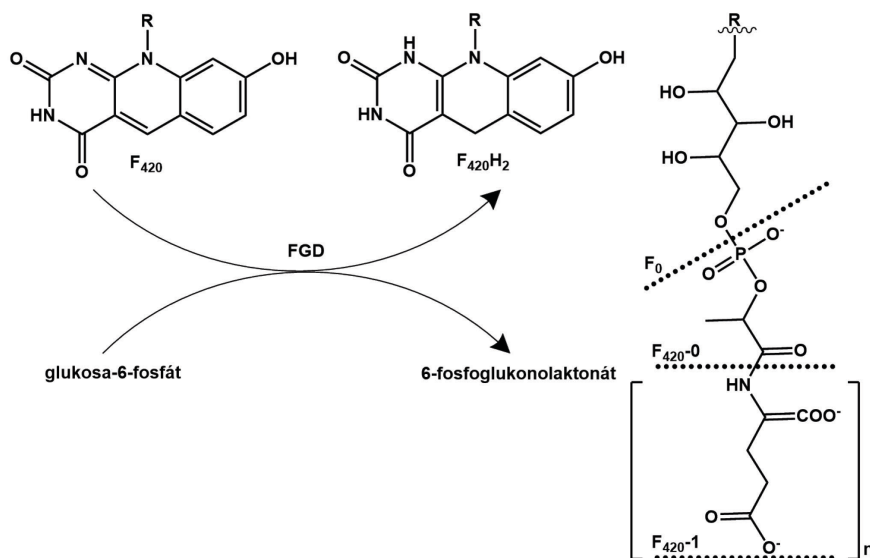
5.4 *In vitro* testování enzymové aktivity Apd6 v přítomnosti F_{420}

Kofaktor F_{420} není komerčně dostupný. V literatuře byla popsána příprava geneticky modifikovaného kmene *M. smegmatis*, u kterého byla zaznamenána až 10× vyšší produkce F_{420} ve srovnání s divokým kmenem, a představuje tak vhodný nástroj pro jeho produkci a následnou izolaci. Nejen, že tento kmen není volně dostupný, ale také izolace kofaktoru zahrnuje vybavení a metody, které v laboratoři, kde tato práce vznikala, nejsou dostupné.

Z tohoto důvodu byla navázána zahraniční spolupráce se skupinou, která produkci a přípravu F_{420} publikovala.²⁵¹ Takto byl získán již purifikovaný F_{420} , jehož absorpční spektrum je zobrazeno na Obr. 5.16. Redukovaná forma kofaktoru byla získána *in situ* pomocí F_{420} -regeneračního systému, který je založen na oxidaci glukosa-6-fosfátu pomocí FGD při současné redukci F_{420} (Obr. 5.17).



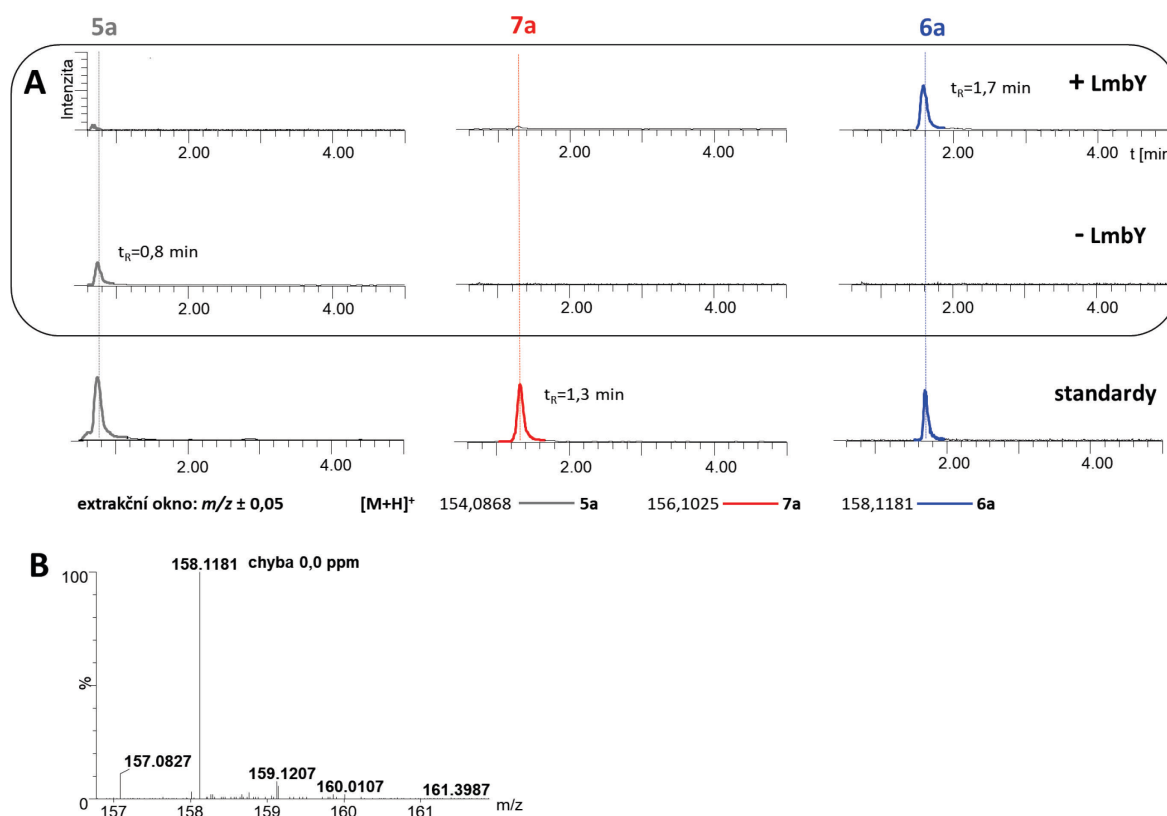
Obr. 5.16. Absorpční spektrum purifikovaného kofaktoru F_{420} . Oxidovaný F_{420} dosahuje absorpčního maxima při 420 nm.



Obr. 5.17. $F_{420}H_2$ -regenerační systém: F_{420} a reakce katalyzovaná FGD. Glukosa-6-fosfát je oxidována na 6-fosfoglukonolaktónát za současné redukce kofaktoru F_{420} na $F_{420}H_2$, který je následně odebírán různými $F_{420}H_2$ -závislými reduktasami (převzato a upraveno²⁵¹).

5.4.1 Enzymová aktivita LmbY

Enzymová aktivita LmbY byla testována *in vitro* v reakci s látkou **5a** a v přítomnosti F₄₂₀ a F₄₂₀H₂-regeneračního systému. V reakci bylo pozorováno úplné vyčerpání substrátu **5a**, zároveň byl nově v t_R = 1,7 min detekován pík, jehož přesná hmota koresponduje s iontem předpokládaného plně nasyceného produktu reakce, látkou **6a** (Obr. 5.18). Naopak, v reakční směsi nebyl detekován iont odpovídající **7a**, látce s jednou dvojnou vazbou. V kontrolních reakcích, obsahujících denaturovaný LmbY, nebyla pozorována žádná enzymatická přeměna substrátu **5a**. Identita látek **5a**, **6a** a **7a** byla potvrzena srovnáním MS spekter a t_R standardů těchto látek.

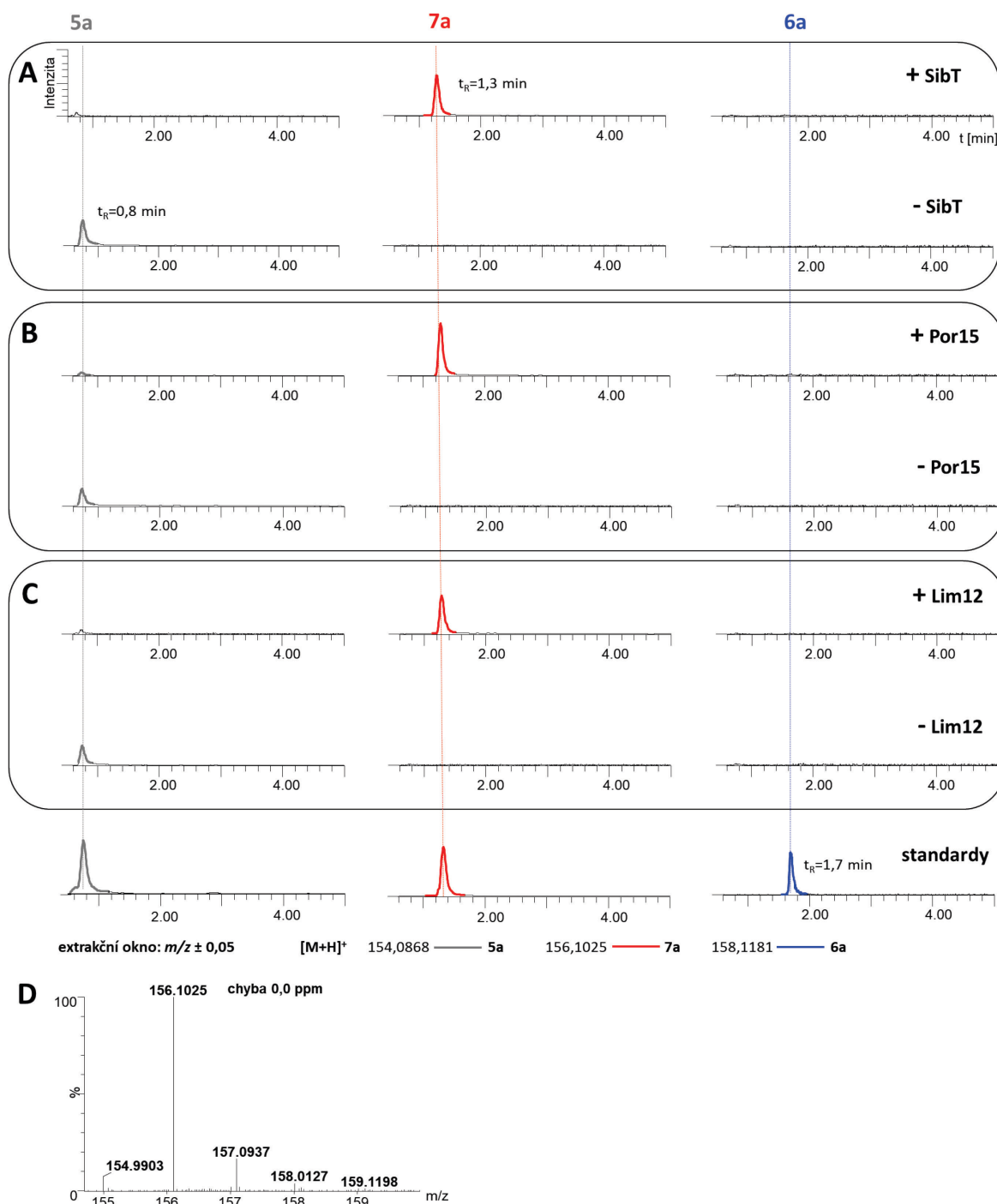


Obr. 5.18. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce katalyzované LmbY. (A) LmbY v přítomnosti F₄₂₀H₂ *in vitro* katalyzuje redukcí substrátu **5a** na plně nasycený produkt **6a**. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy pro ([M+H]⁺) substrát **5a** (šedě) a produkt **6a** (modře). Mono-nenasycený meziprodukt **7a** (červeně) v reakční směsi detekován nebyl. (B) HRMS spektrum reakčního produktu **6a** a chyba měření.

5.4.2 Enzymová aktivita SibT, Por15, Lim12

Enzymová aktivita Apd6 homologů z biosyntézy PBD byla testována v analogické reakci jako LmbY. V reakci obsahující SibT/Por15/Lim12, látku **5a**, F₄₂₀ a F₄₂₀H₂-regenerační systém bylo stejně jako u LmbY pozorováno úplné vyčerpání substrátu **5a**, a to i v případě Lim12 z biosyntézy limazepinu, pro který je jako nativní substrát předpokládána látka **5b** (důvodem je chybějící Apd3 methyltransferasa v limazepinové dráze; kap. 2.5.1). V reakční

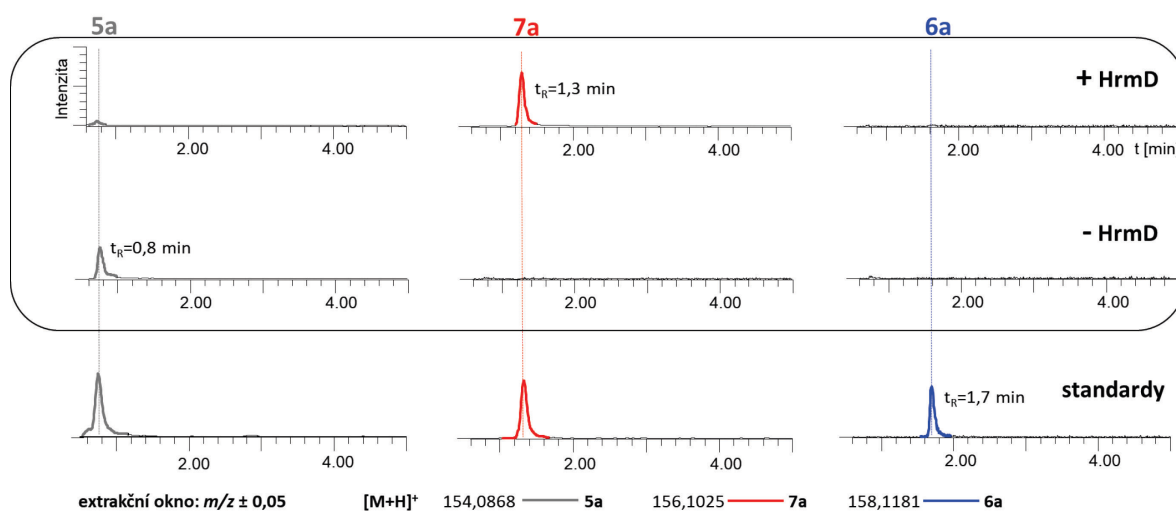
směsi byl nově detekován pík, jehož přesná hmotnost koresponduje s látkou **7a** (Obr. 5.19). V porovnání s produktem LmbY, tedy látkou **6a**, je produktem reakce katalyzované Apd6 homology z biosyntézy PBD látka obsahující ve své struktuře jednu dvojnou vazbu. V kontrolních reakcích, obsahujících denaturované Apd6 proteiny, nebyla pozorována žádná katalytická aktivita. Identita látek **5a**, **6a** a **7a** byla potvrzena srovnáním MS spekter a t_R standardů těchto látek.



Obr. 5.19. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakcí katalyzovaných (A) SibT, (B) Por15 a (C) Lim12. SibT/Por15/Lim12 v přítomnosti $F_{420}H_2$ *in vitro* katalyzují redukci substrátu **5a** na produkt **7a**, látku obsahující ve své struktuře jednu dvojnou vazbu. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) korespondující substrátu **5a** (šedě) a produktu **7a** (červeně). Plně nasycený **6a** (modře) v reakční směsi detekován nebyl. (D) HRMS spektrum reakčního produktu **7a** a chyba měření.

5.4.3 Enzymová aktivita HrmD

Předpokládaným přirozeným substrátem HrmD je látka **4a** (důvodem je chybějící isomerasa Apd5 v hormaomycinové dráze; kap 2.5.1), která ale není dostupná. Nicméně, kromě stanovení enzymové aktivity HrmD bylo také cílem determinovat jeho reakční specifitu, která by ovšem v reakci s **4a** stejně nemohla být určena, neboť pozice dvojných vazeb ve **4a** umožní redukci pouze jedné z nich. Enzymová aktivita HrmD byla proto testována analogicky jako v případě homologů LmbY a Apd6 z biosyntézy PBD, tedy v reakci s **5a** za přítomnosti F_{420} a $F_{420}H_2$ -regeneračního systému. V reakci bylo pozorováno úplné vyčerpání substrátu, nově byl detekován pík, jehož přesná hmota koresponduje s látkou **7a** (Obr. 5.20), tedy reakční specifita HrmD se shoduje se specifitou testovaných PBD homologů. V kontrolních reakcích obsahujících denaturovaný HrmD nebyla pozorována žádná katalytická aktivita. Identita látek **5a**, **6a** a **7a** byla potvrzena srovnáním MS spekter a t_R standardů těchto látek.

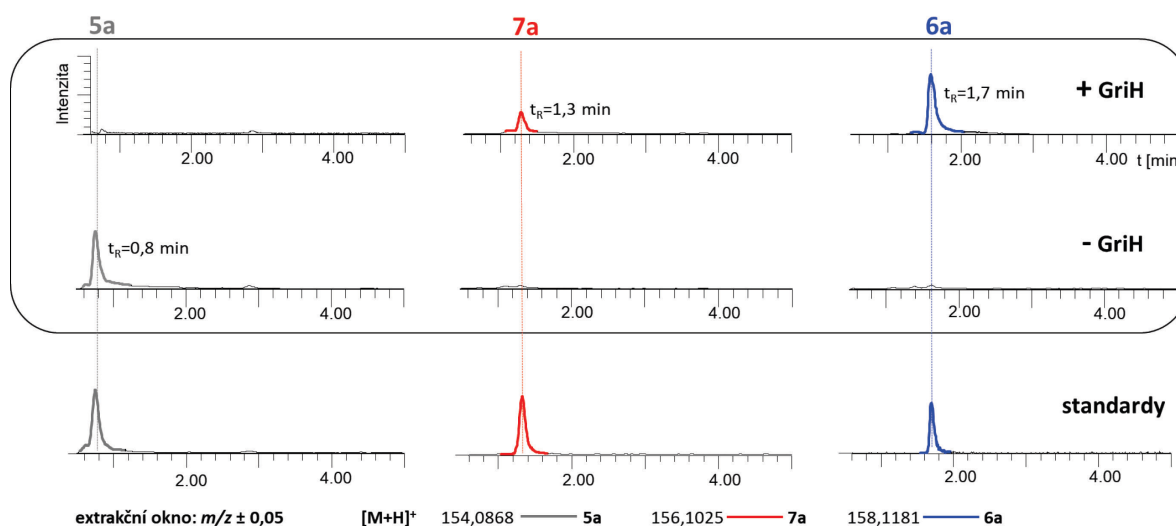


Obr. 5.20. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce katalyzované HrmD. HrmD v přítomnosti $F_{420}H_2$ *in vitro* katalyzuje redukci substrátu **5a** na produkt **7a**, látku obsahující ve své struktuře jednu dvojnou vazbu. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) korespondují substrátu **5a** (šedě) a produktu **7a** (červeně). Plně nasycený **6a** (modře) v reakční směsi detekován nebyl.

5.4.4 Enzymová aktivita GriH

Podobně jako v případě HrmD, predikovanou funkcí GriH je jednonásobná redukce iminové dvojně vazby předpokládaného substrátu, vedoucí k finálnímu prekurzoru **11**, který je následně inkorporován do struktury griselimycinu (kap. 2.5.2). Přirozený substrát GriH není dostupný, avšak záměrem experimentu nebylo testovat GriH v reakci s jeho přirozeným substrátem. Vzhledem k tomu, že GriH představuje sekvenčně nejbližší homolog LmbY (sekvenční identita je 76%, tedy nesouměřitelně vyšší než mezi jakýmkoliv jiným párem porovnávaných sekvencí Apd6 proteinů), cílem bylo stanovit jeho reakční specifitu, která by ale v reakci s jeho přirozeným substrátem (obsahujícím pouze jednu dvojnou vazbu) nemohla být určena. Proto byl i GriH testován v reakci se stejným substrátem jako LmbY, tedy **5a**, opět

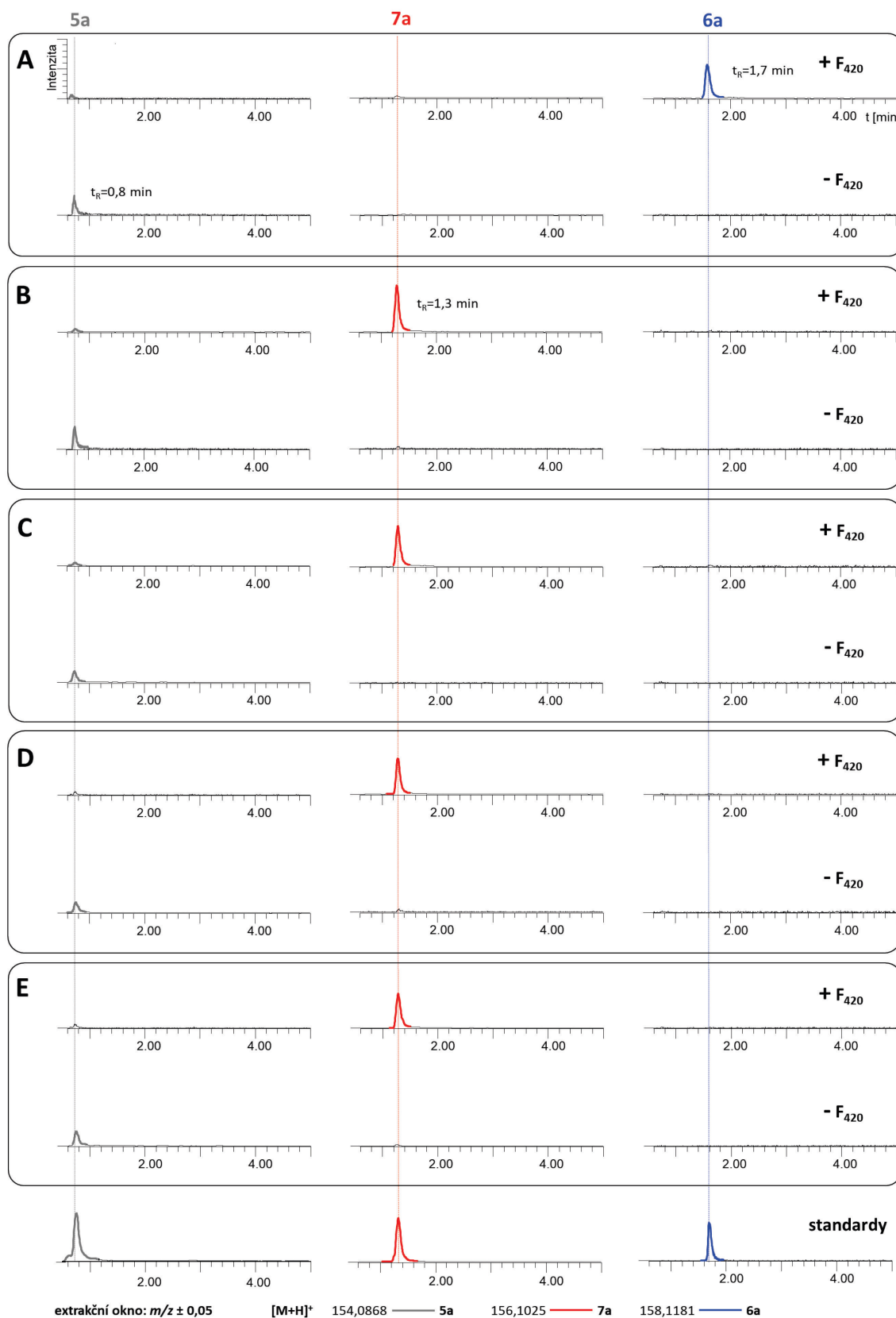
v přítomnosti F_{420} a $F_{420}H_2$ -regeneračního systému. V *in vitro* reakci bylo pozorováno úplné vyčerpání substrátu, překvapivě byla nově detekována směs dvou píků, jejichž přesné hmoty korespondují s látkami **6a** (majoritní produkt) a **7a** (minoritní produkt; Obr. 5.21). V kontrolních reakcích obsahujících denaturovaný GriH nebyla pozorována žádná enzymatická přeměna substrátu **5a**. Identita látek **5a**, **6a** a **7a** byla potvrzena srovnáním MS spekter a t_R standardů těchto látek.



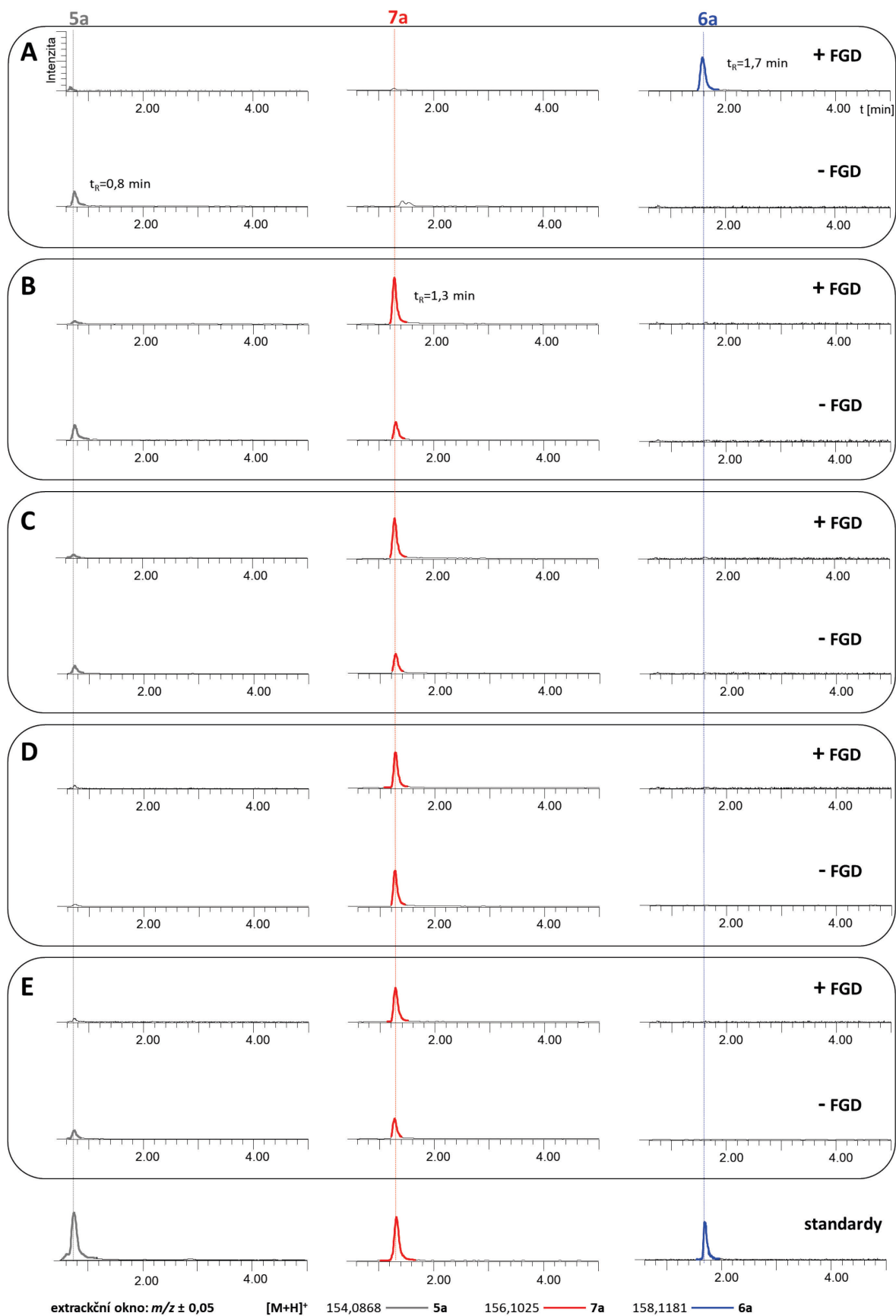
Obr. 5.21. **UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce katalyzované GriH.** GriH v přítomnosti $F_{420}H_2$ *in vitro* katalyzuje redukci substrátu **5a** na dva produkty, majoritní produkt **6a** a minoritní produkt **7a**. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) korespondující substrátu **5a** (šedě) a produktům **7a** (červeně) a **6a** (modře).

5.4.5 Kontrolní *in vitro* reakce – vyloučení F_{420} a FGD

Při stanovování enzymové aktivity Apd6 byly u proteinů LmbY, Por15, HrmD, SibT a Lim12 dále provedeny kontrolní reakce potvrzující závislost enzymové aktivity na kofaktoru F_{420} . Analyzována byla série reakcí, ve kterých byl vyloučen kofaktor F_{420} a dále série reakcí, ve kterých byl vyloučen protein FGD. Ve srovnání s pozitivní kontrolou obsahující F_{420} , byly shodně všechny testované proteiny v případě vyloučení kofaktoru z reakce neschopné konverze substrátu **5a** (Obr. 5.22). Nicméně, při vyloučení FGD z reakce bylo pozorováno, že proteiny jsou stále schopné katalyzovat redukční reakci, ovšem u většiny testovaných proteinů s výrazně nižší efektivitou v porovnání s reakcemi, které FGD obsahovaly (Obr. 5.23). Tento výsledek může být vysvětlen přítomností substrátu FGD, glukosy-6-fosfát, v reakci, která je zřejmě schopná s nízkou efektivitou redukovat F_{420} bez katalytické aktivity FGD. Vysvětlení je pouze hypotetické, je ale podporováno faktem, že v kontrolních *in vitro* reakcích, ze kterých byla glukosa-6-fosfát vyloučena, nebyla nikdy žádná konverze **5a** pozorována.



Obr. 5.22. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce v přítomnosti/nepřítomnosti F₄₂₀ a 5a katalyzovaná (A) LmbY, (B) Por15, (C) HrmD, (D) SibT a (E) Lim12. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ([M+H]⁺) odpovídající substrátu 5a (šedě) a produktům 6a (modře), 7a (červeně). Enzymy nejsou bez F₄₂₀H₂ schopné katalyzovat redukcí 5a.

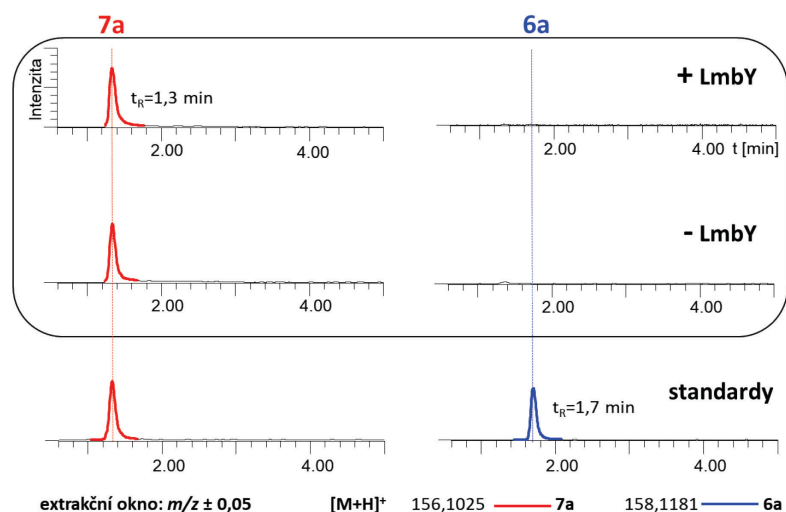


Obr. 5.23. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce v přítomnosti/nepřítomnosti FGD a 5a katalyzovaná (A) LmbY, (B) Por15, (C) HrmD, (D) SibT a (E) Lim12. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy $[M+H]^+$ odpovídající substrátu 5a (šedě) a produktům 6a (modře), 7a (červeně). Redukce 5a sice bez FGD probíhá, ovšem u většiny proteinů s výrazně nižší účinností.

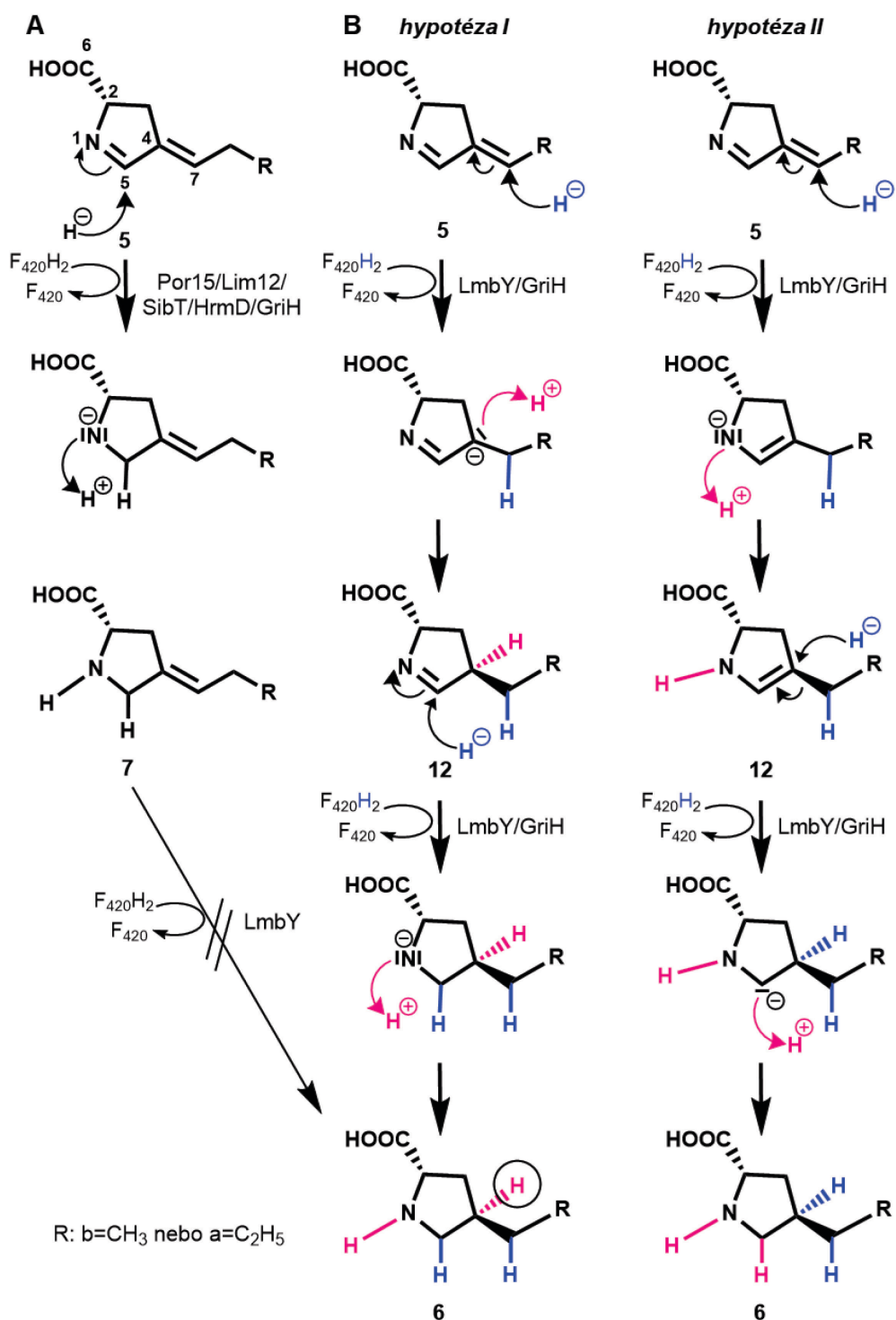
5.5 Redukční mechanismus Apd6 proteinů

5.5.1 Postulace hypotézy rozdílného mechanismu hydridového transferu

Aby byla dvojnásobná redukce vůbec možná, je esenciální, aby jako první byla redukována právě exocyklická dvojná vazba látky **5**, neboť endocyklická dvojná vazba je na rozdíl od exocyklické redukovatelná i v případě, že již není v konjugaci. K získání podpurného důkazu této úvahy byl LmbY testován v reakci s látkou **7a** jako substrátem. Bylo zjištěno, že LmbY opravdu není schopný tento prekurzor redukovat (Obr. 5.24). Na základě tohoto zjištění byla navržena hypotéza o rozdílném mechanismu jedno- a dvojnásobné redukce. **Hypotéza o redukčním mechanismu Apd6 proteinů katalyzujících jednonásobnou redukci:** Aby zůstala v APD prekurzorech dvojná vazba zachována, musí hydridový atak látky **5** nastat v pozici C-5, čímž dojde k redukci endocyklické dvojně vazby (Obr. 5.25A). Exocyklická dvojná vazba nově vzniklé látky **7** se tímto stává nepřístupná jakékoliv další redukci, neboť již není v konjugaci. **Hypotéza o redukčním mechanismu Apd6 proteinů katalyzujících dvojnásobnou redukci:** V případě formace plně saturovaného APD musí proběhnout dva následné hydridové transfery, přičemž byly stanoveny dvě alternativní hypotézy (*I* a *II*; Obr. 5.25B). Pozice prvního hydridového ataku je v obou hypotézách shodná, tedy že při formaci plně saturovaného APD nastává první hydridový atak v pozici C-7. Dále, hypotéza *I* předpokládá, že imin vzniklý první redukcí je přímo atakován druhým hydridem, tentokrát v pozici C-5. Dle hypotézy *II* po prvním hydridovém transferu dochází k formaci enamínu, který může spontánně izomerovat do formy více stabilního iminu, druhý hydridový atak poté nastane v pozici C-4.



Obr. 5.24. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce LmbY s látkou **7a** jako substrátem. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) odpovídající substrátu **7a** (červeně) a předpokládanému produktu **6a** (modře), který ovšem v reakci detekován nebyl.

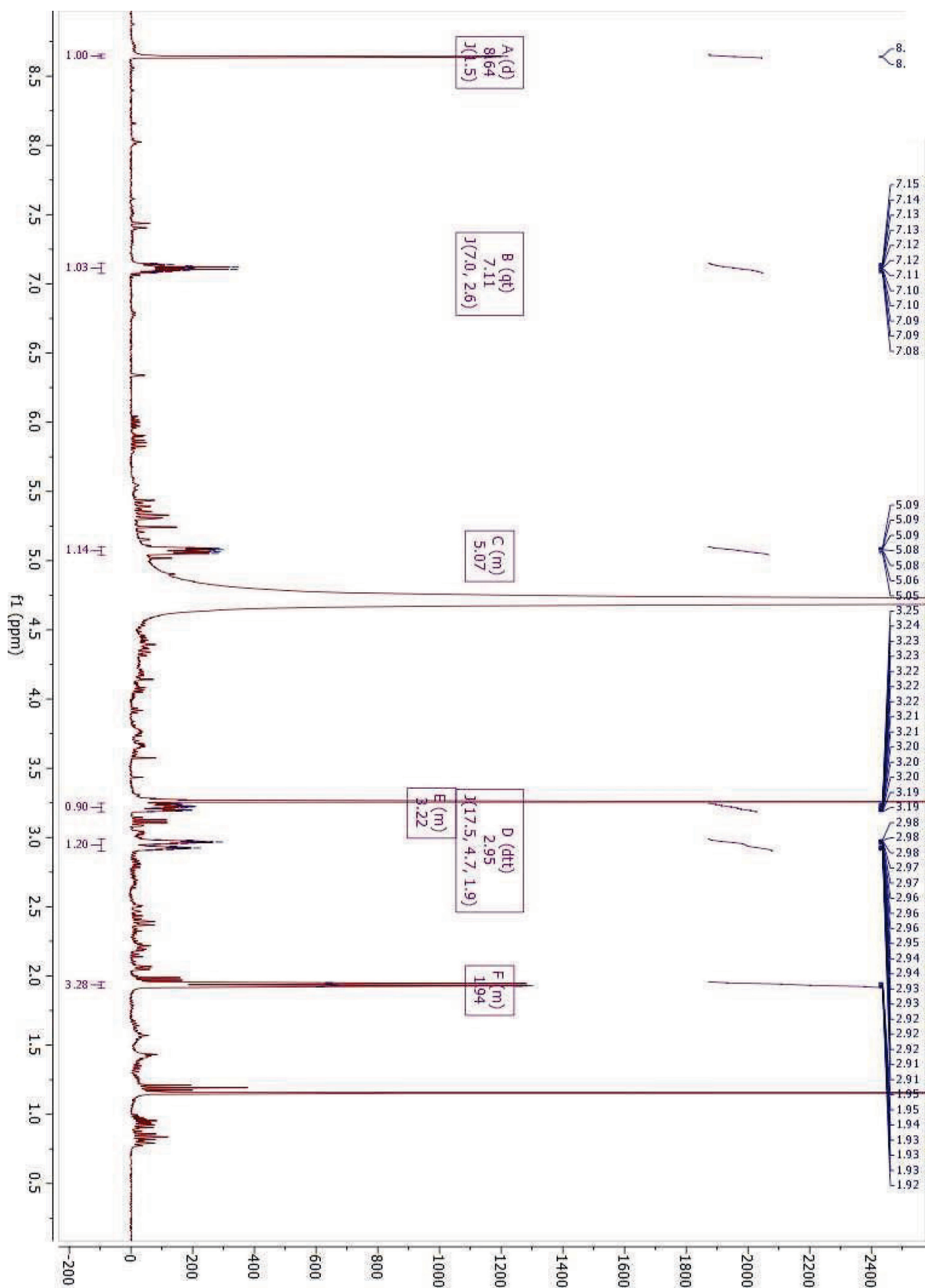


Obr. 5.25. Předpokládaný odlišný mechanismus hydridového transferu v redukcí katalyzované **Apd6** proteiny – z biosyntézy (A) PBD, hormaomycinu a griselimycinu: aby zůstala jedna dvojná vazba zachována, musí hydridový atak nastat v pozici C-5 a (B) linkomycinu a griselimycinu - první hydridový atak je předpokládán v pozici C-7, pro druhý hydridový atak byly stanoveny dvě alternativní hypotézy – I a II. Proton pocházející z prostředí (růžově), hydridy přenášené z kofaktoru F₄₂₀ (modře). Hypotézu podporuje skutečnost, že LmbY není schopný katalyzovat redukcí 7a na 6a.

5.5.2 Přímý průkaz mechanismu hydridového transferu katalyzovaného LmbY

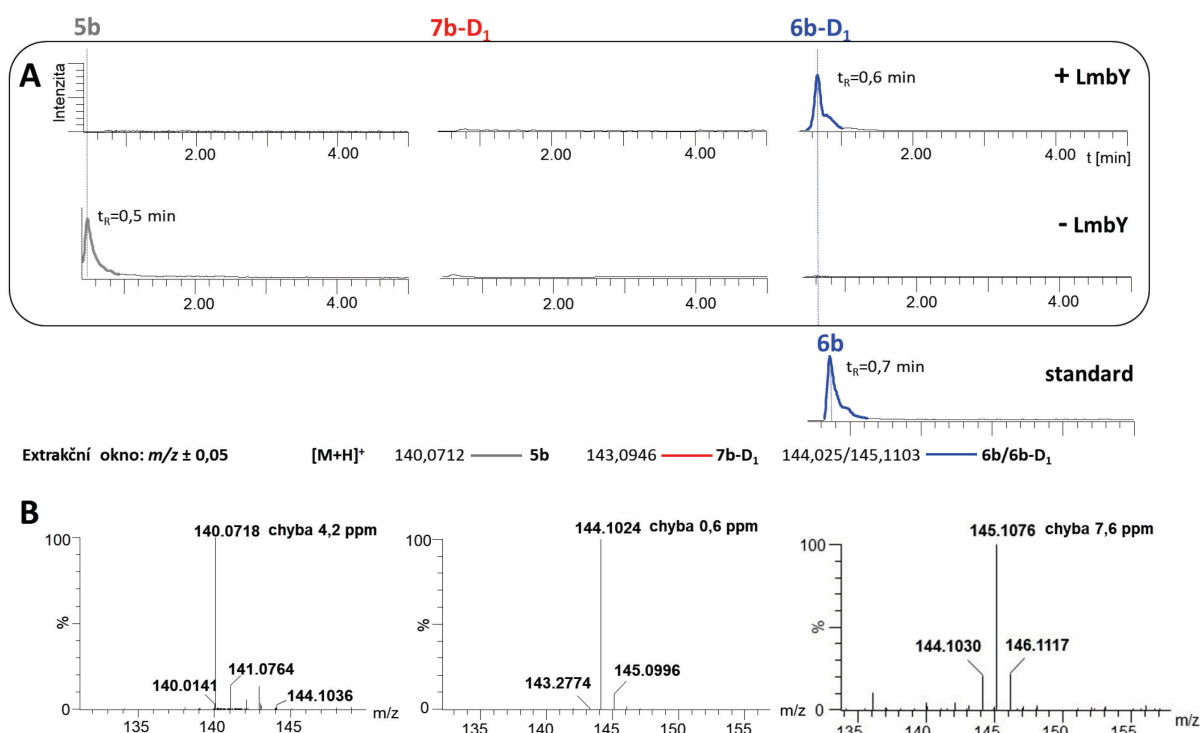
K prokázání hypotézy o neobvyklém dvojnásobném redukčním mechanismu byl navržen a proveden experiment založený na *in vitro* reakci katalyzované LmbY, přičemž redukce substrátu probíhala v deuterovaném prostředí (D₂O), donorem protonů v redukční reakci byl tedy namísto vodíkového atomu těžší atom deuteria. Inkorporace deuterií byla monitorována pomocí NMR, jejich předpokládané pozice odpovídají růžově označeným H-atomům v Obr. 5.25B.

Izolaci substrátu **5a** z producenta *S. lincolnensis* Δ *lmbY*, používaného pro základní stanovení aktivit Apd6 proteinů, nebylo přes opakovanou snahu možné provést v měřítku potřebném pro NMR analýzu. Také opětovné pokusy o chemickou syntézu dostatečného množství látky **5a** nebyly úspěšné. Podařilo se však v dostatečném množství a čistotě připravit látku **5b**, která představuje biologicky relevantní substrát proteinu LmbY, neboť přirozeně se tato látka v biosyntéze linkomycinu vyskytuje – **5b** je prekurzorem vedlejšího produktu biosyntézy linkomycinu (linkomycinu B; kap. 2.2.1 a 2.5.1). NMR spektrum látky **5b** je zobrazeno na Obr. 5.26.

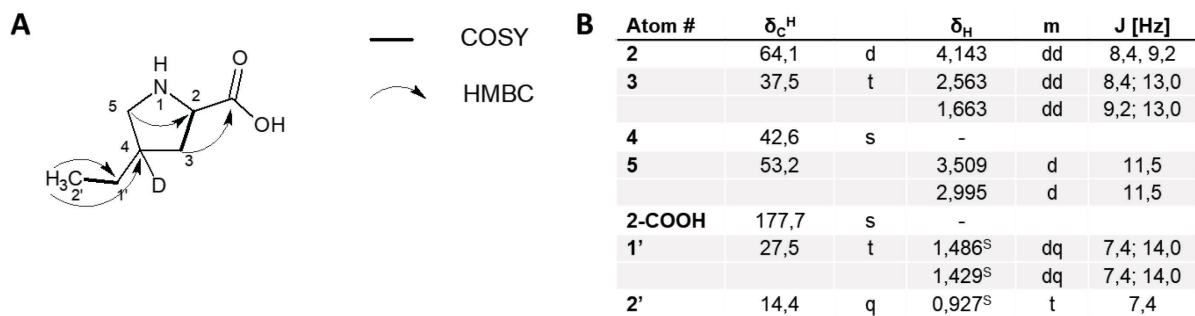


Obr. 5.26. ^1H NMR spektrum chemicky syntetizované látky **5b**. Spektrum bylo naměřeno společností Santiago.

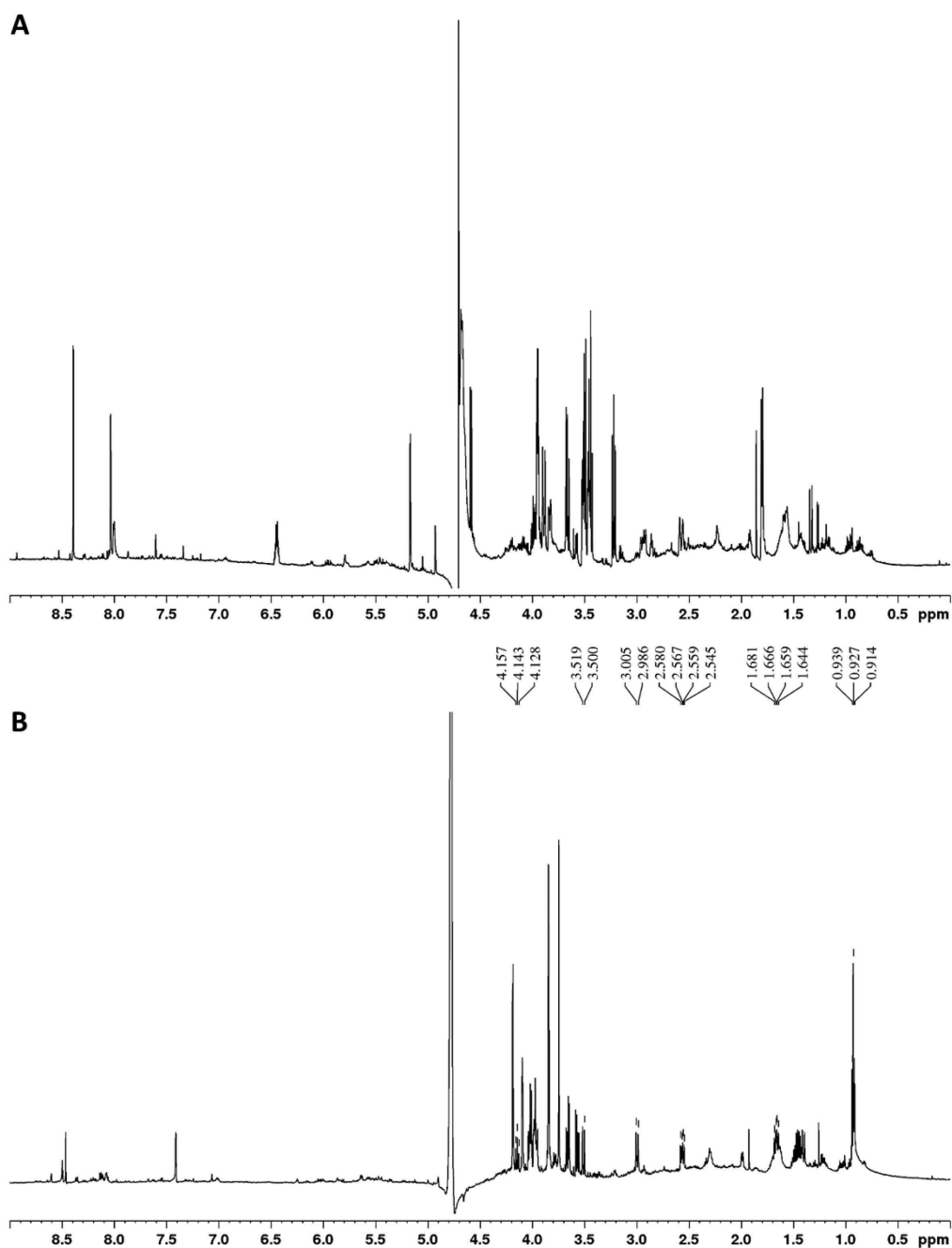
V *in vitro* reakci složené z LmbY, **5b**, F₄₂₀ a F₄₂₀-regeneračního systému došlo k úplné přeměně látky **5b** na látku hmotou odpovídající plně saturovanému **6b**, který ve své struktuře obsahuje jeden inkorporovaný atom deuteria (dále označovaný jako **6b-D₁**; Obr. 5.27). Látka hmotností korespondující **6b** se dvěma inkorporovanými atomy deuteria detekována nebyla. Důvodem je, že N-1 (Obr. 5.25) představuje vyměnitelnou pozici a tudíž při použitých podmínkách UHPLC-MS analýzy, při které jsou používány mobilní fáze obsahující H₂O, dochází ke zpětné výměně D-atomu za atom H. Struktura substrátu **5b** a produktu **6b-D₁** byla charakterizována homonukleární (¹H-¹H; COSY) a heteronukleární (¹H - ¹³C (¹⁵N); HMBC) korelací (Obr. 5.28). Dále byly pro látku **6b-D₁** naměřeny ¹H a ¹³C NMR data (Obr. 5.29). Ze získaných dat bylo nepřímo detekováno, že atom D byl inkorporován do pozice C-5. Experimentálně tedy byla prokázána platnost hypotézy *I*, která je znázorněná v Obr. 5.25B (H atom v kroužku v Obr. 5.25B představuje pozici inkorporovaného D atomu).



Obr. 5.27. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce LmbY s látkou **5b** jako substrátem v D₂O. (A) LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ([M+H]⁺) odpovídající substrátu **5b** (šedě) a předpokládanému produktu **6b** s inkorporovaným atomem deuteria – **6b-D₁** (modře). Minimální posun retenčního času **6b** ve srovnání s **6b-D₁** je konzistentní v opakovaných měřeních a je pravděpodobně způsoben inkorporací D versus H. (B) HRMS spektra substrátu **5b**, standardu **6b** a Apd6 reakčního produktu **6b-D₁** a chyby měření.



Obr. 5.28. Charakterizace struktury substrátu **5b** a produktu **6b-D₁**. (A) COSY a HMBC korelace. (B) ^1H a ^{13}C NMR data reakčního produktu – látky **6b-D₁**. ^H HSQC/HMBC odečet, ^s chemický posun a vazebné konstanty byly stanoveny na základě sub-spektrálních simulací.



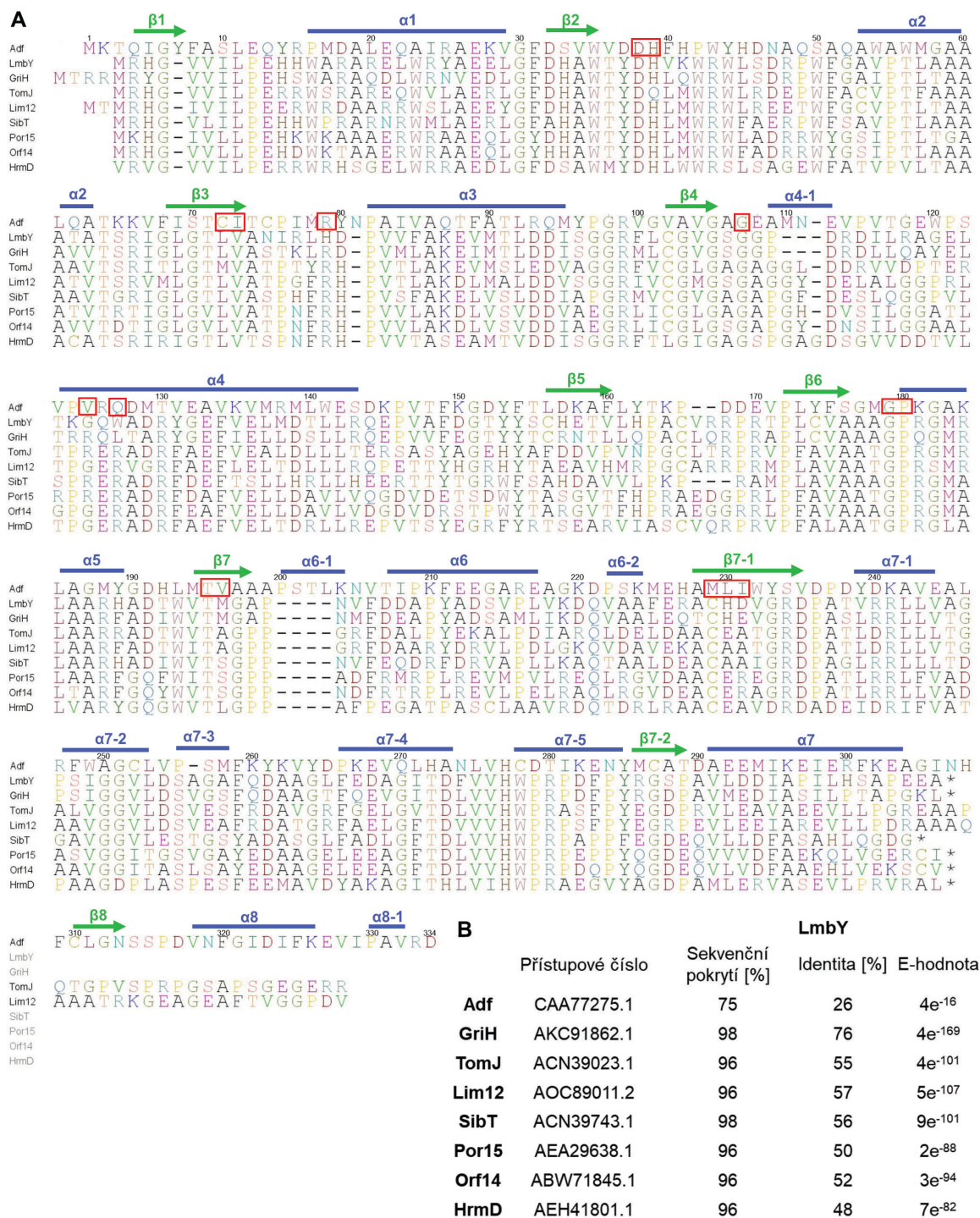
Obr. 5.29. ^1H NMR spektra reakční směsi **LmbY**. (A) NMR spektrum před přidáním **LmbY** a (B) po iniciaci reakce přidáním **LmbY**.

5.6 Analýza molekulární podstaty rozdílné reakční specifity Apd6

5.6.1 Sekvenční analýza Apd6 proteinů

LLHT, kam se Apd6 proteiny dle své sekvenční podobnosti řadí, obecně patří mezi málo strukturně charakterizovanou rodinu proteinů. K dnešnímu dni zůstávají nejlépe popsány zástupci LLHT rodiny tři archaeální proteiny (jejich podrobnější popis je uveden v kap. 2.1.4.2), které ovšem, zejména kvůli fylogenetické vzdálenosti, s aktinobakteriálními Apd6 proteiny sdílejí poměrně nízkou aminokyselinovou sekvenční příbuznost. Nicméně, i přes to lze v aminokyselinových sekvencích Apd6 proteinů nalézt konzervované zbytky, které jsou pro LLHT charakteristické.^{57,75,77,90} Konkrétně, porovnáním aminokyselinové sekvence Apd6 proteinů se sekvencí jednoho vybraného zástupce, proteinu Adf (F_{420} -závislá alkohol dehydrogenasa z *Methonoculleus thermophilus*; Obr. 5.30), jehož struktura byla publikována,⁷⁷ lze u Apd6 proteinů predikovat aminokyselinové zbytky, které pravděpodobně hrají roli především ve vazbě kofaktoru.

F_{420} se do struktury popsaných 5-deazaflavin-závislých enzymů váže v motýlí konformaci, kdy dochází k charakteristickému ohnutí isoalloxazinového kruhu molekuly F_{420} (kap. 2.1.4.2). Klíčové zbytky fixující kofaktor F_{420} ve vazebném místě proteinu ve správné pozici vzhledem k substrátu, tedy jinými slovy v takové pozici, aby byl umožněn přenos hydridu směrem kofaktor→substrát, jsou v sekvenci Adf v Obr. 5.30 zvýrazněny červeným rámečkem. Vůbec nejdůležitějším zbytkem, hrajícím roli nejen ve fixaci F_{420} , ale především v katalytickém mechanismu LLHT proteinů, je pravděpodobně bazický H39 (číslováno dle sekvence Adf). Tento zbytek je přítomen u všech Apd6 homologů, kromě TomJ (Apd6 z biosyntézy tomaymycinu), kde je přítomen polární Q39. V aminokyselinové sekvenci Apd6 proteinů jsou přítomné i další konzervované zbytky, jako je například D38, který má u Adf důležitou roli ve stabilizaci výdutě, do které se F_{420} při vazbě zanořuje. Spekuluje se, že právě D38 je hnací silou pro formování energeticky nevýhodné ne-prolyl *cis* peptidové vazby, která umožňuje vytvořit zmíněnou výduť a její přítomnost ve struktuře je pro LLHT typická.^{57,77} D38 je u Adf v pozici silně fixován solným můstkem k pozitivně nabitému R79, dalšímu konzervovanému zbytku LLHT proteinů. Stejný zbytek se v pozici 79 nachází i u Apd6 proteinů, vyjma LmbY, kde se ale nachází chemicky podobný, kladně nabitý H79. Jiným významným zbytkem je G179 interagující s fosfátovou skupinou F_{420} a jeho absolutní konzervovanost v této pozici vyhraňuje F_{420} -závislé členy od FMN-závislých enzymů LLHT rodiny.⁷⁷ G179 je přítomen v sekvenci všech Apd6 homologů.



Obr. 5.30. Sekvenční srovnání Apd6 proteinů z biosyntézy PBD (Por15, SibT, Lim12, Orf14, TomJ), linkomycinu (LmbY), griselimycinu (GriH) a hormaomycinu (HrmD) s archaeálním proteinem Adf, F₄₂₀-závislou alkohol dehydrogenasou ze stejné LLHT rodiny. (A) Sekvenční srovnání – motivy sekundární struktury Adf jsou znázorněny nad aminokyselinovou sekvencí Adf, zbytky hrající u Adf roli ve vazbě substrátu a F₄₂₀ jsou zvýrazněny červeným rámečkem. (B) Míra sekvenční identity LmbY k Adf a jiným Apd6 proteinům.

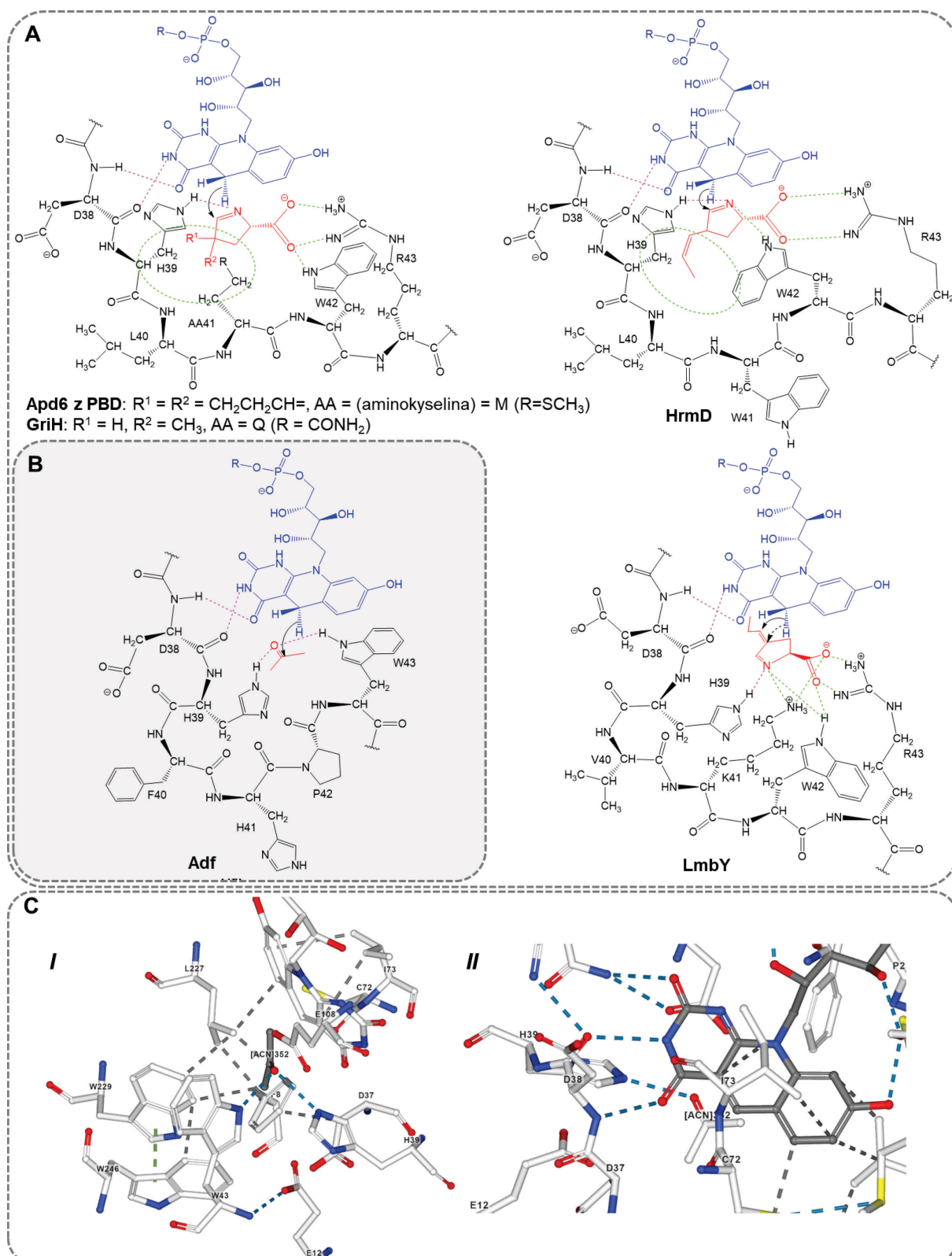
5.6.2 Formulace hypotézy o místě vazby substrátu a kofaktoru ve struktuře Apd6

Bez dat objasňujících krystalovou strukturu Apd6 proteinů nelze jednoznačně determinovat aminokyselinové zbytky zodpovědné za jejich rozdílnou substrátovou

a v případě LmbY a GriH navíc i reakční specifitu. Nicméně, k úvahám a následnému vyslovení hypotézy o katalytickém mechanismu Apd6 proteinů byl jako model vybrán Adf, u kterého byla popsána struktura jak s navázaným substrátem, tak kofaktorem F_{420} ,⁷⁷ přestože je aminokyselinová sekvenční podobnost Adf k LmbY (Obr. 5.30B), a tedy i k ostatním Apd6 proteinům, nízká.

Z porovnání aminokyselinových sekvencí Adf a Apd6 homologů je patrné, že jejich sekvence jsou relativně konzervované v oblastech, které byly v případě Adf určeny jako významné pro interakci se substrátem a F_{420} , přičemž jako vůbec nejzajímavější se jeví konzervovaný úsek D38 – W43, který u Adf odpovídá především za fixaci substrátu v aktivním místě. D38 interaguje s kofaktorem F_{420} , H39 a W43 vytvářejí se substrátem Adf vodíkové vazby. Prostorová orientace zbytků v pozicích 40 – 42 je tudíž relativně limitovaná, čímž se zároveň definuje oblast pro vazbu substrátu. Aceton, substrát Adf, poskytuje aminokyselinovým zbytkům aktivního místa relativní volnost v orientaci jejich postranních řetězců. K esenciální interakci dvou klíčových zbytků, H39 a W43, s karbonylovou skupinou acetonu je nezbytný zlom proteinového řetězce, který je umožněn přítomností P42.

Pro návrh dalších experimentů jsme vyšli z předpokladu, že analogické interakce se substrátem jako v Adf se uplatní i u Apd6 proteinů. K získání bližší představy prostorových rozdílů mezi aktivním místem proteinů se schopností redukovat pouze endocyklickou dvojnou vazbu (Por15, Lim12, SibT, HrmD, GriH) a aktivním místem proteinů se schopností redukovat navíc také exocyklickou dvojnou vazbu (LmbY, GriH), bylo vytvořeno srovnávací schéma domnělých aktivních míst Apd6 homologů (Obr. 5.31A) a Adf (5.31B). Schéma vychází z krystalové struktury aktivního místa Adf (Obr. 5.31C),⁷⁷ přičemž aminokyselinové zbytky v sekvenci Adf byly zaměněny za odpovídající zbytky ve stejné pozici konkrétního Apd6 homologu, pro který bylo schéma vytvořeno. Zajímavé rozdíly byly determinovány v již zmíněné vysoce konzervované oblasti (D38 – W43). Ve srovnání s Adf, všechny Apd6 homology namísto prolinu v pozici 42 obsahují jinou nepolární aminokyselinu, a to prostorově náročnější W42. Tato odchylka v substrát-vazebné oblasti může odrážet skutečnost, že Apd6 homology (v porovnání s Adf) váží ve svém aktivním místě o poznání objemnější substrát. Dále, W43 přítomný v Adf je u všech Apd6 homologů zaměněn za R43. Lze předpokládat, že vedle H39 je R43, obdobně jako W43 u Adf, dalším klíčovým zbytkem, který interaguje se substrátem. Konkrétně bylo predikováno, že H39 interaguje s iminovým dusíkem substrátu **5**, guanidinová skupina R43 pak fixuje substrát interakcí s jeho karboxylovou skupinou.



Modul A-B: Červeně – substrát, Modře – kofaktor F₄₂₀; Přerušovaná růžová čára – H-můstky odvozené ze struktury Adf; Zelená přerušovaná čára – nově předpokládané H-můstky; Zelený přerušovaný ovál – předpokládané hydrofobní oblasti stabilizující boční řetězec Apd6 substrátu.

Obr. 5.31. Aktivní místo proteinu Adf ko-krytalizovaného se substrátem (aceton; PDB ID 1RHC) a srovnávací schémata Apd6 proteinů. (A) Schéma aktivních míst Apd6 z PBD, GriH, HrmD a LmbY. (B) Adf aktivní místo. (C) Adf: *I* – detailní ilustrace H-vazebných interakcí acetonu (ACN) s H39 a W43. *II* – Detailní ilustrace H-vazebných interakcí F₄₂₀H₂ s D38 a ACN352 s H39.

Pokud se v uvažované oblasti (zbytky v pozicích 38 – 43; Obr. 5.32) dále podrobně zaměříme na rozdíly výhradně v sekvencích Apd6 homologů, nejzásadnější odchylky nalezneme v pozici 41. Konkrétně se jedná o přítomnost K41 v sekvenci LmbY (Apd6 z biosyntézy linkomycinu) namísto M41 (Apd6 z biosyntézy PBD), W41 (Apd6 z biosyntézy hormaomycinu) a Q41 (Apd6 z biosyntézy griselimycinu). Zatímco postranní řetězce M a W jsou nenabitě (nepolární), ωNH_2 skupina K je polární a ionizovatelná. Na základě toho jsme predikovali, že právě lysinový zbytek v pozici 41 LmbY může určovat orientaci substrátu vůči kofaktoru tak, že umožní redukci obou dvojných vazeb. Polární Q41 v GriH (Apd6 z biosyntézy griselimycinu) je diskutabilní, neboť *in vitro* redukční profil GriH ukázal na schopnost tohoto homologu redukovat jak jednu, tak obě dvojně vazby. Ze schématu by se dalo předpokládat, že jeho reakční specifita by měla spíše odpovídat Apd6 homologům z biosyntézy PBD (tedy jednonásobná redukce) než LmbY (dvojnásobná redukce). Nicméně, výše uvedená úvaha vyzdvihující důležitost aminokyseliny v pozici 41 tímto není vyloučena, tento zbytek může hrát klíčovou roli v determinaci reakční specifity Apd6 proteinů. Zároveň však, účast dalších, dosud neuvažovaných aminokyselinových zbytků, není tímto vyloučena.

	30							38	39	40	41	42	43				50						
Adf	---	F	G	D	S	V	W	V	D	D	H	F	H	P	W	Y	H	D	N	A	Q	S	---
LmbY	---	G	F	D	H	A	W	T	Y	D	H	V	K	W	R	W	K	S	D	R	P	W	---
GriH	---	G	F	D	H	A	W	T	Y	D	H	L	Q	W	R	W	L	S	D	R	P	Q	---
TomJ	---	G	F	D	H	A	W	T	Y	D	Q	L	M	W	R	W	L	R	D	E	P	W	---
Lim12	---	G	F	D	H	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	L	R	E	E	T	W	---
SibT	---	G	F	A	H	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	F	A	E	R	P	W	---
Por15	---	G	Y	D	H	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	L	A	D	R	R	W	---
Orf14	---	G	Y	H	H	A	W	T	Y	D	H	L	M	W	R	W	F	A	D	R	R	W	---
HrmD	---	F	G	D	S	A	W	M	Y	D	H	L	W	W	R	S	L	S	A	G	E	W	---

Obr. 5.32. **Sekvenční porovnání Adf a Apd6 proteinů: detail pravděpodobného substrát-vazebného místa v oblasti D38 – W43.** Je předpokládáno, že aminokyselinové zbytky v této oblasti formují aktivní místo Apd6 proteinů (čísla nad sekvencí Adf korespondují s číslováním aminokyselin). Červeně zvýrazněny jsou lišící se aminokyselinové zbytky u Apd6 proteinů.

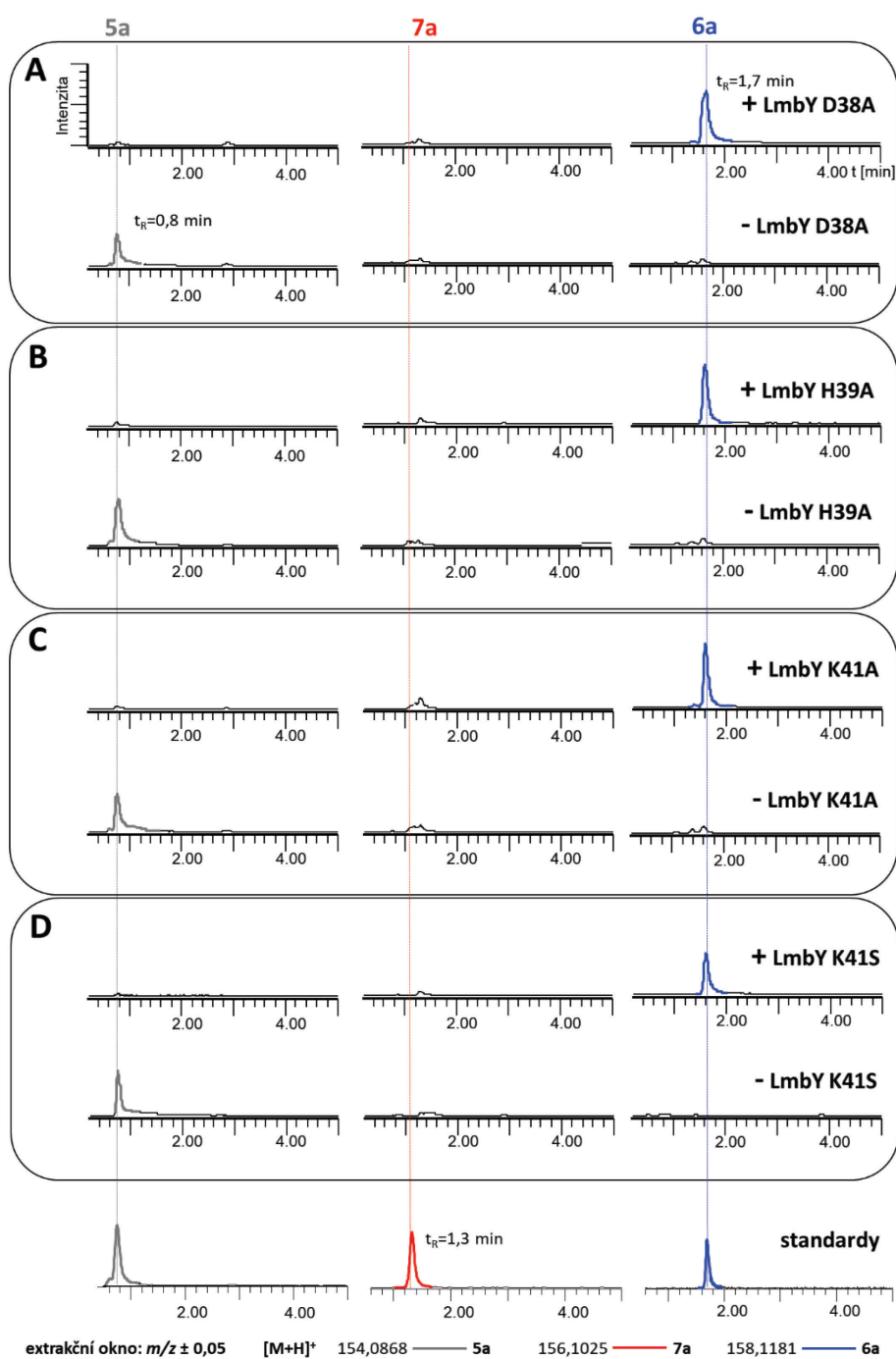
5.6.3 Cílená mutagenese předpokládaného aktivního místa

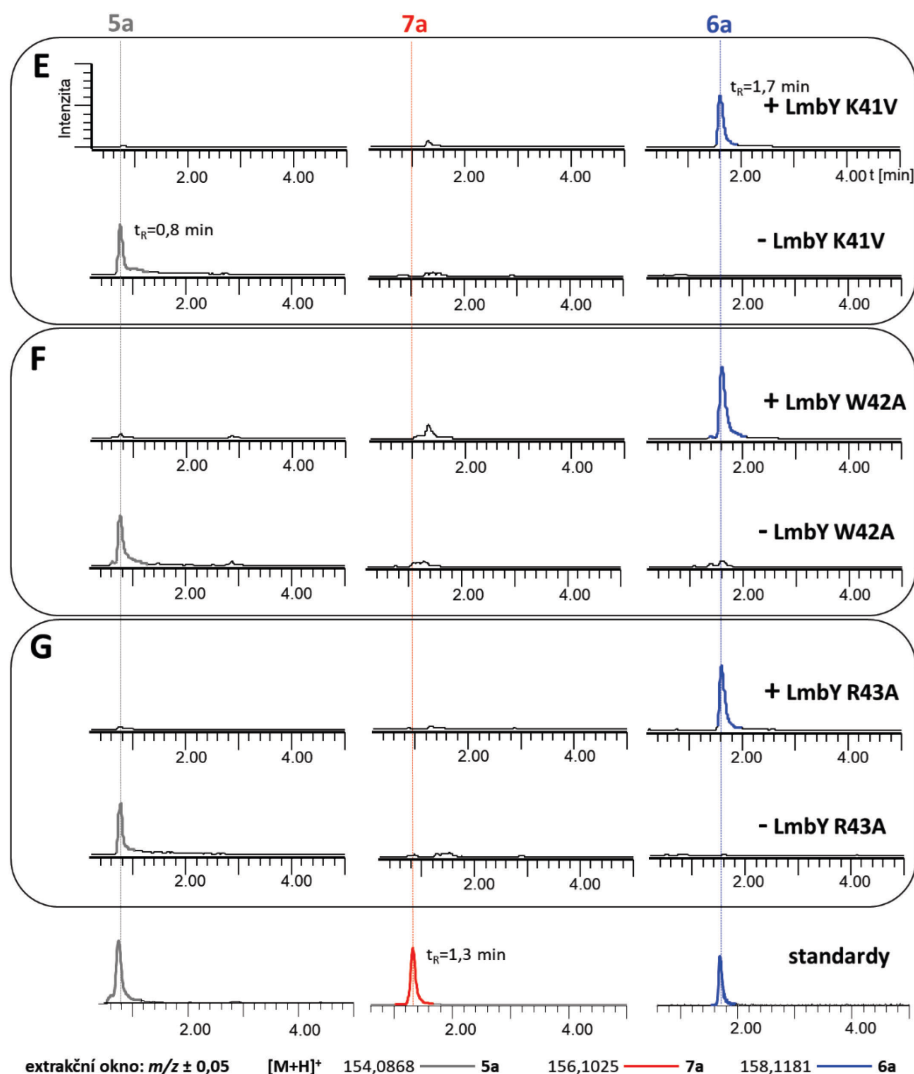
K získání podpůrných důkazů výše stanovené hypotézy o aminokyselinových zbytcích rozhodujících o tom, zda nastane jedno- či dvojnásobná redukce, bylo přistoupeno k mutační analýze. Testování mutantních Apd6 proteinů probíhalo *in vitro* za analogických podmínek, jaké byly použity pro testování aktivity nemutovaných Apd6. Identita látek **5a**, **6a** a **7a** v UHPLC-MS analýzách byla potvrzena srovnáním MS spekter a t_R standardů těchto látek.

Pokus o vyřazení oxidoreduktasové aktivity LmbY

Nejprve bylo testováno, zda záměna některého ze zbytků D38 – W43, u nichž je predikována účast ve vazbě F_{420} či substrátu, za malou aminokyselinu A (v pozici 41 také

S a V) zruší katalytickou aktivitu LmbY. Předpokládalo se, že k vyřazení funkce dojde alespoň u mutantní formy LmbY K41A. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakčních směsí však ukázala, že všechny testované mutantní formy LmbY, konkrétně mutace D38A, H39A, K41A, K41S, K41V, W42A i R43A mají stejnou reakční specifitu jako nemutovaný LmbY (Obr. 5.33). Jinými slovy, všechny uvedené mutanty stále katalyzovaly dvojnásobnou redukci substrátu, přeměnu látky **5a** na látku **6a**, a to s obdobnou účinností jako nemutovaný LmbY. Je tedy zřejmé, že záměna žádného z testovaných aminokyselinových zbytků nemění katalytickou aktivitu LmbY a i reakční specifita zůstává zachována.



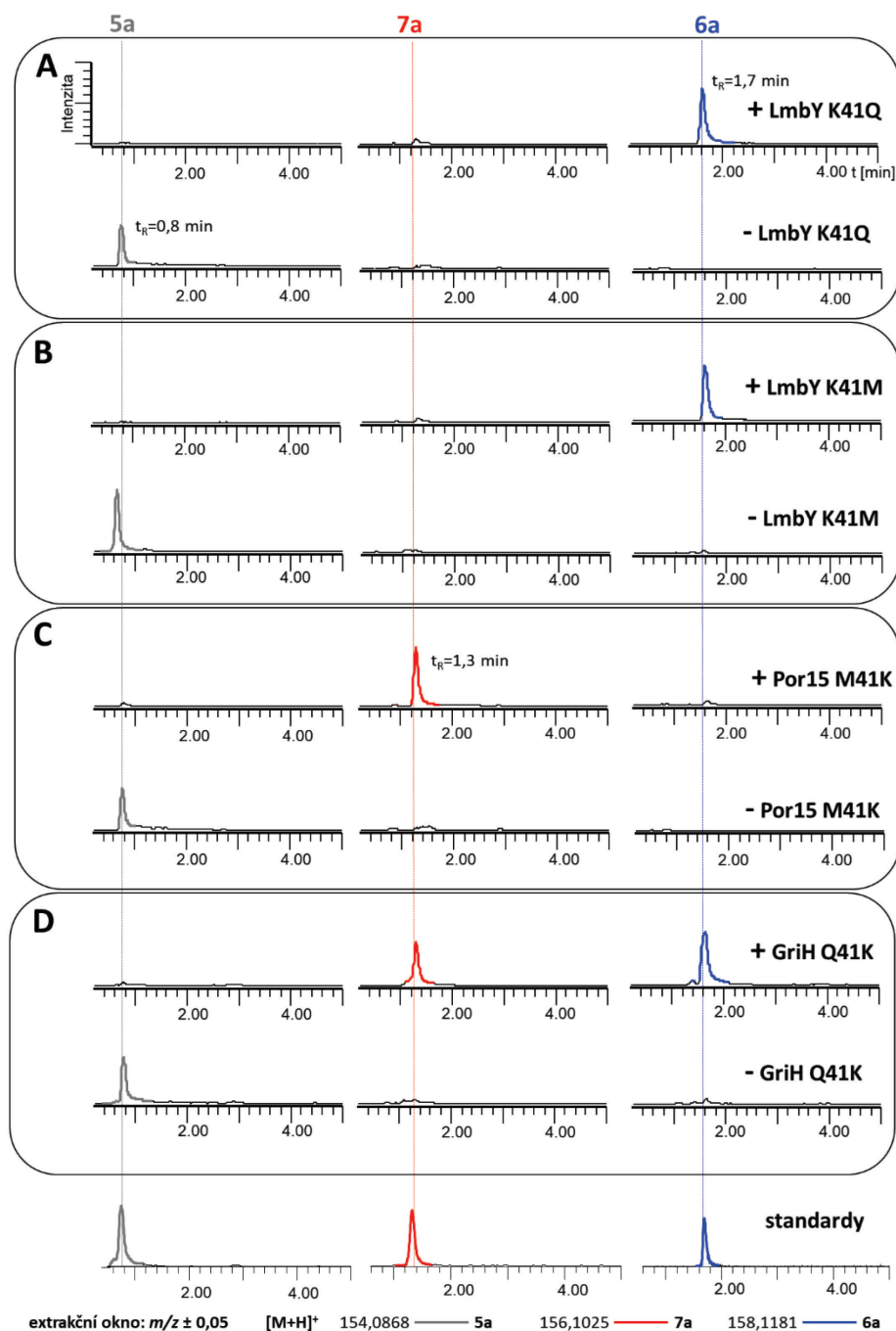


Obr. 5.33. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce mutovaných forem LmbY. (A) LmbY D38A, (B) LmbY H39A, (C) LmbY K41A, (D) LmbY K41S, (E) LmbY K41V, (F) LmbY W42A, (G) LmbY R43A. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) odpovídající substrátu **5a** (šedě) a produktu **6a** (modře). Jednoduchou záměnou aminokyselin v pozicích D38 – W43 nedošlo k inaktivaci ani změně reakční specifity u žádné z mutantních variant LmbY. Všechny mutanty stále katalyzovaly dvojnásobnou redukci s obdobnou účinností jako nemutovaný LmbY.

Pokus o změnu reakční specifity Apd6 homologů

Dále bylo hlouběji cíleno na nejvíce inkriminované místo, pozici 41, které by dle hypotézy mělo mít na reakční specifitu Apd6 proteinů nejvýznamnější vliv. Připraveny byly následující mutantní varianty: LmbY K41Q (náhrada K41 za Q41 přítomný v GriH), LmbY K41M (náhrada K41 za M41 přítomný v Apd6 z biosyntézy PBD), Por15 M41K (náhrada M41 za K41 přítomný v LmbY), GriH Q41K (náhrada Q41 za K41 přítomný v LmbY). Cílem těchto mutací bylo zaměnit reakční specifitu LmbY (dvojnásobná redukce) za specifitu PBD homologu Por15 (jednonásobná redukce) a naopak, tedy specifitu Por15 za LmbY, a dále specifitu GriH (jedno/dvojnásobná redukce) za specifitu LmbY. UHPLC-MS analýzou reakčních směsí bylo zjištěno, že reakční specifita mutantních variant nebyla změněna ani

v jednom případě, reakční profily testovaných mutant odpovídají nemutovaným variantám Apd6 homologů (Obr. 5.34).



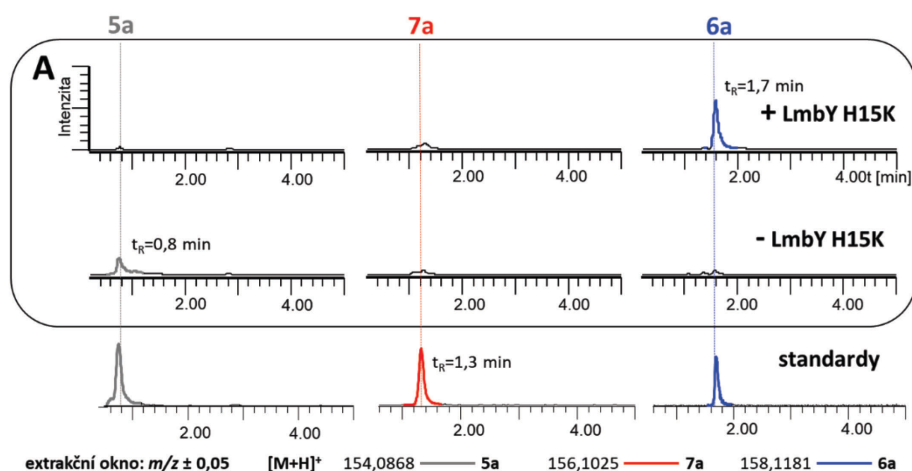
Obr. 5.34. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakcí mutovaných Apd6 proteinů. (A) LmbY K41Q, (B) LmbY K41M, (C) Por15 M41K, (D) GriH Q41K. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) odpovídající substrátu **5a** (šedě) a produktům **6a** (modře) a **7a** (červeně). Jednonásobnou záměnou aminokyseliny v pozici 41 nedošlo k inaktivaci či změně reakční specifity u žádné z testovaných Apd6 mutantních variant. Všechny mutanty LmbY stále katalyzovaly dvojnásobnou redukci **5a**, analogicky mutanta Por15 a mutanta GriH stále katalyzovaly jednonásobnou, resp. jedno/dvojnásobnou redukci stejného substrátu.

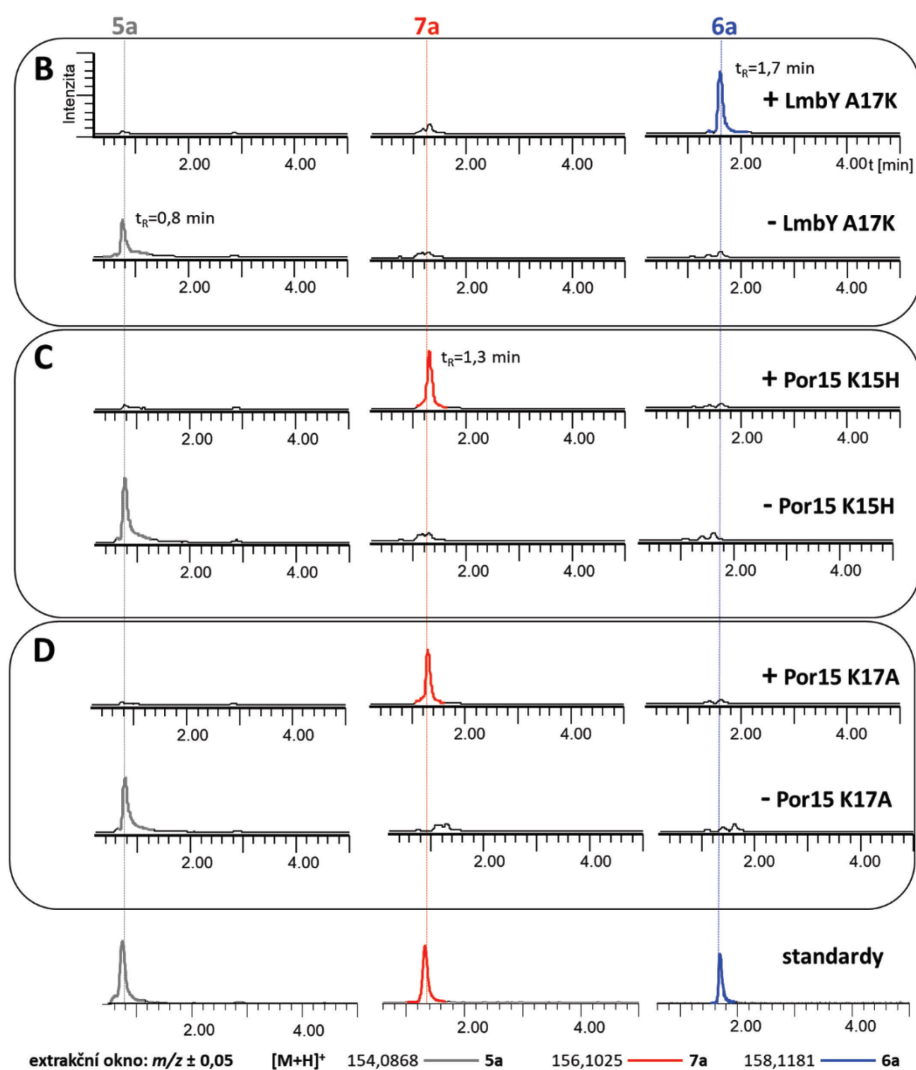
Pozice 15 a 17: další kandidátní aminokyselinové zbytky ovlivňující reakční specifitu

Z výše uvedených experimentálních výsledků vyplývá, že jednoduché mutace v konzervované oblasti D38 – W43 nemají na aktivitu Apd6 proteinů žádný vliv. To ovšem nevyvrací jejich predikovaný význam v katalýze reakce. Jak již bylo dříve vysloveno, nyní se potvrzuje, že zde bude hrát roli zřejmě ještě další zbytek, či zbytky. Pozornost se tedy zpátky obrací ke zkonstruovanému schématu domnělých aktivních míst Apd6 proteinů. Na základě analýzy jejich širšího okolí bylo nově uvažováno, že na natočení substrátu v aktivním místě mohou mít také vliv interakce se zbytky v pozicích 15 a 17 (detail je zobrazen v Obr. 5.35). Připraveny a testovány proto také byly následující mutantní varianty: LmbY H15K (náhrada H15 za K15 přítomný v Por15), LmbY A17K (náhrada A17 za K17 přítomný v Por15), Por15 K15H (náhrada K15 za H15 přítomný v LmbY), Por15 K17A (náhrada K17 za A17 přítomný v LmbY). UHPLC-MS analýzou reakčních směsí nebyly zjištěny žádné změny aktivit ve srovnání s nemutovanými Apd6 proteiny (Obr. 5.36).

	10	15	17	25
Adf	--- S L E Q Y R P M D A L E Q A I R ---			
LmbY	--- I L P E H H W A R A R E L W R Y ---			
GriH	--- I L P E H S W A R A Q D L W R N ---			
TomJ	--- I L P E R R W S R A R E Q W V L ---			
Lim12	--- I L P E E R W R D A A R R W S L ---			
SibT	--- I L P E H H W P R A R N R W M L ---			
Por15	--- L L P E H K W K A A A E R W R A ---			
Orf14	--- L L P E H D W K T A A E R W R A ---			
HrmD	--- I L P E R R W R H S G E L W R R ---			

Obr. 5.35. **Sekvenční porovnání Adf a Apd6 proteinů: zaměřeno na aminokyseliny v pozicích 15 a 17.** Na základě analýzy širšího okolí předpokládaného substrát-vazebného místa bylo nově predikováno, že i tyto zbytky mohou interagovat se substrátem a tím ovlivňovat substrátovou i reakční specifitu Apd6 proteinů (čísla nad sekvencí Adf korespondují s číslováním aminokyselin).

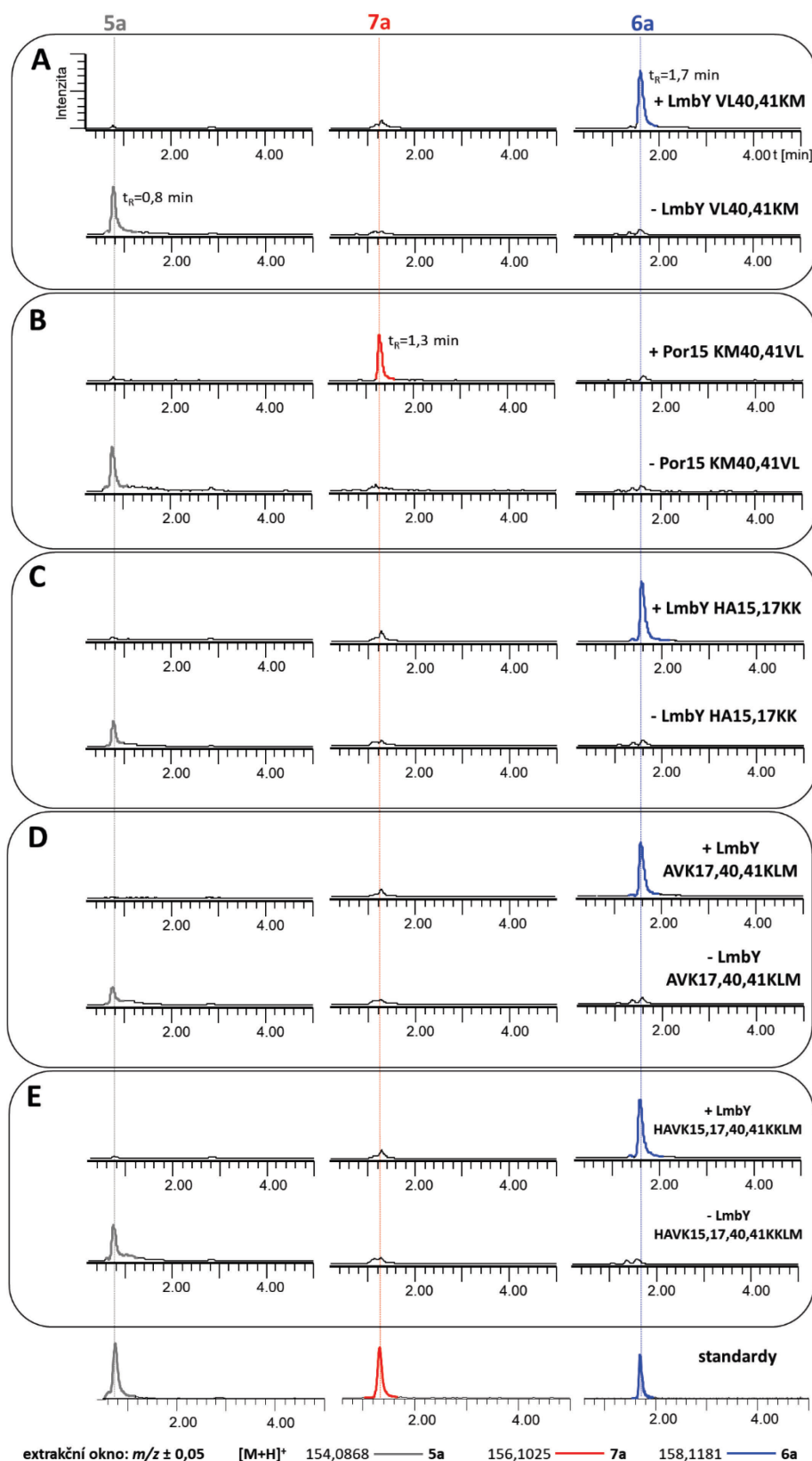




Obr. 5.36. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakcí mutovaných LmbY a Por15. (A) LmbY H15K, (B) LmbY A17K, (C) Por15 K15H, (D) Por15 K17A. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) odpovídající substrátu **5a** (šedě) a produktům **6a** (modře) a **7a** (červeně). Jednoduchou záměnou aminokyselin v pozicích 15 a 17 nedošlo k inaktivaci či jiné katalytické změně u žádné z mutantních variant LmbY ani Por15. Všechny mutanty LmbY stále katalyzovaly dvojnásobnou redukci **5a**, všechny mutanty Por15 stále katalyzovaly pouze jednonásobnou redukci stejného substrátu.

Testování několikanásobných mutantních variant

Poslední část mutační analýzy byla zaměřena na přípravu několikanásobných mutant. Opět, záměrem experimentu byla změna reakční specifity Apd6 proteinů. Testovány byly dvojité mutanty: LmbY VL40,41KM – těmito mutacemi je dosaženo toho, že konzervovaná sekvence D38 – R43 v plné délce odpovídá sekvenci PBD homologům (DHLMWR namísto DHVKWR), Por15 KM40,41VL – těmito mutacemi je dosaženo toho, že konzervovaná sekvence D38 – R43 v plné délce odpovídá sekvenci LmbY (DHVKWR namísto DHLMWR), LmbY HA15,17KK – pozice 15 a 17 jsou zaměněny za aminokyseliny přítomné v Por15. Závěrem byly připraveny a testovány několikanásobné mutanty LmbY: AVK17,40,41KLM a HAVK15,17,40,41KKLM. UHPLC-MS analýzou reakčních směsí opět nebyly zjištěny žádné změny v katalytické aktivitě ve srovnání s nemutovanými Apd6 proteiny (Obr. 5.37).



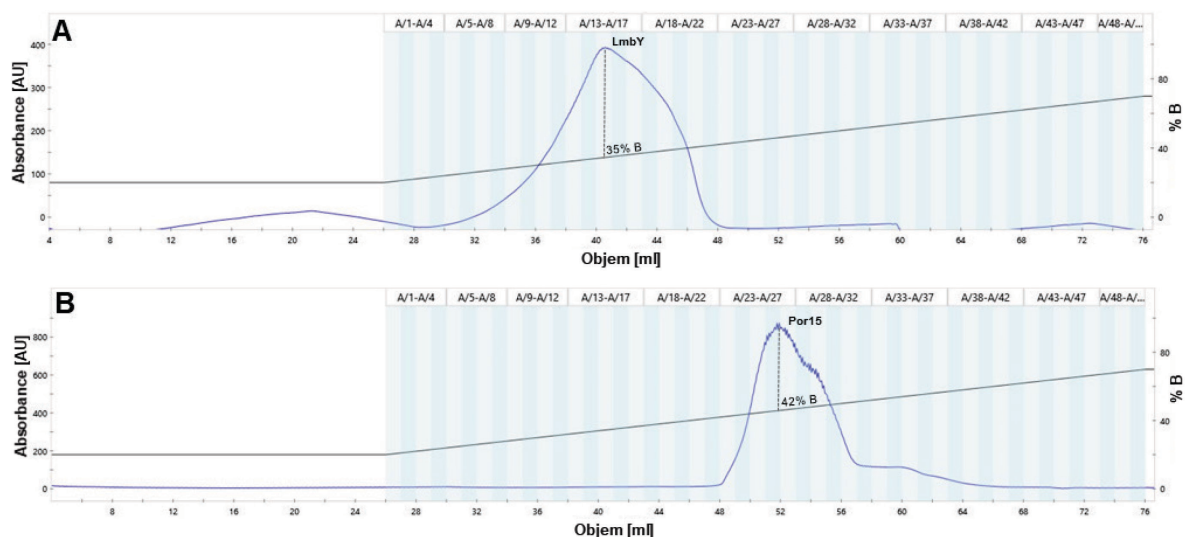
Obr. 5.37. UHPLC-MS analýza *in vitro* reakce mutovaného LmbY a Por15. (A) LmbY VL40,41KM, (B) Por15 KM40,41VL, (C) LmbY HA15,17KK, (D) LmbY AVK17,40,41KLM, (E) LmbY HAVK15,17,40,41KKLM. LC-MS-ion-extrahované chromatogramy ($[M+H]^+$) odpovídající substrátu **5a** (šedě) a produktům **6a** (modře) a **7a** (červeně). Ani několikanásobnou záměnou aminokyselin v pozicích 15, 17, 40 a 41 kupodivu nedošlo k inaktivaci enzymu či jakékoliv katalytické změně.

5.7 Příprava a analýza krystalů LmbY a Por15 pro strukturní studii

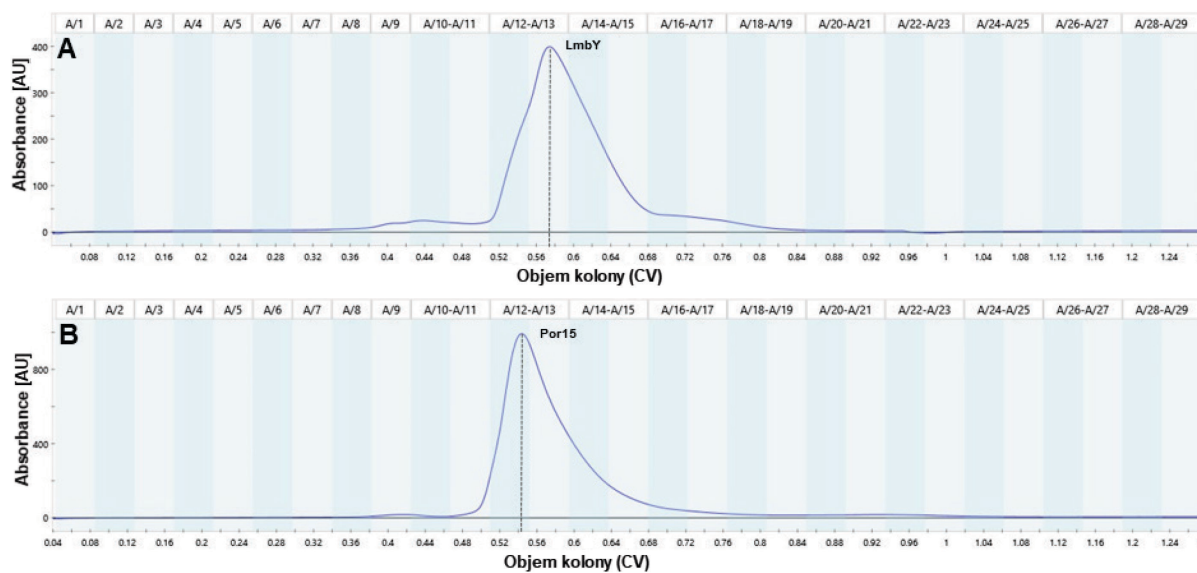
Vzhledem k tomu, že se mutační analýzou nepodařilo prokázat vliv vytipovaných aminokyselinových zbytků na rozdílnou reakční specifitu Apd6 reduktas, rozhodli jsme se pro složitější, avšak spolehlivější cestu – přípravu krystalů proteinů. Krystalová struktura poskytne úplnou informaci o uspořádání aktivních míst Apd6 proteinů. Vybrány byly dva kandidátní proteiny, LmbY, který představuje zástupce se schopností dvojnásobné redukce, Por15 je zástupcem proteinů katalyzujících jednonásobnou redukci.

5.7.1 Příprava rekombinantních proteinů LmbY, Por15 pro krystalizaci

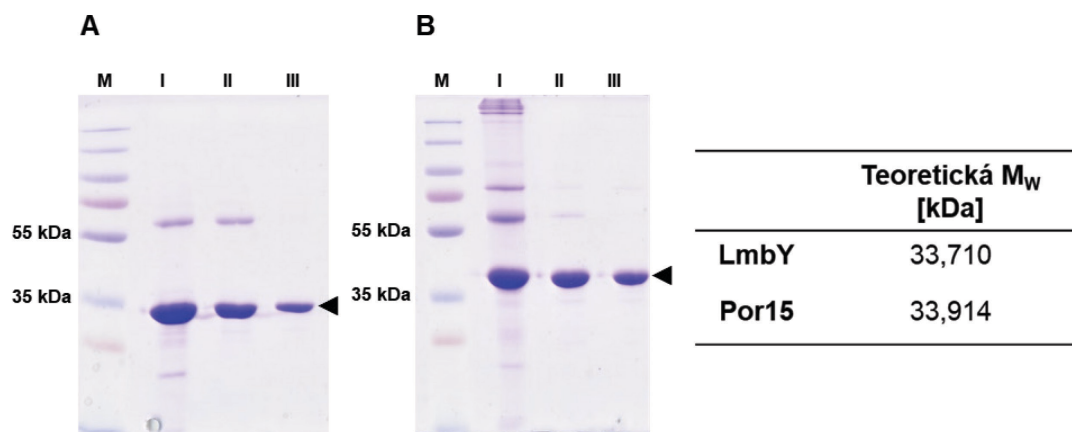
Rekombinantní LmbY a Por15 byly připravovány dle již optimalizovaného protokolu s tím rozdílem, že kultivace transformované *E. coli* BL21 (DE3)/pGroESL probíhala v obohaceném LB médiu, ve kterém kultura dosahuje vyšší OD (ve srovnání se základním LB médiem). Proteiny uvolněné dezintegrací buněk z původního kultivačního objemu 2 – 6 l byly purifikovány ve třech krocích. Prvním krokem byla afinitní chromatografie na kolonce HiTrap™, kterou se podařilo Apd6 proteiny izolovat v dostatečném množství, ovšem značnou část frakce tvořily chaperoniny. Následovala iontově výměnná chromatografie – LmbY byl z chromatografické kolony eluován při 35% B, Por15 při 42% B (Obr. 5.38). Tímto krokem se podařilo odstranit podstatnou část nežádoucích proteinů, avšak Apd6 proteiny stále nebyly dostatečně čisté pro krystalizaci. Posledním krokem proto byla gelová filtrace – LmbY byl z kolony eluován ve frakci odpovídající 0,57 CV, Por15 ve frakci odpovídající 0,54 CV (Obr. 5.39). Gelovou filtrací se podařilo oddělit zbývající chaperoniny a získat tak čisté LmbY i Por15 vhodné pro krystalizační studii (Obr. 5.40). Z 1 l kultivace bylo průměrně získáno 1,5 mg purifikovaného LmbY a 2,9 mg purifikovaného Por15.



Obr. 5.38. Chromatografický záznam iontové výměnné chromatografie při 280 nm. (A) LmbY je z kolony eluován při 35% B a (B) Por15 při 42% B.



Obr. 5.39. Chromatografický záznam gelové filtrace při 280 nm. (A) LmbY je z kolony eluován ve frakci odpovídající 0,57 CV a (B) Por15 ve frakci odpovídající 0,54 CV.

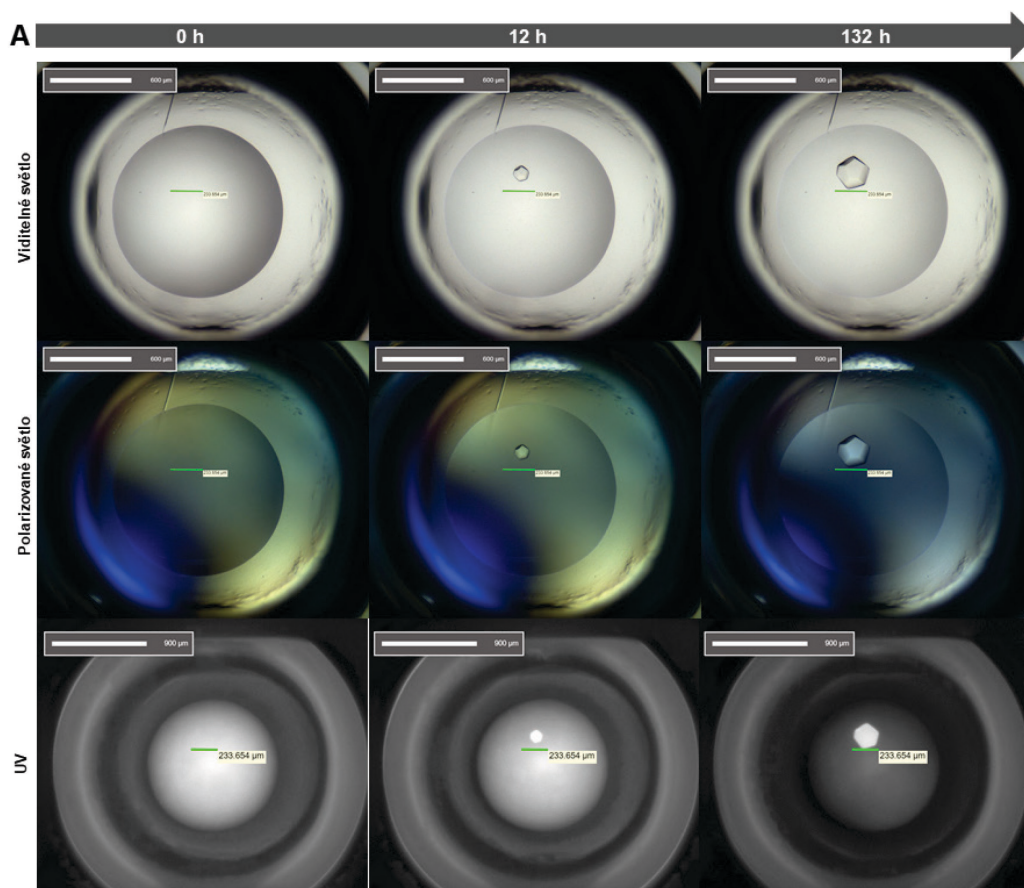


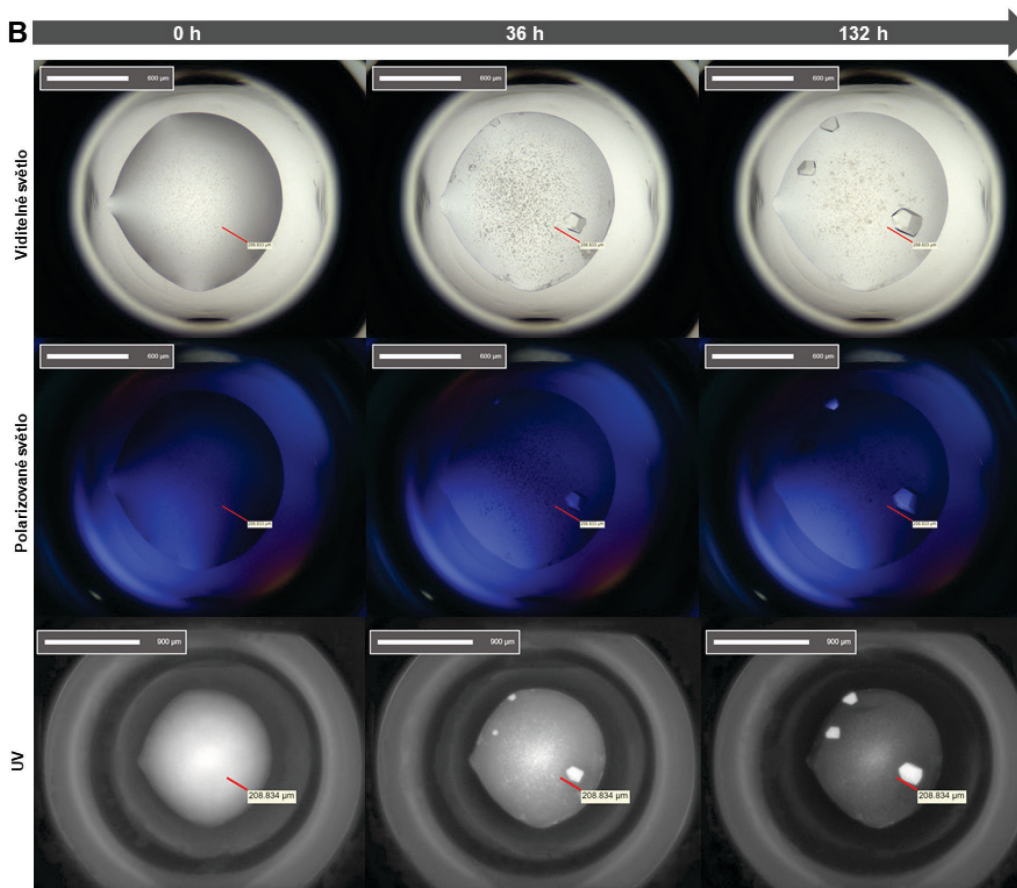
Obr. 5.40. Purifikované LmbY a Por15 určené pro krystalizaci. (A) Purifikovaný LmbY a (B) purifikovaný Por15 po afinitní chromatografii (I), iontové výměnné chromatografii (II) a gelové filtraci (III). U obou proteinů bylo dosaženo požadované čistoty až po gelové filtraci. SDS-PAGE – purifikované proteiny jsou znázorněny černou šipkou. **M**=standard molekulové velikosti proteinů.

5.7.2 Stanovení optimálních krystalizačních podmínek proteinu LmbY

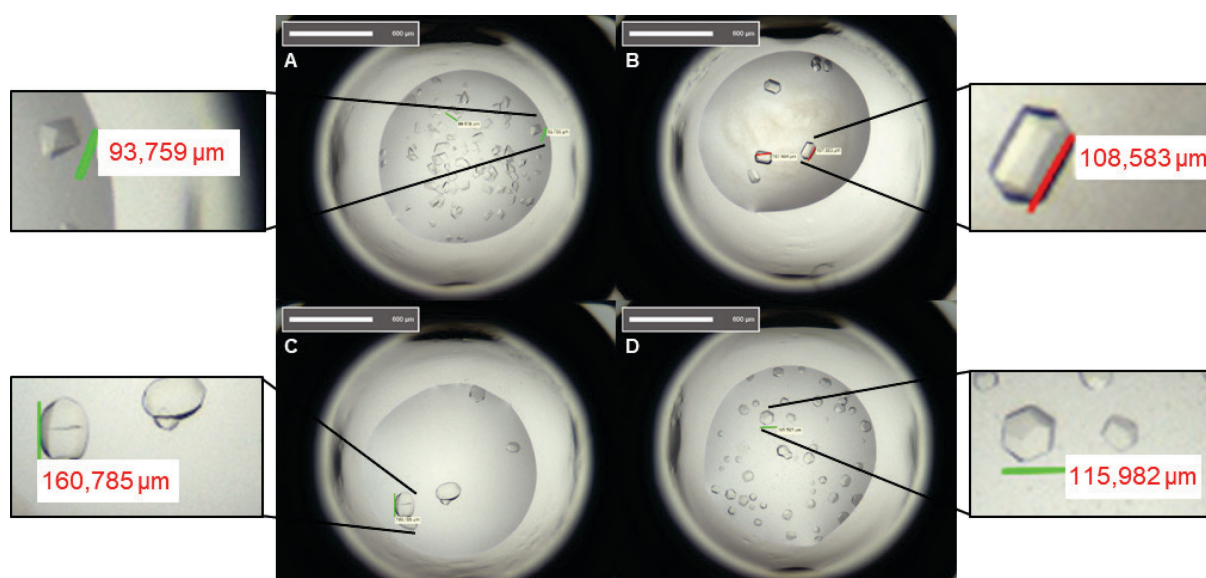
Krystalizace proteinu LmbY byla pozorována ve všech testovaných sadách krystalizačních činidel. První růst krystalů bylo možné zpravidla pozorovat již po 12 – 36 h od nasazení (Obr. 5.41). Pozorována byla různorodá morfologie krystalů, v závislosti na konkrétních krystalizačních podmínkách (Obr. 5.42). Shodně, u všech testovaných krystalizačních činidel se jako nejefektivnější jeví ředění protein:činidlo v poměru 2:1. V jamkách s tímto ředěním byly pozorovány krystaly požadovaného tvaru i velikosti pro rentgenovou difrakci (krystaly s ostrými hranami o velikosti až 200 μm). U ředění 1:1 byl pozorován nárůst výrazně menších krystalů, ředění 1:2 se ukazuje jako nejméně vhodné, neboť protein ve srovnání s ostatními dvěma ředěními značně precipitoval již po 12 h od nasazení (Obr. 5.43).

Přehled podmínek, při kterých vznikají krystaly LmbY vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu, jsou souhrnně uvedeny v Tab. 5.1.

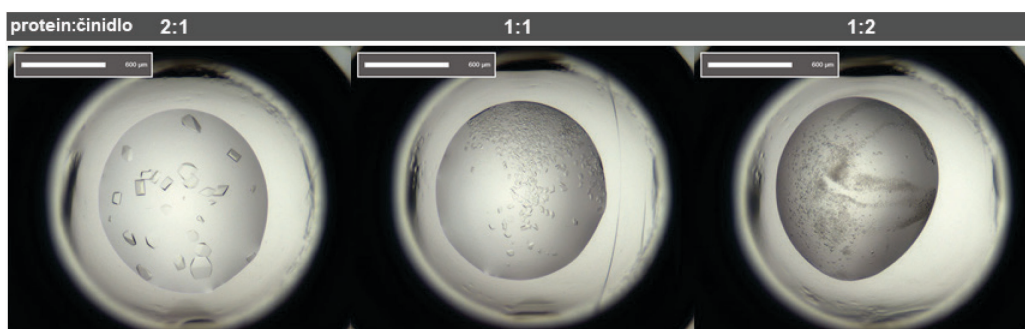




Obr. 5.41. **Růst krystalů LmbY v čase.** (A) JCSG+ Suite: 20% w/v PEG 8000, 0,2 M NaCl, 0,1 M $C_6H_5O_{11}P^{-6}$, pH 4,2; protein:čínidlo – 2:1. (B) PACT *premier*TM: 20% w/v PEG 3350, 0,2 M Na_2SO_4 , 0,1 M $C_{11}H_{26}N_2O_6$, pH 6,5; protein:čínidlo – 2:1. Koncentrace nanášeného LmbY: 11 mg · ml⁻¹. Růst krystalů ve 20°C.



Obr. 5.42. **Různorodá morfologie krystalů LmbY.** (A) BCS Screen: 25% w/v PEG 3350, 0,2 M NaCl, 0,1 M Bis-Tris, pH 5,5; protein:čínidlo – 2:1. (B) XP Screen: 1 mM TEW, 1 M $C_2H_3NaO_2$, 0,1 M imidazol, pH 6,5; protein:čínidlo – 2:1. (C) SG1TM Screen: 0,2 M $Li_3C_6H_5O_7$, 20% w/v PEG 3350; protein:čínidlo – 1:1. (D) PACT *premier*TM: 20% w/v PEG 3350, 0,2 M Na_2SO_4 , 0,1 M $C_{11}H_{26}N_2O_6$, 7,5 pH; protein:čínidlo – 2:1. Koncentrace nanášeného LmbY: 11 mg · ml⁻¹. Růst krystalů 132 h ve 20°C. Záznam ve viditelném světle.



Obr. 5.43. Vliv poměru krystalizačního činidla a proteinu na růst krystalů LmbY. PACT *premier*TM: 20% w/v PEG 3350, 0,2 M NaI; protein:činidlo – 2:1, 1:1, 1:2: jako nejefektivnější se jeví ředění protein:činidlo v poměru 2:1. Koncentrace nanášeného LmbY: 11 mg · ml⁻¹. Růst krystalů 132 h ve 20°C. Záznam ve viditelném světle.

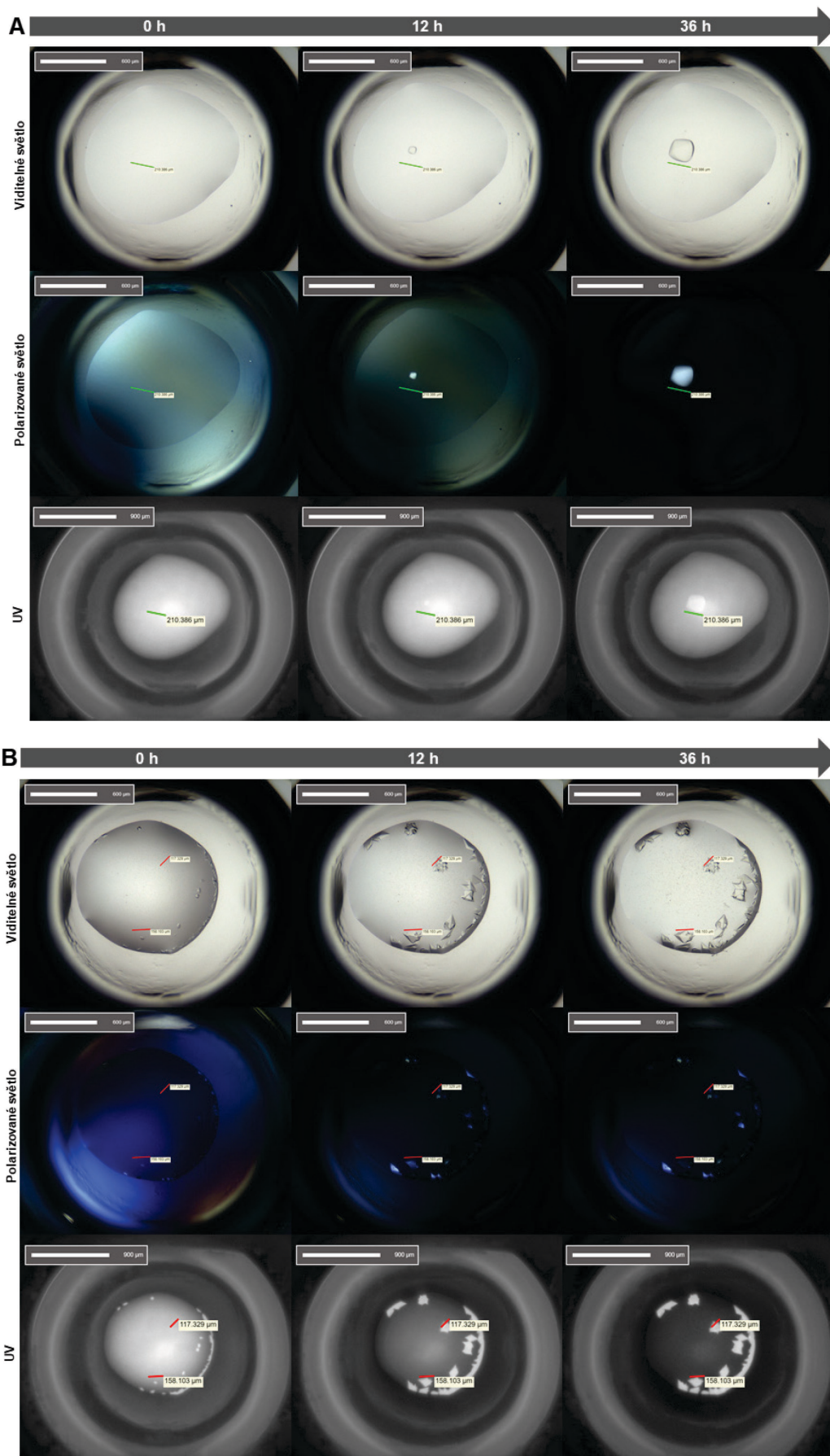
Tab. 5.1. Souhrnný přehled optimálních krystalizačních podmínek LmbY.

Sůl	Srážedlo	Pufr	Poměr v kapce
0,2 M Na ₂ SO ₄	20% w/v PEG 3350	0,1 M C ₁₁ H ₂₆ N ₂ O ₆ pH 6,5	2:1
0,2 M NaI	20% w/v PEG 3350	-	2:1
0,2 M Na ₂ SO ₄	20% w/v PEG 3350	0,1 M C ₁₁ H ₂₆ N ₂ O ₆ pH 7,5	2:1

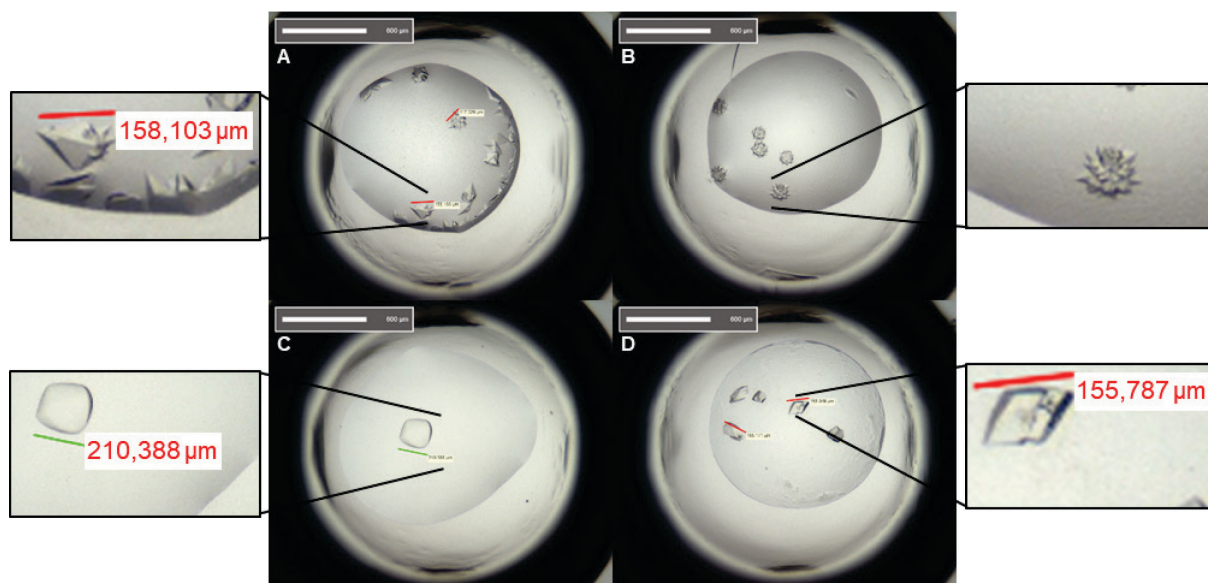
5.7.3 Stanovení optimálních krystalizačních podmínek proteinu Por15

Krystalizace proteinu Por15 byla pozorována ve všech testovaných sadách krystalizačních činidel, ovšem v porovnání s LmbY s výrazně nižší účinností. První růst krystalů bylo sice možné pozorovat ihned po nasazení (Obr. 5.44), pozorována byla taktéž různorodá morfologie krystalů (Obr. 5.45), avšak Por15 ve většině testovaných krystalizačních podmínkách krystaloval ve formě srostlic (Obr. 5.45A-B,D), které nepředstavují příliš vhodnou formu pro rentgenovou difrakci. Stejně jako u LmbY, i u Por15 se ve všech testovaných krystalizačních činidlech jako nejefektivnější jeví ředění protein:činidlo v poměru 2:1. V jamkách s tímto ředěním byly pozorovány krystaly dosahující vhodné velikosti pro rentgenovou difrakci (až 210 µm). Ředění 1:1 i 1:2 se ukázalo jako neúčinné, neboť protein značně precipitoval již po 12 h od nasazení (Obr. 5.46).

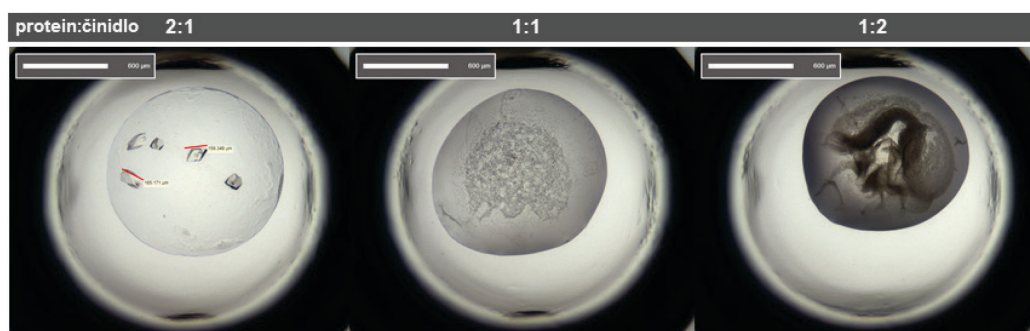
Přehled konkrétních podmínek, při kterých vznikají krystaly Por15 vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu, jsou souhrnně uvedeny v Tab. 5.2.



Obr. 5.44. **Růst krystalů Por15 v čase.** (A) XP Screen: 25% v/v EG, 1 mM TEW; protein:čidlo – 2:1. (B) SG1™ Screen: 20% w/v PEG 3350, 0,2 M NaSCN; protein:čidlo – 2:1. Koncentrace nanášeného Por15: 18 mg · ml⁻¹. Růst krystalů 36 h ve 20°C.



Obr. 5.45. **Různorodá morfologie krystalů Por15.** (A) SG1™ Screen: 20% w/v PEG 3350, 0,2 M NaSCN; protein:čínidlo – 2:1. (B) BCS Screen: 3 M NaCl, 0,1 M Bis-Tris, pH 5,5; protein:čínidlo – 1:1. (C) XP Screen: 25% v/v EG, 1 mM TEW; protein:čínidlo – 2:1. (D) BCS Screen: 1,6 M MgSO₄, 0,1 M MES, pH 6,5; protein:čínidlo – 2:1. Koncentrace nanášeného Por15: 18 mg · ml⁻¹. Růst krystalů 36 h ve 20°C. Záznam ve viditelném světle.



Obr. 5.46. **Vliv poměru krystalizačního činidla a proteinu na růst krystalů Por15.** BCS Screen: 1,6 M MgSO₄, 0,1 M MES, pH 6,5; protein: činidlo – 2:1, 1:1, 1:2: jako nejefektivnější se jeví ředění protein:činidlo v poměru 2:1. Koncentrace nanášeného Por15: 18 mg · ml⁻¹. Růst krystalů 36 h ve 20°C. Záznam ve viditelném světle.

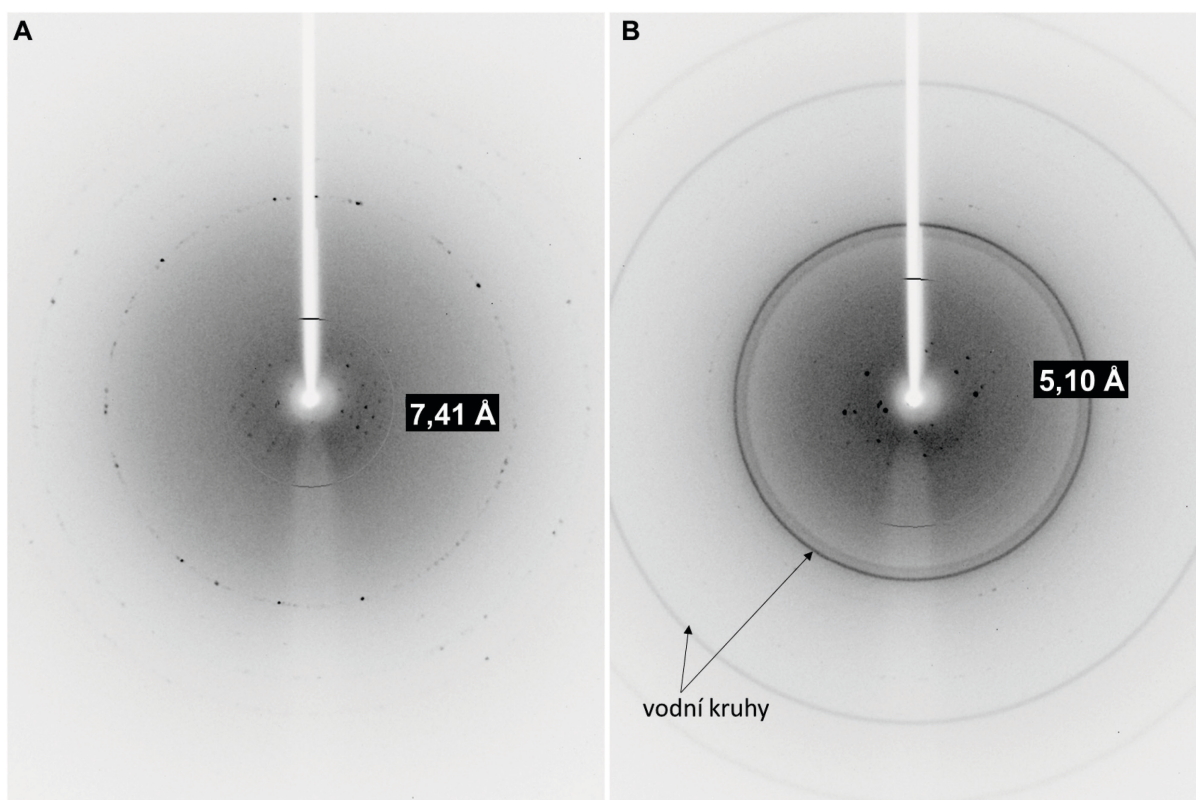
Tab. 5.2. Souhrnný přehled optimálních krystalizačních podmínek Por15.

Sůl/jiné aditivium	Srážedlo	Pufr	Poměr v kapce
0,2 M NaSCN	20% w/v PEG 3350	-	2:1
1 mM TEW*	20% v/v EG	-	2:1

* Anderson–Evans polyoxotungstát: [TeW₆O₂₄]⁶⁻

5.7.3.1 Ověření proteinových krystalů pomocí rentgenové difrakční analýzy

Rentgenovou difrakcí byly získány difrakční snímky s rozlišením 7,4 Å pro LmbY, respektive 5,1 Å pro Por15 (Obr. 5.47). Bylo ověřeno, že se jedná o krystaly proteinů, jelikož reflexe jsou rozmístěny blízko lapače primárního svazku. V případě Por15 nepravidelnost difrakčního obrazce naznačuje přítomnost více monokrystalů, což odpovídá pozorované krystalové morfologii. V další části práce bude zapotřebí podmínky krystalizace a kryprotektce optimalizovat tak, aby bylo dosaženo rozlišení dostatečné pro určení struktury a zároveň byly odstíněny všechny artefakty měření, jako například vodní kruhy vznikající difrakcí na krystalech ledu (Obr. 5.47B).



Obr. 5. 47. Difrakční snímek krystalů (A) LmbY a (B) Por15 zchlazené na teplotu 100 K. Tmavé skvrny – pozitivní interference, světlá místa – negativní interference (šum pozadí). Vodní kruhy představují práškovou difrakci na krystalech ledu.

5.8 Bioinformatická analýza Apd6 proteinů

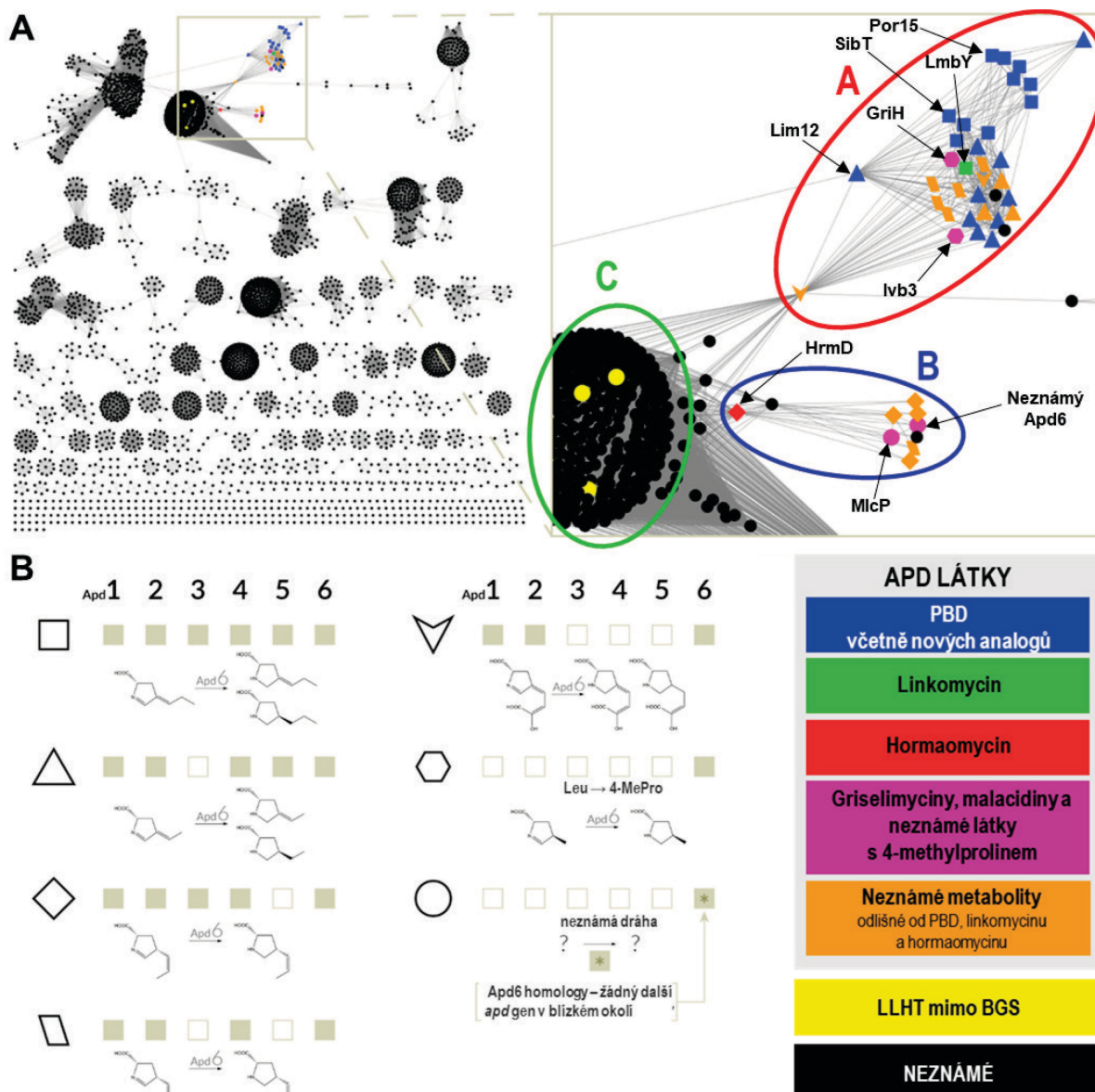
Dvojnásobná $F_{420}H_2$ -závislá redukce katalyzovaná LmbY představuje unikátní enzymovou aktivitu, proto byl tento protein podroben bioinformatické analýze s cílem zjistit: (1) zda není ve veřejných databázích publikován homolog, u kterého by se dala předpokládat stejná reakční specifita a dále (2) odhalit evoluční aspekty vzniku této neobvyklé aktivity.

Obr. 5.48 ukazuje sekvenčně-podobnostní síť (SSN, z angl. sequence similarity network) 5 000 proteinů z UniProt²⁵⁸ databáze, které jsou LmbY sekvenčně nejpodobnější

a zároveň mají ještě významnou míru identity (nejnižší sekvenční identita: 24% a nejvyšší E-hodnota: $2e^{-14}$), Obr. 5.50 pak ukazuje fylogenetickou analýzu Apd6 proteinů, jejichž sekvence pocházejí z GenBank²⁵⁹ databáze. Výstupy obou analýz jsou analogické a vzájemně si odpovídají. Výstup fylogenetické analýzy zobrazuje pouze detailní pohled zaměřený na Apd6 proteiny, ačkoliv vzhledem k vyššímu počtu záznamů v databázi GenBank než v databázi UniProt, vznikla zpracováním většího počtu sekvencí. Na druhou stranu, SSN analýza zajímavě ukazuje vlastní skupinu Apd6 proteinů zakotvenou v podstatně širším kontextu pravděpodobných archaeálních a bakteriálních LLHT (zobrazuje všech 5 000 vstupních sekvencí; celkový pohled). Výsledky obou analýz jsou popsány v následujících dvou kapitolách.

5.8.1 Sekvenčně-podobnostní síť LmbY-homologních proteinů

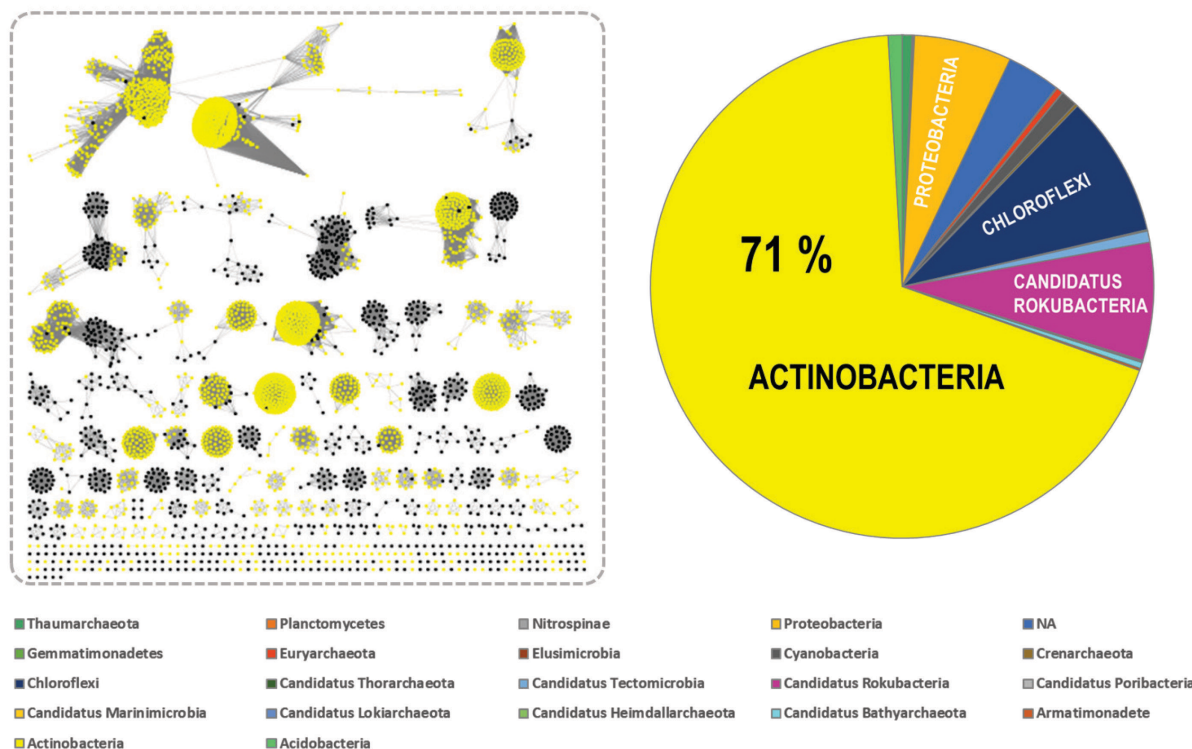
Data pro konstrukci SSN byla generována pomocí on-line nástroje EFI-EST,²⁶⁰ ze získaných dat byla síť následně vytvořena pomocí Cytoscape 3.5.0. Datový soubor, ze kterého analýza vychází, je k dispozici on-line na DOI [10.6084/m9.figshare.11417559](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11417559). Síť zobrazuje 95% reprezentativní uzly, což znamená, že proteiny sdílející více jak 95% sekvenční identitu jsou zobrazeny jako jeden uzel (Obr. 5.48).



Obr. 5.48. Sekvenčně-podobnostní síť pravděpodobných oxidoreduktas z LLHT rodiny proteinů zobrazující 5 000 LmbY-nepodobnějších proteinů jako uzly. (A) Barevné uzly (kruh A a B) představují Apd6 proteiny zapojené do biosyntézy APD prekurzorů vznikajících z L-tyrosinu nebo L-leucinu. Sestava sousedních *apd* genů je znázorněna tvarem uzlu, typ produkovaného metabolitu je znázorněn barvou. Znázornění kruhů A – C je uvedeno pro možnost odkazu na podskupiny proteinů v následujícím textu. (B) Struktury známých/predikovaných Apd6 substrátů a produktů (stanoveno na základě analýzy BGS). Tvary geometrických symbolů označují sestavy *apd* genů, a tím i typ APD prekurzoru, a korespondují s tvary v oddílu A.

Apd6 homology jsou majoritně distribuovány mezi Actinobacteria

Podrobnou analýzou SSN bylo zjištěno, že většina široce definované skupiny Apd6 homologů (tj. 5 000 proteinů) pochází z Actinobacteria, a to celých 71 % (Obr. 5.49). Mezi bakteriemi jsou dále hojně zastoupené například taxonomicky nejbližší kmen Chloroflexi (8 %) či Proteobacteria (5 %).



Obr. 5.49. Zastoupení Actinobacteria v SSN 5 000-LmbY nejpodobnějších proteinů. Vlevo – 71 % uzlů (žlutě) představují aktinobakteriální proteiny. Vpravo – kromě proteinů z Actinobacteria jsou dále například hojně zastoupeny proteiny z Chloroflexi (8 %) a Proteobacteria (5 %).

SSN jako nástroj pro vyhledávání nových APD-inkorporujících látek

V recentní studii¹³ byly pomocí BLASTP²⁶¹ analyzovány proteiny kódované v okolí genů kódujících charakterizované Apd6 proteiny a jejich homology, na základě čehož byly odhaleny desítky předtím necharakterizovaných BGS, které nesou „*apd* podshluk“ (definován jako set nejméně *apd1* a *apd2* genů). Některé z nich kódují biosyntézu známých PBD či jejich nových analogů (odpovídají modrým uzlům v Obr. 5.48A). Na druhou stranu, nebyl objeven žádný BGS kódující biosyntézu linkomycinu, hormaomycinu, griselimycinu nebo jejich analogů. Dosud charakterizované APD biosyntetické dráhy vycházející z L-tyrosinu využívají buď celou sadu Apd1 – Apd6 proteinů (linkomycin a PBD s 3-C bočním alkylovým řetězcem), případně sadu pěti Apd proteinů: sada bez Apd3 (PBD s 2-C bočním alkylovým řetězcem) či sada bez Apd5 (hormaomycin; kap. 2.5.1). Ovšem, několik nově charakterizovaných BGS jsou novinkou v souvislosti se složením *apd* genů. Například, byla identifikována sada bez *apd3*, 5 či sada bez *apd3,4,5*. Lze tedy předpokládat, že Apd6 reduktasy zobrazené uzly na Obr. 5.48A v kruhu A a B budou schopny redukovat i další substráty. Na Obr. 5.48B je zobrazen přehled potvrzených a predikovaných substrátů a produktů Apd6 proteinů.

Apd6 zapojené do biosyntézy látek inkorporujících MPL jsou na Obr. 5.48A znázorněny jako fialové uzly. Kromě charakterizovaného Apd6 z griselimycinu (GriH) a známých Apd6 homologů z biosyntézy malacidinů (MlcP) a intervencinu (Ivb3), byl v rámci této práce z SSN

nově identifikován další Apd6 homolog účastnící se biosyntézy dosud neznámé MPL-inkorporující látky. Tento Apd6 homolog pravděpodobně shodně katalyzuje redukci endocyklické dvojnás vazby 4-methyl- Δ^1 -pyrrolin-2-karboxylové kyseliny (odvozeno na základě složení BGS této látky – analýzu BGS provedla Mgr. Magdaléna Lenartová) a jeho reakční specifita je tudíž analogická k Apd6 z PBD a hormaomycinu (a částečně griselimycinu).

V neposlední řadě, výsledky této analýzy poskytují námět pro návazné studie kryptických BGS (Obr. 5.48A; Apd6 homology, které jsou kódovány v kryptických BGS, jsou znázorněny oranžovými uzly), které mohou potenciálně rozšířit svět APD, či jiných látek obsahujících ve své struktuře L-prolinový motiv.

Evoluční aspekty Apd6 proteinů

Nápadné rozdělení Apd6 homologů z biosyntézy APD látek do dvou oddělených skupin – A a B (Obr. 5.48A), které jsou zároveň napojeny na skupinu C, nás nutí přemýšlet o evolučních událostech uvnitř LLHT.

Separace uzlů asociovaných s APD biosyntézou do dvou oddělených skupin ukazuje na jejich nezávislou evoluci a to pravděpodobně, právě díky shodnému napojení na skupinu C, ze společného předka. Na nezávislý evoluční vývoj ukazuje i fakt, že zatímco obě skupiny (A i B) jsou asociovány s MPL metabolity (fialové uzly), jen jeden z těchto shluků je dále asociován pouze s PBD a linkomycinem (skupina A), zatímco druhý s hormaomycinem (skupina B).

Lze uvažovat, že společnými předky mohou být proteiny znázorněné uzly ve zmíněné skupině C. Analýzou genomového kontextu bylo zjištěno, že některé uzly v této skupině jsou asociovány s LLHT proteiny kódovanými mimo BGS. Například, žluté uzly ve skupině C na Obr. 5.48A zobrazují LLHT kódované v genomu producenta linkomycinu *S. lincolnensis*, producenta limazepinu *S. sp.* ICBB 1877 a producenta hormaomycinu *S. griseoflavus*. Na základě specifického ohledání okolí genů kódujících tyto proteiny lze s určitou mírou jistoty předpokládat, že jsou tyto proteiny asociovány spíše s centrálním, než specializovaným metabolismem.

5.8.2 Fylogenetická analýza

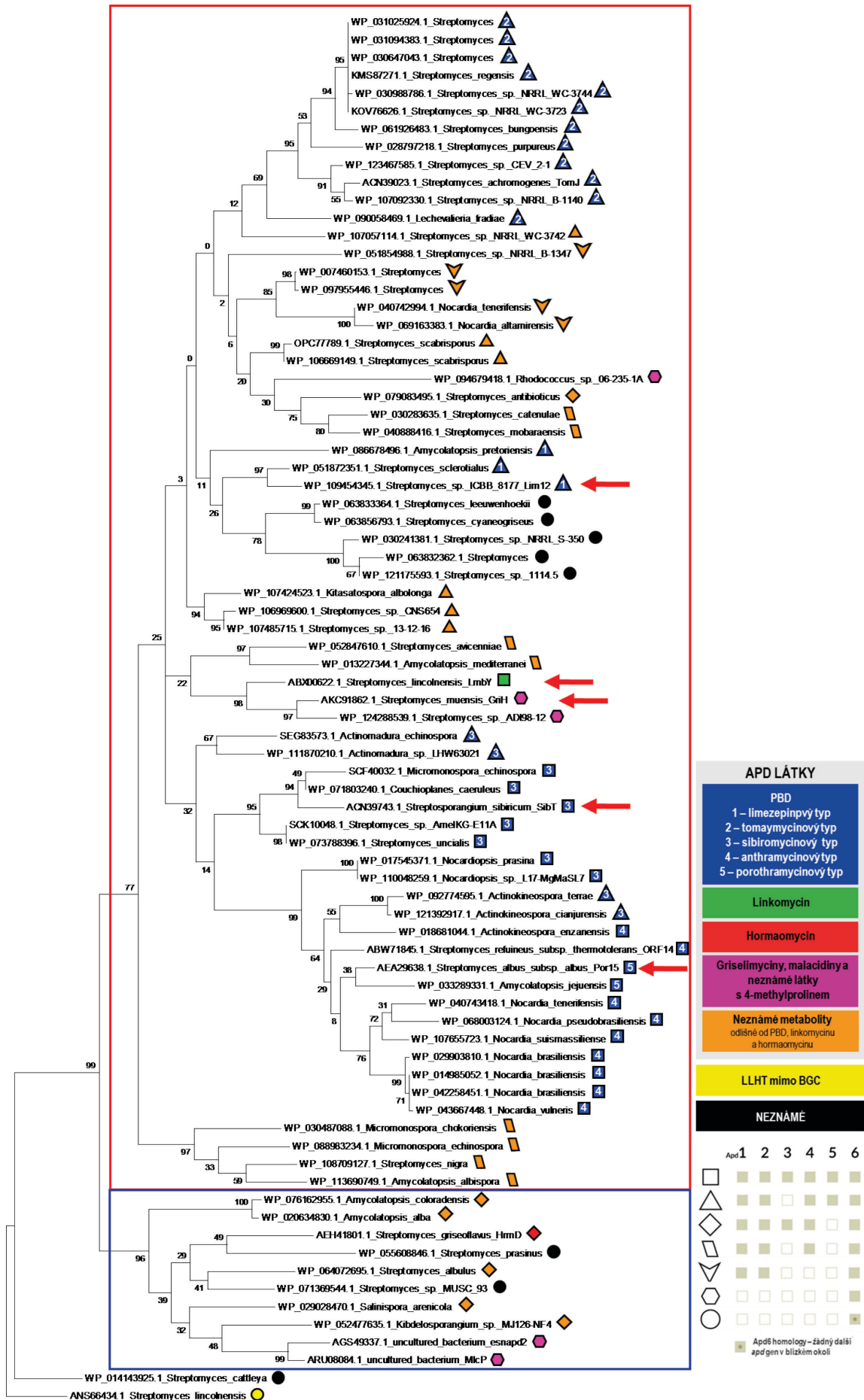
Fylogenetická analýza Apd6 proteinů ukazuje výsledek analogický výstupu SSN, pouze v detailu. Jako kořen fylogenetického stromu (Obr. 5.50) byl zvolen protein z genomu *S. lincolnensis* (ANS66434.1), který byl již zmíněn výše a u kterého předpokládáme zapojení v centrálním metabolismu.

Stejně jako v SSN, i zde můžeme pozorovat nápadný rozpad na dvě skupiny proteinů, analogicky jako v SSN označených barevně (červený rámeček – v SSN skupina A; modrý

rámeček – v SSN skupina B). Na rozdíl od SSN lze ve fylogenetickém stromu detailně pozorovat klastrování dle podobnosti struktur výsledných metabolitů, jejichž biosyntézy se Apd6 účastní (typ produkovaného metabolitu je uveden číslem uvnitř značky). Asi nejmarkantnější klastrování je pozorovatelné u homologů z biosyntézy PBD – lze rozlišit PBD limazepinového, sibiromycinového, tomaymycinového, anthramycinového i porothramycinového typu. Analogicky jako v SSN, z větvení je patrné, že obě skupiny (A a B) vznikly nezávisle, ale z téže skupiny proteinových předchůdců. Vzhledem k tomu, že GriH je dosud nejbližším identifikovaným homologem LmbY a přesto má jen částečnou funkční shodu (schopný jak jedno- tak dvojnásobné redukce), zdá se, že neobvyklá schopnost katalyzovat výlučně dvojnásobnou redukci dělá z LmbY protein unikátní nejen mezi proteiny charakterizovanými v této práci, ale také mezi všemi LLHT z GenBank databáze.

- LEGENDA K OBRÁZKU ZOBRAZENÉHO NA NÁSLEDUJÍCÍ STRANĚ -

Obr. 5.50. **Zakořeněný fylogenetický strom Apd6 proteinů.** Jednotlivé proteiny jsou ve fylogenetickém stromu znázorněny přístupovým GenBank kódem (accession number) a produkujícím kmenem. Dále je znázorněn i typ produkované látky (odvozeno z Obr. 5.48). Červené šipky označují Apd6 charakterizované v této práci. „Bootstrapové“ hodnoty (hodnota označuje procento, v kolika případech z celkové počtu opakování by dané větvení bylo znázorněno stejným způsobem) jsou uvedeny nad uzly větví, počet replikátů byl nastaven na 500.

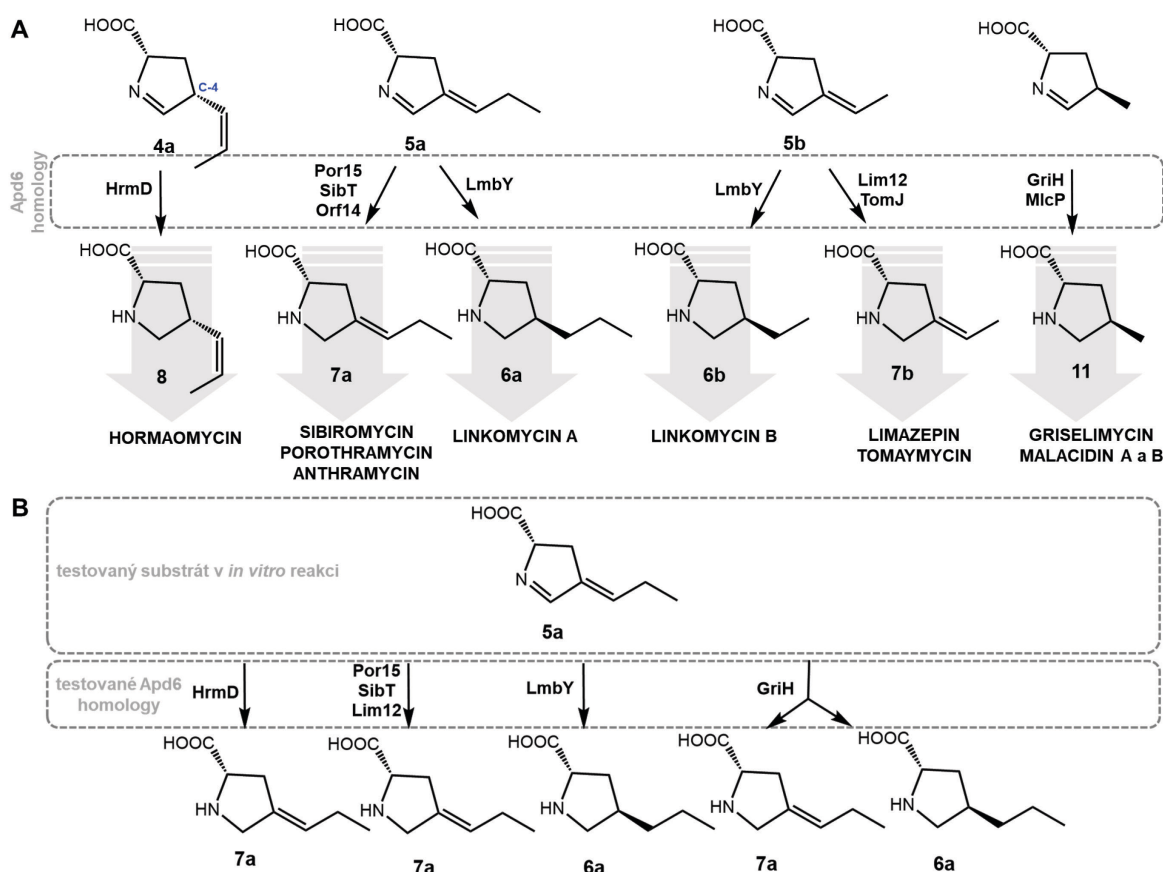


6 DISKUZE

Hypotéza a několik nepřímých důkazů o funkci LmbY v alkylnolinové dráze linkomycinu existovaly již poměrně dlouhou dobu.^{206,207,218,262} Nicméně, i přes tyto stabilní základy, na kterých bylo možné dále stavět, přímý biochemický průkaz enzymové aktivity a zařazení LmbY do navrhovaného stupně biosyntézy nebyly nikdy doloženy.

S nárůstem počtu sekvenačních projektů, a tím se vzrůstajícím počtem sekvencí ve veřejných genových databázích, byly různé variace alkylnolinové/methylprolinové dráhy postupně predikovány i v biosyntéze několika dalších SM. Funkce Apd6 homologních proteinů je v současné době předpokládána minimálně v biosyntéze pěti PBD, jmenovitě anthramycinu,¹²⁶ porothramycinu,¹²⁷ limazepinu,¹²⁸ tomaymycinu¹³¹ a sibiromycinu,¹³⁰ dále pak v biosyntéze hormaomycinu,²⁰² griselimycinu²⁶³ a také nově objevených malacidinů²³⁸ a linkosamidu intervencinu.⁹⁷ Ve všech případech se jedná o aktinobakteriální metabolity s významnou biologickou aktivitou, a tím pádem o látky potenciálně zajímavé nejen pro farmaceutický výzkum.

Nativní substráty Apd6 homologů mají společný základ – prolinový kruh, který je dále různě modifikován (Obr. 6.1A). V zásadě se substráty Apd6 homologů liší v saturaci a poloze dvojných vazeb a/nebo délce bočního alkylového řetězce. Nepřímá indicie o rozdílné reakční specifitě Apd6 homologů byla prezentována relativně nedávno.²³⁶ Aby z **5a/5b** vznikl plně nasycený **6a/6b**, musí linkomycinový Apd6 katalyzovat dvě následné redukce, což je velmi neobvyklé. Naopak, pro homologní Apd6 z biosyntézy PBD je zcela evidentní, že k tomu, aby vznikl mononenasycený **7a/7b**, redukována musí být jen jedna z dvojných vazeb stejného substrátu. V rámci této práce se podařilo *in vitro* objasnit reakční specifitu šesti Apd6 homologů v reakci s identickým substrátem, látkou **5a** (Obr. 6.1B).



Obr. 6.1. Souhrnný přehled chemických struktur (A) předpokládaných nativních substrátů Apd6 homologů a jejich reakčních produktů a (B) schématické znázornění *in vitro* reakcí katalyzovaných Apd6 homology – reakce byly provedeny za účelem stanovení reakční specifity Apd6 (HrmD, Por15, SibT, Lim12, LmbY, GriH), proto byla jako substrát použita výhradně látka 5a, která je přirozeným substrátem jen pro Por15, SibT a LmbY.

Dostupnost F_{420} je limitujícím faktorem pro studium 5-deazaflavin-závislých enzymů

Existují zřejmě dva hlavní důvody, proč funkce Apd6 proteinů nebyla úspěšně vyřešena již dávno. První z nich jsou komplikace při přípravě rekombinantních proteinů (diskutováno v následující kapitole), druhým je nedostupnost kofaktoru F_{420} pro *in vitro* testování proteinů.

Většina laboratoří se pokouší o produkci a purifikaci F_{420} z různých, většinou pomalu rostoucích F_{420} -syntetizujících mikroorganismů, včetně Archaea (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosacrina*) a Actinobacteria (*Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacteria*), s různými výtěžky (Tab. 6.1).²⁵² Při analýze F_{420} -produkcujících mikroorganismů se jako nejlepší producent ukázal *M. smegmatis* – mikrobiální druh, který v porovnání s methanogeny snadno a rychle roste, je nepatogenní a náklady na kultivaci jsou relativně nízké.²⁵² Od tohoto poznatku se odrážejí některé další úspěšné práce zaměřující se na *in vivo* produkci F_{420} . Například, v roce 2010 byla publikována práce o produkci F_{420} v geneticky modifikované *M. smegmatis*. Bylo ukázáno, že ko-expressí tří F_{420} -biosyntetických genů z *M. tuberculosis* v produkčním organismu *M. smegmatis* a

optimalizací kultivačních podmínek je možné získat až 10× více F₄₂₀ v porovnání s typovým kmenem.²⁵¹

Úplnou novinkou je pak produkce F₄₂₀ v *E. coli*. Revizí F₄₂₀-biosyntetické dráhy u Bacteria bylo v r. 2019 nově prokázáno, že substrátem zúčastněného enzymu FbiD, formujícího jeden z esenciálních prekurzorů pro biosyntézu F₄₂₀, je fosfoenolpyruvát (PEP) a ne do té doby předpokládaný 2-fosfo-L-laktát (2-PL; Obr. 6.2).⁶⁴ Toto zjištění přineslo zásadní zlom, neboť na rozdíl od 2-PL je PEP v *E. coli* hojně zastoupeným intermediátem glykolýzy a glukoneogeneze a tedy je volně přístupný dalším transformacím. Z biosyntetického hlediska tedy v genové výbavě *E. coli* teoreticky chybí k produkci F₄₂₀ už jen čtyři F₄₂₀-biosyntetické geny – *fbiA*, *fbiB*, *fbiC*, *fbiD*. Ve stejné studii bylo ukázáno, že skutečně expresí těchto genů, které jsou do *E. coli* vneseny na plazmidu, je možné z *E. coli* získat srovnatelné množství F₄₂₀, jako z F₄₂₀-přirozeně produkujících kmenů.

Pro úplnost, v literatuře existují i práce zaměřující se na chemickou syntézu 5-deazaflavinů,²⁶⁴ recentní studie dokonce ukazuje i možnost přípravy a využití nepřirozeného 5-deazaflavinu, F₀-5'-fosfátu, chemo-enzymatickou cestou.²⁶⁵ Postupem lze z kultivačního média získat až slibných 50 μM · l⁻¹.

Zlepšení metod preparativní produkce F₄₂₀ vedoucí k větším výtěžkům s menšími ekonomickými náklady je více než žádoucí, neboť F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislé enzymy představují cenný, avšak dosud nepříliš využívaný nástroj biotechnologického průmyslu (kap. 6.6.2).^{266,267} Už teď je ale zřejmé, že současný stav poznání otevírá dveře pro mnohem rozsáhlejší studium F₄₂₀/F₄₂₀H₂-závislých enzymů, než tomu bylo doposud.

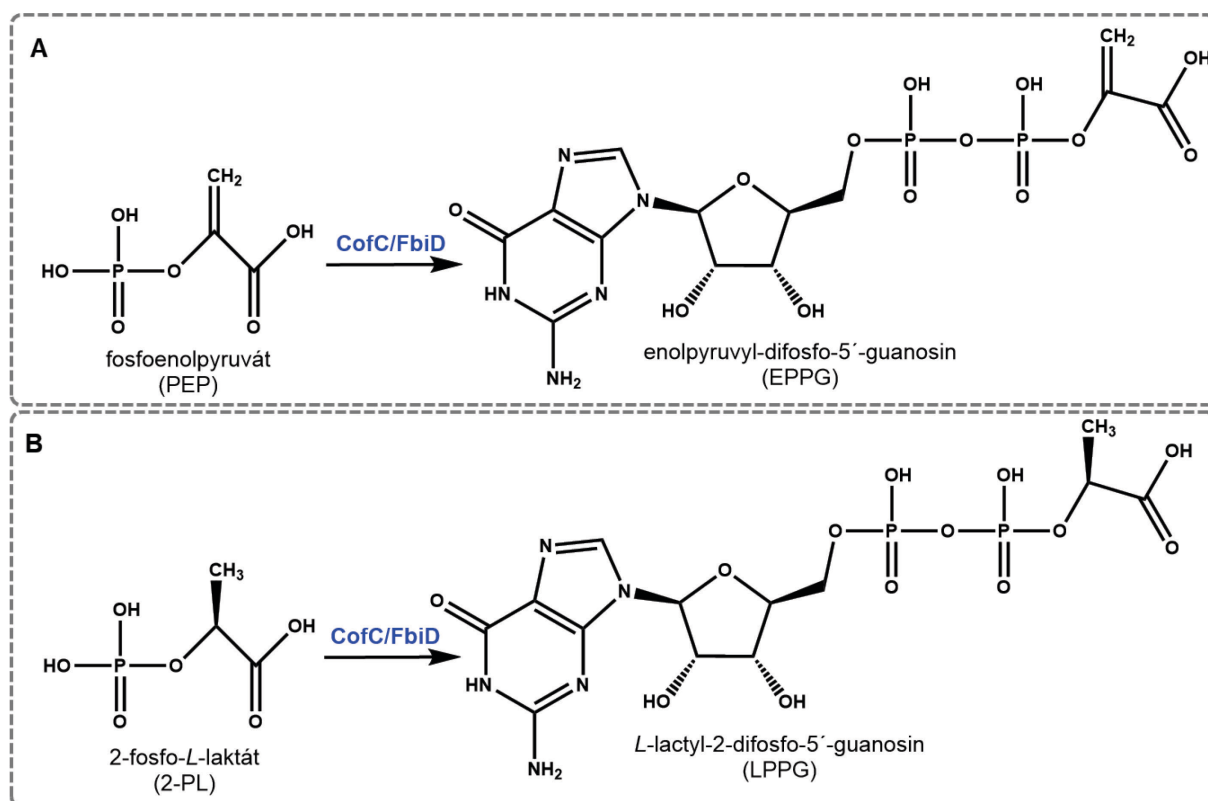
Tab. 6.1. Příklady publikovaných F₄₂₀-produkčních systémů.

Zdroj	Výtěžek F ₄₂₀ [μM · g ⁻¹ buněčné biomasy]	Růstové podmínky
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ²⁵²	1,70 ^a	Růst ve fermentoru za anaerobních podmínek, komplexní médium
<i>Streptomyces coelicolor</i> ²⁵²	0,04 ^a	Růst ve fermentoru, komplexní médium
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ²⁵²	0,11 ^a	Růst ve fermentoru, komplexní médium
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ²⁵²	0,30 ^a	Růst ve fermentoru, komplexní médium
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ²⁵¹ – nadprodukce F ₄₂₀ biosyntetických genů	3,00 ^b	Růst ve 37°C ve třepačce, komplexní médium
<i>Escherichia coli</i> ⁶⁴ – nadprodukce F ₄₂₀ biosyntetických genů	0,30 ^c	Růst ve 30°C ve třepačce, minimální médium

^a koncentrace odhadnutá z absorpance při 400 nm, užitý extinkční koeficient: 25,7 mM⁻¹ · cm⁻¹

^b koncentrace v publikaci přímo neuvedena, pouze zmíněno, že produkce je 10× vyšší než u divokého kmene *M. smegmatis*

^c koncentrace odhadnutá z absorpance při 420 nm, užitý extinkční koeficient: 41,4 mM⁻¹ · cm⁻¹



Obr. 6.2. Detail reakce katalyzované proteinem FbiD v biosyntéze kofaktoru F_{420} (stejnou reakci v Archaea katalyzuje homolog CofC). (A) Dle revidované verze je substrátem reakce v buňce běžně dostupný fosfoenolpyruvát a jeho specializovaná syntéza tedy není třeba. (B) Původní verze jako substrát předpokládala 2-fosfo-L-laktát. Nové poznatky otevírají dveře k produkci F_{420} v *E. coli* (převzato a upraveno⁶⁴).

6.1 Zhodnocení nadprodukce, purifikace a charakterizace Apd6 proteinů

6.1.1 Obtížnost nadprodukce Apd6 zřejmě odráží nepřítomnost F_{420} v *E. coli*

Druhý důvod, proč funkce Apd6 proteinů nebyla úspěšně vyřešena již dříve, má zcela jistě souvislost s produkcí a purifikací rozpustných rekombinantních proteinů. Obecně bylo pozorováno, že při nadprodukci Apd6 dochází k jejich značné precipitaci ve formě nerozpustných tělísek, což svědčí o problémech se skládáním do nativní konformace. Skládání proteinu může ovlivňovat řada faktorů.

Pokud se zaměříme na proteiny na aminokyselinové úrovni, problémy se skládáním může způsobovat His-kotva, se kterou byly Apd6 produkovány. Vzhledem k velikosti His-kotvy (~2,5 kDa) se předpokládá, že by neměla významně interferovat s funkcí či strukturním uspořádáním většiny proteinů.²⁶⁸ Nicméně, v literatuře lze dohledat poznatky, že tomu nemusí vždy tak být. Například ve studii Mohanty a Wiener (2003) byl demonstrován vliv nejen pozice, ale i délky His-kotvy na expresi a purifikaci membránového proteinu AqpZ z *E. coli*, tvořícího vodní kanál.²⁶⁹ Zajímavé je, že právě délka kotvy měla na proteiny v této studii významnější vliv, než její pozice. His-kotva také může interferovat s funkcí proteinu, jak bylo například

ukázáno u chlorkatechol-1,2-dioxygenas z *Pseudomonas putida*.²⁷⁰ Funkce proteinu, ze kterého byla *N*-His-kotva proteolyticky odštěpena, vykazoval 5× vyšší aktivitu, než stejný protein, ze kterého kotva odštěpena nebyla. V této práci bylo například pozorováno, že LmbY s *N*-His-kotvou (obsahující 6× histidin), který se v předchozích studiích pokoušela připravit Mgr. Petra Jirásková, byl zcela nerozpustný (nepublikovaná data). Konstrukt vytvořený v rámci této práce byl navržen tak, aby byla His-kotva připojena na C-konci produkovaného proteinu (8× histidin). Ve výsledku se touto malou změnou podařilo získat frakci rozpustného LmbY. Evidentně spíše než délka kotvy hraje v rozpustnosti LmbY větší roli její pozice. Nelze však unifikovat tvrzení, že C-kotva u Apd6 proteinů poskytuje rozpustné proteiny a zároveň s *N*-kotvou se produkují pouze nerozpustné proteiny, neboť se podařilo některé Apd6 homology produkovat rozpustné právě s *N*-kotvou (SibT, Lim12).

Na produkci proteinů má pravděpodobně mnohem větší vliv součet faktorů prostředí, tedy vnitřního prostředí hostitele a vnější kultivační podmínky, než samotná His-kotva. $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislé enzymy, které dosud byly studovány na úrovni rekombinantních proteinů, byly většinou produkovány v hostiteli, který syntézu F_{420} kóduje, přičemž autoři prací se o případných problémech s nadprodukcí nezmiňují.^{77,271} V této práci byly ovšem k heterologním produkcím použity dva kmeny *E. coli*, které ve svém genomu geny pro syntézu F_{420} nenesou. Právě nepřítomnost F_{420} během exprese a především skládání proteinů do nativní konformace může vysvětlovat nepříznivý produkční poměr frakcí Apd6 proteinů (rozpustných vs. nerozpustných). Proteinová biogeneze je totiž úzce spjata s mašinerií kontrolou kvality proteinů, která zahrnuje molekulární chaperony a cytosolické a vakuolární degradační systémy.²⁷² Ty rozpoznávají a označují pro degradaci nejen mutantní proteiny, ale i špatně složené proteiny bez vázaného kofaktoru.²⁷³

Testována byla produkce LmbY v kmeni *E. coli* BL21 (DE3) a dále ve stejném kmeni *E. coli* nesoucí navíc plazmid kódující chaperoninový systém GroEL-GroES (pGroESL). Chaperonin GroEL interaguje nejméně s 250 odlišnými cytosolickými proteiny, kdy většina z nich ve své terciární struktuře obsahuje motiv typu TIM-barel.²⁷⁴ TIM-barelový motiv je pro LLHT rodinu proteinů, tedy pravděpodobně i pro Apd6 homology, charakteristický.^{75,77,90} Bylo zjištěno, že ko-exprese *groEL-groES* s *lmbY* je pro produkci rozpustného LmbY esenciální. V kmeni *E. coli* bez tohoto plazmidu nebyl při zachování stejného protokolu exprese v rozpustné frakci detekován žádný LmbY. Pozitivní vliv chaperoninů na produkci rozpustných proteinů je všeobecně známý. Konkrétním příkladem, kdy chaperoniny významně zlepšovaly rozpustnost, je například nadprodukce regulačního proteinu *E. coli* důležitého pro homeostázu železa.²⁷⁵ Důležitost úlohy chaperoninů pro nativní konformaci Apd6 proteinů ukazují i výsledky SDS analýz purifikovaných proteinů. I přes optimalizaci podmínek afinitní chromatografické purifikace (různé koncentrace imidazolu v promývacím pufru) nebylo možné

v jedнокrokové purifikaci získat homogenní vzorek obsahující pouze purifikovaný Apd6 protein bez příměsi chaperoninů.

Dále byl testován vliv post-indukční kultivační teploty na expresi *lmbY*. Testována byla standardní růstová teplota *E. coli* – 37°C, teplota optimální pro růst zástupců rodu *Streptomyces* – 28°C a dále teplota 17°C, standardně používaná teplota pro expresi rekombinantních proteinů. Nejlepší produkce bylo dosaženo v 17°C, což opět koresponduje s tvrzením, že proteiny jsou obtížně skládány. Nižší růstová teplota zajišťuje pomalejší expresi a tedy růst kultury, což ve výsledku dává proteinům delší čas pro uspořádání se do správné konformace.

6.1.2 Vyloučení vazby kofaktoru v purifikovaných proteinech, či jiných proteinových modifikací, před *in vitro* testy

Podrobná MS analýza vyloučila interakce s kofaktory, ionty kovů či jakékoliv modifikace v sekvenci proteinů, které by mohly plnit funkci kofaktoru.²⁵⁷ V sekvenci FGD byl determinován chybějící *N*-koncový methionin a dále částečná acetylace a glukonoylace *N*-konce. V obou případech se jedná o běžné post-translační modifikace. Glukonoylace může nastat, pokud se v buňce, kde je rekombinantní protein exprimován, hromadí intermediát pentosa-fosfátové dráhy – 6-fosfoglukonolaktonát (tedy produkt vznikající přímo aktivitou FGD).²⁷⁶ Při nadprodukci FGD, který teoreticky může v oxidačně-redukční reakci do určité míry využívat i strukturně podobné flavinové kofaktory, může v *E. coli* tedy docházet k hromadění 6-fosfoglukonolaktonátu. Nicméně, i když tato modifikace může nepříznivě ovlivnit kvalitu produkovaných proteinů,^{277,278} v souladu s výsledky *in vitro* testů je zřejmé, že uvedené modifikace neměly celkově na funkci FGD žádný pozorovatelný vliv.

Naopak, co bylo pozorováno, na enzymovou aktivitu FGD má vliv pH reakce. To ovšem bylo demonstrováno již v rámci dřívějších studií.⁵⁸ Co bylo nově pozorováno v této práci je, že FGD v pH 7,5 a vyšším, což je mimo optimum pH 7,0,^{58,279} může jednonásobně redukovat substrát Apd6 proteinů, látku **5a**. Toto zjištění bylo velmi překvapující a ve skutečnosti bylo hlavním důvodem, proč bylo nutné provést tak rozsáhlou charakterizaci Apd6 proteinů a vyloučit všechny možnosti, jak by k redukci **5a** bez Apd6 mohlo docházet. Po zjištění, že FGD redukuje jednonásobně **5a**, byla v reakcích jako reduktasa F₄₂₀ také testována F₄₂₀-závislá NADP reduktasa (Fno) z *Methanothermobacter marburgensis* (Fno pocházela z komerčních zdrojů). Z těchto reakcí se ale nepodařilo získat jednoznačné výsledky určující aktivitu Apd6 proteinů, neboť enzym Fno zřejmě nebyl v reakci dostatečně aktivní.

Je možné, že FGD je schopný vázat a ve výsledku i redukovat **5a**, který je ve srovnání s glukosou-6-fosfát menším substrátem. Analogickým příkladem mohou být například reduktasy z FDOR rodiny proteinů, jejichž aktivní místo je relativně prostorné a dovolují přijmout chemicky různorodé substráty.²⁸⁰ Najít reakční podmínky takové, aby FGD plnil pouze

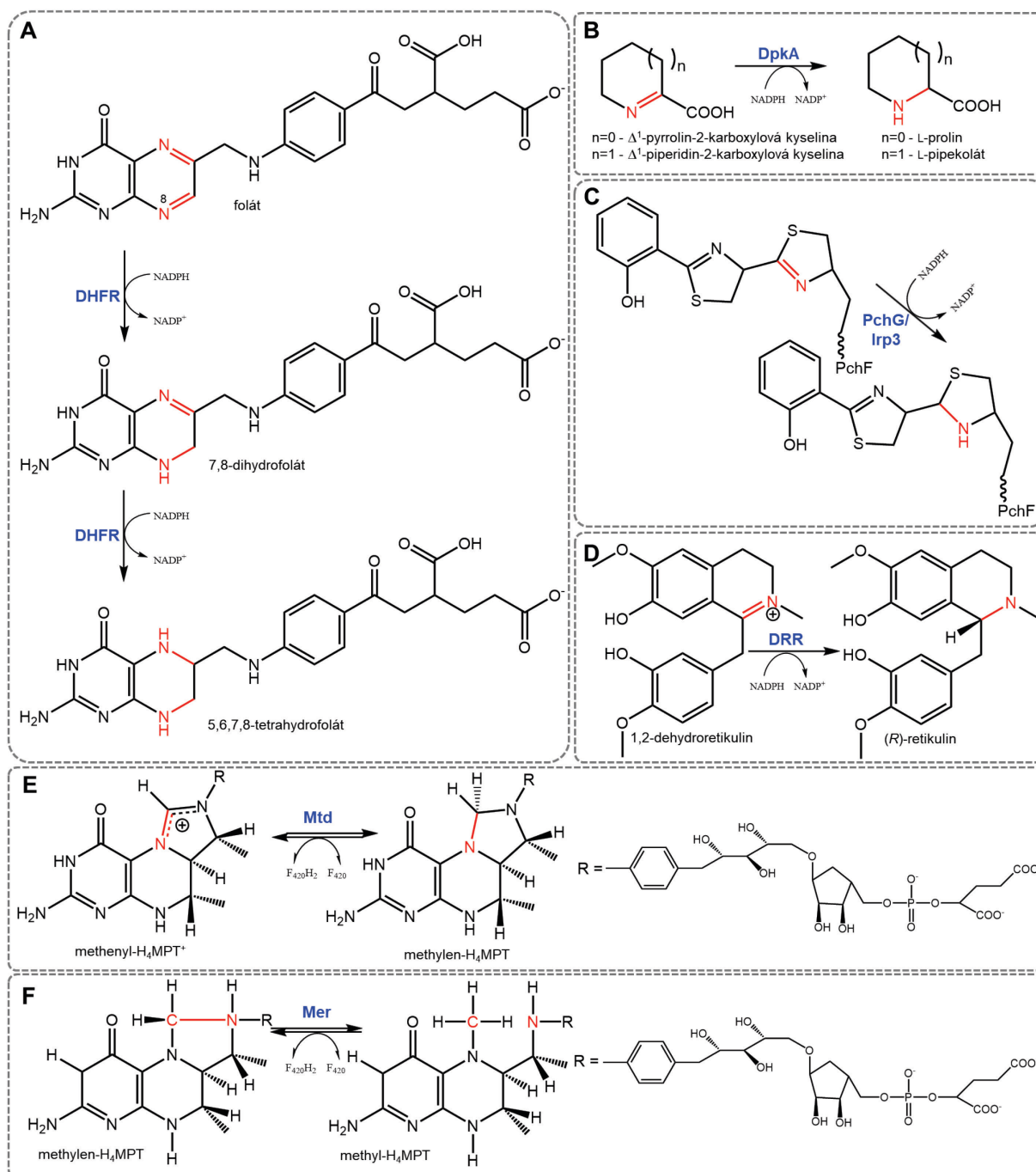
funkci reduktasy F₄₂₀, ale zároveň, Apd6 proteiny zůstaly aktivní, bylo pro stanovení aktivity Apd6 esenciální. Tyto podmínky se podařilo nalézt, bylo zjištěno, že v pH 6,5 – 7,0 jsou Apd6 enzymaticky aktivní, přičemž protein FGD už není v tomto pH látku **5a** schopný redukovat.

6.2 Katalytický mechanismus hydridových reduktas v přírodě vs. Apd6 proteiny

Apd6 proteiny katalyzují redukci dvojně C=N vazby iminu **5**, která je v konjugaci s exocyklickou dvojnou vazbou (Apd6 katalyzující jednonásobnou redukci) či C=C vazbu bočního alkylové řetězce látky **5**, která je v konjugaci s endocyklickou vazbou (vzniká látka **12**) následovanou redukcí C=N iminové vazby látky **12**, která již není v konjugaci (Apd6 proteiny katalyzující dvojnásobnou redukci). Redukce endocyklických C=N i exocyklických C=C dvojných vazeb jsou obecně známy a popsány v biosyntézách mnoha látek. Následující kapitoly se zaměřují na popis reakcí katalyzovaných hydridovými reduktasami z přírody, jejichž substráty nesou podobné strukturní znaky, jako nese látka **5** a **12**. Respektive, reduktasy se substráty obsahující endocyklické iminové dvojně vazby, konjugované dvojně vazby či dvojně vazby v bočním alkylovém řetězci. Na závěr jsou známé mechanismy některých těchto reduktas porovnány s mechanismem Apd6 reduktas navrženým v rámci této práce.

6.2.1 Asymetrická redukce iminů

Iminová vazba je v přírodních látkách hojně zastoupená, přestože redukce C=N vazby představuje náročnější reakci vzhledem k nestabilitě iminové vazby, která ve vodném prostředí lehce hydrolyzuje. Iminové reduktasy zprostředkovávající asymetrickou redukci cyklických prochirálních iminů (IRED) jsou zapojené do biosyntetických drah základního i specializovaného metabolismu – od biosyntézy derivátů folátu, siderofory až po antibiotika (Obr. 6.3). Iminové meziproducty těchto drah jsou strukturně velmi různorodé a tedy i IRED, které katalyzují jejich redukci, jsou často sekvenčně i funkčně rozdílné.



Obr. 6.3. Reakce katalyzované IRED zapojeními do různých biosyntetických drah – redukované iminové vazby jsou ve strukturách zvýrazněny červeně. (A) DHFR z biosyntézy folátu, (B) DpkA z biosyntézy pipekolátu, (C) PchG a Irp3 z biosyntézy sideroforů (PchF - modul NRPS, ke kterému je substrát kovalentně vázán), (D) DRR z biosyntézy retikulínu, (E) Mer a (F) Mtd – oba shodně z methanogeneze (převzato a upraveno^{75,281–286}).

6.2.1.1 NADPH-závislé iminové reduktasy

Dihydrofolát reduktasa (DHFR). DHFR představuje jednu z nejvíce studovaných biosyntetických IRED. DHFR v *E. coli* a její funkční homology v eukaryotickém systému katalyzují v biosyntéze folátu NADPH-závislou enantioselektivní konverzi 7,8-dihydrofolátu na amin 5,6,7,8-tetrahydrofolát (THF; Obr. 6.3A).²⁸¹ Produkt této reakce je vyžadován

pro *de novo* syntézu purinů, thymidylové kyseliny a jiných aminokyselin. Kromě konverze 7,8-dihydrofolátu na THF je také DHFR schopna redukovat folát až na THF. Nicméně, tato reakce primárně probíhá u obratlovců, kde je specifita DHFR pro folát mnohem vyšší. Konverze folátu na THF u *E. coli* (zejména druhý redukční krok) probíhá s výrazně nižší efektivitou.²⁸⁷ Mechanismus, jakým je folát redukován až na THF, nebyl dosud blíže objasněn.

Piperidin/pyrrolin-karboxylát reductasa. V *Pseudomonas* je D-lysin katabolizován sérií transformačních kroků zahrnujících šesti-uhlíkový cyklický intermediát v rámci pipekolátové dráhy. V této dráze NADPH-závislá oxidoreduktasa DpkA redukuje cyklické iminy Δ^1 -piperidin-2-karboxylovou kyselinu, resp. Δ^1 -pyrrolin-2-karboxylovou kyselinu na odpovídající aminokyseliny L-pipekolát a L-prolin (Obr. 6.3B).²⁸²

Thiazolinylové reductasy. PchG z *Pseudomonas aeruginosa* a jeho homolog Irp3 z *Yersinia enterocolitica* katalyzují v přítomnosti NADPH redukcí thiazolinového kruhu intermediátů v biosyntéze sideroforů pyochelinu a yersiniabaktinu (Obr. 6.3C).^{283,284}

Dihydroretikulin reductasa (DRR). V biosyntéze morfinu byla NADPH-závislá redukce iminu pozorována při konverzi (*S*)-retikulinu na (*R*)-retikulin, přičemž meziproductem reakce je 1,2-dehydroretikulin, který je redukován dehydroretikulin reductasou (Obr. 6.3D).²⁸⁵

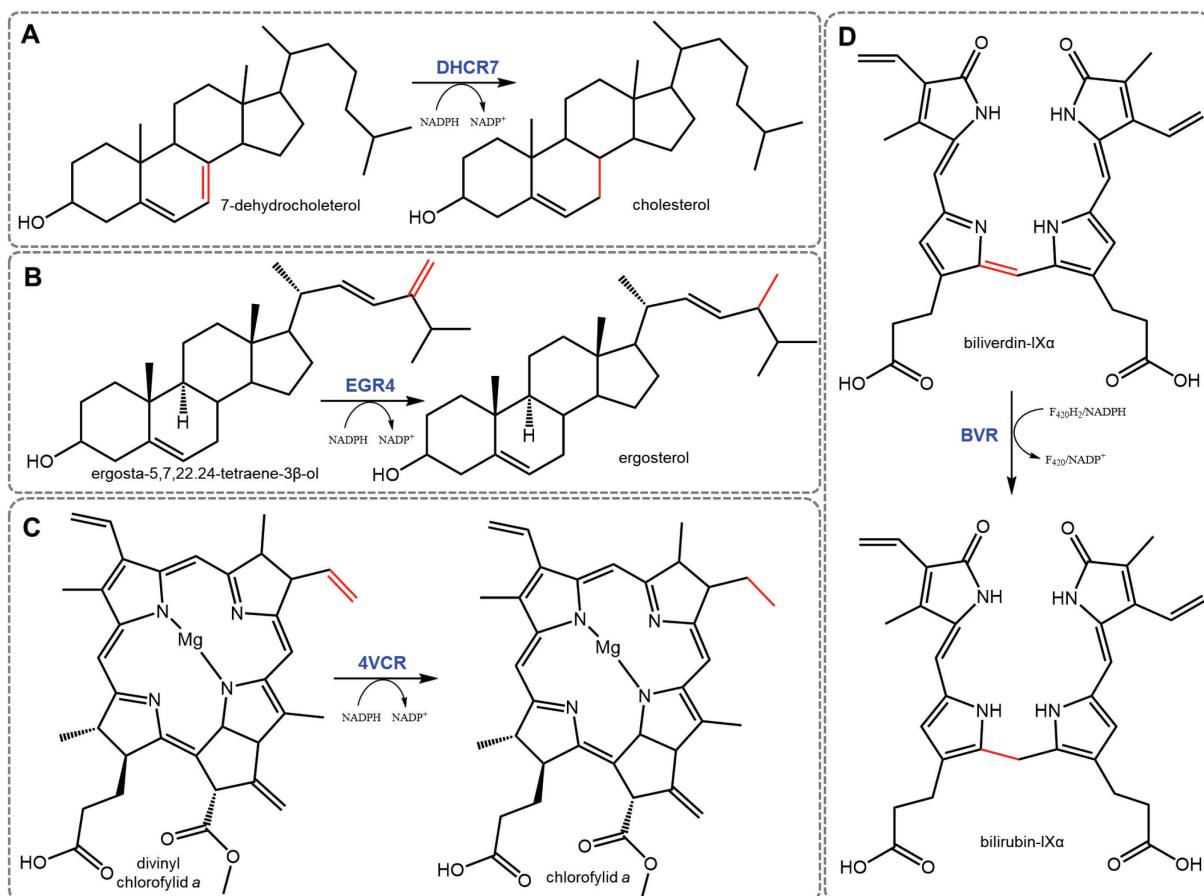
6.2.1.2 $F_{420}H_2$ -závislé iminové reductasy

Tetrahydromethanopterin (H_4 MPT) dehydrogenasa (Mtd) a reductasa (Mer). H_4 MPT slouží v methanogenních drahách jako nosič jednouhlíkových jednotek, přičemž tyto jednotky mohou být k H_4 MPT konjugovány v různých oxidačních stavech, včetně formylu, methylu, atd.²⁸⁸ Mtd v základním metabolismu Archaea katalyzuje v přítomnosti $F_{420}H_2$ reverzibilní hydridový transfer mezi methenyl- H_4 MPT a methylen- H_4 MPT (Obr. 6.3E).²⁸⁶ Methylen- H_4 MPT je v dráze dále reverzibilně v přítomnosti $F_{420}H_2$ redukován pomocí Mer na methyl- H_4 MPT (Obr. 6.3F).⁷⁵

$F_{420}H_2$ -závislá oxidoreduktasa TpnL, katalyzující redukcí v biosyntéze thiostreptonu Aa, byla již pospána v rámci kap 2.1.4.1.

6.2.2 Reduktasy izolovaných/konjugovaných C=C vazeb

V přírodě lze nalézt široké spektrum hydridových reductas katalyzujících redukcí izolovaných či konjugovaných C=C vazeb. Biokatalytické C=C redukce mají ohromný význam v biosyntéze esenciální složek eukaryotických buněk jako například sterolu, ergosterolu, či v redukcí 2-substituovaných alkoholů pomocí enzymů pocházejících z různých druhů *Candida* (shrnutí v Huang et al. 2014).²²⁹



Obr. 6.4. **Reakce katalyzované C=C reduktasami zapojenými do různých biosyntetických drah** – redukované C=C vazby jsou ve strukturách zvýrazněny červeně. **(A)** DHCR7 z biosyntézy cholesterolu, **(B)** EGR4 z biosyntézy ergosterolu, **(C)** 4VCR z biosyntézy chlorofylu a **(D)** BVR z biosyntézy bilirubinu (převzato a upraveno^{271,289}).

6.2.2.1 NADPH-závislé reduktasy

Sterolové reduktasy. Cholesterol je esenciální lipid všech savčích buněk a je hlavní lipidovou komponentou buněčných membrán. Ergosterol, prekursor vitamínu D₂, je ekonomicky důležitý k produkci léčiv na bázi sterolu (př. progesteron). V biosyntéze obou látek se uplatňují C=C reduktasy. 7-Dehydrocholesterol reduktasa (DHCR7) redukuje za přítomnosti NADPH dvojnou vazbu 7-dehydrocholesterolu na výsledný cholesterol (Obr. 6.4A).²⁹⁰ Sterol C-24(28)reduktasa (EGR4) vystupuje v biosyntéze ergosterolu, kde v přítomnosti NADPH redukuje ergosta-5,7,22,24-tetraene-3 β -ol na ergosterol (Obr. 6.4B).²⁹¹

Reduktasy v biosyntéze chlorofylu. Divinyl chlorofylid a 8-vinyl reduktasa (4VCR) konvertuje v přítomnosti NADPH divinyl chlorofylid a na chlorofylid a (Obr. 6.4C).²⁹²

6.2.2.2 F₄₂₀H₂-závislé reduktasy

Biliverdin reduktasa (BVR). Biliverdin je přirozeně se vyskytující lineární tetrapyrrol, produkováný oxidativní degradací hemu. U savců je biliverdin redukován na bilirubin BVR

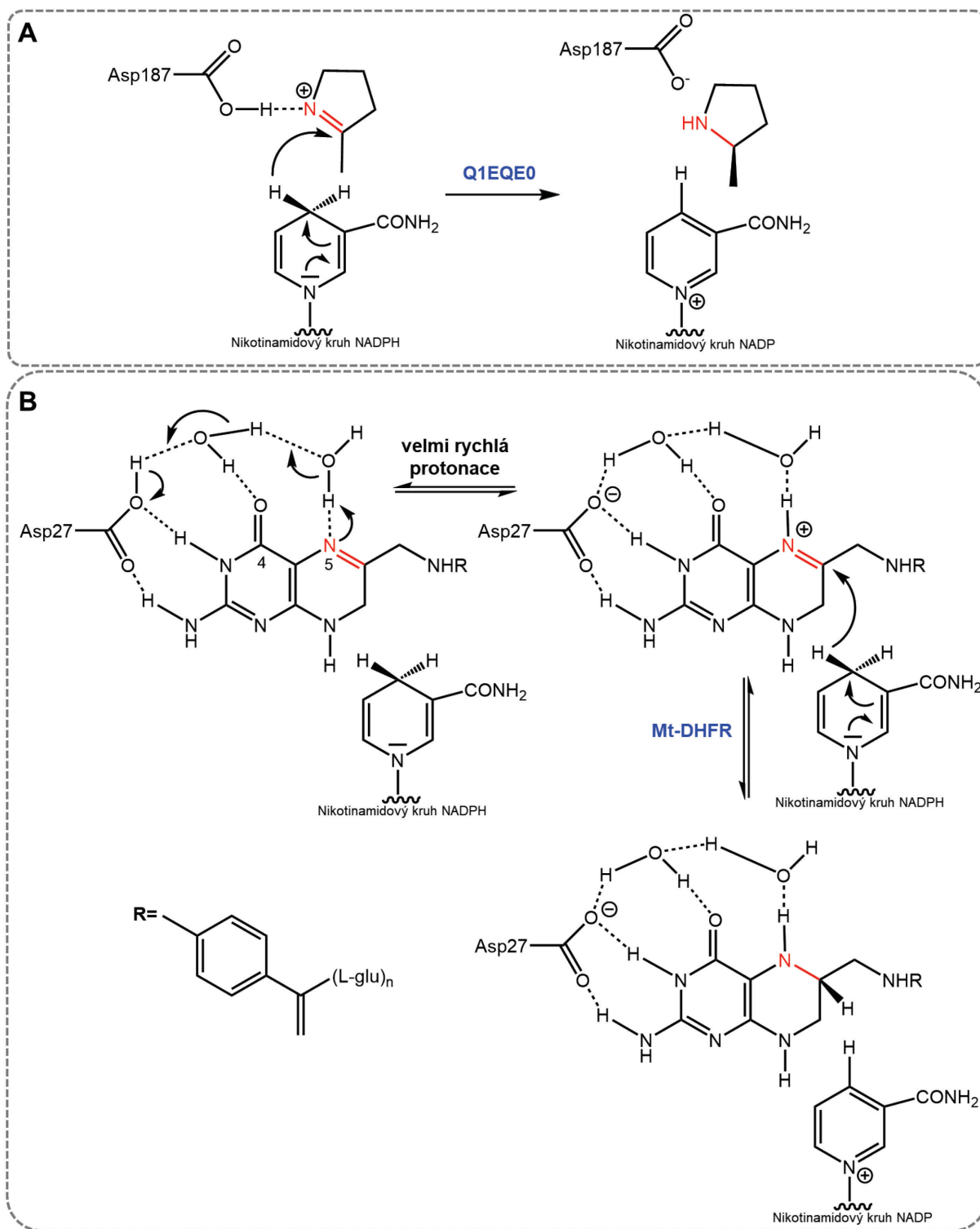
využívající NADH či NADPH.²⁹³ U *Mycobacteria* byla identifikována reduktasa katalyzující analogickou reakci, jako donor elektronů je však využíván $F_{420}H_2$ (Obr. 6.4D).²⁷¹

6.2.3 Strukturní základ a katalytický mechanismus vybraných NADPH- a $F_{420}H_2$ -závislých reduktas

6.2.3.1 Strukturní základ a katalytický mechanismus NADPH-závislých IRED

První strukturně charakterizovanou IRED je protein Q1EQE0 ze *Streptomyces kanamyceticus* (PDB ID 3Z4B), který katalyzuje redukci syntetického iminového substrátu 2-methylpyrrolinu (Obr. 6.5A).²⁹⁴ Jedná se o dimerní protein s konzervovaným IRED motivem charakteristickým pro NADPH-závislé IRED. N-terminální oblasti každého monomeru obsahují Rossmannovu doménu pro vazbu NADP(H) a jsou zároveň ve spojení s C-terminální helikální smyčkou. Aktivní místo je formováno mezi podjednotkami, přičemž NADP(H) je vázáno na rozhraní dimeru. Sekundární i kvartérní struktury jsou velmi flexibilní a po vazbě ligandů dochází k dynamickým změnám ve struktuře. Mechanismus IRED Q1EQE0 zahrnuje protonaci iminového substrátu zbytky v aktivním místě (D). Protonovaný substrát (iminiový ion) je následně atakován hydridem z NADPH (Obr. 6.5A).

Je zajímavé, že pro jiné NADPH-závislé IRED jsou předpokládány odlišné mechanismy redukce, například lišící se pořadím protonace a přenosu hydridu. Konkrétně, předpokládaný mechanismus thiazolinylových iminových reduktas (Irp3, PchG) zahrnuje nejprve hydridový transfer, který je až poté následován protonací substrátu (protonačními zbytky u Isp3 jsou H a Y).²⁸³ V mechanismu DHFR nejsou aminokyselinové zbytky pro protonaci využity, neboť v reakci katalyzované DHFR je 7,8-dihydrofolát protonován molekulou vody, která je vodíkovými můstky vázána ke konzervovanému D (D27 v *M. tuberculosis*) a k O-4 substrátu (Obr. 6.5B). K protonaci substrátu v pozici N-5 dochází ve vazebné kapse enzymu, kde je substrát vhodnou orientací vystaven rozpouštědлу. Teprve poté dochází k hydridovému ataku a redukci.^{281,295}



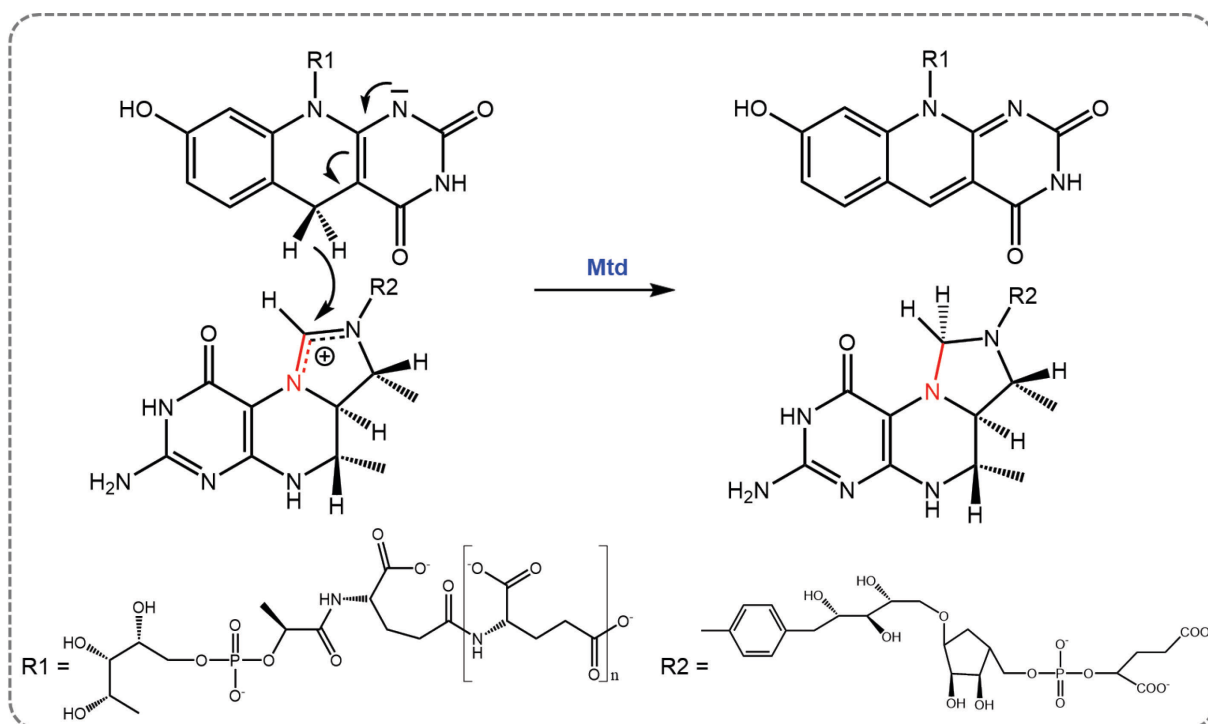
Obr. 6.5. **Dva různé mechanismy reakcí katalyzované IRED.** (A) Mechanismus redukce katalyzované proteinem Q1EQE0. Katalycky aktivní D zbytek (Asp187) v aktivním místě nejprve protonuje iminový substrát, který je následně atakován hydridem z NADPH. (B) Mechanismus redukce katalyzované DHFR z *M. tuberculosis* (Mt-DHFR). Nejprve proběhne rychlá protonace iminového substrátu molekulou H_2O , pak nastává hydridový transfer z NADPH (převzato a upraveno^{281,294}).

6.2.3.2 Strukturní základ a mechanismus přenosu hydridu pomocí $F_{420}\text{H}_2$ -závislé Mtd

Mtd z *Methanopyrus kandleri* je hexamerní protein (obsahující dvě trimerní podjednotky), jehož mechanismus redukce je velmi podobný DHFR. Produkty obou enzymů

(THF a H₄MPT) jsou si strukturně sice velmi podobné, enzymy přesto nesdílejí žádnou sekvenční podobnost. To ukazuje na nezávislý vývoj funkce, zřejmě jde o konvergentní evoluční proces.⁸²

Přenos hydridu (Obr. 6.6) se v reakci katalyzované Mtd uskutečňuje ve specificky tvarovaném aktivním místě, do kterého se nejdříve váže substrát (methylen-H₄MPT), až poté vstupuje F₄₂₀H₂. Je zajímavé, že vazba substrátu a kofaktoru neindukuje žádné konformační změny proteinu (na rozdíl od IRED). Hlavní úlohou polypeptidového řetězce je formace aktivního místa tak, aby byla zajištěna optimální geometrická pozice pro přenos hydridu. Na této formaci se podílí mnoho zbytků. Důležitý je především konzervovaný D122, který váže substrát skrze molekulu rozpouštědla (jde o analogické interakce, jako se uplatňují u DHFR). Mechanismem přenosu hydridu je vytvoření ternárního komplexu (hydridový donor a akceptor jsou v kontaktu prostřednictvím van der Waalsových interakcí). Methylen-H₄MPT a deazaisoalloxazinový kruh jsou orientovány tak, že *R*-strana H₄MPT je natočena k *S*-straně F₄₂₀H₂, přenos hydridu je stereospecifický – hydrid (z F₄₂₀H₂) v pozici *proS* je reverzibilně přenesen do *proR* pozice methenyl-H₄MPT⁺. Polypeptidový řetězec může aktivně zvyšovat katalytickou efektivitu stlačováním atomů, mezi kterými hydridový přenos probíhá.

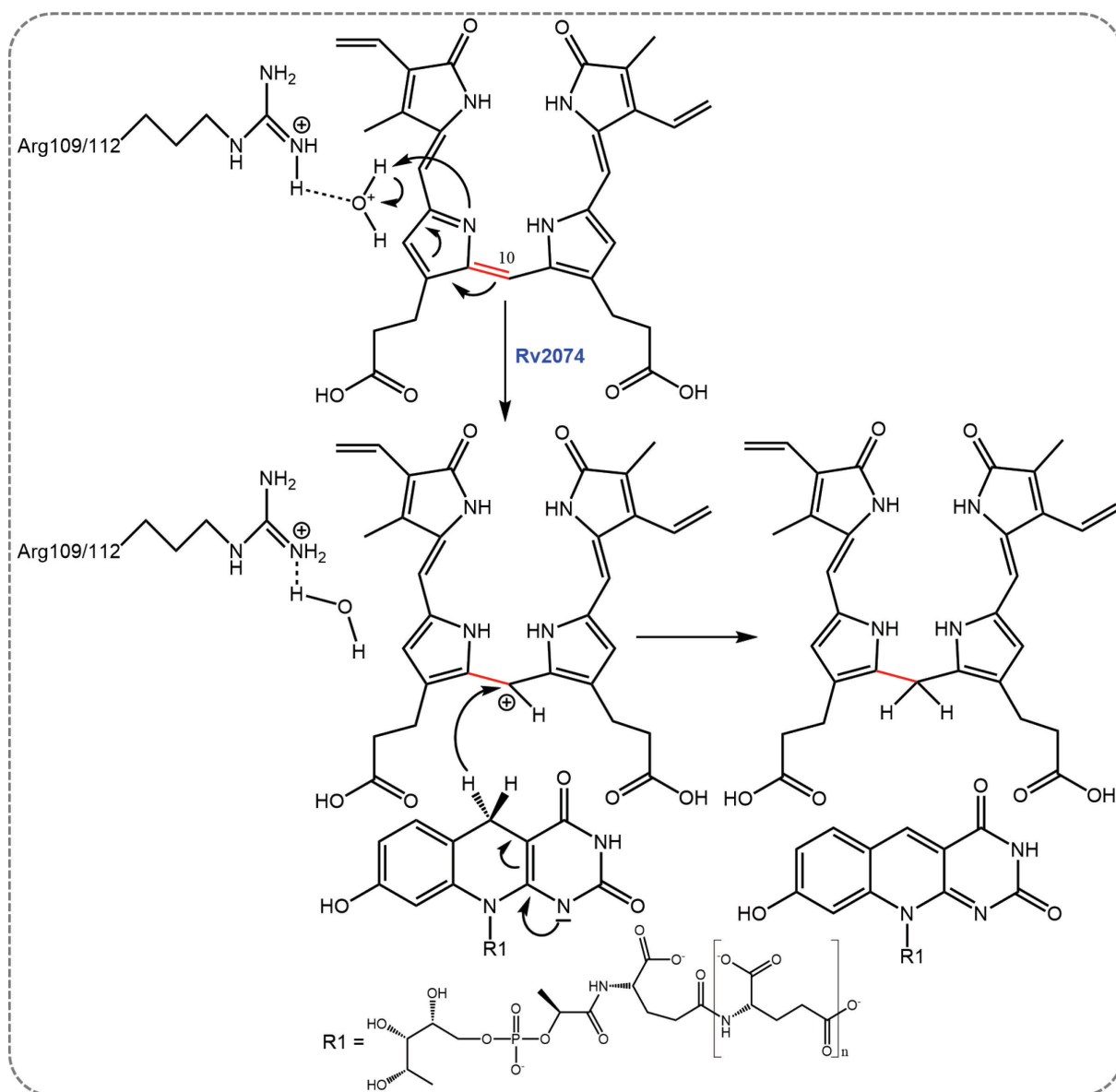


Obr. 6.6. **Mechanismus přenosu hydridu v redukci katalyzované Mtd.** Iminový substrát je nejprve protonován molekulou vody interagující s D zbytkem (mechanismus je analogický protonaci při redukci katalyzované DHFR a není proto ve schématu zobrazen), následuje hydridový atak z F₄₂₀H₂ (převzato a upraveno²⁹⁶).

6.2.3.3 Strukturní základ a mechanismus přenosu hydridu pomocí $F_{420}H_2$ -závislé BVR

Biliverdin reduktasa Rv2074 z *M. tuberculosis* je tetramerní protein uspořádaný jako dvě homodimerní podjednotky, přičemž aktivní místo se podobně jako u IRED nachází na jejich rozhraní.²⁷¹

Po vazbě F_{420} nedochází k větším konformačním změnám, kromě zbytků, které s kofaktorem přímo interagují. Ribityl-fosfolaktylová část F_{420} je zanořena hlouběji do proteinu, zatímco glutamátový řetězec je relativně mobilní. Substrát je naskládán nad deazaisoalloxazinem kofaktoru, přičemž kruhy přiléhající k C-10 redukované dvojně vazbě jsou v porovnání s krajními dvěma kruhy pevně ukotvené. Substrát v aktivním místě interaguje zejména s R zbytky. I zde katalytický mechanismus zahrnuje dva kroky. Iniciační protonaci pyrrolového dusíku přiléhajícího k C-10, donorem je hydroxoniový ion, který interaguje s konzervovanými R zbytky. Následuje přenos hydridu z kofaktoru (Obr. 6.7).



Obr. 6.7. Mechanismus redukce katalyzované biliverdin reduktasou Rv2074. Iminový substrát je nejprve protonován, přičemž donorem je molekula H_2O , následuje hydridový atak z $F_{420}H_2$ (převzato a upraveno²⁷¹).

6.2.4 Mechanismus Apd6 reductas v porovnání se známými redukčními mechanismy

Z popsaných mechanismů reductas z přírody, katalyzujících redukci dvojných vazeb prostřednictvím přenosu hydridu, lze nepřímo částečně validovat navržený mechanismus redukce katalyzované Apd6 proteiny.

Redukce endocyklické iminové dvojně vazby. Bez ohledu na pořadí protonace a hydridového ataku, redukce iminové vazby substrátů u popsaných IRED (Q1EQE0, DHFR, Mtd) probíhá analogicky. Vždy dochází k protonaci dusíku C=N iminové vazby, přičemž hydridem je atakován příslušný C atom. Stejný mechanismus byl navržen pro Apd6 proteiny katalyzující jednonásobnou redukci (látko 5 → látko 7) i pro Apd6 proteiny katalyzující dvojnásobnou redukci (u těchto Apd6 se jedná o druhý krok redukce, látko 12 → látko 6). To, že je iminová dvojná vazba v případě látko 5 v konjugaci, zřejmě mechanismus redukce neovlivní. Podobně, iminovou vazbu v konjugaci má například také substrát DHFR (7,8-didehydrofolát), přesto je mechanismus stejný jako u Q1EQE0, jehož substrát má izolovanou iminovou dvojnou vazbu (Obr. 6.5).

Pro navržený mechanismus redukce exocyklické C=C vazby látko 5, která je navíc v konjugaci s endocyklickou C=N vazbou, není v literatuře jednoduché najít podpůrné důkazy. Podobná vazba je sice přítomna v substrátu biliverdin reductasy Rv2074 (Obr. 6.7). Ovšem, i když je exocyklická C=C vazba vzhledem k endocyklické C=N vazbě v konjugaci, na rozdíl od látko 5 je C=N v substrátu Rv2074 v obrácené pozici, tedy dusíkový atom iminové vazby je situován blíže k C=C vazbě. Co je shodné, u Apd6 i Rv2074 se předpokládá, že redukce C=C vazby nastává v důsledku hydridového ataku uhlíkového atomu, který je vzdálenější od cyklu.

6.2.4.1 Hypotetické možnosti uspořádání substrátu a kofaktoru v aktivním místě Apd6 proteinů

MS analýzou LmbY a Por15 za nativních podmínek bylo určeno, že proteiny jsou ve své kvartérní struktuře homodimerní. Jiné dosud strukturně popsané LLHT proteiny mají též homodimerní uspořádání (FGD, Adf, Mer z *Methanothermobacter marburgensis* a *Methanopyrus kandleri*),^{57,75,77,90} ovšem za jiných krystalizačních podmínek byl Mer z *M. kandleri* určen také jako homotetramer složený ze dvou dimerů.⁹⁰ Homotetramerní uspořádání má i Mer z *Methanosarcina barkeri*.⁷⁵ Oligomer má funkci nejen stabilizující, ale strukturní analýzy ukazují další přímou funkci a to ve fixaci konformací sekundárních struktur, které jsou zapojené do vazby F₄₂₀.⁷⁷ Aktivní místo se u FGD, Adf i Mer nachází v každé monomerní jednotce. Pořadí, v jakém jsou kofaktor a substrát vázány do substrát-vazebných míst, není zcela objasněno, neboť při krystalizačních studiích autoři často naráželi na problém determinovat krystal jak s navázaným kofaktorem, tak substrátem.^{75,90} Esenciálním předpokladem hydridové transferu z F₄₂₀H₂ je vhodné geometrické umístění

substrátu vzhledem ke kofaktoru. Samotný přenos je spojen s vytvořením Michaelisova komplexu, který předchází formaci tranzičního stavu, který je pro hydridový přenos charakteristický. Vzdálenost donor-akceptor by měla odpovídat vzdálenosti $\sim 2,7 \text{ \AA}$.²⁹⁷ Experimentálně zjištěná vzdálenost C-C kofaktoru a substrátu u Adf byla $1,5 \text{ \AA}$, u Mer $0,5 \text{ \AA}$. Struktura FGD současně s navázaným F_{420} a nativním substrátem nebyla získána, homologním modelováním byla ale tato vzdálenost vypočtena jako $2,1 \text{ \AA}$.⁵⁷

Je možné, že v případě Apd6 proteinů bude substrát-vazebné místo zanořeno hlouběji do proteinu, přičemž $F_{420}H_2$ bude naskládán nad ním, obdobně, jako je tomu u BVR.²⁷¹ Opačnou orientaci je, z hlediska dvojnásobné redukce, obtížnější si představit. Respektive, aby byly dva redukční kroky v případě reakce katalyzované LmbY možné, jsou zapotřebí dvě molekuly „nabitého“ kofaktoru $F_{420}H_2$. Pokud by byl kofaktor v aktivním místě více přístupný okolnímu prostředí (ve srovnání se substrátem), po první redukčním kroku by se „vybitý“ F_{420} jednoduše z proteinu uvolnil, přičemž se uvolní vazebné místo pro nově příchozí nabitý $F_{420}H_2$. Zároveň by mohlo první redukci **5a**, při které dochází k saturaci bočního alkylového řetězce a tudíž formaci **12**, dojít k přeorganizování interakcí substrátu s polypeptidovým řetězcem. Výsledná pozice by odpovídala požadavkům na druhý hydridový transfer. Jinou variantou může být takové uspořádání, kdy substrát i F_{420} jsou stejně přístupné okolnímu prostředí s tím, že po prvním redukčním kroku analogicky nedochází k uvolnění substrátu, ale opět se pouze vymění vybitý – nabitý kofaktor. Možnost, že se substrát po první redukci z proteinu zcela uvolní a následně se naváže meziproduct **12** s jednou dvojnou vazbu je, z hlediska energetické bilance, málo pravděpodobná. Jedná se pouze o hypotézy, pro které prozatím neexistují žádné podpůrné důkazy.

6.3 Aktivní místo LLHT proteinů vs. predikované aktivní místo Apd6 reduktas (na aminokyselinové úrovni)

6.3.1 Výběr LLHT proteinu pro vytvoření schémat aktivních míst Apd6 proteinů

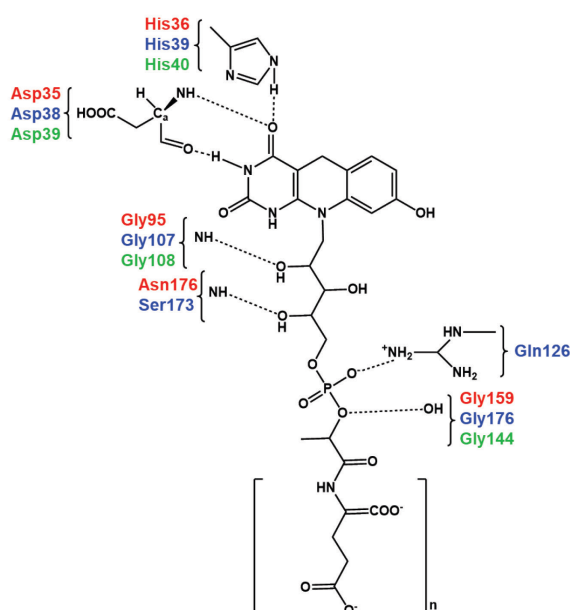
V rámci této práce bylo navrženo schéma aktivních míst Apd6 proteinů, které vycházelo ze známé krystalové struktury proteinu z LLHT rodiny, kam se Apd6 řadí, $F_{420}H_2$ -závislé alkohol dehydrogenasy Adf z *M. thermophilicus*. Podobnosti Adf, Mer a FGD proteinů (jediné dosud strukturně charakterizované LLHT) k Apd6 proteinům jsou srovnatelné. Adf byl pro srovnávací analýzu vybrán jako nejvhodnější ze dvou důvodů. Jednak vzhledem k jeho substrátu (acetonu), který je na rozdíl od polycyklického substrátu Mer, či substrátu FGD, který ve své struktuře obsahuje větvené boční řetězce, strukturně nevýrazný a velikostí se spíše přibližuje látce **5**. Dalším podstatným důvodem bylo, že krystalová struktura Adf byla

determinována v přítomnosti jak nativního substrátu, tak kofaktoru. Toto se například u struktury FGD nepodařilo.^{57,79}

6.3.2 Konzervované interakce v aktivních místech proteinů z LLHT rodiny

Ve strukturách známých LLHT se nachází několik sdílených charakteristických znaků, které jsou výsledkem přítomnosti konzervovaných aminokyselinových zbytků v jejich sekvencích. Jejich přehled byl již uveden v kap. 2.1.4.2.

Aby byla vzájemná pozice kofaktoru vzhledem k substrátu udržitelná, jsou oba prvky v aktivním místě stabilizovány mnoha interakcemi s polypeptidovým řetězcem. Významným interakčním místem na molekule F_{420} je fosfátová skupina, která vždy u 5-deazaflavin-závislých LLHT interaguje s glycinem (Obr. 6.8, Gly159/Gly176/Gly144).⁷⁷ U Adf je F_{420} dále držen v své charakteristické motýlí konformaci konzervovanými zbytky H39, E108, V193, I227. Kromě H39 a E108, většina formovaných vodíkových vazeb míří na atomy centrální kostry F_{420} , což značí, že F_{420} je fixován velmi pevně. H39 a E108 se dále účastní interakce se substrátem. I když ze strukturních studií Adf nelze jednoznačně určit jejich funkci, předpokládá se, že tyto dva zbytky hrají v katalytickém mechanismu důležitou roli. Podobné interakce byly determinovány i ve strukturách Mer a FGD.^{57,75,79,90} U FGD, který byl krystalizován s jeho inhibítorem, molekulou citrátu, se také předpokládá důležitost tří lysinových (K198, K252, K259) a jednoho argininového zbytku (R283). Konkrétně, nativní substrát FGD (glukosa-6-fosfát) je stlačován mezi K252 a dezaizalloxazin F_{420} . Zbylé aminokyseliny formují pozitivně nabitou kapsu, se kterou F_{420} skrze negativně nabitou fosfátovou skupinou interaguje, čímž je celý komplex efektivně stabilizován.⁵⁷



Obr. 6.8. Konzervované aminokyselinové zbytky LLHT proteinů interagující s F_{420} prostřednictvím vodíkových vazeb. Vodíkové vazby (přerušovaná čára); aminokyselinové zbytky: Mer (červeně), Adf (modře), Fgd (zeleně; převzato a upraveno^{57,75,77}).

6.3.3 Predikce Apd6 aktivního místa a jeho cílená mutageneze

Porovnáním sekvencí Apd6 proteinů se sekvencí Adf byla identifikována oblast (D38 – W43), která začíná konzervovanou dvojicí zbytků DH, které byly u Mer, Adf i FGD shodně predikovány jako katalyticky aktivní (Asp35/38/39, His36/39/40; Obr. 6.8).^{57,75,90} Aminokyseliny v této oblasti byly cíleně mutovány za účelem změny katalytické účinnosti či efektivity konverze. Nicméně, žádné detekovatelné změny nebyly zaznamenány a to ani u varianty LmbY H39A, kde byla očekávána úplná ztráta aktivity. Mutace odpovídajícího H zbytku ve FGD (FGD H40A) sice také nevedla ke ztrátě enzymatické funkce, katalytická aktivita mutantního FGD však byla 1000× nižší.⁵⁸ V této souvislosti je potřeba vzít v úvahu, s jakým množstvím substrátu bylo v *in vitro* reakcích mutantních Apd6 pracováno. Vzhledem k tomu, že látka **5a** byla pro *in vitro* testování získávána relativně náročným procesem, nebylo technicky možné připravit ji ve větším množství. Pro reakce tedy byla používána taková množství, za kterých bylo umožněno pouze sledovat enzymatickou konverzi, stanovení kinetických parametrů však již možné nebylo. Pokud by byly mutanty LmbY ovlivněny stejně jako u FGD, bohužel ani rozdíl v aktivitě v řádu 10^3 by prakticky nemusel být za daných podmínek zachycen. Na druhou stranu, v reakcích byl ve všech případech substrát vždy plně konvertován a to bez ohledu na reakční dobu (5 s – 30 min, nepublikovaná data). Nicméně, z mutačních studií FGD vyplývá, že konzervovaný H sice hraje jednu z důležitých rolí ve vazbě F_{420} , ale zdaleka ne jedinou.⁵⁸ Jinými slovy, je zcela evidentní, že k úplnému zastavení aktivity FGD, a tedy pravděpodobně i aktivity Apd6 proteinů, je zapotřebí vyřadit více zbytků.

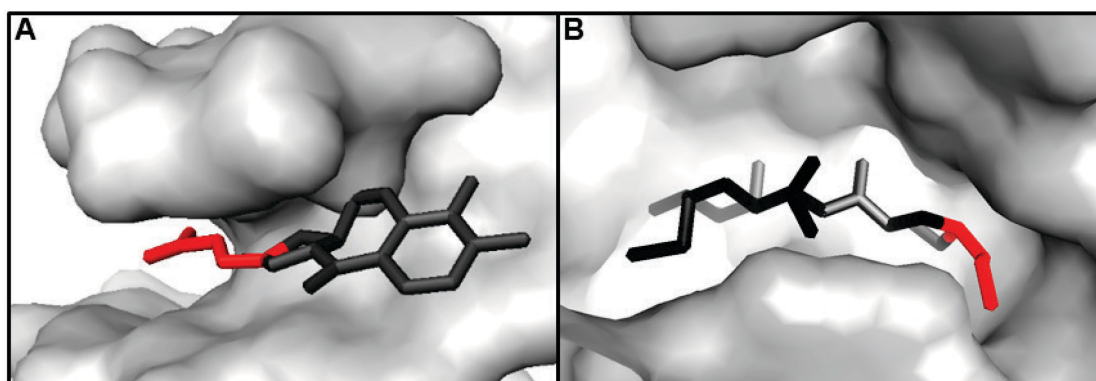
Kromě zrušení katalytické aktivity, mutační experimenty také dále cílily na změnu reakční specifity Apd6 proteinů. Specifickými mutacemi aminokyselinových zbytků bezprostředně následujících po konzervovaných H a D byla očekávána transformace reakční specifity jednonásobně redukujících Apd6 na dvojnásobnou redukci a naopak. V tomto kontextu jsou velmi zajímavé poznatky ze studia homologních DHFR – DHFR z *E. coli* je schopna přijmout a redukovat folát (nativní substrát homologních DHFR z obratlovců), ovšem s mnohem nižší účinností, než jeho nativní substrát 7,8-dihydrofolát (kap. 6.2.1). Jinými slovy, v případě homologních DHFR rozdílná substrátová specifita (neboli tvar aktivního místa) zcela určitě rozhoduje o tom, zda redukce proběhne jednou (DHFR z bakterií) či dvakrát (DHFR z obratlovců). Předpokládá, že za neschopností bakteriální DHFR efektivně redukovat folát zřejmě stojí nemožnost protonace N-8 folátu, který není v aktivním místě ve vhodné protonační pozici.²⁹⁸ Analogické vysvětlení se nabízí i u Apd6 proteinů: Teoreticky, aktivní místo Apd6 proteinů katalyzujících jednonásobnou redukci může mít takový tvar, kde příliš velká vzdálenost protonovaného atomu substrátu (dosud neustanovený atom, který by měl být protonován během redukce exocyklické C=C vazby) od aminokyselinového zbytku vázajícího hydroxoniový ion zprostředkovávající protonaci, znemožňuje protonaci. A tedy i následný transfer hydridu a redukci exocyklické C=C vazby. Ve výsledku je tak redukována přístupnější

endocyklická C=N vazba (kde je vhodným natočením umožněna protonace a zároveň i hydridový transfer). V úvahu také připadá možnost, kdy poloha substrátu ve vazebném místě sice protonaci umožní, ale redukce C=C vazby není možná kvůli nevhodné geometrické pozici kofaktoru vzhledem k substrátu, což je pro efektivní hydridový transfer esenciální. Z toho vyplývá, že za odlišnou reakční specifitu Apd6 proteinů mohou zodpovídat jak aminokyseliny interagující se substrátem, tak ty interagující s kofaktorem, případně se substrátem i kofaktorem zároveň. Je také zajímavé, že substrátová specifita není v DHFR homologních proteinech podmíněna jedním či několika málo aminokyselinovými zbytky, ale zodpovídají za ní poměrně rozsáhlé oblasti proteinu.²⁸⁷ Není tedy zcela vyloučeno, že zbytky hrající roli v odlišné reakční specifitě Apd6 proteinů, které byly v rámci této práce predikovány, skutečně mají pro reakční specifitu význam. Determinace krystalové struktury je jediným spolehlivým nástrojem, který by měl pomoci vyřešit neznámou v této rovnici a stanovit molekulární podstatu prokázané odlišné reakční specifity Apd6 proteinů.

6.4 Odlišná reakční specifita homologních proteinů

6.4.1 Biologický význam odlišné reakční specifity Apd6 proteinů

Odlišná reakční specifita Apd6 proteinů přispívá k diverzitě APD prekurzorů, a ve výsledku tedy k různorodosti tvarů APD částí bioaktivních látek. Exocyklická dvojná vazba, která zůstává zachována v APD prekurzorech PBD, je esenciálním předpokladem pro následnou formaci konjugovaného systému dvojných vazeb v APD většiny PBD s 3-C bočním řetězcem.²³⁶ Dvojná vazba jsou důvodem planární, lehce natočené konformace molekuly, která je nezbytná k efektivní vazbě PBD do malého žlábků DNA (Obr. 6.9A).¹²³ Naopak, plně satureovaný boční řetězec, který je díky LmbY formován v biosyntéze APD prekurzoru linkomycinu, je zřejmě důležitý k účinné interferenci antibiotika s t-RNA v A-vazebném místě ribozomu (Obr. 6.9B).¹¹⁵



Obr. 6.9. Krystalové struktury anthramycinu a linkomycinu vázané do odlišných biologických cílů. (A) PBD anthramycin kovalentně vázaný v malém žlábků DNA, (B) linkomycin vázaný v PTC 50S ribozomální podjednotky *S. aureus* s bočním řetězcem APD jednotky směřujícím k A-místu ribozomu (převzato a upraveno^{114,146}).

6.4.2 Jiné homologní enzymy s rozdílnou reakční specifitou

V přírodě lze nalézt poměrně dost příkladů homologních enzymů, u kterých byl popsán podobný fenomén, tedy ačkoliv jsou si proteiny sekvenčně blízké, přesto mají odlišnou reakční specifitu.

Na první příklad lze narazit přímo v biosyntéze linkosamidů. Již zmiňované homology LmbF (linkomycin) a CcbF (celesticetin), jejichž sekvenční identita je téměř 40 %, mají poměrně překvapivou odlišnou reakční specifitu. Zatímco LmbF katalyzuje pyridoxal-5'-fosfát-závislou β -eliminaci formující sulfohydroylovou skupinu na sdíleném strukturním motivu intermediátu linkosamidové dráhy, CcbF katalyzuje oxidativní deaminaci spojenou s dekarboxylací, která vede k vzniku aldehydu.^{11,212} Krystalové struktury, které by měly odhalit podstatu rozdílnosti, jsou v současné době v přípravě (nepublikovaná data).

Dalším příkladem jsou bakteriální 5'-methyladenosin nukleosidasy z *E. coli* (EcMTAN) a *Vibrio cholerae* (VcMTAN), které mají klíčové role v několika biologických procesech, včetně quorum sensing systému indukujícího produkci patogenních faktorů, a které mají sekvenční identitu 60 %. I přes to, že sekvenčně jsou homology v aktivních místech téměř identické, mají odlišnou vazebnou afinitu v různých tranzičních stavech (afinita se liší až 1000×). Ze sekvenčního srovnání nevyplývá žádné vysvětlení tohoto rozdílu.²⁹⁹ Studií byl odhalen atomický detail katalytických kroků a blíže definována byla také aktivní místa obou homologů. Odlišná afinita je v tomto případě výsledkem rozdílné flexibility a geometrie jednotlivých katalyticky aktivních zbytků.³⁰⁰

Příkladem v eukaryotickém systému jsou například dvě homologní cytochrom P450 monooxygenasy se sekvenční identitou 65 %, katalyzující hydroxylaci stejného substrátu v odlišných pozicích. Konkrétně jde o hydroxylaci kyseliny germacrenové A, prekursoru seskviterpenových laktonů, v pozici 6 α vs. 8 β .³⁰¹ Homologním modelováním byl ze šesti predikovaných substrát-vazebných oblastí sice vytipován jeden aminokyselinový zbytek, který by mohl být zodpovědný za odlišnou orientaci substrátu ve vazebném místě, čímž je ve výsledku ovlivněna pozice hydroxylace, avšak jde pouze o predikci a není vyloučeno, že rozdíl v sekvenci pouze ve skutečnosti ovlivní interakci v jiných substrát-vazebných oblastech a za natočení tak ve výsledku bude zodpovídat úplně jiná aminokyselina.

Jiným příkladem jsou homology zapojené do biosyntézy strigolaktonů, třídy fytohormonů, v rýži seté (*Oryza sativa Japonica*). Jedná se o dva proteiny z rodiny cytochrom P450, CYP711, se sekvenční identitou 82 %, které mají jak odlišné substráty, tak katalytickou aktivitu. Zatímco homolog Os900 katalyzuje oxidační reakci, druhý homolog, Os1400, v pozdější fázi biosyntézy katalyzuje hydroxylaci.³⁰² Zajímavé jsou také homologní methyltransferasy ATX1 a ATX2 z *Arabidopsis*, které methylují histony. Bylo ukázáno, že zatímco ATX1 katalyzuje tri-methylaci histonu H3, ATX2 katalyzuje pouze di-methylaci

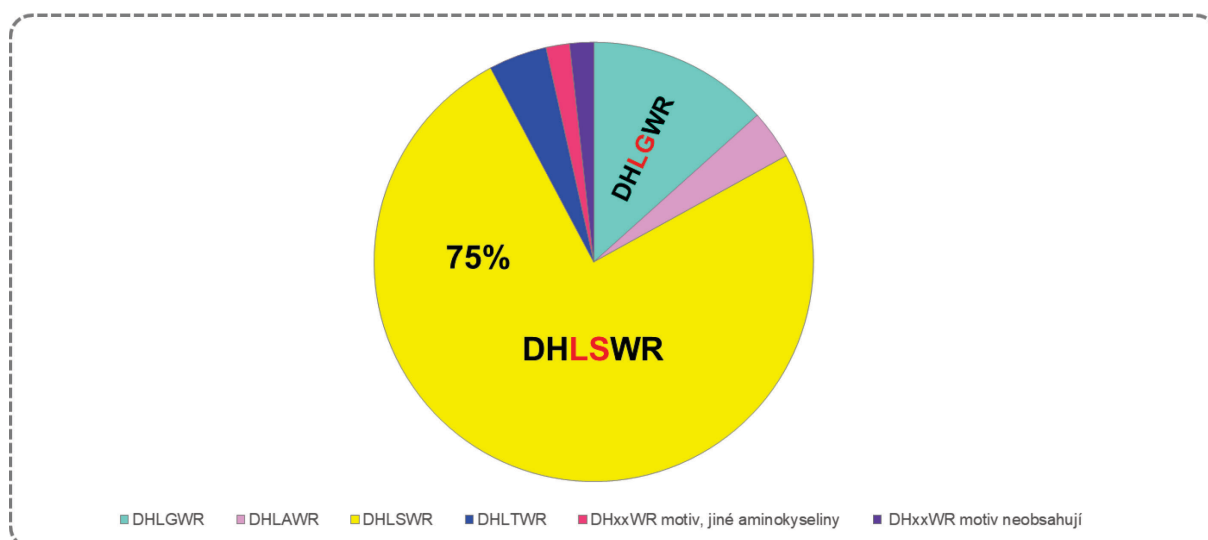
stejného histonu.³⁰³ Co přesně stojí za odlišnou aktivitou Os900/Os1400, resp. ATX1/ATX2 není dosud objasněno.

6.5 Evoluce funkce Apd6 proteinů z centrálních metabolických LLHT

Z SSN analýzy (kap. 5.8.1) bylo vyvozeno, že se Apd6 proteiny z APD biosyntetických drah (skupiny A a B; Obr. 5.48) zřejmě vyvinuly z centrálních metabolických LLHT (skupina C), přítomných ve velké části aktinobakterií, avšak jejich funkce i konkrétní katalyzovaná reakce zůstávají dosud neidentifikovány. Genové duplikace jsou hlavním mechanismem, který poskytuje čerstvý genetický materiál pro vznik nových genů s novými funkcemi (shrnuto v Long et al. 2003).³⁰⁴ Je tedy pravděpodobné, že predikované centrálně metabolické LLHT daly vzniknout Apd6 účastnícím se specializovaných biosyntetických drah.

Podobná evoluční událost byla zaznamenána například v evoluci enzymů účastnících se centrální šikimátové dráhy v rostlinách.³⁰⁵ Šikimátová dráha je základem pro biosyntézu aromatických aminokyselin, ovšem koncový šikimát i meziproducty dráhy jsou hojně využívány k biosyntéze různých SM (například PBD či fenazinů¹²⁸).³⁰⁶ Zajímavá je například kyselina chinová, prekursor SM kyseliny chlorogenové, která vzniká jako vedlejší produkt šikimátové dráhy, konkrétně redukcí 3-dehydrochinové kyseliny pomocí chinát dehydrogenasy (QDH). QDH sdílí sekvenční identitu s bifunkčním enzymem dehydrochinát dehydratasou/šikimát dehydrogenasou (DQD/SDH), enzymem z primární šikimátové dráhy konvertující stejný substrát na dehydrošikimát. Oba enzymy tedy katalyzují podobný typ reakce.³⁰⁷ QDH a SDH patří do stejné rodiny, která se rozděluje na dvě fylogenetické větve. Bylo determinováno, že ke změně funkce QDH stačila pouze jedna změna v aktivním místě enzymů, konkrétně výměna kodonu pro Y za kodon pro G.³⁰⁵

Pokud se blíže podíváme na sekvence LLHT proteinů ležících v SSN analýze ve skupině C (kap. 5.8.1; Obr. 5.48), lze zachytit generalizovaný motiv v aminokyselinových zbytcích, které u Apd6 proteinů předpokládáme jako zbytky formující substrát-vazebné místo (D38 – W43). Tímto motivem je sekvence **DHxxWR**, přičemž zastoupení dvou prostředních variabilních zbytků (označených xx) je souhrnně vyjádřeno grafem v Obr. 6.10. Tento konsensus neplní pouze 1,8 % sekvencí. Většina proteinů obsahuje motiv DHLSWR (75 %), pouze 3,6 % sekvencí má na 4. pozici jinou aminokyselinu než L. Je možné, že podobně jako v šikimátové dráze, i zde mohla změna jedné či dvou aminokyselin změnit aktivitu proteinu kódovaného duplikovaným *apd6* genem. Lze očekávat, že centrální metabolické LLHT a Apd6 proteiny budou mít podobnou aktivitu (reduktasy) a redukovat budou i podobný substrát, přičemž u LLHT by to mohla být látka jednodušší než APD, například látka podobná L-prolinu obsahujícímu endocyklickou dvojnou vazbu.



Obr. 6.10. Rozpad zastoupení variabilních aminokyselin (xx) v generalizovaném motivu DHxxWR v aminokyselinových sekvencích LLHT proteinů – jedná se LLHT znázorněné uzly ve skupině C v Obr. 5.48, u kterých se předpokládá zapojení v centrálních metabolických drahách aktinobakterií.

6.6 Obecné přínosy práce

6.6.1 Apd6 v kontextu $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých oxidoreduktas a LLHT proteinů

$F_{420}/F_{420}H_2$ -závislé oxidoreduktasy byly původně objeveny u Archaea, kde hrají klíčové role v centrálních katabolických drahách. Například, methanogenní Archaea využívají F_{420} jako redoxní kofaktor v CO_2 -redukujících a methyltrofních drahách.³⁷ Mezi Bacteria byl výskyt F_{420} potvrzen v rodech Actinobacteria, Proteobacteria a Chloroflexi.^{35,36} Z bakteriálních $F_{420}/F_{420}H_2$ -závislých enzymů byly do dnešního dne charakterizovány enzymy pouze z centrálního metabolismu rodu *Mycobacteria* a dále pak dva enzymy zapojené v biosyntéze SM produkovaných rodem *Streptomyces*.^{42,81} Nicméně, oba enzymy patří do rodiny FDOR. Apd6 funkčně charakterizované v rámci této práce jsou tak prvními charakterizovanými proteiny rodu *Streptomyces* z LLHT rodiny a také prvními charakterizovanými proteiny LLHT rodiny hrající roli v biosyntéze bioaktivních metabolitů.

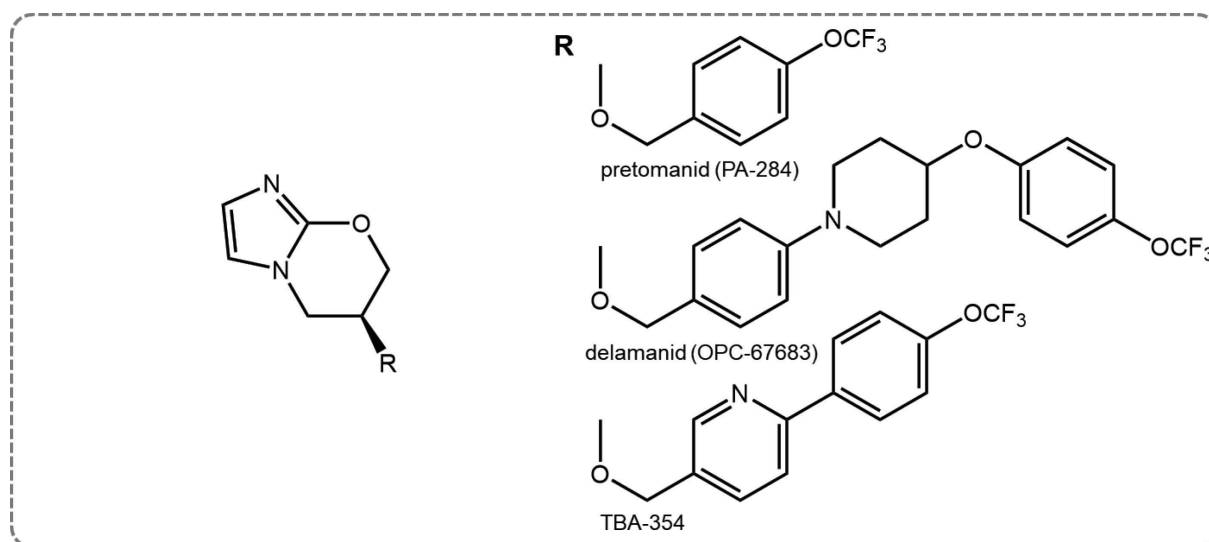
6.6.2 $F_{420}H_2$ -závislé reduktasy v biotechnologickém průmyslu

Některé přírodní látky se mohou biologicky aktivními stát až po specifické redukci C=C vazeb, jako je tomu například v morfinové biosyntéze,³⁰⁸ či v již zmíněné biosyntéze bilirubinu.³⁰⁹ To, že redukce C=C vazeb hraje významnou roli v aktivaci/inaktivaci látek, bylo již využito například při přípravě delamanidu (OPC-67683),³¹⁰ pretomanidu (PA-824)³¹¹ a TBA-354³¹² (Obr. 6.11), nových antituberkulózních látek, které jsou aktivovány hydridovým transferem z $F_{420}H_2$. Tyto látky inhibují růst *M. tuberculosis* již ve velmi nízkých koncentracích, přičemž díky novému mechanismu účinku na mykobakteriální buňku nevykazují *in vitro*

zkříženou rezistenci k současně užívaným látkám v léčbě tuberkulózy.^{310,311,313} Mechanismus aktivace těchto látek byl primárně testován na pretomanidu. 5-Deazaflavin-závislá nitroreduktasa (Rv3547) zprostředkovává redukcí nitroimidazolu, což vede k tvorbě nestabilního intermediátu, který se následně rozkládá na tři základní metabolity. Během rozkladu je nitro skupina eliminována. Výsledkem je tvorba reaktivních dusíkových látek, jako jsou například NO či HNO₂. Tyto látky působí negativně nejen na produkci mykolové kyseliny, esenciální složky mykobakteriálních membrán, ale také na dýchací řetězec.³¹³

Mnoho F₄₂₀H₂-závislých reduktas má širokou substrátovou specifitu a mohou redukovat různé xenobiotické látky. Například mykobakteriální reduktasy degradují kumarinové deriváty,^{85,314} LLHT z *Rhodococcus* jsou zase schopné iniciovat mineralizaci pikrátu a příbuzných nitro-aromatických látek, které jsou vysoce toxické a do prostředí se dostávají zejména průmyslovou výrobou.³¹⁵ Fyziologická výhoda široké substrátové specifiky těchto enzymů nebyla sice plně objasněna, ale poskytuje dobrý základ pro jejich využití v bioremediacích. 5-Deazaflavin závislé enzymy mají také slibný potenciál využití při dekontaminaci znečištěných půd či vod.²⁶⁶

Biotransformace rychle nahrazují konvenční chemické procesy ve výrobě nových látek.³¹⁶ F₄₂₀-závislé procesy se již například uplatňují v průmyslové výrobě tetracyklinových antibiotik.³¹⁷ F₄₂₀H₂-závislé Apd6 reduktasy by v budoucnu například mohly najít potenciální uplatnění ve stereospecifické redukcí iminů různých heterocyklických látek, včetně těch synteticky připravených.



Obr. 6.11. Chemické struktury antituberkulózních látek pretomanidu (PA-284), delamanidu (OPC-67683) a TBA-354. Tyto látky jsou při vstupu do mykobakteriální buňky aktivovány F₄₂₀H₂-závislým enzymem.

7 SOUHRN

- Heterologní nadprodukcí a *in vitro* testováním šesti Apd6 homologních proteinů se podařilo prokázat jejich zařazení do navrhovaného stupně biosyntézy APD prekurzorů. Bylo ukázáno, že zatímco Apd6 z biosyntézy PBD a hormaomycinu jsou schopné v přítomnosti $F_{420}H_2$ redukovat pouze endocyklickou iminovou vazbu předpokládaného substrátu, 4-substituované Δ^1 -pyrrolin-2-karboxylové kyseliny (**5a**), LmbY z biosyntézy linkomycinu a částečně GriH z biosyntézy griselimycinu redukují také více inertní exocyklickou dvojnou vazbu stejného substrátu.
- Charakterizované Apd6 představují vůbec první popsané $F_{420}H_2$ -závislé proteiny rodu *Streptomyces* z LLHT rodiny a vůbec první charakterizované LLHT proteiny účastnící se biosyntézy bioaktivních metabolitů.
- Byl navržen rozdílný mechanismus hydridového transferu v redukcích katalyzovaných Apd6 proteiny. Tandemová redukce dvou dvojných vazeb enzymem zprostředkovávajícím dva hydridové transfery z $F_{420}H_2$ dosud nebyla v literatuře popsána.
- Byly vytvořeny schémata predikovaných aktivních míst Apd6 homologů, na základě kterých byla stanovena hypotéza vysvětlující jejich rozdílnou reakční specifitu. Předpokládá se, že klíčové aminokyselinové zbytky v aktivním místě rozhodují o natočení substrátu vzhledem ke kofaktoru, čímž určují, zda redukce proběhne jednou či dvakrát. Platnost hypotézy byla ověřována cílenou mutagenezí navržených klíčových aminokyselin v predikovaném aktivním místě. Připraveno a *in vitro* testováno bylo 20 mutantních variant Apd6 proteinů. Překvapivě, jedno-, dvoj-, troj- a dokonce i čtyřnásobné mutanty byly stále schopné katalyzovat redukci bez jakékoliv změny v katalytické aktivitě. Předpokládá se, že v katalýze reakce budou hrát roli ještě další, dosud neustanovené aminokyselinové zbytky. K objasnění molekulární podstaty odlišné reakční specifity bylo dále přistoupeno ke krystalografické studii. Připraveny byly krystaly dvou reprezentativních Apd6 zástupců, LmbY a PBD Por15.
- Apd6 proteiny byly podrobeny bioinformatické analýze. Zkonstruována byla sekvenčně-podobností síť a fylogenetický strom. Výsledky se vzájemně doplňují a naznačují, že Apd6 se pravděpodobně vyvinuly jako dvě nezávislé evoluční větve ze společného předka, kterým je zřejmě LLHT protein z centrálního metabolismu aktinobakterií. Analýza dále ukázala na BGS dosud neznámých metabolitů, jejichž biosyntézy se Apd6 účastní.

8 SEZNAM LITERATURY

1. Hopwood D. The Leeuwenhoek Lecture, 1987. Towards an Understanding of Gene Switching in *Streptomyces*, the Basis of Sporulation and Antibiotic Production. *Proc R Soc London*. 1988;235(1279):121-138.
2. Fischbach MA, Walsh CT, Clardy J. The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(12):4601–4608.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79:629-661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
4. Bachmann BO, Lanen SG Van, Baltz RH. Microbial Genome Mining for Accelerated Natural Products Discovery: Is a Renaissance in the Making? *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015;41(2):175-184. doi:10.1007/s10295-013-1389-9.
5. Chen R, Wong HL, Burns BP. New Approaches to Detect Biosynthetic Gene Clusters in the Environment. *Medicines*. 2019;1-11. doi:10.3390/medicines6010032
6. Walsh CT. Combinatorial Biosynthesis of Antibiotics: Challenges and Opportunities. *Chembiochem*. 2002;3:124-134.
7. Baltz RH. Natural Product Drug Discovery in the Genomic Era: Realities, Conjectures, Misconceptions, and Opportunities. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2019;46(3-4):281-299.
8. Nguyen KT, Ritz D, Gu J, et al. Combinatorial Biosynthesis of Novel Antibiotics Related to Daptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17462-17467. doi:10.1073/pnas.0608589103
9. Kadlcik S, Kamenik Z, Vasek D, et al. Elucidation of Salicylate Attachment in Celesticetin Biosynthesis Opens the Door to Create a Library of More Efficient Hybrid Lincosamide Antibiotics. *Chem Sci*. 2017;8(5):3349-3355. doi:10.1039/c6sc04235j
10. Zhao Q, Wang M, Xu D, et al. Metabolic Coupling of Two Small-Molecule Thiols Programs the Biosynthesis of Lincomycin A. *Nature*. 2015;518(7537):115-119. doi:10.1038/nature14137
11. Kamenik Z, Kadlcik S, Radojevic B, et al. Deacetylation of Mycothiol-Derived “Waste Product” Triggers the Last Biosynthetic Steps of Lincosamide Antibiotics. *Chem Sci*. 2016;7(1):430-435. doi:10.1039/c5sc03327f
12. Medema MH, Cimermancic P, Sali A, et al. A Systematic Computational Analysis of Biosynthetic Gene Cluster Evolution: Lessons for Engineering Biosynthesis. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(12). doi:10.1371/journal.pcbi.1004016
13. Janata J, Kamenik Z, Gazak R, et al. Biosynthesis and Incorporation of an Alkylproline-Derivative (APD) Precursor into Complex Natural Products. *Nat Prod Rep*. 2018;35(3):257-289. doi:10.1039/c7np00047b
14. Theorell H. Purification of the Active Group of the Yellow Enzyme. *Biochem Z*. 1935;275:344-346.
15. Krebs H. Metabolism of Amino Acids. III. Deamination of Amino Acids. *Biochem J*. 1935;29:1620-1644.
16. Warburg O, Christian W. The Yellow Enzyme and Its Functions. *Biochem Z*. 1933;266:377-411.
17. Walsh C. Flavin Coenzymes: at the Crossroads of Biological Redox Chemistry. *Acc Chem Res*. 1980;13(5):148-155. doi:10.1021/ar50149a004
18. Walsh CT, Wencewicz TA. Flavoenzymes: Versatile Catalysts in Biosynthetic Pathways. *Nat Prod Rep*. 2013;30:175-200. doi:10.1039/c2np20069d
19. Cheeseman P, Toms-wood A, Wolfe RS. Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor F₄₂₀, from *Methanobacterium* strain MOH. *J Bacteriol*. 1972;112(1):527-531.
20. Abbas CA, Sibirny AA. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(2):321-360. doi:10.1128/MMBR.00030-10
21. Hemmerich P, Massey V, Fenner H. Flavin and 5-Deazaflavin: A Chemical Evaluation of “Modified” Flavoproteins with Respect to the Mechanisms of Redox Biocatalysis. *FEBS Lett*. 1977;84(1):5-21. doi:10.1016/0014-5793(77)81047-8
22. Eirich L, Vogels G, Wolfe R. Proposed Structure for Coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium*. *Am Chem Soc*. 1978;17(22):4583-4593.
23. Ashton WT, Brown RD, Jacobson F, Walsh C. Synthesis of 7, 8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin and Confirmation of Its Identity with the Deazaalloxazine Chromophore of *Methanobacterium* Redox Coenzyme F₄₂₀. *J Am Chem Soc*. 1979;101(15):4419-4420. doi:10.1021/ja00509a083
24. Yasui A, Takao M, Oikawa A, et al. Cloning and Characterization of a Photolyase Gene from the *Cyanobacterium Anacystis nidulans*. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(10):4447-4463. doi:10.1093/nar/16.10.4447
25. Kobayashi T, Takao M, Oikawa A, Yasui A. Molecular Characterization of a Gene Encoding a Photolyase from *Streptomyces griseus*. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(12):4731-4744. doi:10.1093/nar/17.12.4731
26. Mayer F, Piret J, Kiener A, et al. Functional Expression of 8-Hydroxy-5-Deazaflavin-Dependent DNA Photolyase from *Anacystis nidulans* in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*. 1990;172(10):6061-6065. doi:10.1128/jb.172.10.6061-6065.1990
27. Kiener A, Husain I, Sancar A, Walsh C. Purification and Properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA Photolyase. *J Biol Chem*. 1989;264(23):13880-13887.
28. Takao M, Kobayashi T, Oikawa A, Yasui A. Tandem Arrangement of Photolyase and Superoxide Dismutase Genes in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol*. 1989;171(11):6323-6329. doi:10.1128/jb.171.11.6323-6329.1989
29. Eker APM, Hessels JKC, Van De Velde J. Photoreactivating Enzyme from the Green Alga *Scenedesmus*

- acutus*. Evidence for the Presence of Two Different Flavin Chromophores. *Biochemistry*. 1988;27(5):1758-1765. doi:10.1021/bi00405a056
30. Glas AF, Maul MJ, Cryle M, et al. The Archaeal Cofactor F₀ Is a Light-Harvesting Antenna Chromophore in Eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(28):11540-11545. doi:10.1073/pnas.0812665106
 31. Weber S. Light-Driven Enzymatic Catalysis of DNA Repair: A Review of Recent Biophysical Studies on Photolyase. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2005;1707(1 SPEC. ISS.):1-23. doi:10.1016/j.bbabi.2004.02.010
 32. Gorris L, van der Drift C. Cofactor Contents of Methanogenic Bacteria Reviewed. *BioFactors*. 1994;4(3-4):139-145.
 33. Bair TB, Isabelle DW, Daniels L. Structures of Coenzyme F₄₂₀ in *Mycobacterium* Species. *Arch Microbiol*. 2001;176(1-2):37-43. doi:10.1007/s002030100290
 34. Ney B, Carere CR, Sparling R, et al. Cofactor Tail Length Modulates Catalysis of Bacterial F₄₂₀-Dependent Oxidoreductases. *Front Microbiol*. 2017;8:1-11. doi:10.3389/fmicb.2017.01902
 35. Selengut JD, Haft DH. Unexpected Abundance of Coenzyme F₄₂₀-Dependent Enzymes in *Mycobacterium tuberculosis* and Other Actinobacteria. *J Bacteriol*. 2010;192(21):5788-5798. doi:10.1128/JB.00425-10
 36. Ney B, Ahmed FH, Carere CR, et al. The Methanogenic Redox Cofactor F₄₂₀ is Widely Synthesized by Aerobic Soil Bacteria. *ISME J*. 2017;11(1):125-137. doi:10.1038/ismej.2016.100
 37. Liu Y, Whitman WB. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1125:171-189. doi:10.1196/annals.1419.019
 38. Lin XL, White RH. Occurrence of Coenzyme F₄₂₀ and Its γ -Monoglutamyl Derivative in Non-methanogenic Archaeobacteria. *J Bacteriol*. 1986;168(1):444-448. doi:10.1128/jb.168.1.444-448.1986
 39. de Wit LEA, Eker APM. 8-Hydroxy-5-Deazaflavin-Dependent Electron Transfer in the Extreme Halophile *Halobacterium cutirubrum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;48(1-2):121-125. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02527.x
 40. Daniels L, Bakhiet N, Harmon K. Widespread Distribution of a 5-Deazaflavin Cofactor in Actinomyces and Related Bacteria. *Syst Appl Microbiol*. 1985;6(1):12-17.
 41. Purwantini E, Gillis TP, Daniels L, et al. Presence of F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in *Mycobacterium* and *Nocardia* Species, but Absence from *Streptomyces* and *Corynebacterium* Species and Methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;146:129-134.
 42. Wang P, Bashiri G, Gao X, et al. Uncovering the Enzymes That Catalyze the Final Steps in Oxytetracycline Biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2013;135(19):7138-7141. doi:10.1021/ja403516u
 43. Ebert S, Rieger PG, Knackmuss HJ. Function of Coenzyme F₄₂₀ in Aerobic Catabolism of 2,4,6-Trinitrophenol and 2,4-Dinitrophenol by *Nocardioides Simplex* FJ2-1A. *J Bacteriol*. 1999;181(9):2669-2674.
 44. Choi KP, Kendrick N, Daniels L. Demonstration That *fbjC* is Required by *Mycobacterium bovis* BCG for Coenzyme F₄₂₀ and F₀ Biosynthesis. *J Bacteriol*. 2002;184(9):2420-2428. doi:10.1128/JB.184.9.2420-2428.2002
 45. Gurusurthy M, Rao M, Mukherjee T, et al. A Novel F₄₂₀-Dependent Anti-oxidant Mechanism Protects *Mycobacterium tuberculosis* Against Oxidative Stress and Bactericidal Agents. *Agric Econ Res*. 2014;15(2):100-112. doi:10.1111/mmi.12127
 46. Manjunatha UH, Boshoff H, Dowd CS, et al. Identification of a Nitroimidazo-Oxazine-Specific Protein Involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(2):431-436. doi:10.1073/pnas.0508392103
 47. Dubnau E, Chan J, Raynaud C, et al. Oxygenated Mycolic Acids are Necessary for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in Mice. *Mol Microbiol*. 2000;36(3):630-637. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01882.x
 48. Janssen PH. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):1719-1728. doi:10.1128/AEM.72.3.1719
 49. Schonheit P, Keweloh H, Thauer KR. Factor F₄₂₀ Degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* During Exposure to Oxygen. *FEMS Microbiol Lett*. 1981;12:347-349.
 50. Gloss L, Hausinger R. Methanogen Factor 390 Formation: Species Distribution, Reversibility and Effects of Non-Oxidative Cellular Stresses. *BioFactors*. 1988;1(3):237-240.
 51. van de Wijngaard W, Vermey P, van der Drift C. Formation of Factor 390 by Cell Extracts of *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol*. 1991;173(8):2710-2711.
 52. Tholen A, Pester M, Brune A. Simultaneous Methanogenesis and Oxygen Reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at Low Oxygen Fluxes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;62(3):303-312. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00390.x
 53. Hausinger R, Orme-Johnson W, Walsh C. Factor 390 Chromophores: Phosphodiester between AMP or GMP and Methanogen Factor 420. *Biochemistry*. 1985;24(7):1629-1633.
 54. Kiener A, Orme-Johnson W, Walsh C. Reversible Conversion of Coenzyme F₄₂₀ to the 8-OH-AMP and 8-OH-GMP Esters, F390-A and F390-G, on Oxygen Exposure and Re-establishment of Anaerobiosis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol*. 1988;150(3):249-253.
 55. Walsh C. Naturally Occurring 5-Deazaflavin Coenzymes: Biological Redox Roles. *Acc Chem Res*. 1986;19(7):216-221. doi:10.1021/ar00127a004
 56. Jacobson F, Walsh C. Properties of 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazaflavins Relevant to Redox Coenzyme Function in Methanogen Metabolism. *Biochemistry*. 1984;23(5):979-988. doi:10.1021/bi00300a028
 57. Bashiri G, Squire CJ, Moreland NJ, Baker EN. Crystal Structures of F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase FGD1 Involved in the Activation of the Anti-Tuberculosis Drug Candidate PA-824 Reveal the Basis of Coenzyme and Substrate Binding. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17531-17541.

- doi:10.1074/jbc.M801854200
58. Oyugi MA, Bashiri G, Baker EN, Johnson-Winters K. Investigating the Reaction Mechanism of F₄₂₀-Dependent Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*: Kinetic Analysis of the Wild-Type and Mutant Enzymes. *Biochemistry*. 2016;55(39):5566-5577. doi:10.1021/acs.biochem.6b00638
 59. de Poorter LMI, Geerts WJ, Keltjens JT. Hydrogen Concentrations in Methane-Forming Cells Probed by the Ratios of Reduced and Oxidized Coenzyme F₄₂₀. *Microbiology*. 2005;151(5):1697-1705. doi:10.1099/mic.0.27679-0
 60. Thauer R, Jungermann K, Decker K. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriol Rev*. 1977;40(1):100-181. doi:10.1108/eb027807
 61. Purwantini E, Mukhopadhyay B. Conversion of NO₂ to NO by Reduced Coenzyme F₄₂₀ Protects *Mycobacteria* from Nitrosative Damage. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(15):6333-6338. doi:10.1073/pnas.0812883106
 62. Greening C, Ahmed FH, Mohamed AE, et al. Physiology, Biochemistry, and Applications of F₄₂₀- and Fo-Dependent Redox Reactions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(2):451-493. doi:10.1128/MMBR.00070-15.Address
 63. Decamps L, Philmus B, Benjdia A, et al. Biosynthesis of F₀, Precursor of the F₄₂₀ Cofactor, Requires a Unique Two Radical-SAM domain Enzyme and Tyrosine as Substrate. *J Am Chem Soc*. 2012;134(44):18173-18176. doi:10.1021/ja307762b
 64. Bashiri G, Antony J, Jirgis ENM, et al. A Revised Biosynthetic Pathway for the Cofactor F₄₂₀ in Prokaryotes. *Nat Commun*. 2019;10(1558):1-12. doi:10.1038/s41467-019-09534-x
 65. Graupner M, Xu H, White RH. Characterization of the 2-Phospho-L-Lactate Transferase Enzyme Involved in Coenzyme F₄₂₀ Biosynthesis in *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry*. 2002;41(11):3754-3761. doi:10.1021/bi011937v
 66. Choi K, Bair T, Bae Y, Daniels L. Use of Transposon Tn5367 Mutagenesis and a Nitroimidazopyran- Based Selection System To Demonstrate a Requirement for *fbtA* and *fbtB* in Coenzyme F₄₂₀ Biosynthesis by *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol*. 2001;183(24):7058-7066. doi:10.1128/JB.183.24.7058
 67. Li H, Graupner M, Xu H, White RH. CofE Catalyzes the Addition of Two Glutamates to F₄₂₀-0 in F₄₂₀ Coenzyme Biosynthesis in *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry*. 2003;42(32):9771-9778. doi:10.1021/bi034779b
 68. Bashiri G, Rehan AM, Sreebhavan S, et al. Elongation of the Poly-γ-Glutamate Tail of F₄₂₀ Requires Both Domains of the F₄₂₀:γ-Glutamyl Ligase (FbiB) of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6882-6894. doi:10.1074/jbc.M115.689026
 69. Fischer M, Bacher A. Biosynthesis of Vitamin B2 and Flavocoenzymes in Plants. *Adv Bot Res*. 2011;58:93-152. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00607.x
 70. Muth E, Mörschel E, Klein A. Purification and Characterization of an 8-Hydroxy-5-Deazaflavin-Reducing Hydrogenase from the Archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *Eur J Biochem*. 1987;169(3):571-577. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13647.x
 71. Vitt S, Ma K, Warkentin E, et al. The F₄₂₀-Reducing [NiFe]-Hydrogenase Complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the First X-ray Structure of a Group 3 Family Member. *J Mol Biol*. 2014;426(15):2813-2826. doi:10.1016/j.jmb.2014.05.024
 72. Ilina Y, Lorent C, Katz S, et al. X-Ray Crystallography and Vibrational Spectroscopy Reveal the Key Determinants of Biocatalytic Dihydrogen Cycling by [NiFe] Hydrogenases. *Angew Chemie Int Ed*. 2019;58(51):18710-18714. doi:10.1002/anie.201908258
 73. Warkentin E, Mamat B, Sordel-Klippert M, et al. Structures of F₄₂₀H₂:NADP⁺ Oxidoreductase with and without Its Substrates Bound. *EMBO J*. 2001;20(23):6561-6569. doi:10.1093/emboj/20.23.6561
 74. Silaghi-Dumitrescu R, Kurtz DM, Ljungdahl LG, et al. X-ray Crystal Structures of *Moorella thermoacetica* FprA. Novel Diiron Site Structure and Mechanistic Insights into a Scavenging Nitric Oxide Reductase. *Biochemistry*. 2005;44(17):6492-6501. doi:10.1021/bi0473049
 75. Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, et al. Crystal Structure of Methylenetetrahydromethanopterin Reductase (Mer) in Complex with Coenzyme F₄₂₀: Architecture of the F₄₂₀/FMN Binding Site of Enzymes Within the Nonprolyl *cis*-Peptide Containing Bacterial Luciferase Family. *Protein Sci*. 2005;14(7):1840-1849. doi:10.1110/ps.041289805
 76. Hagemeyer CH, Shima S, Thauer RK, et al. Coenzyme F₄₂₀-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: A Methanogenic Enzyme with an Unusual Quarternary Structure. *J Mol Biol*. 2003;332(5):1047-1057. doi:10.1016/S0022-2836(03)00949-5
 77. Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, et al. Coenzyme Binding in F₄₂₀-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase, a Member of the Bacterial Luciferase Family. *Structure*. 2004;12(3):361-370. doi:10.1016/j.str.2004.02.010
 78. Purwantini E, Mukhopadhyay B. Rv0132c of *Mycobacterium tuberculosis* Encodes a Coenzyme F₄₂₀-Dependent Hydroxymycolic Acid Dehydrogenase. *PLoS One*. 2013;8(12):4-12. doi:10.1371/journal.pone.0081985
 79. Nguyen Q-T, Trinco G, Binda C, et al. Discovery and Characterization of an F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Rh-FGD1) from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;101(7):2831-2842. doi:10.1007/s00253-016-8038-y
 80. Cellitti S, Shaffer J, Jones D, Al E. Structure of Ddn, the Deazaflavin-Dependent Nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Bioreductive Activation of PA-824. *Structure*. 2012;20(1-2):101-112.
 81. Ichikawa H, Bashiri G, Kelly WL. Biosynthesis of the Thiopeptins and Identification of an F₄₂₀H₂-Dependent

- Dehydropiperidine Reductase. *J Am Chem Soc.* 2018;140(34):jacs.8b04238. doi:10.1021/jacs.8b04238
82. Ceh K, Demmer U, Warkentin E, et al. Structural Basis of the Hydride Transfer Mechanism in F₄₂₀-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase. *Biochemistry.* 2009;48(42):10098-10105. doi:10.1021/bi901104d
 83. Ahmed FH, Carr PD, Lee BM, et al. Sequence-Structure-Function Classification of a Catalytically Diverse Oxidoreductase Superfamily in *Mycobacteria*. *J Mol Biol.* 2015;427(22):3554-3571. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.021
 84. Lapalikar G, Taylor M, Warden A, et al. Cofactor Promiscuity among F₄₂₀-Dependent Reductases Enables Them to Catalyse Both Oxidation and Reduction of the Same Substrate. *Catal Sci Technol.* 2012;2(8):1560-1567. doi:10.1039/C6CY02215D
 85. Taylor MC, Jackson CJ, Tattersall DB, et al. Identification and Characterization of Two Families of F₄₂₀H₂-Dependent Reductases from *Mycobacteria* that Catalyse Aflatoxin Degradation. *Mol Microbiol.* 2010;78(3):561-575. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07356.x
 86. Mashalidis EH, Gittis AG, Tomczak A, et al. Molecular Insights into the Binding of Coenzyme F₄₂₀ to the Conserved Protein Rv1155 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* 2015;24(5):729-740. doi:10.1002/pro.2645
 87. Mascotti ML, Kumar H, Nguyen Q, Fraaije MW. Reconstructing the Evolutionary History of F₄₂₀-Dependent Dehydrogenases. *Sci Rep.* 2018;8:1-10. doi:10.1038/s41598-018-35590-2
 88. Fisher AJ, Thompson TB, Thoden JB, et al. The 1.5-Å Resolution Crystal Structure of Bacterial Luciferase in Low Salt Conditions. *J Biol Chem.* 1996;271(36):21956-21968. doi:10.1074/jbc.271.36.21956
 89. Chaiyen P, Suadee C, Wilairat P. A Novel Two-Protein Component Flavoprotein Hydroxylase p-Hydroxyphenylacetate Hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Biochem.* 2001;268(21):5550-5561. doi:10.1046/j.1432-1033.2001.02490.x
 90. Shima S, Warkentin E, Grabarse W, et al. Structure of Coenzyme F₄₂₀ Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Reductase from Two Methanogenic Archaea. *J Mol Biol.* 2000;300(4):935-950. doi:10.1006/jmbi.2000.3909
 91. Widdel F, Wolfe S. Expression of Secondary Alcohol Dehydrogenase in Methanogenic Bacteria and Purification of the F₄₂₀-Specific Enzyme from *Methanogenium thermophilum* strain TCI. *Arch Microbiol.* 1989;152(4):322-328.
 92. Klein AR, Berk H, Purwantini E, et al. Si-face Stereospecificity at C5 of Coenzyme F₄₂₀ for F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F₄₂₀-Dependent Alcohol Dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*. *Eur J Biochem.* 1996;239(1):93-97.
 93. Purwantini E, Daniels L. Purification of a Novel Coenzyme F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 1996;178(10):2861-2866. doi:10.1128/JB.178.10.2861-2866.1996
 94. Wheeler P. Catabolic Pathways for Glucose, Glycerol and 6-Phosphogluconate in *Mycobacterium leprae* Grown in Armadillo Tissues. *Microbiology.* 2009;129(5):1481-1495. doi:10.1099/00221287-129-5-1481
 95. Schniete JK, Cruz-morales P, Selem-mojica N, et al. Expanding Primary Metabolism Helps Generate the Metabolic Robustness To Facilitate Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *MBio.* 2018;9(1):1-13.
 96. Bergy M, Herr R, Mason D. Antibiotic Lincolnensis and Method of Production. *United State Pat 3086912.* 1963.
 97. Guzman JD, Kadlcik S, Kamenik Z, et al. Intervencin, a Genome-Mined Lincosamide Antibiotic from *Rhodococcus* sp. 06-235-1A. *V přípravě.* 2020.
 98. De Boer C, Dietz A, Hoeksema H. Celesticetin, its Salts and Method of Preparation. *United State Pat 2928844.* 1960.
 99. Hanada M, Tsunakawa M, Tomita K, Tsukiura H. Antibiotic Bu-2545, a New Member of the Celesticetin-Lincomycin Class. *Journal Antibiot.* 1980;33(7):751. doi:10.7164/antibiotics.34.596
 100. Spizek J, Novotna J RT. Lincosamides: Chemical Structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance, and Applications. *Adv Appl Microbiol.* 2004;56:121-154.
 101. Argoudelis AD, Fox JA, Mason DJ, Eble TE. New Lincomycin-Related Antibiotics. *J Am Chem Soc.* 1964;86(22):5044-5045. doi:10.1021/ja01076a090
 102. Schroeder W, Bannister B, Hoeksema H. Lincomycin. III. Structure and Stereochemistry of the Carbohydrate Moiety. *J Am Chem Soc.* 1967;89(10):2448-2453. doi:10.1021/ja00986a036
 103. Hoeksema H. Celesticetin. IV. The Structure of Celesticetin. *J Am Chem Soc.* 1964;86(19):4224-4225. doi:10.1021/ja01073a084
 104. Hoeksema, H, Bannister, B, Birkenmeyer, et al. Chemical Studies on Lincomycin. I. The Structure of Lincomycin. *J Am Chem Soc.* 1964;429(9):4223-4224. doi:10.1021/ja01073a083
 105. Argoudelis A, Fox J, Eble T. U-21,669: A New Lincomycin-Related Antibiotic. *Biochemistry.* 1965;4(4):698-703. doi:10.1021/bi00880a014
 106. Birkenmeyer RD, Kagan F. Lincomycin XI. Synthesis and Structure of Clindamycin, a Potent Antibacterial Agent. *J Med Chem.* 1970;13(4):616-619. doi:10.1021/jm00298a007
 107. Loewen K, Schreiber Y, Kirlew M, et al. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection: Literature Review and Clinical Update. *Clin Rev.* 2017;63:512-520.
 108. David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. 2010;23(3):616-687. doi:10.1128/CMR.00081-09
 109. Steer AC, Lamagni T, Curtis N, Carapetis JR. Invasive Group A Streptococcal Disease. 2012;72(9):1213-1227.
 110. Brook I. Spectrum and Treatment of Anaerobic Infections. *J Infect Chemother.* 2016;22(1):1-13. doi:10.1016/j.jiac.2015.10.010

111. World Health Organization. Treatment of Severe Malaria. *Guidel Treat Malar.* 2015;71-88. doi:10.1016/0035-9203(91)90261-V
112. Rezanka T, Spizek J, Sigler K. Medicinal Use of Lincosamides and Microbial Resistance to Them. *Antiinfect Agents Med Chem.* 2008;6(2):133-144. doi:10.2174/187152107780361670
113. Tenson T, Ehrenberg M. Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel. *Cell.* 2002;108(5):591-594. doi:10.1016/S0092-8674(02)00669-4
114. Matzov D, Eyal Z, Benhamou RI, et al. Structural Insights of Lincosamides Targeting the Ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(17):10284-10292. doi:10.1093/nar/gkx658
115. Schlunzen F, Zarivach R, Harms J, et al. Structural Basis for the Interaction of Antibiotics with the Peptidyl Transferase Centre in *Eubacteria*. *Nature.* 2001;413(October):814-821.
116. Dunkle JA, Xiong L, Mankin AS, Cate JHD. Structures of the *Escherichia coli* Ribosome with Antibiotics Bound Near the Peptidyl Transferase Center Explain Spectra of Drug Action. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(40):17152-17157. doi:10.1073/pnas.1007988107
117. Magerlein B. Modification of Lincomycin. *Adv Appl Microbiol.* 1971;14:185-229.
118. Pang AP, Du L, Lin CY, et al. Co-Overexpression of *ImbW* and *metK* Led to Increased Lincomycin A Production and Decreased Byproduct Lincomycin B Content in an Industrial Strain of *Streptomyces lincolnensis*. *J Appl Microbiol.* 2015;119(4):1064-1074. doi:10.1111/jam.12919
119. Ulanova D, Novotna J, Smutna Y, et al. Mutasyntesis of Lincomycin Derivatives with Activity against Drug-Resistant *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):927-930. doi:10.1128/AAC.00918-09
120. Fotso S. Naturally Occuring Pyrrolo[1,4]benzodiazepines in Bacteria. *Mini Rev Org Chem.* 2010;7(1):68-74.
121. Hurley L. Pyrrolo(1,4)Benzodiazepine Antitumor Antibiotics. Comparative Aspects of Anthramycin, Tomaymycin and Sibiromycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1977;30(5):349-370. doi:10.7164/antibiotics.30.349
122. Kumar R, Lown J. Recent Developments in Novel Pyrrolo[2,1-c][1,4]Benzodiazepine Conjugates: Synthesis and Biological Evaluation. *Mini Rev Med Chem.* 2003;3(4):323-339.
123. Gerratana B. Biosynthesis, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrolobenzodiazepines. *Med Res Rev.* 2012;32(2):254-293. doi:10.1002/med
124. Miyamoto M, Sawa T, Kondo S, et al. Biosynthesis of Neothramycin. *J Ferment Technol.* 1978;56(4):329-333.
125. Hurley L, Lasswell W, Ostrander J, Parry R. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics. Biosynthetic Conversion of Tyrosine to the C2- and C3-Proline Moieties of Anthramycin, Tomaymycin, and Sibiromycin. *Biochemistry.* 1979;18(19):4230-4237.
126. Hu Y, Phelan V, Ntai I, et al. Benzodiazepine Biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem Biol.* 2007;14(6):691-701. doi:10.1016/j.chembiol.2007.05.009
127. Najmanova L, Ulanova D, Jelinkova M, et al. Sequence Analysis of Poro-thramycin Biosynthetic Gene Cluster. *Folia Microbiol (Praha).* 2014;59(6):543-552. doi:10.1007/s12223-014-0339-x
128. Pavlikova M, Kamenik Z, Janata J, et al. Novel Pathway of 3-Hydroxyanthranilic Acid Formation in Limazepine Biosynthesis Reveals Evolutionary Relation Between Phenazines and Pyrrolobenzodiazepines. *Sci Rep.* 2018;8(1):2-11. doi:10.1038/s41598-018-26179-w
129. Shannon P, Markiel A, Owen Ozier, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 2018;13(11):2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite
130. Li W, Khullar A, Chou S, et al. Biosynthesis of Sibiromycin, a Potent Antitumor Antibiotic. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(9):2869-2878. doi:10.1128/AEM.02326-08
131. Li W, Chou S, Khullar A, Gerratana B. Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster for Tomaymycin, an SJG-136 Monomeric Analog. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(9):2958-2963. doi:10.1128/AEM.02325-08
132. Tendler M, Korman S. 'Refuin': a Non-cytotoxic Carcinostatic Compound Proliferated by a Thermophilic Actinomycet. *Nature.* 1963;199(489):501.
133. Leimgruber W, Batcho AD, Schenker F. The Structure of Anthramycin. *J Am Chem Soc.* 1965;87(24):5793-5795. doi:10.1021/ja00952a051
134. Tsunakawa M, Konishi M, Miyaki T. BMY-28121, a New Antitumor Antibiotic. *United State Pat 4683230.*
135. Tsunakawa M, Kamei H, Konishi, M, et al. Poro-thramycin, a New Antibiotic of the Anthramycin Group - Production, Isolation, Structure and Biological Activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1988;45(10):1366-1373.
136. Brazhnikova MG, Konstantinova NV, Mesentsev AS. Sibiromycin: Isolation and Characterization. *Journal Antibiot.* 1972;25(11):668-673.
137. Mesentsev AS, Kuljaeva V, Rubasheva L. Structure of Sibiromycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1974;27(11):866-873.
138. Arima K, Kohsaka M, Tamura G, et al. Studies on Tomaymycin, a New Antibiotic. Isolation and Properties of Tomaymycin. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;25(8):437-444. doi:10.7164/antibiotics.25.437
139. Fotso S, Zabriskie TM, Proteau PJ, et al. Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp. *J Nat Prod.* 2009;72(4):690-695. doi:10.1021/np800827w
140. Fotso S, Zabriskie TM, Proteau PJ, et al. Erratum: Limazepines A - F, Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp. (*J. Nat. Prod.* (2009) 72:4 (690-695) DOI: 10.1021/np800827w). *J Nat Prod.* 2016;79(1):259. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01098
141. Kariyone K, Yazawa H, Kohsaka M. The Structures of Tomaymycin and Oxotomaymycin. *Chem Pharm Bull.* 1971;19(11):2289-2293.
142. Hurley LH, Reck T, Langley DR, et al. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antitumor Antibiotics: Relationship of DNA Alkylation and Sequence Specificity to the Biological Activity of Natural and Synthetic Compounds.

- Chem Res Toxicol*. 1988;1(5):258-268. doi:10.1021/tx00005a002
143. Rahman KM, Vassoler H, James CH, Thurston DE. DNA Sequence Preference and Adduct Orientation of Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine Antitumor Agents. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1:427-432. doi:10.1021/ml100131b
 144. Kohn K, Glaubiger D, Spears C. The Reaction of Anthramycin with DNA: II. Studies of Kinetics and Mechanism. *Biochim Biophys Acta - Nucleic Acids Protein Synth*. 1974;361(3):288-302.
 145. Petrussek RL, Anderson GL, Garner TF, et al. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics. Proposed Structures and Characteristics of the *in vitro* Deoxyribonucleic Acid Adducts of Anthramycin, Tomaymycin, Sibiromycin, and Neothramycins A and B. *Biochemistry*. 1981;20(5):1111-1119. doi:10.1021/bi00508a011
 146. Kopka ML, Goodsell DS, Baikalov I, et al. Crystal Structure of a Covalent DNA—Drug Adduct: Anthramycin Bound to C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and a Molecular Explanation of Specificity. *Biochemistry*. 1994;33(46):13593-13610. doi:10.1021/bi00250a011
 147. Kotecha M, Kluza J, Wells G, et al. Inhibition of DNA Binding of the NF-Y Transcription Factor by the Pyrrolobenzodiazepine-Polyamide Conjugate GWL-78. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(5):1319-1328. doi:10.1158/1535-7163.mct-07-0475
 148. Susan B, Horwitz, Chang SC, Grollman AP. Chemosterilant Action of Anthramycin: A Proposed Mechanism. *Science (80)*. 1971;174(4005):159-161.
 149. Reid JM, Buhrow SA, Kuffel MJ, et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism of the Dimeric Pyrrolobenzodiazepine SJG-136 in Rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(3):777-786. doi:10.1007/s00280-010-1517-4
 150. Chou Y, Chandru G, Chen C, et al. Design and Synthesis of Pyrrolobenzodiazepine-Gallic Hybrid Agents as p53-Dependent and -Independent Apoptogenic Signaling in Melanoma Cells. *Eur J Med Chem*. 2016;109:59-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.12.039
 151. Thurston DE. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. *Br J Cancer*. 2007;97(12):2007. doi:10.1038/sj.bjc.6604075
 152. Hurley LH, Gairola C, Das NV. Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics. Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic 11-Demethyltomaymycin and Its Biologically Inactive Metabolite Oxotomaymycin by *Streptomyces achromogenes*. *Biochemistry*. 1976;15(17):3760-3769. doi:10.1021/bi00662a019
 153. Thurston DE, Bose DS, Howard PW, et al. Effect of A-Ring Modifications on the DNA-Binding Behavior and Cytotoxicity of Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *J Med Chem*. 1999;42(11):1951-1964. doi:10.1021/jm981117p
 154. Jackson PJM, James CH, Jenkins TC, et al. Computational Studies Support the Role of the C7-Sibirosamine Sugar of the Pyrrolobenzodiazepine (PBD) Sibiromycin in Transcription Factor Inhibition. *ACS Chem Biol*. 2014;9(10):2432-2440. doi:10.1021/cb5002203
 155. Puwada MS, Hartley JA, Jenkins TC, Thurston DE. A Quantitative Assay to Measure the Relative DNA-Binding Tumour Antibiotics Based on the Inhibition of Restriction Endonuclease BamHI. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(16):3671-3675.
 156. Gregson SJ, Howard PW, Barcella S, et al. Effect of C2/C3-Endo Unsaturation on the Cytotoxicity and DNA-Binding Reactivity of Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2000;10(16):1849-1851. doi:10.1016/S0960-894X(00)00351-6
 157. Wells G, Martin CRH, Howard PW, et al. Design, Synthesis, and Biophysical and Biological Evaluation of a Series of Pyrrolobenzodiazepine-Poly(N-methylpyrrole) Conjugates. *J Med Chem*. 2006;49(18):5442-5461. doi:10.1021/jm051199z
 158. Rahman KM, Jackson PJM, James CH, et al. GC-Targeted C8-Linked Pyrrolobenzodiazepine – Biaryl Conjugates with Femtomolar *in vitro* Cytotoxicity and *in vivo* Antitumor Activity in Mouse Models. *J Med Chem*. 2013;56(7):2911-2935. doi:10.1021/jm301882a
 159. Farmer JD, Gustafson GR, Conti A, et al. DNA Binding Properties of a New Class of Linked Anthramycin Analogs. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(4):899-903. doi:10.1093/nar/19.4.899
 160. Bose DS, Thompson AS, Ching J, et al. Rational Design of a Highly Efficient Irreversible DNA Interstrand Cross-Linking Agent Based on the Pyrrolobenzodiazepine Ring System. *J Am Chem Soc*. 1992;114(12):4939-4941. doi:10.1021/ja00038a089
 161. Gregson SJ, Howard PW, Hartley JA, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Pyrrolobenzodiazepine DNA-Interactive Agent with Highly Efficient Cross-Linking Ability and Potent Cytotoxicity. *J Med Chem*. 2001;44(5):737-748. doi:10.1021/jm001064n
 162. Hartley J, Spanswick V, Brooks N, et al. SJG-136 (NSC 694501), a Novel Rationally Designed DNA Minor Groove Interstrand Cross-Linking Agent with Potent and Broad Spectrum Antitumor Activity. Part 1: Cellular Pharmacology, *in vitro* and Initial *in vivo* Antitumor Activity. *Cancer Res*. 2004;64(18):6693-6699. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2941
 163. Rahman KM, Rosado H, Moreira JB, et al. Antistaphylococcal Activity of DNA-Interactive Pyrrolobenzodiazepine (PBD) Dimers and PBD-Biaryl Conjugates. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1683-1696. doi:10.1093/jac/dks127
 164. Gregson SJ, Howard PW, Thurston DE. Synthesis of the First Examples of A-C8/C-C2 Amide-Linked Pyrrolo [2,1-c][1,4]benzodiazepine Dimers. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:2277-2280. doi:10.1016/S0960-894X(03)00436-0
 165. Hartley JA, Flynn MJ, Bingham JP, et al. Pre-Clinical Pharmacology and Mechanism of Action of SG3199, the Pyrrolobenzodiazepine (PBD) Dimer Warhead Component of Antibody-Drug Conjugate (ADC) Payload Tesirine. *Sci Rep*. 2018;8(10479).
 166. Kemp GC, Tiberghien AC, Patel N., et al. Synthesis and *in vitro* Evaluation of SG3227, a Pyrrolobenzodiazepine Dimer Antibody-Drug Conjugate Payload Based on Sibiromycin. *Bioorganic Med*

- Chem Lett.* 2017;27(5):1154-1158. doi:10.1016/j.bmcl.2017.01.074
167. Rudin CM, Pietanza MC, Bauer TM, et al. Rovalpituzumab Tesirine, a DLL3-Targeted Antibody-Drug Conjugate, in Recurrent Small-Cell Lung Cancer: a First-in-Human, First-in-Class, Open-Label, Phase 1 Study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):42-51. doi:10.1016/S1470-2045(16)30565-4
 168. Wu J, Clingen PH, Spanswick VJ, et al. γ -H2AX Foci Formation as a Pharmacodynamic Marker of DNA Damage Produced by DNA Cross-Linking Agents: Results from 2 Phase I Clinical Trials of SJG-136 (SG2000). *Clin Cancer Res.* 2013;19(3):721-730. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2529
 169. Zlatopolskiy BD, De Meijere A. First Total Synthesis of Hormaomycin, a Naturally Occurring Depsipeptide with Interesting Biological Activities. *Chem - A Eur J.* 2004;10(19):4718-4727. doi:10.1002/chem.200400249
 170. Omura S, Mamada H, Wang N-J, et al. Takaokamycin, a New Peptide Antibiotic Produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo).* 1984;37:700-705.
 171. Cai X, Teta R, Kohlhaas C, et al. Manipulation of Regulatory Genes Reveals Complexity and Fidelity in Hormaomycin Biosynthesis. *Chem Biol.* 2013;20(6):839-846. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.018
 172. Bae M, Chung B, Oh KB, et al. Hormaomycins B and C: New Antibiotic Cyclic Depsipeptides from a Marine Mudflat-Derived *Streptomyces* sp. *Mar Drugs.* 2015;13(8):5187-5200. doi:10.3390/md13085187
 173. Otoguro K, Isjiyama A, Kobayashi M, et al. *In vitro* and *in vivo* Antimalarial Activities of a Non-glycosidic 18-Membered Macrolide Antibiotic, Borrelidin, against Drug-resistant Strains of *Plasmodia*. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;56(8):727-729. doi:10.7164/antibiotics.56.727
 174. Andres N, Wolf H, Zahner H, et al. Hormaomycin, a Novel Peptide Lactone with Morphogenetic Activity on *Streptomyces*. *Helv Chim Acta.* 1989;72(3):3426-3437.
 175. Andres N, Wolf H, Zaehner H. Hormaomycin, a New Peptide Lacton Antibiotic Effective in Inducing Cytodifferentiation and Antibiotic Biosynthesis in Some *Streptomyces* Species. *Zeitschrift fuer Naturforschung Sect C.* 1990;45(7-8):851-855.
 176. Kozhushkov SI, Zlatopolskiy BD, Brandl M, et al. Hormaomycin Analogues by Precursor-Directed Biosynthesis – Synthesis of and Feeding Experiments with Amino Acids Related to the Unique 3-(trans-2J-Nitrocyclopropyl) alanine Constituent. *European J Org Chem.* 2005;(5):854-863. doi:10.1002/ejoc.200400608
 177. Zlatopolskiy BD, Radzom M, Zeeck A, Meijere A De. Synthesis and Precursor-Directed Biosynthesis of New Hormaomycin Analogues. *European J Org Chem.* 2006;(6):1525-1534. doi:10.1002/ejoc.200500856
 178. Reinscheid UM, Zlatopolskiy BD, Griesinger C, et al. The Structure of Hormaomycin and One of Its All-Peptide Aza-Analogues in Solution: Syntheses and Biological Activities of New Hormaomycin Analogues. *Chem Eur J.* 2005;11:2929-2945. doi:10.1002/chem.200400977
 179. Terlain B, Thomas J. Constitution of Griselimycin, Polypeptide Antibiotic Extracted from Cultures *Streptomyces*. 1. Identification of Substances Obtained by Hydrolysis. *Bull Soc Chim Fr.* 1971;(6).
 180. Fredersdorf M, Kurz M, Bauer A, et al. Conformational Analysis of an Antibacterial Cyclodepsipeptide Active against *Mycobacterium tuberculosis* by a Combined ROE and RDC Analysis. *Chem - A Eur J.* 2017;23(24):5729-5735. doi:10.1002/chem.201605143
 181. Terlain B, Thomas J. Constitution of Griselimycin, Polypeptide Antibiotic Extracted from Cultures of *Streptomyces*. 2. Structure of Griselimycin. *Bull Soc Chim Fr.* 1971;6.
 182. Kling A, Lukat P, Almeida D, et al. Targeting DnaN for Tuberculosis Therapy Using Novel Griselimycins. *Antibiotics.* 2015;348(6239):1106-1112.
 183. Toyohara M. Aspects of the Antituberculous Activity of 27753-RP, a New Demisynthetic Derivative of Griselimycine. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1987;138(6):737-744.
 184. Noufflard G, Loe H, Berteaux S. Experimental Antituberculous Action of a New Antibiotic: RP 11,072. *Rev Tuberc Pneumol.* 1965;29:301-326.
 185. Gademann K, Portmann C. Secondary Metabolites from *Cyanobacteria*: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Curr Org Chem.* 2008;12:326-341.
 186. Fujii K, Sivonen K, Adachi K, Noguchi K. Comparative Study of Toxic and Non-toxic Cyanobacterial Products. *Tetrahedron.* 1997;38(31):5525-5528.
 187. Anas ARJ, Kisugi T, Umezawa T, et al. Thrombin Inhibitors from the Freshwater Cyanobacterium *Anabaena compacta*. *J Nat Prod.* 2012;75(9):1546-1552. doi:10.1021/np300282a
 188. Burja A, Banaigs B, Abou-Mansour E, et al. Marine *Cyanobacteria* – a Prolific Source of Natural Products. *Tetrahedron.* 2001;57:9347-9377.
 189. Golakoti T, Yoshida W, Chaganty S, Moore R. Isolation and Structure Determination of Nostocyclopeptides A1 and A2 from The terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. *J Nat Prod.* 2001;64:54-59.
 190. Liu L, Jokela J, Her L, et al. 4-Methylproline Guided Natural Product Discovery: Co-Occurrence of 4-Hydroxy- and 4-Methylprolines in Nostoweipeptins and Nostopeptolides. *ACS Chem Biol.* 2014;9(11):2646-2655. doi:10.1021/cb500436p
 191. Jokela J, Herfindal L, Wahlsten M, et al. A Novel Cyanobacterial Nostocyclopeptide is a Potent Antitoxin against Microcystins. *Chembiochem.* 2010;11(11):1594-1599. doi:10.1002/cbic.201000179
 192. Teruya T, Sasaki H, Fukazawa H, Suenaga K. Bisebromoamide, a Potent Cytotoxic Peptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp.: Isolation, Stereostructure, and Biological Activity. *Org Lett.* 2009;11(21):5062-5065. doi:10.1021/ol9020546
 193. Fewer DP, Jokela J, Rouhiainen L, et al. The Non-Ribosomal Assembly and Frequent Occurrence of the Protease Inhibitors Spumigins in the Bloom-Forming Cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Mol Microbiol.* 2009;73(5):924-937. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06816.x
 194. Nyfeler R, Keller-Schierlein W. Metabolites of Microorganisms. 143. Echinocandin B, a Novel Polypeptide-

- Antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolation and Structural Components. *Helv Chim Acta*. 1974;57(8):2459-2477.
195. Boeck LD, Kastner RE, Shapiro PEM, Arthur R. Method of Producing the A-30912 Antibiotics. *United State Pat 4288549*. 1981.
 196. Sawistowska-Schröder ET, Kerridge D, Perry H. Echinocandin Inhibition of 1,3- β -D-Glucan Synthase from *Candida albicans*. *FEBS Lett*. 1984;173(1):134-138.
 197. Cacho RA, Jiang W, Chooi YH, et al. Identification and Characterization of the Echinocandin B Biosynthetic Gene Cluster from *Emericella rugulosa* NRRL 11440. *J Am Chem Soc*. 2012;134(40):16781-16790. doi:10.1021/ja307220z
 198. von Traber R, Keller-Justl C, Thom A. 129. Cyclopeptid-Antibiotika aus *Aspergillus*-Arten. Struktur der Echinocandine C und D. *Helv Chim Acta*. 1979;62(129):1252-1267.
 199. Javier F, Ca M, Genilloud O, et al. Cyclic Colisporifungin and Linear Cavinafungins, Antifungal Lipopeptides Isolated from *Colispora cavincola*. *J Nat Prod*. 2015;78(3):468-475. doi:10.1021/np500854j
 200. Festa C, Marino S De, Sepe V, et al. Perthamides C and D, Two New Potent Anti-Inflammatory Cyclopeptides from a Solomon Lithistid Sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron*. 2009;65(50):10424-10429. doi:10.1016/j.tet.2009.10.026
 201. von Tesmar A, Hoffmann M, Pippel J, et al. Total Biosynthesis of the Pyrrolo[4,2]benzodiazepine Scaffold Tomaymycin on an *in vitro* Reconstituted NRPS System. *Cell Chem Biol*. 2017;24(10):1216-1227.e8. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.001
 202. Höfer I, Crüsemann M, Radzom M, et al. Insights into the Biosynthesis of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. *Chem Biol*. 2011;18(3):381-391. doi:10.1016/j.chembiol.2010.12.018
 203. Lukat P, Katsuyama Y, Wenzel S, et al. Biosynthesis of Methyl-Proline Containing Griselimycins, Natural Products with Antituberculosis Activity. *Chem Sci*. 2017;8:7521-7527. doi:10.1039/c7sc02622f
 204. Janata J, Kadlcik S, Koberska M, et al. Lincosamide Synthetase - a Unique Condensation System Combining Elements of Nonribosomal Peptide Synthetase and Mycothiol Metabolism. *PLoS ONE*. 2015;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0118850
 205. Najmanova L, Kutejova E, Kadlec J, et al. Characterization of N-Demethylincosamide Methyltransferases LmbJ and CcbJ. *Chembiochem*. 2013;14:2259-2262.
 206. Peschke U, Schmidt H, Zhang H-Z, Piepersberg W. Molecular Characterization of the Lincomycin-Production Gene Cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol*. 1995;16(6):1137-1156. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02338.x
 207. Koberska M, Kopecky J, Olsovska J, et al. Sequence Analysis and Heterologous Expression of the Lincomycin Biosynthetic Cluster of the Type Strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(5):395-401. doi:10.1007/s12223-008-0060-8
 208. Lin C-I, Sasaki E, Zhong A, Liu H. *In vitro* Characterization of LmbK and LmbO: Identification of GDP-D-erythro- α -Glucosyl- α -D-Glucose as a Key Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2015;136(3):906-909. doi:10.1021/ja412194w.ln
 209. Sasaki E, Lin C, Lin K, Liu H. Construction of the Octose 8-Phosphate Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis: Characterization of the Reactions Catalyzed by LmbR and LmbN. *J Am Chem Soc*. 2012;134(42):17432-17435. doi:10.1021/ja308221z
 210. Kadlcik S, Kucera T, Chalupska D, et al. Adaptation of an L-Proline Adenylation Domain to Use 4-Propyl-L-Proline in the Evolution of Lincosamide Biosynthesis. *PLoS One*. 2013;8(12):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0084902
 211. Ushimaru R, Lin C, Sasaki E, Liu H. Characterization of Enzymes Catalyzing Transformations of Cysteine S-Conjugated Intermediates in the Lincosamide Biosynthetic Pathway. *Chembiochem*. 2016;78712:1606-1611. doi:10.1002/cbic.201600223
 212. Wang M, Zhao Q, Zhang Q, Liu W. Differences in PLP-Dependent Cysteinylation Processing Lead to Diverse. *J Am Chem Soc*. 2016;138:6348-6351. doi:10.1021/jacs.6b01751
 213. Vobruba S, Kamenik Z, Kadlcik S, Janata J. N-Deacetylation in Lincosamide Biosynthesis is Catalyzed by a TldD/PmbA Family Protein. *ACS Chem Biol*. 2020. *V recenzním řízení*.
 214. Hou B, Lin Y, Wu H, et al. The Novel Transcriptional Regulator LmbU Promotes Lincomycin Biosynthesis through Regulating Expression of Its Target Genes in *Streptomyces lincolnensis*. *J Bacteriol*. 2018;200(2):1-17.
 215. Witz DF, Hessler EJ, Miller TL. Bioconversion of Tyrosine into the Propylhygric Acid Moiety of Lincomycin. *Biochemistry*. 1971;10(7):1128-1133. doi:10.1021/bi00783a005
 216. Hurley LH, Zmijewski M, Chang CJ. Biosynthesis of Anthramycin. Determination of the Labeling Pattern by the Use of Radioactive and Stable Isotope Techniques. *J Am Chem Soc*. 1975;97(15):4372-4378. doi:10.1021/ja00848a040
 217. Hurley LH, Lasswell WL, Malhotra RK, Das NV. Pyrrolo[1, 4]benzodiazepine Antibiotics. Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic Sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum*. *Biochemistry*. 1979;18(19):4225-4229. doi:10.1021/bi00586a029
 218. Jiraskova P, Gazak R, Kamenik Z, et al. New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a γ -Glutamyltransferase Cleave the C-C Bond? *Front Microbiol*. 2016;7(MAR):1-14. doi:10.3389/fmicb.2016.00276
 219. Novotna J, Honzatko A, Bednar P, et al. L-3,4-dihydroxyphenyl Alanine-Extradial Cleavage Is Followed by Intramolecular Cyclization in Lincomycin Biosynthesis. *Eur J Biochem*. 2004;271(18):3678-3683. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04308.x

220. Neusser D, Schmidt H, Spizek J, et al. The Genes *ImbB1* and *ImbB2* of *Streptomyces lincolnensis* Encode Enzymes Involved in the Conversion of L-Tyrosine to Propylproline During the Biosynthesis of the Antibiotic Lincomycin A. *Arch Microbiol.* 1998;169(4):322-332. doi:10.1007/s002030050578
221. Connor KL, Colabroy KL, Gerratana B. A Heme Peroxidase with a Functional Role as an L-Tyrosine Hydroxylase in the Biosynthesis of Anthramycin. *Biochemistry.* 2011;50(41):8926-8936. doi:10.1021/bi201148a
222. Novotna J, Olsovska J, Novak P, et al. Lincomycin Biosynthesis Involves a Tyrosine Hydroxylating Heme Protein of an Unusual Enzyme Family. *PLoS One.* 2013;8(12):6-15. doi:10.1371/journal.pone.0079974
223. Colabroy KL, Hackett WT, Markham AJ, et al. Biochemical Characterization of L-DOPA 2,3-Dioxygenase, a Single-Domain Type I Extradiol Dioxygenase from Lincomycin Biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2008;479(2):131-138. doi:10.1016/j.abb.2008.08.022
224. Saha S, Li W, Gerratana B, Rokita SE. Identification of the Dioxygenase-Generated Intermediate Formed During Biosynthesis of the Dihydropyrrole Moiety Common to Anthramycin and Sibiromycin. *Bioorganic Med Chem.* 2015;23(3):449-454. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.024
225. Zhong G, Zhao Q, Zhang Q, Liu W. 4-Alkyl-L-(Dehydro)Proline Biosynthesis in Actinobacteria Involves N-Terminal Nucleophilehydrolase Activity of γ -Glutamyltranspeptidase Homolog for C-C Bond Cleavage. *Nat Commun.* 2017;8:1-10. doi:10.1038/ncomms16109
226. Kamenik Z, Gazak R, Kadlcik S, et al. C-C Bond Cleavage in Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin and Anthramycin Cannot Precede C-Methylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4-7. doi:10.1038/s41467-018-05455-3
227. 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.' *Nat Commun.* 2018;9(1):10-12. doi:10.1038/s41467-018-05455-3
228. Braun SD, Hofmann J, Wensing A, et al. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster for 3-Methylarginine, a Toxin Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(8):2500-2508. doi:10.1128/AEM.00666-09
229. Huang YT, Lyu SY, Chuang PH, et al. *In vitro* Characterization of Enzymes Involved in the Synthesis of Nonproteinogenic Residue (2S,3S)- β -Methylphenylalanine in Glycopeptide Antibiotic Mannopectimycin. *ChemBioChem.* 2009;10(15):2480-2487. doi:10.1002/cbic.200900351
230. Zou X, Huang C, Chan H, et al. Structure and Mechanism of a Nonhaem-Iron SAM-Dependent C-Methyltransferase and Its Engineering to a Hydratase and an O-Methyltransferase. *Acta Crystallogr.* 2014;70(6):1549-1560. doi:10.1107/S1399004714005239
231. Brahme NM, Gonzalez JE, Rolls JP, et al. Biosynthesis of the Lincomycins. 1. Studies Using Stable Isotopes on the Biosynthesis of the Propyl- and Ethyl-L-Hygric Acid Moieties of Lincomycins A and B. *J Am Chem Soc.* 1984;106(25):7873-7878.
232. Kuo MS, Yurek DA, Coats JH, et al. Isolation and Identification of 3-Propylidene- Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylic Acid, a Biosynthetic Precursor of Lincomycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1992;45(11):1773-1777.
233. Castellano I, Merlino A. γ -Glutamyltranspeptidases: Sequence, Structure, Biochemical Properties, and Biotechnological Applications. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(20):3381-3394. doi:10.1007/s00018-012-0988-3
234. Blankfeldt W, Kuzin AP, Skarina T, et al. Structure and Function of the Phenazine Biosynthetic Protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):16431-16436.
235. Parsons JF, Song F, Parsons L, et al. Structure and Function of the Phenazine Biosynthesis Protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(47):12427-12435. doi:10.1021/bi049059z
236. Kamenik Z, Kadlcik S, Gazak R, et al. Diversity of Alkylproline Moieties in Pyrrolobenzodiazepines Arises from Postcondensation Modifications of a Unified Building Block. *ACS Chem Biol.* 2017;12(8):1993-1998. doi:10.1021/acscchembio.7b00335
237. Deutsch A, Smith C, Rushlow K, Kretschmer P. *Escherichia coli* Al-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase: Gene Sequence, Protein Overproduction and Purification. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(19):5753-5763.
238. Hover BM, Kim SH, Katz M, et al. Culture-Independent Discovery of the Malacidins as Calcium-Dependent Antibiotics with Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Nat Microbiol.* 2018;3(4):415-422. doi:10.1038/s41564-018-0110-1
239. Hoffmann D, Hevel JM, Moore RE, Moore BS. Sequence Analysis and Biochemical Characterization of the Nostopeptolide A Biosynthetic Gene Cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene.* 2003;311:171-180. doi:10.1016/S0378-1119(03)00587-0
240. Luesch H, Hoffmann D, Hevel JM, et al. Biosynthesis of 4-Methylproline in Cyanobacteria: Cloning of *nosE* and *nosF* Genes and Biochemical Characterization of the Encoded Dehydrogenase and Reductase Activities. *J Org Chem.* 2003;68(1):83-91. doi:10.1021/jo026479q
241. Becker JE, Moore RE, Moore BS. Cloning, Sequencing, and Biochemical Characterization of the Nostocyclopeptide Biosynthetic Gene Cluster: Molecular Basis for Imine Macrocyclization. *Gene.* 2004;325:35-42. doi:10.1016/j.gene.2003.09.034
242. Jiang W, Cacho RA, Chiou G, et al. EcdGHK are Three Tailoring Iron Oxygenases for Amino Acid Building Blocks of the Echinocandin Scaffold. *J Am Chem Soc.* 2013;135(11):4457-4466. doi:10.1021/ja312572v
243. Kamenik Z, Kopecky J, Mareckova M, Ulanova D. HPLC-Fluorescence Detection Method for Determination of Key Intermediates of the Lincomycin Biosynthesis in Fermentation Broth. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(6-7):1779-1787. doi:10.1007/s00216-009-2605-3
244. Kadek A, Mrazek H, Halada P, et al. Aspartic Protease Nepenthesin-1 As a Tool for Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(9):4287-4294. doi:10.1021/ac404076j

245. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
246. Qi D, Scholthof KG. A One-Step PCR-Based Method for Rapid and Efficient Site-Directed Fragment Deletion, Insertion, and Substitution Mutagenesis. *J Virol Methods.* 2008;149(1):85-90. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.002
247. Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA Mutagenesis: An Overview. *Anal Biochem.* 1997;178(254):157-178.
248. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. SLiCE: a Novel Bacterial Cell Extract-Based DNA Cloning Method. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(8):1-10. doi:10.1093/nar/gkr1288
249. Baldwin JE, Bamford SJ, Fryer AM, et al. Towards a Versatile Synthesis of Kainoids I: Introduction of the C-3 and C-4 Substituents. *Tetrahedron.* 1997;53(14):5233-5254.
250. Yoshida K, Takahashi H, Imamoto T. Synthesis of Substituted Benzenes and Phenols by Ring-Closing Olefin Metathesis. *Eur J Chem.* 2008;14(27):8246-8261. doi:10.1002/chem.200800484
251. Bashiri G, Rehan AM, Greenwood DR, et al. Metabolic Engineering of Cofactor F₄₂₀ Production in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One.* 2010;5(12):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0015803
252. Isabelle D, Simpson DR, Daniels L. Large-Scale Production of Coenzyme F₄₂₀-5, 6 by Using *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(11):5750-5755. doi:10.1128/AEM.68.11.5750
253. Teake F, Weber G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. *Biochem J.* 1957;65(1):476-482.
254. Moller M, Denicola A. Study of Protein-Ligand Binding by Fluorescence. *Biochem Mol Biol Educ.* 2002;30(5):309-312.
255. McPherson A. Introduction to Protein Crystallization. *Acta Crystallogr.* 2014;70(1):2-20. doi:10.1107/S2053230X13033141
256. Pflugrath JW. Practical Macromolecular Cryocrystallography IYCr Crystallization Series. *Struct Biol Commun.* 2015;71:622-642. doi:10.1107/S2053230X15008304
257. Davidson VL. Protein-Derived Cofactors Revisited: Empowering Amino Acid Residues with New Functions. *Biochemistry.* 2018;57(22):3115-3125. doi:10.1021/acs.biochem.8b00123
258. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:158-169. doi:10.1093/nar/gkw1099
259. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2004;33(Database issue):D34-D38. doi:10.1093/nar/gki063
260. Gerlt JA, Bouvier JT, Davidson DB, et al. Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A Web Tool for Generating Protein Sequence Similarity Networks. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics.* 2015;1854(8):1019-1037. doi:10.1016/j.bbapap.2015.04.015.Enzyme
261. Altschul S, Gish W, Miller W, et al. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410.
262. Kuo M-ST, Yurek DA, Coats JH, Li GP. Isolation and Identification of 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin, an Unusual Cosynthetic Factor in *Streptomyces*, from *Streptomyces lincolnensis*. *J Antibiot (Tokyo).* 1989;42(475-478).
263. Lukat P, Katsuyama Y, Wenzel S, et al. Biosynthesis of Methyl-Proline Containing Griselimycins, Natural Products with Anti-Tuberculosis Activity. *Chem Sci.* 2017;8(11):7521-7527. doi:10.1039/c7sc02622f
264. Hossain MS, Le CQ, Joseph E, et al. Convenient Synthesis of Deazaflavin Cofactor F_O and Its Activity in F₄₂₀-Dependent NADP Reductase. *Org Biomol Chem.* 2015;13(18):5082-5085. doi:10.1039/C5OB00365B
265. Drenth J, Trajkovic M, Fraaije MW. Chemoenzymatic Synthesis of an Unnatural Deazaflavin Cofactor that Can Fuel F₄₂₀-Dependent Enzymes. *ACS Catal.* 2019;9(7):6435-6443. doi:10.1021/acscatal.9b01506
266. Taylor M, Scott C, Grogan G. F₄₂₀-Dependent Enzymes – Potential for Applications in Biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2013;31(2):63-64. doi:10.1016/j.tibtech.2012.09.003
267. Shah M, Antoney J, Kang S, et al. Cofactor F₄₂₀-Dependent Enzymes: An Under-Explored Resource for Asymmetric Redox Biocatalysis. *Catalysts.* 2019;v tisku.
268. Gaslund S, Institutet K, Institutet K, et al. Protein Production and Purification. *Nat Methods.* 2008;5(2):135-146. doi:10.1038/nmeth.f.202
269. Mohanty AK, Wiener MC. Membrane Protein Expression and Production: Effects of Polyhistidine Tag Length and Position. *Protein Expr Purif.* 2004;33(2):311-325. doi:10.1016/j.pep.2003.10.010
270. Araujo A, Oliva G, Garratt R, et al. Influence of the Histidine Tail on the Structure and Activity of Recombinant Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(2):480-484. doi:10.1006/bbrc.2000.2802
271. Ahmed FH, Mohamed AE, Carr PD, et al. Rv2074 is a Novel F₄₂₀H₂-Dependent Biliverdin Reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* 2016;25:1692-1709. doi:10.1002/pro.2975
272. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis. *Nature.* 2014;475(7356):324-332. doi:10.1038/nature10317
273. Martinez-Limon A, Alriquet M, Lang W, et al. Recognition of Enzymes Lacking Bound Cofactor by Protein Quality Control. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(43):12156-12161. doi:10.1073/pnas.1611994113
274. Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, et al. Proteome-Wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in *Escherichia coli*. *Cell.* 2005;122(2):209-220. doi:10.1016/j.cell.2005.05.028
275. Carvalho H, Meneghini R. Increased Expression and Purification of Soluble Iron-Regulatory Protein 1 from *Escherichia coli* Co-expressing Chaperonins GroES and GroEL. *Brazilian J Med Biol Res.* 2008;41:270-276.
276. Rakitzis ET, Papandreou P. Reactivity of 6-Phosphogluconolactone with Hydroxylamine: The Possible Involvement of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Endogenous Glycation Reactions. *Chem Biol Interact.* 1998;113(3):205-216.
277. Beranek M, Drsata J, Pali V. Inhibitory Effect of Glycation on Catalytic Activity of Alanine Aminotransferase.

- Mol Cell Biochem.* 2001;218:35-39.
278. Kim KM, Yi EC, Baker D, Kam YJ. Posttranslational modification of the N-terminal His Tag Interferes with the Crystallization of the Wild-Type and Mutant SH3 Domains from Chicken src Tyrosine Kinase. *Biol Crystallogr.* 2001;57(Pt-5):759-763.
 279. Oyugi MA, Bashiri G, Baker EN, Johnson-Winters K. Mechanistic Insights into F₄₂₀-Dependent Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase using Isotope Effects and Substrate Inhibition Studies. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1866(2):387-395. doi:10.1016/j.bbapap.2017.08.001.Mechanistic
 280. Greening C, Jirapanjawan T, Afroz S, et al. Mycobacterial F₄₂₀H₂-Dependent Reductases Promiscuously Reduce Diverse Compounds through a Common Mechanism. *Front Microbiol.* 2017;8(May):1-10. doi:10.3389/fmicb.2017.01000
 281. Czekster CM, Vandemeulebroucke A, Blanchard JS. Kinetic and Chemical Mechanism of the Dihydrofolate Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 2011;50(3):367-375. doi:10.1021/bi1016843
 282. Muramatsu H, Mihara H, Kakutani R, et al. The Putative Malate/Lactate Dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Is an NADPH-dependent delta¹-Piperidine-2-Carboxylate/delta¹-Pyrroline-2-Carboxylate Reductase Involved in the Catabolism of D-Lysine and D-Proline. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5329-5335. doi:10.1074/jbc.M411918200
 283. Meneely KM, Lamb AL. Two Structures of a Thiazolanyl Imine Reductase from *Yersinia enterocolitica* (Irp3) Provide Insight for Catalysis and Binding to the Nonribosomal Peptide Synthetase Module of HMWP1. *Biochemistry.* 2013;51(44):9002-9013. doi:10.1021/bi3011016.Two
 284. Meneely KM, Ronnebaum TA, Riley AP, et al. Holo Structure and Steady State Kinetics of the Thiazolanyl Imine Reductases for Siderophore Biosynthesis. *Biochemistry.* 2016;55(38):5423-5433. doi:10.1021/acs.biochem.6b00735
 285. Winzer T, Kern M, King AJ, et al. Morphinan Biosynthesis in Opium Poppy Requires a P450-Oxidoreductase Fusion Protein. *Plant Sci.* 2015;349(6245):309-312.
 286. Klein A, Koch J, Stetter K, Thauer R. Two N5, N10-Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenases in the Extreme Thermophile *Methanopyrus kandleri*: Characterization of the Coenzyme F₄₂₀-Dependent Enzyme. *Arch Microbiol.* 1993;160(3):186-192.
 287. Posner BA, Li L, Bethell R, et al. Engineering Specificity for Folate into Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1996;35(5):1653-1663. doi:10.1021/bi9518095
 288. Escalante-Semerenas J, Rinehart K, Wolfe R. Tetrahydromethanopterin, a Carbon Carrier in Methanogenesis. *J Biol Chem.* 1984;259(15):9447-9455.
 289. Huang M, Hu H, Ma L, et al. Carbon-Carbon Double-Bond Reductases in Nature. *Drug Metab Rev.* 2014;46(3):362-378. doi:10.3109/03602532.2014.910219
 290. Moebius F, Fitzky B, Lee J, et al. Molecular Cloning and Expression of the Human delta⁷-Sterol Reductase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(February):1899-1902.
 291. He X, Zhang B, Tan H. Overexpression of a Sterol C-24 (28) Reductase Increases Ergosterol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 2003;24(28):773-778.
 292. Parham R, Rebeiz CA. Chloroplast Biogenesis: [4-Vinyl] Chlorophyllide a Reductase Is a Divinyl ¹⁴C-Chlorophyllide-Specific, NADPH-Dependent Enzyme. *Biochemistry.* 1992;31:8460-8464. doi:10.1021/bi00151a011
 293. Whitby FG, Phillips JD, Hill CP, et al. Crystal Structure of a Biliverdin IX a Reductase Enzyme – Cofactor Complex. *J Mol Biol.* 2002;319(5):1199-1210. doi:10.1016/S0022-2836(02)00383-2
 294. Rodriguez-Mata M, Frank A, Wells E, et al. Structure and Activity of NADPH-Dependent Reductase Q1EQE0 from *Streptomyces kanamyceticus*, which Catalyses the R-Selective Reduction of an Imine Substrate. *ChemBiochem.* 2013;14(11):1372-1379. doi:10.1002/cbic.201300321
 295. Shrimpton P, Allemann RK. Role of Water in the Catalytic Cycle of *E. coli* Dihydrofolate Reductase. *Protein Sci.* 2002;11(6):1442-1451. doi:10.1110/ps.5060102.N5
 296. Ceh K, Demmer U, Warkentin E, et al. Structural Basis of the Hydride Transfer Mechanism in F₄₂₀-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase. *Biochemistry.* 2009;48(42):10098-10105. doi:10.1021/bi901104d
 297. Hammes-Schiffer S, Watney JB. Hydride Transfer Catalysed by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Dihydrofolate Reductase: Coupled Motions and Distal Mutations. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006;361(1472):1365-1373. doi:10.1098/rstb.2006.1869
 298. Reyes VM, Sawaya MR, Brown KA, Kraut J. Isomorphous Crystal Structures of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Complexed with Folate, 5-Deazafofolate, and 5,10-Dideazatetrahydrofolate: Mechanistic Implications. *Biochemistry.* 1995;34(8):2710-2723. doi:10.1021/bi00008a039
 299. Gutierrez J, Crowder T, Rinaldo-Matthis A, et al. Transition State Analogues of 5'-Methylthioadenosine Nucleosidase Disrupt Quorum Sensing. *Nat Chem Biol.* 2009;5(4):251-257. doi:10.1038/nchembio.153.Transition
 300. Zoi I, Motley M, Antoniou D, et al. Enzyme Homologues Have Distinct Reaction Paths through Their Transition States. *J Phys Chem.* 2015;119(19):3662-3668. doi:10.1021/jp511983h
 301. Ikezawa N, Gopfert JC, Nguyen DT, et al. Lettuce Costunolide Synthase (CYP71BL2) and Its Homolog (CYP71BL1) from Sunflower Catalyze Distinct Regio- and Stereoselective Hydroxylations in Sesquiterpene Lactone Metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286(24):21601-21611. doi:10.1074/jbc.M110.216804
 302. Zhang Y, Dijk ADJ, Scaffidi A, et al. Rice Cytochrome P450 MAX1 Homologs Catalyze Distinct Steps in Strigolactone Biosynthesis. *Nat Chem Biol.* 2014;10(12):1028-1033. doi:10.1038/nchembio.1660
 303. Saleh A, Alvarez-Venegas R, Yilmaz M, et al. The Highly Similar Arabidopsis Homologs of Trithorax ATX1 and ATX2 Encode Proteins with Divergent Biochemical Functions. *Plant Cell.* 2008;20(March):568-579. doi:10.1105/tpc.107.056614

304. Long M, Betran E, Thornton K, Wang W. The Origin of New Genes: Glimpses From the Young and Old. *Nat Rev Genet.* 2003;4(11):865-875. doi:10.1038/nrg1204
305. Carrington Y, Guo J, Le CH, et al. Evolution of a Secondary Metabolic Pathway from Primary Metabolism: Shikimate and Quinate Biosynthesis in Plants. *Plant J cell Mol Biol.* 2018:823-833. doi:10.1111/tpj.13990
306. Herrmann KM, Weaver LM. The Shikimate Pathway. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999;50:473-503.
307. Guo J, Carrington Y, Alber A. Molecular Characterization of Quinate and Shikimate Metabolism in *Populus trichocarpa*. *J Biol Chem.* 2014;289(34):23846-23858. doi:10.1074/jbc.M114.558536
308. Barna T, Messiha HL, Petosa C, et al. Crystal Structure of Bacterial Morphinone Reductase and Properties of the C191A Mutant Enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30976-30983. doi:10.1074/jbc.M202846200
309. McDonagh AF, Palma LA, Schmid R. Reduction of Biliverdin and Placental Transfer of Bilirubin and Biliverdin in the Pregnant Guinea Pig. *Biochem J.* 1981;194(1):273-282.
310. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, et al. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis *in vitro* and in Mice. *PLoS Med.* 2006;3(11). doi:10.1371/journal.pmed.0030466
311. Stover CK, Warrenner P, Vandevanter DR, et al. A Small-Molecule Nitroimidazopyran Drug Candidate for the Treatment of Tuberculosis. *Nature.* 2000;405(6789):962-966.
312. Denny WA. TBA-354: A New Drug for the Treatment of Persistent Tuberculosis. *Chem New Zeal.* 2015:18-22.
313. Singh R, Manjunatha U, Boshoff HIM, et al. PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science (80-).* 2009;322(5906):1392-1395. doi:10.1126/science.1164571.PA-824
314. Lapalikar G, Taylor M, Warden A, et al. F₄₂₀H₂-Dependent Degradation of Aflatoxin and other Furanocoumarins Is Widespread throughout the Actinomycetales. *PLoS One.* 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0030114
315. Takeo MA, Abe YO, Negoro SE, Heiss GE. Simultaneous Degradation of 4-Nitrophenol and Picric Acid by Two Different Mechanisms of *Rhodococcus* sp. PN1. *J Chem Eng Japan.* 2015;36(10):1178-1184. doi:10.1252/jcej.36.1178
316. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow. *Nature.* 2001;409:258-268.
317. McCormick R, Hirsch U, Sjolander N, Doerschuk A. Cosynthesis of Tetracyclines by Pairs of *Streptomyces aureofaciens* Mutants. *J Am Chem Soc.* 1959;492(1):1959-1960. doi:10.1021/ja01503a066

9 PŘÍLOHY

Seznam publikací:

- Different Reaction Specificities of F₄₂₀H₂-Dependent Reductases Facilitate Pyrrolobenzodiazepines and Lincomycin To Fit Their Biological Targets

Lucie Steiningerova, Zdenek Kamenik, Radek Gazak, Stanislav Kadlcik, Ghader Bashiri, Petr Man, Marek Kuzma, Magdalena Pavlikova, and Jiri Janata. *Journal of the American Chemical Society* 2020 142 (7), 3440-3448. DOI: 10.1021/jacs.9b11234.

- C-C Bond Cleavage In Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin and Anthramycin Cannot Preceed C-Methylation

Zdenek Kamenik, Radek Gazak, R, Stanislav Kadlcik, **Lucie Steiningerova**, Vit Rynd, and Jiri Janata. *Nature Communication* 2018 9 (3167). DOI: 10.1038/s41467-018-05455-3.

- New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a Gamma-Glutamyltransferase Cleave the C-C Bond?

Petra Jiraskova, Radek Gazak, Zdenek Kamenik, **Lucie Steiningerova**, Lucie Najmanova, Stanislav Kadlcik, Jitka Novotna, Marek Kuzma, and Jiri Janata. *Frontiers in Microbiology* 2016 7 (276). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00276.