

## 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  $\Delta^1$ -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 reductasy 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 reductasy 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