

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Analýza genů biosyntetického shluku linkomycinu
využitelných pro přípravu hybridních látek**

Mgr. Dana Ulanova

Praha 2009

Tato disertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři sekundárního metabolismu pod odborným vedením Ing. Jiřího Janaty, CSc. v období říjen 2005 – srpen 2009.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR (GA204/04/0801), Grantové agentury Akademie věd ČR (IAA500200810) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (2B08064).

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně a použila jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Dále prohlašuji, že tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného titulu.

V Praze, srpen 2009

.....

Mgr. Dana Ulanova

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za celkové vedení práce, cenné konzultace a rady. Moje velké poděkování za spolupráci patří také všem kolegům:

Mgr. Zdeňku Kameníkovi a RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. za provedení chromatografických analýz a pomoc při interpretaci výsledků,

RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za analýzu vzorků metodou hmotnostní spektrometrie,

Ing. Radku Gažákovi, Ph.D. za chemickou syntézu derivátů prolinu,

RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D., Ing. Janu Kopeckému, Mgr. Ladislavu Čermákovi a Petře Šanderové za spolupráci při testování sbírky půdních kmenů,

Gabriele Novotné, Ph.D. za cenné rady a konzultace týkající se rezistencí u stafylokoků,

Ing. Markétě Jelínkové, CSc. za pomoc při sepisování této práce.

Dále děkuji všem členům Laboratoře sekundárního metabolismu za spolupráci, praktické rady, nápady a především za vytvoření přátelského prostředí, ve kterém se mi krásně pracovalo.

Své rodině děkuji za trpělivost, lásku a podporu během celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. Rod <i>Streptomyces</i>	10
3.1.1. Životní cyklus streptomycet	12
3.1.2. Regulace životního cyklu	12
3.1.3. Genom streptomycet	18
3.2. Sekundární metabolismus streptomycet	21
3.2.1. Definice sekundárního metabolismu	21
3.2.2. Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů	22
3.2.2.1. ppGpp a cAMP	22
3.2.2.2. γ -butyrolaktony	22
3.2.2.3. Dvousložkový fosforylační systém	23
3.2.2.4. AfsK/AfsR serin-threonin kinasy	25
3.2.2.5. Anorganický fosfát	25
3.2.2.6. Dráhově specifické regulační proteiny	27
3.3. Antibiotika – hlavní skupiny antibiotik	28
3.3.1. β -laktamy	30
3.3.2. Makrolidy	30
3.3.3. Tetracykliny	33
3.3.4. Aminoglykosidy	33
3.3.5. Glykopeptidy	33
3.3.6. Linkosamidy	34
3.4. Antibiotika – způsoby vyhledávání nových antibiotik	37
3.4.1. Izolace a kultivace nových producentů	38
3.4.2. Metody nezávislé na kultivaci	39
3.4.3. Analýza sekvencí	42
3.4.4. Cílené zásahy do biosyntézy antibiotik – semisyntetické metody	42
3.4.5. Cílené zásahy do biosyntézy antibiotik – kombinatorní biosyntéza	43
3.5. Biosyntéza antibiotik využitelných pro účely kombinatorní biosyntézy	47
3.5.1. Polyketidová a neribozomálně syntetizovaná peptidová antibiotika	47
3.5.2. Aminokumariny	51
3.6. Biosyntéza linkosamidů	55
3.6.1. Biosyntetická dráha linkosamidů	55
3.6.2. Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu	57
4. MATERIÁL A METODY	62
4.1. Materiál	62
4.1.1. Bakteriální kmeny	62
4.1.2. Plazmidy	63
4.1.3. Enzymy a chemikálie	64
4.1.4. Kultivační média	65
4.1.5. Roztoky a pufrý	67
4.1.6. Komerční soupravy	68
4.2. Metody	68
4.2.1. Kultivace <i>E. coli</i>	68
4.2.2. Příprava kompetentních buněk	68

4.2.3.Transformace <i>E. coli</i> plazmidovou DNA elektroporací.....	69
4.2.4.Transformace <i>E. coli</i> plazmidovou DNA teplotním šokem	69
4.2.5.Kultivace aktinomycet	69
4.2.6.Příprava spor <i>S. lincolnensis</i>	70
4.2.7.Kultivace <i>S. lincolnensis</i> pro sledování produkce linkomycinu.....	70
4.2.8.Kultivace půdních aktinomycet	70
4.2.9.Příprava protoplastů <i>S. lincolnensis</i>	70
4.2.10.Transformace protoplastů <i>S. lincolnensis</i>	71
4.2.11.Transformace <i>S. lincolnensis</i> plasmidovou DNA mezidruhovou konjugací	71
4.2.12.Obohacovací pokusy s mutantními kmeny <i>S. lincolnensis</i>	71
4.2.13.Kultivace <i>K. rhizophila</i>	72
4.2.14.Kultivace klinických izolátů stafylokoků	72
4.2.15.Diskový difuzní test.....	72
4.2.16.Agarová diluční metoda	72
4.2.17.Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou lyzí	73
4.2.18.Izolace plazmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> komerční soupravou	73
4.2.19.Izolace kosmidové DNA komerční soupravou	73
4.2.20.Štěpení DNA pomocí restričních endonukleas	74
4.2.21.Ligace.....	74
4.2.22.Izolace genomové DNA ze streptomycet fenolovou extrakcí	74
4.2.23.DNA elektroforéza	74
4.2.24.Izolace DNA fragmentu z agarosového gelu	75
4.2.25.Polymerasová řetězová reakce.....	75
4.2.26.Koloniová PCR.....	76
4.2.27.Seznam primerů	77
4.2.28.TA klonování	80
4.2.29.Sekvenační analýza.....	81
4.2.30.Metoda inaktivace genů na chromozómu streptomycet.....	81
4.2.31.Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii	85
4.2.32.Stanovení linkomycinu metodou UPLC	85
4.2.33.Stanovení derivátů linkomycinu metodou UPLC.....	86
4.2.34.Stanovení prekurzorů linkomycinu	86
4.2.35.Tenkovrstvá chromatografie	87
4.2.36.Hmotnostní spektrometrie.....	89
4.2.37.SOFTWARE.....	89
5.VÝSLEDKY.....	90
5.1. Inaktivace <i>Imb</i> genů s předpokládanou funkcí.....	90
5.1.1. Mutační analýza genu <i>ImbN</i> a jeho částí.....	90
5.1.1.1.Srovnávací analýza genu <i>ImbN</i> a jeho homologu v <i>ccb</i> shluku	90
5.1.1.2.Inaktivace genu <i>ImbN</i> a jeho částí.....	91
5.1.1.3.Stanovení produkce linkomycinu a jeho prekurzorů	99
5.1.1.4.Testování obnovení produkce linkomycinu	99
5.1.1.5.Nová inaktivace N.....	102
5.1.2. Mutační analýza genů <i>ImbH, K, Q, T, U</i> a <i>V</i>	104
5.1.2.1.Inaktivace genů <i>ImbK, ImbT</i> a <i>ImbV</i>	104
5.1.2.2.Výměna kazety za jizvu u <i>S. lincolnensis</i> $\Delta IH, \Delta Q, \Delta T, \Delta U$ a ΔV	106
5.1.2.3.Stanovení produkce linkomycinu a jeho prekurzorů	106
5.1.2.4.Obohacovací pokusy.....	112
5.1.2.5.Nadprodukce genu <i>ImbU</i>	116
5.2. Cílená manipulace biosyntetické dráhy linkomycinu	117
5.2.1. Mutasyntéza derivátů linkomycinu	117
5.2.2. Testování citlivosti klinických izolátů rodu <i>Staphylococcus</i>	123

5.3. Testování („screening“) sbírky půdních aktinomycet.....	128
5.3.1. Testování kmenů na přítomnost genů rezistence	129
5.3.2. Fylogenetická analýza kmenů.....	131
5.3.3. Testování produkčního potenciálu	131
6.DISKUZE	137
7.ZÁVĚRY	147
8.SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	148
9.PŘÍLOHA.....	162

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ACP – protein nesoucí acyl (**acyl carrier protein**)
- AK – aminokyselina
- BULIN – 4'-butyl-4'-depropylkomycin
- BUPL – 4-L-butylprolin
- CCB – biosyntéza celesticetinu (**celesticetin biosynthesis/biosynthetic**)
- DMSO - demethylsulfoxid
- FLP – rekombinasa (flippase recombination enzyme)
- FRT – místa rozpoznávaná rekombinasou (flippase recognition target sites)
- HPLC – kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
- KLI - klindamycin
- LIN - linkomycin
- LMB – biosyntéza linkomycinu (**lincomycin biosynthesis/biosynthetic**)
- LOD – limit detekce (limit of detection)
- LOQ – limit kvantifikace (limit of quantification)
- MIC – minimální inhibiční koncentrace
- MLS - makrolid, linkosamid a streptogramin B
- MS – hmotnostní spektrometrie
- MTL – methylthiolinkosamid
- NDL – N-demethylinkosamid
- Pb – pár bází
- PCR – polymerázová řetězcová reakce (**polymerase chain reaction**)
- PELIN – 4'-pentyl-4'-depropylkomycin
- PEPL – 4-L-pentylprolin
- PP - fosfopantethein
- PPL – 4-L-propylprolin
- TLC – tenkovrstvá chromatografie (**thin layer chromatography**)
- SPE – extrakce pevné fáze (solid-phase extraction)
- UPLC – kapalinová chromatografie (**ultra-performance liquid chromatography**)

1. ÚVOD

Antibiotika jsou jednou z nejúspěšnějších forem chemoterapie za celou historii lékařství. Krátce po uvedení antibiotik na trh v 40. letech minulého století jejich účinky proti patogenním organizmům byly natolik vysoké, že byla vyslovena myšlenka o ukončení hrozby infekčních onemocnění. Avšak, zanedlouho se objevily první odolné kmeny patogenů, často k více druhům antibiotik najednou. Ke dnešnímu dni byly popsány mechanismy rezistence prakticky ke všem klinicky používaným antibiotikům (D' COSTA *et al.* 2006).

V literatuře bylo popsáno kolem 12 000 antibiotik a jim podobných biologicky aktivních látek. Jednu z největších skupin producentů antibiotik tvoří příslušníci rodu *Streptomyces* a jiné vláknité aktinomycety. Z přirozeně produkovaných biocidních látek vychází více než 100 000 semisyntetických a syntetických derivátů, avšak v praxi se používá pouze 160 z nich (BERDY 2005). Proč jsou nevhodná ostatní přirozená antibiotika nebo jejich deriváty? Důvodem může být nízká účinnost, toxicita, náročná kultivace producentů, složitá chemická syntéza atd.

Vzhledem k rostoucímu počtu rezistentních patogenních kmenů a novým druhům infekce, existuje potřeba neustále hledat a vyvíjet nové antimikrobiální látky. Tyto látky s novými strukturami, které by mohly být aktivní vůči rezistentním bakteriím a mít dobré farmakologické vlastnosti, mohou pocházet z přírodních zdrojů anebo být připraveny modifikací již známých antibiotik (DEMAIN 2009). Modifikace se provádí např. chemickou cestou, která je z hlediska finančních a časových nároků vhodná pro menší úpravy, např. chloraci. Ovšem mnohem elegantnější způsob je produkce nových látek geneticky upraveným mikroorganizmem. Tento přístup samozřejmě vyžaduje nákladný výzkum a vývoj, ale pak takto modifikovaný kmen může produkovat přímo žádoucí látku jen s potřebou minimálních nebo dokonce žádných chemických úprav. Přístup kombinatorní biosyntézy je založen na kombinaci různých genů či drah z různých producentů antibiotik za účelem vzniku hybridních látek s lepšími antimikrobiálními a farmakologickými vlastnostmi. V současné době existuje řada hybridních sloučenin odvozených od klinicky významných makrolidových, peptidových a dalších antibiotik (WALSH 2002).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRACE

Pro úspěšné navržení a přípravu hybridní biosyntetické dráhy je nutné splnit prvotní předpoklad, a tím je dokonalá znalost jednotlivých kroků biosyntézy, včetně jejich regulace. Naše laboratoř se zabývá výzkumem biosyntézy linkosamidových antibiotik za účelem přípravy hybridních látek na jejich bázi.

Cíle předkládané dizertační práce byly:

1. Analýza genů účastnících se biosyntézy jednoho z linkosamidových antibiotik linkomycinu s neznámou nebo předpokládanou funkcí, potenciálně využitelných k přípravě nových látek.
2. Navržení a vyzkoušení metod pro přípravu derivátů linkomycinu, např. mutasyntetický postup.
3. Charakterizace sbírky půdních kmenů jako možného zdroje nových genů sekundárního metabolismu.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Aktinomycety jsou rozsáhlou třídou grampozitivních bakterií, mezi nimiž nacházíme mnoho rodů významných z hlediska lidské činnosti. Aktinomycety nalézáme volně v půdě (*Streptomyces*), jako symbionty vyšších rostlin (*Frankia*), ale také jako patogeny zvířat a člověka (*Mycobacterium*). Název *Actinomycetes*, v překladu „paprsčitá plíseň“, vznikl podle prvního známého zástupce těchto bakterií, který měl mycelium podobné houbovému. Později byly popsány aktinomycety i jiných tvarů. Nejjednodušší tvar mají tyčinky rodu *Corynebacterium*, do kterého patří původce záškrtu *C. diphtheriae* a také průmyslově významný *C. glutamicum*, producent kyseliny glutamové. Ostatní aktinomycety, jako např. mykobakterie, původce tuberkulózy a lepry; streptomycety, známí producenti antibiotik, mají vláknité mycelium.

Většina rodů aktinomycet tvoří spory o různém počtu a morfologii (Obr. 1). Rod *Micromonospora* tvoří na koncích hyf jednotlivé spory, rod *Streptomyces* – dlouhé řetězky spor, rod *Streptosporangium* – sporangium.

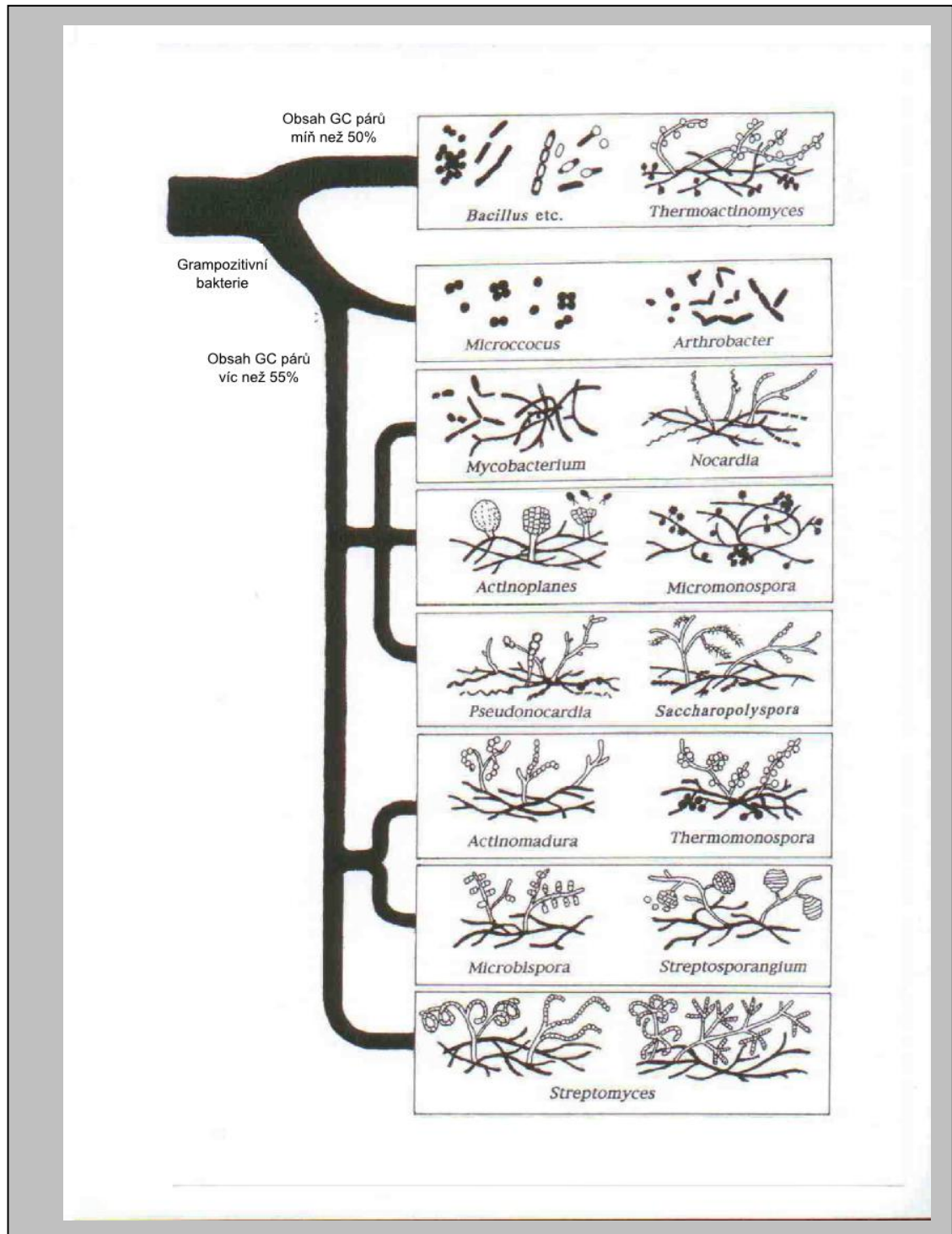
Nukleotidové složení DNA řadí aktinomycety do skupiny bakterií s bohatým zastoupením GC párů.

V další části literárního úvodu se budeme věnovat rodu *Streptomyces*, nejpodrobněji popsanému rodu z třídy aktinomycet.

3.1. Rod *Streptomyces*

Jedním z nejdůležitějších producentů antibiotik je rod *Streptomyces*, jehož zástupci produkují až 95% dnes známých a používaných antimikrobiálních látek.

Poprvé byl tento rod popsán Ferdinandem Cohnem koncem 19. století. Ale název *Streptomyces* zavedl až ve 40 letech minulého století Selman Waksman, kterému patří objev prvního antibiotika uvedeného do klinické praxe – streptomycinu (WAKSMAN *et al.* 1946). Do rodu *Streptomyces* patří přes 500 popsaných druhů. Jsou to aerobní vláknité bakterie se složitým životním cyklem. Nacházíme je většinou v půdě, kde se podílejí na rozkladu organické hmoty, ale také i ve vodě. Do této skupiny patří jak nepatogenní, tak i patogenní druhy. *S. somaliensis* a *S. sudanensis* způsobují mycetomy u lidí, hlavně v afrických zemích, a *S. scabies* je celosvětově známým původcem strupovitosti brambor.



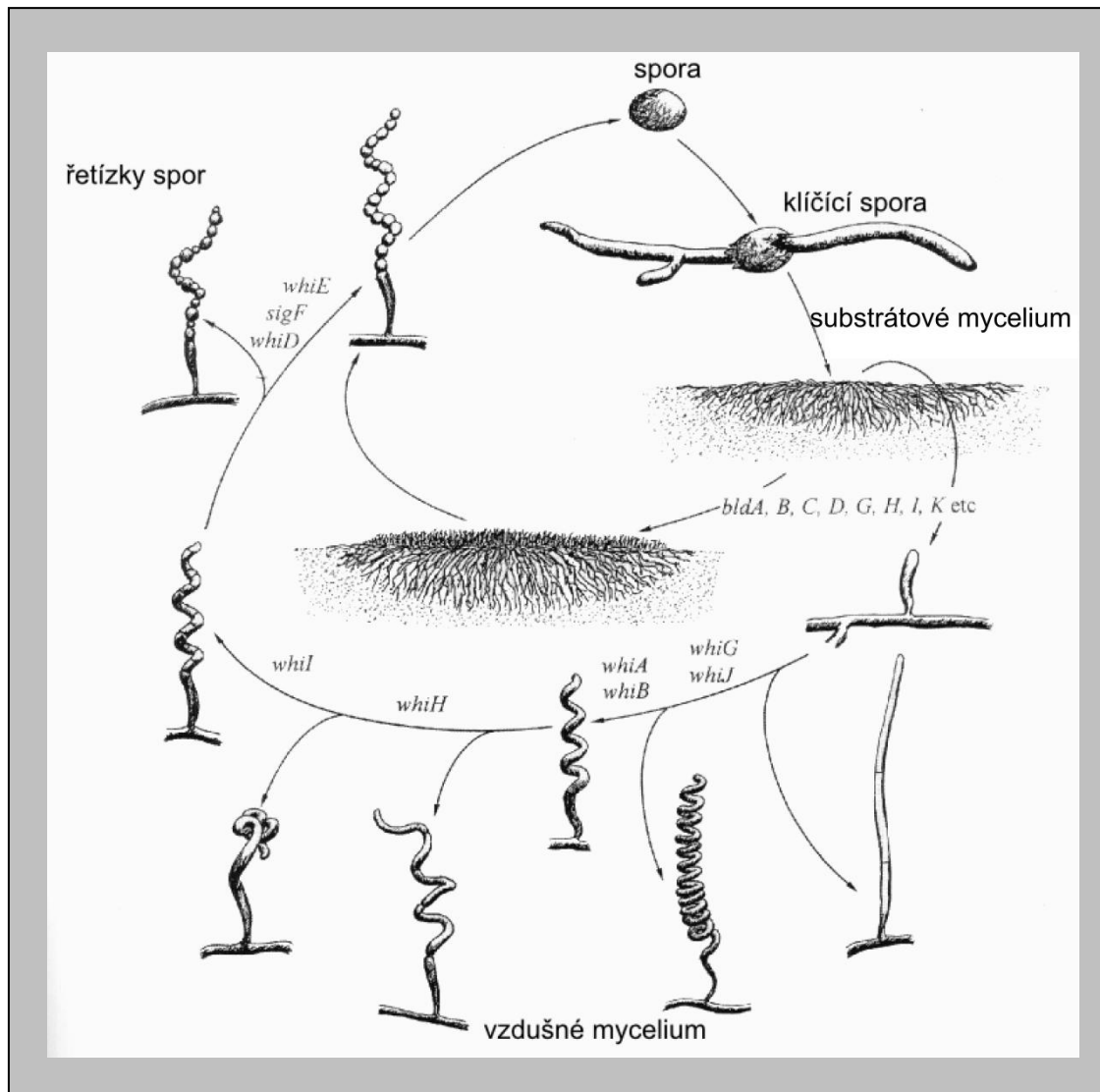
Obr. 1: Strom fylogenetické příbuznosti bakterií s vysokým obsahem GC párů v genomu založený na analýze sekvencí 16S rRNA (MIYADOH 1997).

3.1.1. Životní cyklus streptomycet

Nejvíce prostudovaným a popsáným zástupcem rodu *Streptomyces* je *Streptomyces coelicolor*. Životní cyklus tohoto modelového organismu (Obr. 2) začíná vyklíčením spory jako odpovědí na vysoký obsah rozpustných živin v prostředí. Jedna nebo dvě hyfy rostou apikálním prodlužováním, větví se a dávají vznik substrátovému mnohojadernému myceliu. Po vyčerpání rychle dostupných živin začínají buňky mycelia vylučovat extracelulární enzymy nutné pro rozklad nerozpustných látek. V téže době začíná vznikat vzdušné mycelium a dochází k postupné lyzi buněk substrátového mycelia. Tyto mrtvé buňky pak slouží k výživě nově vznikajícího mycelia. Konce vzdušných hyf se začínají spirálovitě zatáčet a oddělovat jednotlivé chromozómy přepážkami. Po ukončení růstu vzdušného mycelia jsou na koncích hyf řetízky spor, z nichž každá má po jednom chromozómu. Tlustostěnné spory obsahují pigment a jsou odolné vůči vysokým teplotám a vysychání. Spory jsou roznášeny do okolního prostředí větrem a zvířaty (KIESER *et al.* 2000).

3.1.2. Regulace životního cyklu

Vývoj vzdušného mycelia a spor u streptomycet je řízen několika regulačními mechanismy, které dosud nebyly plně objasněny. Kaskáda *bld* genů zpracovává intracelulární a extracelulární signály a má klíčovou úlohu v iniciaci vzniku vzdušných hyf (CHATER 2006). Kmeny *S. coelicolor* s mutacemi v *bld* kaskádě nejsou schopny vytvářet vzdušné mycelium a proto dostaly název *bld* mutanty (*bld* – holý, angl. bald). Zatím bylo popsáno několik *bld* genů patřících do této kaskády (Obr. 2). Gen *bldA* kóduje tRNA, která rozpoznává kodon UUA na mRNA (LAWLOR *et al.* 1987). Kodon UUA je jeden ze šesti kodonů pro leucin, který může být přeložen pouze pomocí tRNA kódované genem *bldA*. Vzhledem k tomu, že je DNA *S. coelicolor* podobně jako u ostatních aktinomycet, bohatá na G a C báze, kombinace TTA se v chromozómu nachází jen vzácně.



Obr. 2: Životní cyklus *Streptomyces coelicolor*.

Ze spory nejdříve vzniká mnohojaderné substrátové mycelium, které se postupně mění na mycelium vzdušné. Ve vzdušném myceliu dochází k oddělování jednotlivých chromozómů přepážkami a vzniku spor. Regulační geny jsou uvedeny u příslušných stadií životního cyklu (převzato z KIESER *et al.* 2000).

Ze 7825 genů *S. coelicolor* pouze 145 obsahuje TTA kodon (BENTLEY *et al.* 2002). V několika případech byla prokázána přítomnost této sekvence u některých genů pro regulaci diferenciaci a produkce antibiotik (NGUYEN *et al.* 2003).

Kaskáda *bld* genů reguluje mimo jiné tvorbu aktivních látek – surfaktantů (**surface active compounds**), které snižují povrchové napětí vody a umožňují tím hyfám vertikální růst. Jedna z těchto látek byla objevena v roce 1993 skupinou z Harvardské univerzity, která popsala jev extracelulární komplementace. Bylo pozorováno, že kmeny s mutacemi v různých *bld* genech získávají schopnost tvorby vzdušného mycelia, pokud rostou v blízkosti divokého kmene *S. coelicolor*, nebo určitých typů *bld* mutantů. Bylo zjištěno, že za tento jev odpovídá extracelulární hydrofobní protein SapB, který difunduje od divokého kmene k mutantům (WILLEY *et al.* 1991, 1993). SapB snižuje povrchové napětí vody ze 72 na 32 mJ/m² a tím napomáhá růstu hyf do výšky. Surfaktanty streptofactin z *S. tendae* a SC3 hydrofobin z vláknité houby *Schizophyllum commune* mohou funkčně nahradit SapB a obnovit tvorbu vzdušného mycelia u *bld* mutantů (TILLOTSON *et al.* 1998). Ovšem aktivní látky surfaktin a fengicin z *Bacillus subtilis* a viskosin z *Pseudomonas* tuto schopnost nemají (RICHTER *et al.* 1998). Pravděpodobným vysvětlením daného jevu může být vlastnost mnoha surfaktantů narušovat integritu cytoplazmatické membrány (WÖSTEN *et al.* 1999).

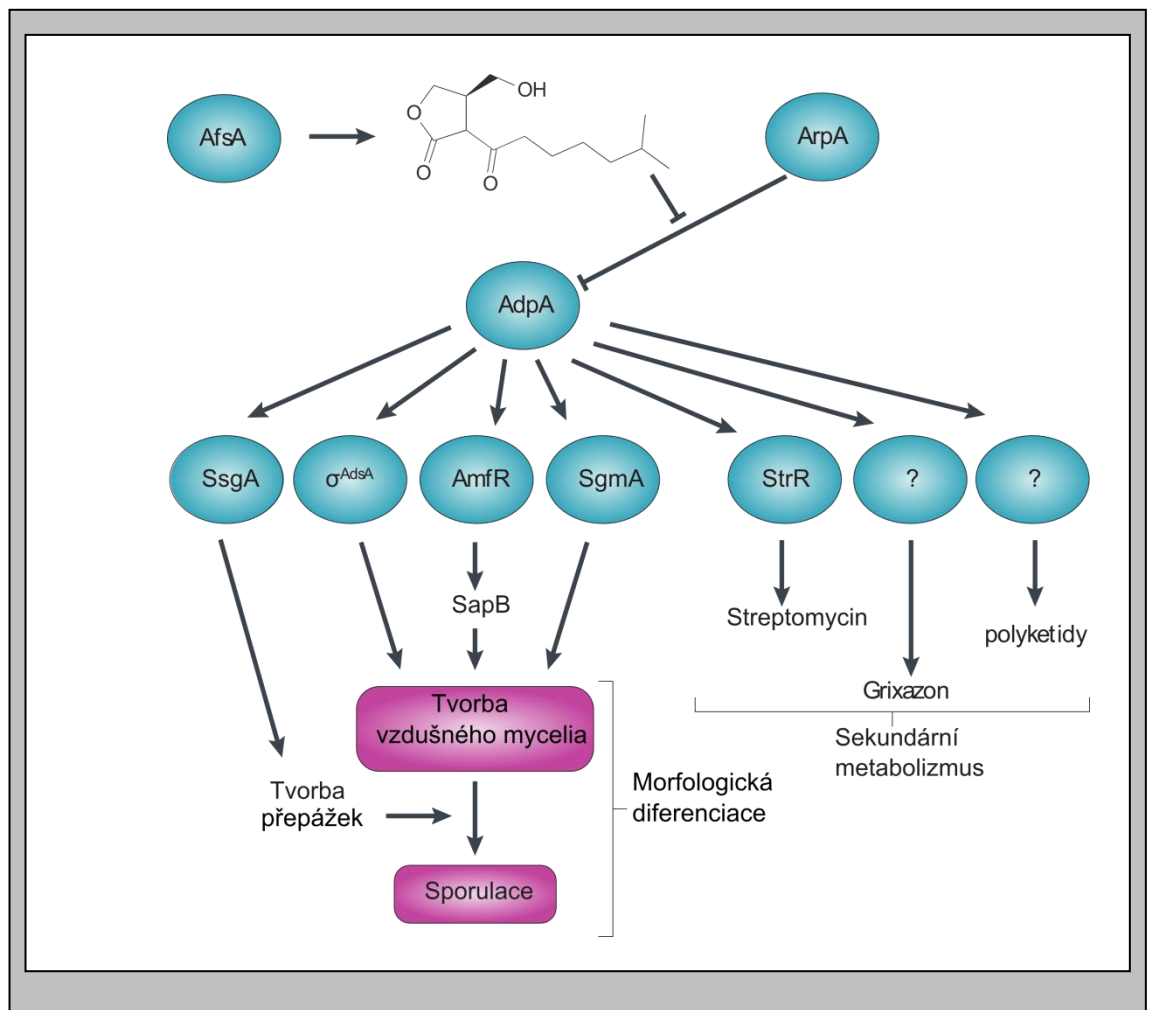
Biosyntéza a transport proteinu SapB jsou kódovány shlukem genů *ram* na chromozómu *S. coelicolor*. Gen *ramS* kóduje preprotein, jehož posttranslační modifikací vzniká protein SapB, strukturně podobný lantibiotikům - skupině peptidových antimikrobiálních látek. Tuto úpravu provádí protein RamC, jehož C konec je homologní s odpovídajícími konci enzymů MrsM a CinM zodpovědnými za modifikace lantibiotik (KODANI *et al.* 2004). Geny *ramAB* kódují ABC transporter a *ramR* – regulační protein. Gen *ramR* je přepisován z vlastního promotoru, protein RamR se pak váže na promotor operonu *ramCSAB*, a tím aktivuje jeho transkripci. Gen *ramR* není přepisován v některých z *bld* mutantů, což poukazuje na jeho závislost na *bld* regulační kaskádě (KEIJSER *et al.* 2002).

Regulační kaskáda *bld* rovněž aktivuje přepis genů *chpE* a *chpH* kódujících jiné povrchově aktivní proteiny, tzv. chapliny. Společně s proteinem SapB se chapliny podílejí na snižování povrchového napětí v okolí kolonie a tím umožňují tvorbu vzdušného mycelia (CLAESSEN *et al.* 2003). Produkce chaplinů není závislá na

složení média na rozdíl od SapB, který je produkován pouze při růstu na komplexním médiu (CLAESSEN *et al.* 2006).

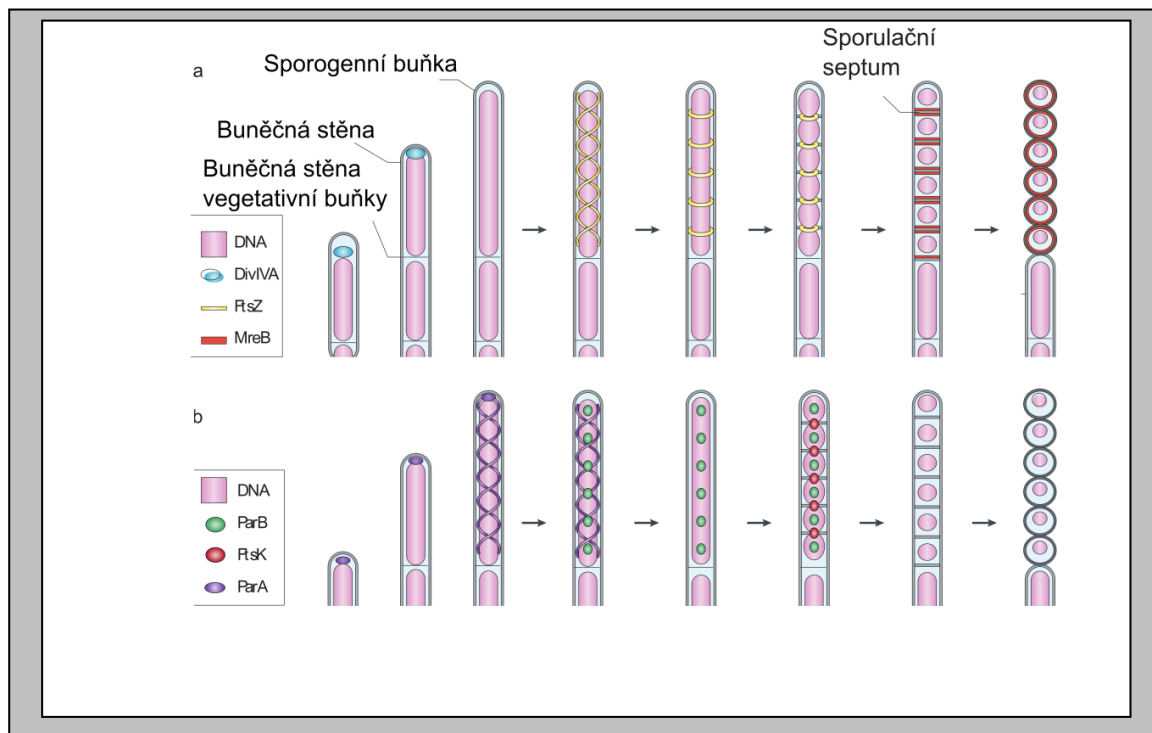
U jiného modelového organismu *Streptomyces griseus* byla popsána další regulační dráha aktivující morfologickou diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů, ve které klíčovou roli hraje tzv. A-faktor (KHOKHOLOV *et al.* 1967). A-faktor patří do rodiny γ -butyrolaktonových signálních molekul a podobně jako jiné molekuly z této rodiny se účastní jevu zvaného quorum sensing. A-faktor vzniká činností enzymu AfsA a jeho koncentrace s časem stoupá. V polovině exponenciální fáze růstu koncentrace A-faktoru dosahuje určité kritické hladiny, při které dochází k vazbě molekuly na represor ArpA, jež se váže na promotorovou oblast genu *adpA* a tím inhibuje jeho transkripci. Gen *adpA* kóduje transkripční faktor, který aktivuje celou řadu proteinů nutných pro zahájení syntézy sekundárních metabolitů a pro správný morfologický vývoj kolonie (HORINOUCI 2002). Nejznámějším cílem aktivatoru AdpA je transkripční faktor StrR, který reguluje biosyntetickou dráhu antibiotika streptomycinu (TOMONO *et al.* 2005). Homology A-faktoru a Adp proteinu byly popsány i u dalších streptomycet (HORINOUCI 2002, 2007, Obr. 3).

Během prvních fází tvorby vzdušného mycelia na koncích hyf dochází ke tvorbě apikální sporogenní buňky. V určité fázi vývoje tato buňka zastaví růst a spustí synchronizované mnohonásobné buněčné dělení. Přechod od apikálního růstu hyf vzdušného mycelia ke sporulaci řídí kaskáda *whi* genů (CHATER 2001). *Whi* geny kódují řadu regulačních proteinů a sigma faktorů, které regulují jednotlivé kroky sporulace. Mutanty *S. coelicolor* defektní v některých z těchto genů tvoří bílé (angl. **white**) vzdušné mycelium, ale nejsou schopny tvorby spor zbarvených šedým pigmentem. Geny *whiA* a *whiG* jsou nezbytné pro zahájení tvorby přepážek ve sporogenní buňce (FLÄRDH a BUTTNER 2009). Důležitou roli při vzniku buněčných přepážek hraje, podobně jako u ostatních bakterií, protein FtsZ (Obr. 4). Tento protein interaguje s transmembranovým proteinem FtsW, který působí jako tzv. membránová kotva pro FtsZ. Ostatní proteiny pomáhající uspořádání FtsZ proteinového komplexu u *E. coli* a *B. subtilis* (FtsA, ZipA, ZapA, ZapB, EzrA a SpoIIE) podle všeho u streptomycet chybí, a zatím nebyly popsány jiné systémy, které je nahrazují (FLÄRDH a BUTTNER 2009).



Obr. 3: Signální kaskáda řízená A-faktorem.

V polovině exponenciální fáze růstu koncentrace se A-faktor váže na represor ArpA, který je navázán na promotorovou oblast genu *adpA*. Gen *adpA* kóduje transkripční faktor, který aktivuje celou řadu proteinů nutných pro zahájení syntézy sekundárních metabolitů a pro správný morfologický vývoj kolonie, např. transkripční faktor StrR pro regulaci biosyntézy antibiotika streptomycinu. Dále to jsou faktory regulující vznik surfaktantu SapB a další proteiny nutné pro morfologickou diferenciaci mycelia (převzato a upraveno z FLÄRDH a BUTTNER 2009).



Obr. 4: Reorganizace buněčných procesů během diferenciace vzdušného mycelia na spory (převzato a upraveno z FLÄRDH a BUTTNER 2009).

a. Uspořádání buněčné stěny a dělení buňky. Během apikálního růstu vzdušná hyfa na koncích obsahuje protein DivIVA. Vznik koncové sporogenní buňky zastavuje růst mycelia. Protein FtsZ se skládá nejdřív do helikálních filament a pak do Z-kruhů, které řídí buněčné dělení. Po vzniku přepážek budoucí spory tvoří tlustou buněčnou stěnu za pomoci bakteriálního aktinu MreB.

b. Segregace chromozómu. ParA ATPasa se nejdřív nachází ve špičkách vzdušných hyf, později se skládá do helikálních filament podél sporogenní buňky. ParB tvoří nukleoproteinové komplexy v oblastech replikačních počátků. FtsK DNA translokasy jsou umístěny u vznikajících přepážek a pomáhají průchodu DNA.

Sporogenní buňka může obsahovat až 50 kopií chromozomální lineární DNA. Za správné umístění a segregaci chromozómů během sporulace odpovídají proteiny ParA, ParB a FtsK. ParB se váže na DNA v okolí *oriC* a tvoří velké nukleoproteinové komplexy. Tyto komplexy jsou s pomocí ParA ATPasy pravidelně distribuovány podél sporogenní buňky tak, že vznikající spory nesou jen jednu kopii chromozómu (Obr. 4) (JAKIMOWICZ *et al.* 2007). Proteiny ParAB jsou regulovány kaskádou *whi* genů (JAKIMOWICZ *et al.* 2006). Další protein – translokasa FtsK – zajišťuje průchod lineární DNA vznikající buněčnou přepážkou. Kmeny s odstraněným genem *ftsK* jsou geneticky velice nestabilní, 71% mutantů obsahuje chromozómy s velkými terminálními delecemi, v některých případech až 10% chromozómu (WANG *et al.* 2007).

3.1.3. Genom streptomycet

Složitá regulace životního cyklu se zákonitě odráží i na genovém vybavení streptomycet. Streptomycety na rozdíl od většiny jiných bakterií mají lineární chromozóm o průměrné velikosti 8 Mb, s vysokým podílem GC párů (více než 70%) (LIN *et al.* 1993). Ke dnešnímu dni byly dokončeny a publikovány tři kompletní sekvence genomů streptomycet, a to *S. coelicolor*, *S. avermitilis* a *S. griseus* (Obr. 5) (BENTLEY *et al.* 2002, IKEDA *et al.* 2003 a OHNISHI *et al.* 2008). Srovnávací sekvenční analýza ukázala, že chromozóm streptomycet se dělí na centrální část o velikosti přibližně 6,5 Mb a ramena – pravé (cca 2 Mb) a levé (cca 1 Mb), dohromady 9,5 Mb (OHNISHI *et al.* 2008). Geny nezbytné pro primární metabolismus a dělení buňky se nacházejí v centrální části chromozómu, která je vysoce konzervovaná a strukturně podobná cirkulárním chromozómům jiných bakterií (IKEDA *et al.* 2003). Naopak neesenciální geny, kódující např. biosyntézu sekundárních metabolitů, jsou zpravidla umístěny na ramenech, což vysvětluje jejich genetickou nestabilitu z důvodu častých rekombinací na koncích chromozómu (CHEN *et al.* 2002). Zajímavostí je, že právě na ramenech se nachází více než polovina genů specifických pro jednotlivé druhy streptomycet, stejně jako většina mobilních elementů, např. transpozónů. Na základě tohoto pozorování se předpokládá, že streptomycety a bakterie s cirkulárním chromozómem mohou pocházet ze společného předka (IKEDA *et al.* 2003). Replikační počátek *oriC* je umístěn uprostřed chromozómu streptomycet a replikace probíhá na obě strany. Na koncích ramen lineárního chromozómu se nacházejí terminální invertované repetice, tzv. telomery, na jejichž 5' konce se vážou

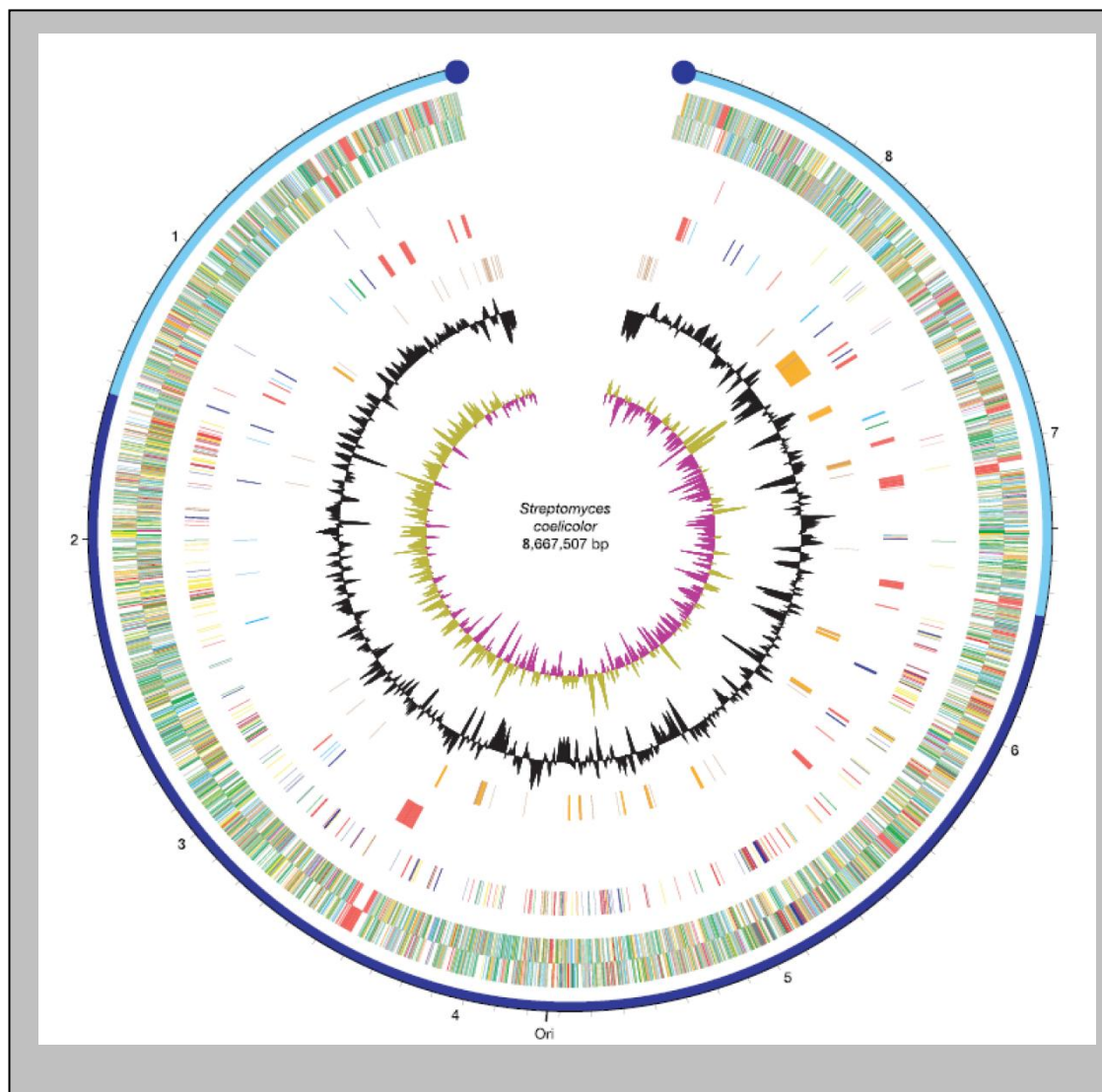
specifické terminální proteiny, které působí jako primery pro dokončení replikace 3' konce (BAO a COHEN 2001).

Jak už bylo uvedeno výše, životní cyklus streptomycet vyžaduje složité regulační mechanismy. Skutečně, až 13% genů *S. coelicolor* kóduje proteiny s regulační funkcí, včetně 65 σ -faktorů, z nichž 45 jsou tzv. ECF (extra cytoplasmic function). ECF σ -faktory odpovídají na externí podněty a aktivují geny účastnící se například tvorby vzdušného mycelia (BENTLEY *et al.* 2002).

Popsané genomy *S. coelicolor* a *S. avermitilis* obsahují také velké množství dvousložkových systémů (BENTLEY *et al.* 2002, IKEDA *et al.* 2003). Dvousložkové systémy se obvykle skládají ze sensorové kinasy, která rozpoznává signály z okolí a předává je na regulační protein, který pak pozitivně nebo negativně ovlivňuje přepis příslušných genů. U *S. coelicolor* bylo identifikováno 85 sensorových kinas a 79 regulátorů odpovědi, včetně 53 párů sensorová kinasa/regulátor odpovědi. Další zajímavostí genomu *S. coelicolor* je přítomnost 44 předpovídaných serin/threonin proteinových kinas. Tyto typicky eukaryotní regulátory jsou dnes sice známy i u jiných bakterií, ale jsou v nich výrazně méně četné.

Dalším zajímavým rysem chromozomu streptomycet je přítomnost genových shluků determinujících syntézu známých i předpovídaných sekundárních metabolitů. Ve všech třech osekvenovaných genomech bylo popsáno víc než dvacet takových shluků, převážně na ramenech chromozómů (BENTLEY *et al.* 2002, IKEDA *et al.* 2003, OHNISHI *et al.* 2008). Tento objev podporuje teorii, že k velké diverzitě sekundárních metabolitů u streptomycet přispívá horizontální genový transfer a výrazná výměna genetického materiálu (DONADIO *et al.* 2002).

U několika druhů streptomycet byla popsána přítomnost lineárních plazmidů (KINASHI 1994). Na koncích plazmidů, podobně jako u chromozómu se nacházejí invertované repete s navazanými terminálními proteiny. Lineární plazmidy o velikosti od několika desítek do několika set tisíc párů bazí často obsahují geny sekundárního metabolismu, včetně biosyntézy antibiotik (KIRBY a HOPWOOD 1977, SUWA *et al.* 2000). Některé plazmidy jsou schopny integrace do chromozómální DNA (HOPWOOD *et al.* 1973), což mohlo mít vliv na evoluční vznik lineárního chromozómu z původního cirkulárního (VOLFF *et al.* 2000).



Obr. 5: Mapa chromozómu *S. coelicolor* (převzato a upraveno z BENTLEY *et al.* 2002).

Vnější kruh číslován (v Mb) proti směru hodinových ručiček a barva označuje centrální část (tmavě modrá) a ramena (světle modrá). Kruhy 1 a 2 (počítáno směrem k centru) označují geny s barevně kódovanou funkcí (černá, energetický metabolismus; červená, přenos informace a sekundární metabolismus; tmavě zelená, povrchově asociované funkce; modrozelená, degradace velkých molekul; tmavě fialová, degradace malých molekul; žlutá, centrální nebo intermediální metabolismus; světle modrá, regulátory; oranžová, konzervované hypotetické geny; hnědá, pseudogeny; světle zelená, neznámé geny; šedá, různé). Kruh 3 označuje vybrané esenciální geny (buněčné dělení, transkripce, translace, biosyntéza aminokyselin) – barevné kódování viz dříve. Kruh 4 označuje vybrané geny „výjimečných situací“ (červená, sekundární metabolismus; světle modrá, exoenzymy; tmavě modrá „konzervon“; zelená; proteiny plynových vezikulů). Kruh 5 zahrnuje mobilní elementy (hnědá, transposasy; oranžová, geny získané pravděpodobně horizontálním přenosem). Kruh 6 označuje G+C obsah. Kruh 7 ($((G-C)/(G+C))$), khaki, hodnoty >1 a růžová hodnoty <1. OriC a terminální protein (modré kroužky) jsou také označeny.

3.2. Sekundární metabolismus streptomycet

3.2.1. Definice sekundárního metabolismu

Sekundární metabolity jsou nízkomolekulární látky, postradatelné pro přežití organismu. Jsou produkovány především bakteriemi, houbami, ale též rostlinami a živočichy. Do skupiny mikrobiálních sekundárních metabolitů patří antibiotika, pigmenty, toxiny, feromony, autoregulační faktory, siderofory a další (DEMAIN 1998). Tyto látky mají různorodou a složitou molekulární strukturu a jsou produkovány specifickými biosyntetickými dráhami, které jsou citlivě řízeny a stimulovány snížením koncentrace živin, přechodem do stacionární fáze růstu a přítomností indukčních látek. Jsou tedy odlišné od drah primárního metabolismu.

Ke dnešnímu dni bylo popsáno 23 000 bioaktivních sekundárních látek, ze kterých 7600 je produkováno zástupci rodu *Streptomyces*. Z toho je 150 látek s antimikrobiálními, protinádorovými, imunosupresivními a jinými funkcemi využíváno v lékařství, zemědělství a průmyslu (BERDY 2005).

Od samého počátku objevu sekundárních metabolitů se diskutuje jejich ekologická role a význam v životním cyklu producentů. Teorie, že to jsou odpadní produkty primárního metabolismu, byla překonána a prohlášena za nevěrohodnou z důvodu složitosti genetických determinant biosyntézy a interakcí různých typů sekundárních metabolitů s cílovými molekulami (WILLIAMS *et al.* 1989). Antibiotika v mikrobiálním společenství mohou hrát roli v kompetičním boji o živiny a přinášet tak selekční výhodu svému producentovi (WIENER 1996). Sekundární metabolity mohou též sloužit jako signální molekuly pro interakci mezi mikroorganismy (HORINOUCHI a BEPPU 1992). Byl také vysloven názor, že antibiotika mají dvojitou funkci, za nízkých koncentrací působí jako regulační molekuly tak, že ovlivňují transkripci a translaci, a za vysokých koncentrací mají antimikrobiální účinky (GOH *et al.* 2002, TSUI *et al.* 2004).

3.2.2. Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů

Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů jsou u bakterií a nižších hub uspořádány ve shlucích. Shluky se ve většině případů nacházejí na chromozómu, ale vzácně také na plazmidech (MARTIN a LIRAS 1989). Každý shluk obsahuje nejen biosyntetické geny, ale též geny udávající resistenci ke kódovanému metabolitu a regulační geny specifické pro danou dráhu. Exprese biosyntetických genů sekundárního metabolismu je obvykle zahájena na začátku stacionární fáze růstu v tekutém médiu nebo morfologické diferenciaci kultury na agaru. Exprese je regulována především na úrovni transkripce a to pomocí jak specifických, tak i centrálních kontrolních okruhů, které často vykazují pleiotropní efekt (BIBB 2005).

3.2.2.1. ppGpp a cAMP

Molekula ppGpp, která funguje jako globální regulátor mnoha buněčných procesů, ovlivňuje také biosyntézu sekundárních metabolitů (CHAKRABURTTY a BIBB 1997, HESKETH *et al.* 2007). Byl prokázán negativní vliv této signální molekuly na produkci kyseliny klavulanové a cefamycinu C u *S. clavuligerus*. Kmeny defektní v genu *relA*, kódujícím syntetasu ppGpp, vykazovaly zvýšenou produkci těchto dvou antibiotik (GOMEZ-ESCRIBANO *et al.* 2008).

Obdobným způsobem - delecí genu zodpovědného za přípravu cyklického AMP - bylo pozorováno pozitivní působení molekuly cAMP na morfologickou diferenciaci a produkci antibiotik u *S. coelicolor* (SÜSSTRUNK *et al.* 1998).

3.2.2.2. γ -butyrolaktony

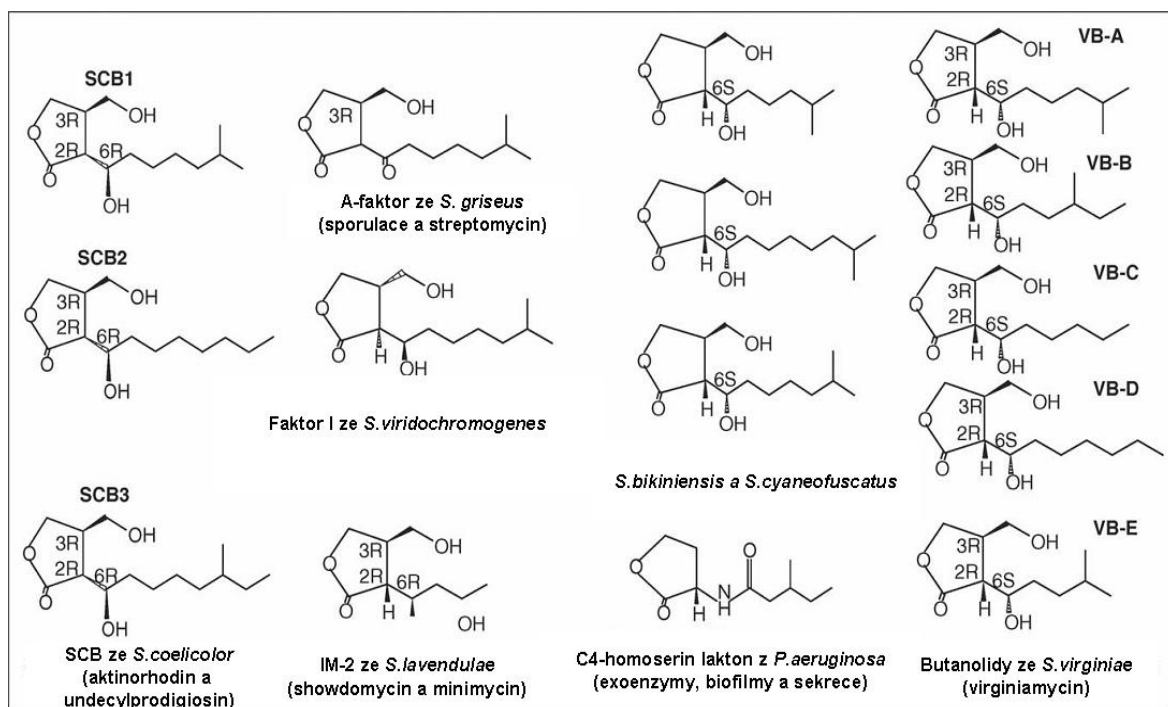
Malé signální molekuly, jako např. γ -butyrolaktony nebo homoserinové laktony, byly popsány u různých druhů bakterií a hrají roli v mnoha fyziologických procesech, jako morfologická diferenciaci, produkce antibiotik, tvorba biofilmu, virulence, atd. (Obr. 6).

Poprvé byla γ -butyrolaktonová signální molekula, A-faktor, objevena u *S. griseus*, kde reguluje sporulaci a produkci antibiotika streptomycinu (Kap. 3.1.2.). Podobné signální látky byly popsány i u jiných streptomycet, např. SCB1 u *S. coelicolor* (TAKANO *et al.* 2000), IM-2 u *S. lavendulae* (RUENGJITCHATCHAWALYA *et al.* 1995) a VB u *S. virginiae* (KINOSHITA *et al.* 1997). U těchto druhů nejsou γ -butyrolaktony nezbytné pro morfologickou diferenciaci a regulují především produkci antimikrobiálních látek.

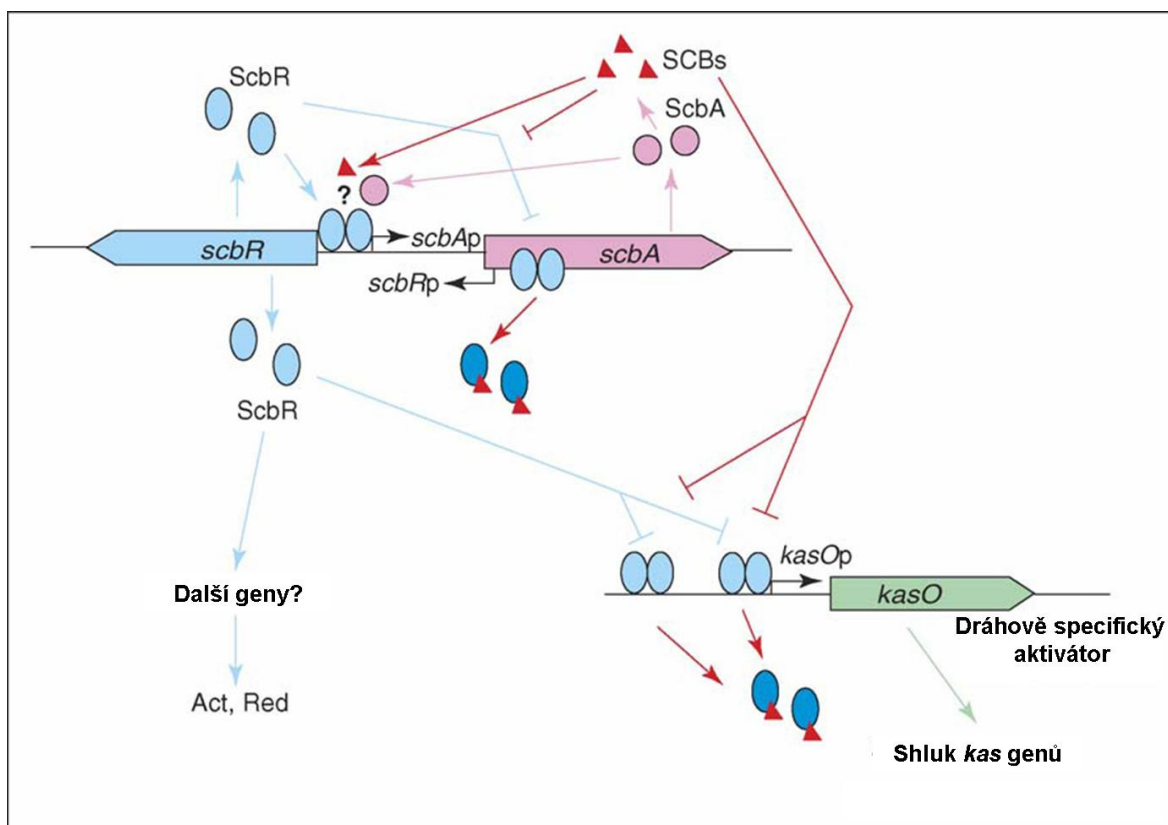
Regulační kaskáda řídící produkci antibiotik pomocí γ -butyrolaktonové signální molekuly byla nejlépe popsána u *S. coelicolor* (Obr. 7). Protein ScbA je klíčovým enzymem biosyntézy molekuly SCB1 a také se předpokládá jeho účast v regulaci produkce této látky. Receptorový protein ScbR v nepřítomnosti SCB1 se váže na vlastní promotorovou oblast a též na promotory regulačních genů pro produkce antibiotik, kde působí jako represor. Po navázání SCB1 se ScbR uvolňuje z těchto oblastí, čímž umožňuje přepis regulačních genů a následnou syntézu antibiotik. Homology ScbA a ScbR byly nalezeny u všech streptomycet, majících γ -butyrolaktonové signální molekuly a také u jiných druhů aktinomycet (TAKANO 2006).

3.2.2.3. Dvousložkový fosforylační systém

Dvousložkové fosforylační systémy bakterií se skládají ze sensorové histidinové kinasy, která zachycuje signály z okolního prostředí a přenáší je dál pomocí fosforylace aspartátového zbytku regulačního proteinu, který negativně či pozitivně reguluje transkripci příslušných genů. Tyto systémy jsou u bakterií velice rozšířeny a byla popsána jejich role v regulaci biosyntézy antibiotik u několika druhů streptomycet. Kinasa AfsQ1 a regulační protein AfsQ2 kladně ovlivňují transkripci genů, kódujících regulační proteiny specifické pro biosyntézu antibiotik aktinorhodinu, undecylprodigiosinu a antibiotika závislého na vápníku u *S. coelicolor* (ISHIZUKA *et al.* 1992, SHU *et al.* 2009), zatímco další systém AbsA1/AbsA2 působí na produkci těchto tří antibiotik negativně (ANDERSON *et al.* 2001, RYDING *et al.* 2002). Podobný systém CutRS negativně ovlivňující biosyntézu aktinorhodinu byl objeven také u *S. lividans* (CHANG *et al.* 1996).



Obr. 6: Ukázky malých signálních molekul z různých druhů bakterií (převzato a upraveno z TAKANO 2006)



Obr. 7: Signální kaskáda spouštěná molekulami SCB a vedoucí k biosyntéze několika antibiotik.

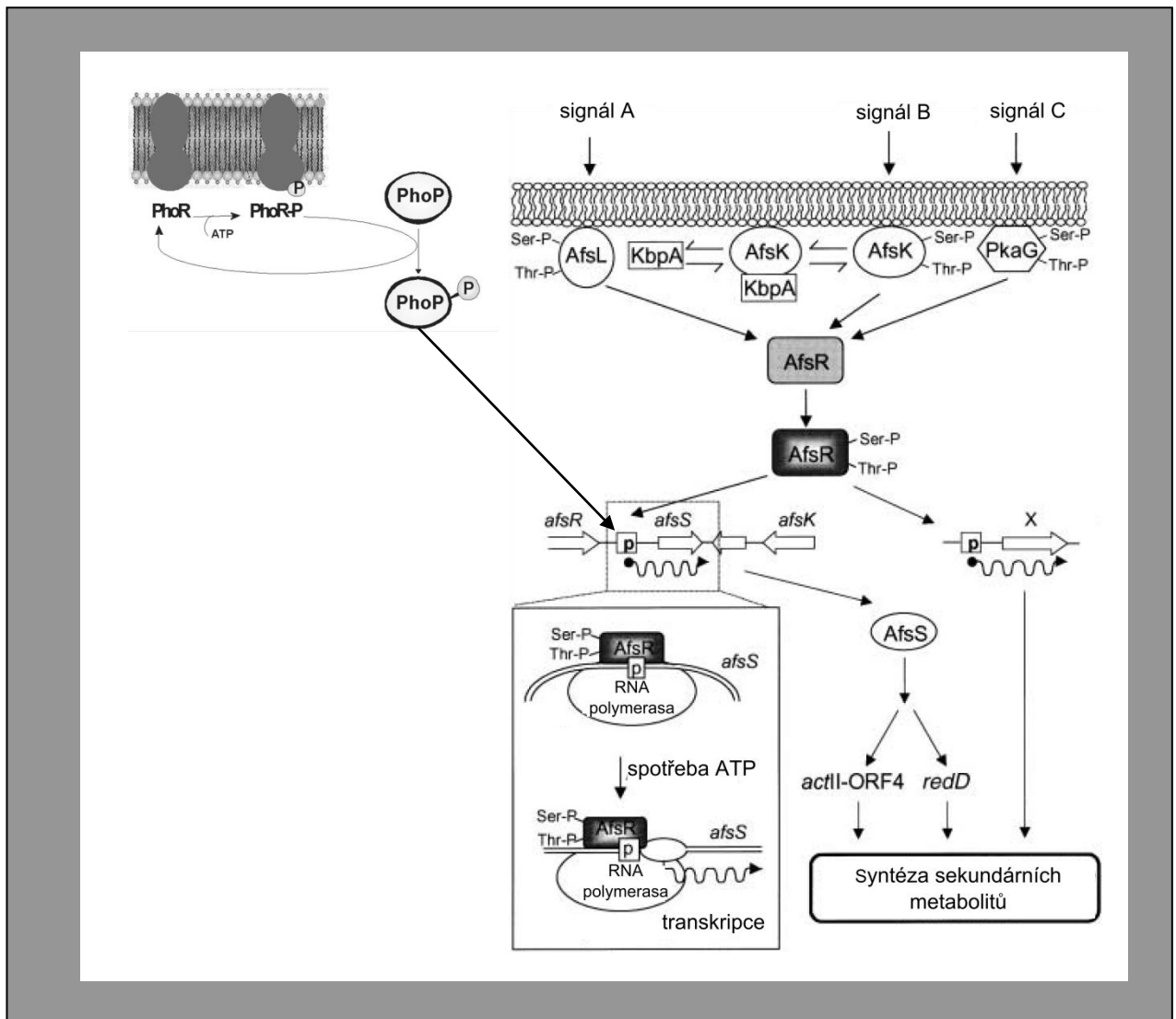
ScbA – účastní se syntézy SCB; ScbR – represor, který se váže na vlastní promotor, promotor genu *scbA* a také na promotorové oblasti dalších regulačních genů (upraveno a převzato z TAKANO 2006).

3.2.2.4. AfsK/AfsR serin-threonin kinasy

Dlouhou dobu se předpokládalo, že signální kaskády serin-threoninových kinas a příslušných regulačních proteinů jsou výlučným jevem u eukaryotních buněk. Ovšem studie posledních let prokázaly přítomnost těchto sensorových kinas i u prokaryot (ZHANG 1996). První sensorovou kinasou s potvrzenou účastí v regulaci sekundárního metabolismu streptomycet je kinasa AfsK. Dvousložkový systém AfsK/AfsR u *S. coelicolor* reguluje pouze tvorbu sekundárních metabolitů, zatímco u *S. griseus* se navíc účastní regulace morfologické diferenciaci (MATSUMOTO *et al.* 1994, UMEYAMA *et al.* 1999). V odpovědi na zatím neznámý vnější signál se tato kinasa, ukotvená na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, autofosforyluje na serinovém a threoninovém zbytku. V zápětí dochází k fosforylaci proteinu AfsR, který v této formě působí jako regulátor transkripce genu *afsS* (LEE *et al.* 2002). AfsS dále ovlivňuje transkripci dalších genu *actII-orf4* a *redD*, účastnících se regulaci biosyntézy antibiotik aktinorhodinu a undecylprodigosinu (FLORIANO a BIBB 1996). Protein KbpA se váže na nefosforylovanou formu proteinu AfsK a brání tak jeho autofosforylaci a to vede ke snížení produkce antibiotika (UMEYAMA a HORINOUCI 2001). Složitost této regulační kaskády je umocněna schopností jiných kinas PkaG a AfsL fosforylovat AfsR a tím zvyšovat jeho vazebnou afinitu k DNA (MATSUMOTO *et al.* 1994). Též se předpokládá, že AfsR mimo gen *afsS* ovlivňuje i další geny pro regulaci syntézy aktinorhodinu (UMEYAMA *et al.* 2002) (Obr. 8).

3.2.2.5. Anorganický fosfát

Vysoké koncentrace anorganického fosfátu v prostředí inhibují produkce sekundárních metabolitů, včetně antibiotik (MARTIN 2004). Zajímavým dvousložkovým systémem objeveným u *S. coelicolor*, *S. lividans* a *S. natalensis* regulujícím produkci antibiotik v závislosti na koncentraci anorganického fosfátu je systém PhoR/PhoP (SOLA-LANDA *et al.* 2003). Při vysoké koncentraci fosfátu v médiu kinasa PhoR fosforyluje protein PhoP, který se pak váže na tzv. PHO sekvenci v promotorových oblastech řady genů jako např. *afsS* gen, jehož produkt ovlivňuje transkripci genů *actII-ORF4* a *redD* pro regulaci syntézy aktinorhodinu a undecylprodigosinu u *S. coelicolor* a *S. lividans* a pimaricinu u *S. natalensis* (SOLA-LANDA *et al.* 2005). Bylo popsáno, že vazebná oblast proteinu PhoP se v promotoru genu *afsS* překrývá s vazebním místem pro AfsR protein.



Obr. 8: Dvousložkové systémy AfsK/AfsR a PhoR/PhoP ze *S. coelicolor* řídící biosyntézu sekundárních metabolitů.

Kinasa AfsK se autofosforyluje na serinovém a threoninovém zbytku. V zápětí dochází k fosforylaci proteinu AfsR, který v této formě působí jako regulátor transkripce genu *afsS*.

AfsS ovlivňuje transkripci genů *actII-orf4* a *redD* regulujících biosyntézu antibiotik aktinorhodinu a undecylprodigiosinu. Protein KbpA brání tak jeho autofosforylaci AfsK, což vede k zastavení fosforylace regulátoru AfsR. Naopak, další kinasy PkaG a AfsL fosforylují AfsR a tím zvyšují jeho vazebnou afinitu k DNA. Předpokládá se, že AfsR mimo gen *afsS* ovlivňuje i další geny pro regulaci syntézy aktinorhodinu. Dalším dvousložkovým systémem, který reguluje transkripci genu *afsS* je PhoR/PhoP systém (převzato a upraveno z UMEYAMA *et al.* 2002, MARTIN 2004).

Proto je pravděpodobná teorie, že PhoP soutěží o vazební místo s pozitivním regulátorem AfsR a tím působí na transkripci genu *afsS* (SANTOS-BENEIT *et al.* 2009, Obr. 8). Kmeny *S. lividans* a *S. natalensis* defektní v genech *phoRP* vykazovaly zvýšenou produkci daných antibiotik ve srovnání s divokým kmenem, což poukazuje na negativní regulaci pomocí PhoP (SOLA-LANDA *et al.* 2003). Naopak, u *S. coelicolor* je pozorován opačný trend - PhoP zde působí na produkci antibiotika pozitivně. Systém PhoPR se neúčastní jen regulace biosyntézy antibiotik, ale též regulace metabolismu dusíku a fosfátu (SANTOS-BENEIT *et al.* 2009).

3.2.2.6. Dráhově specifické regulační proteiny

Geny kódující regulační proteiny specifické pro určitý biosyntetický shluk genů se nacházejí uvnitř nebo v nejbližším okolí tohoto shluku.

Výše uvedené proteiny AfsR, ProP, ACTII-ORF4, RedD a KasO patří do velké skupiny regulačních proteinů řídících biosyntézu antibiotik u streptomycet (***Streptomyces antibiotic regulatory proteins*** - SARPs). Tato skupina je charakteristická přítomností DNA vazebné domény na N-konci, která je strukturně podobná C-koncové doméně regulačního proteinu OmpR z enterobakterií. Dané proteiny podléhají kontrole globálních regulačních drah a vážou se na promotorovou oblast genů pro biosyntézu antibiotik, čímž pozitivně ovlivňují jejich přepis (WIETZORREK a BIBB 1997).

Transkripční aktivator StrR, jehož vlastní transkripce je kontrolována γ -butyrolaktonovou signální kaskádou (Kap. 3.2.2.2.), se váže na konsensus sekvenci GTTCGActG(N)₁₁CagTcGAAC v promotorové oblasti cílových genů pro biosyntézu streptomycinu a tím pozitivně ovlivňuje jejich přepis a produkci antibiotika (RETZLAFF a DISTLER 1995). Homology tohoto proteinu byly nalezeny i u jiných streptomycet, např. NovG u *S. spheroides*, který reguluje biosyntézu novobiocinu (EUSTAQUIO *et al.* 2005b)

Byla popsána skupina proteinů s předpokládanou regulační funkcí, které nesou vzácný TTA kodón (Kap. 3.1.2.). Sem patří např. NovE protein ze novobiocinového shluku (EUSTAQUIO *et al.* 2003, DANGEL *et al.* 2008). Přesná funkce těchto regulačních proteinů zatím nebyla objasněna.

Na závěr této kapitoly je nutné zdůraznit, že znalost regulačních drah je důležitá především pro účinnou modifikaci kmenů produkujících antibiotika.

U některých biosyntetických shluků hladina koncentrace specifických regulačních proteinů je jediným limitujícím faktorem pro začátek genové exprese. Jejich konstitutivní přepis může vést k časnému zahájení produkce a větším výtěžkům antibiotika (GRAMAJO *et al.* 1993, TAKANO *et al.* 1992).

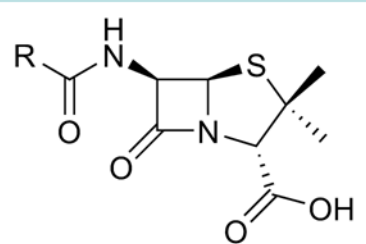
Pomocí delece represoru nebo zvýšení počtů kopií aktivátoru se dá získat kmen s vyšší produkcí žádoucí látky (OLANO *et al.* 2008). Příklady zvýšené produkce antibiotika v přítomnosti více kopií regulačního proteinu ze skupiny SARP byly popsány u producentů aktinorhodinu, undecylprodigiosinu, nikkomycinu, tylosinu a dalších (NARVA a FEITELSON 1990, FERNÁNDEZ-MORENO *et al.* 1991, LIU *et al.* 2005, STRATIGOPOULOS *et al.* 2004). Také globální regulátory, např. AfsS a AfsQ1/AfsQ2, ve vyšším množství mohou zvyšovat produkci aktinorhodinu u *S. coelicolor* (VOGTLI *et al.* 1994, ISHIZUKA *et al.* 1992).

3.3. Antibiotika – hlavní skupiny antibiotik

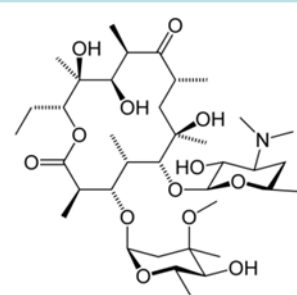
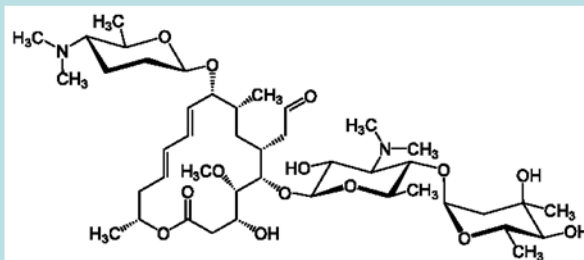
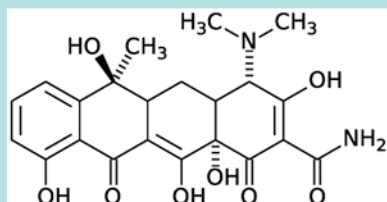
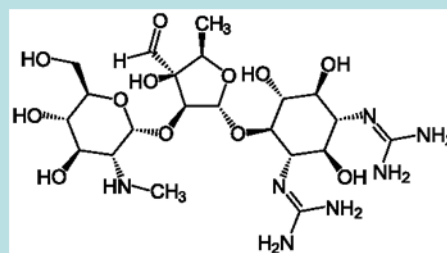
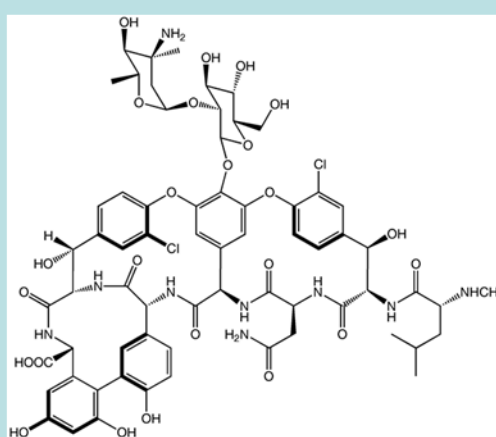
Ke dnešnímu dni bylo popsáno více než 20 000 biologicky aktivních sekundárních metabolitů mikroorganismů. Patří sem antibiotika, imunomodulační látky, inhibitory enzymatické aktivity, pesticidy, insekticidy, potravinové doplňky a další látky. Z toho se v praxi používá 150 - 200 látek, což představuje jen malý zlomek nejen známých, ale i dosud neobjevených biologicky aktivních sloučenin (BERDY 2005, WATVE 2001). Nejvíce bioaktivních látek bylo objeveno u aktinomycet z rodu *Streptomyces* a dále u vzácných aktinomycet, přičemž antibiotika představují značnou část této skupiny látek.

V humánní medicíně se používají jak antibiotika izolována z přirozených producentů, tak i jejich deriváty připravené buď částečnou, nebo úplnou chemickou syntézou, které mají lepší antimikrobiální a farmakokinetické vlastností.

Klinicky nejvýznamnější přírodní antibiotika se podle struktury dají rozdělit do několika skupin (Obr. 9).

**Peniciliny**

(R = CH₂C₆H₅ - penicilin G,
R = CH₂OC₆H₅ - penicilinu V)

**Erythromycin****Spiramycin****Tetracyklin****Streptomycin****Vankomycin****Obr. 9: Zástupci hlavních skupin antibiotik.**

3.3.1. β -laktamy

Do velké skupiny β -laktamových antibiotik patří penicilin a jeho deriváty, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy a inhibitory β -laktámas. Všechny tyto látky spojuje přítomnost β -laktamového jádra v molekule. Cefalosporiny a semisyntetické deriváty penicilinu jsou celosvětově nejvíc prodávanými antibiotiky (WALSH 2003).

β -laktamová antibiotika jsou především používána k léčbě infekcí způsobených grampozitivními mikroorganismy. Širokospektré β -laktamy, jako např. karbapenemy, jsou navíc účinné i proti gramnegativním patogenům.

Tato antibiotika se vážou na transpeptidasy, proteiny zodpovědné za tvorbu peptidových můstků mezi jednotlivými molekulami peptidoglykenu, čímž blokují syntézu buněčné stěny bakterií. Současně činností hydrolas dochází ke štěpení existujícího peptidoglykanu, což vede k lyzi a smrti buňky. Byly popsány dva mechanismy odolnosti bakteriálních buněk vůči působení β -laktamových antibiotik. Nejrozšířenějším mechanismem je přítomnost β -laktamas, které inaktivují antibiotikum štěpením β -laktamového jádra. Proto jsou β -laktamy často aplikovány v kombinaci s inhibitory β -laktamas, např. kyselinou klavulanovou. Dalším mechanismem je mutační změna vazebného místa transpeptidasy, která znemožňuje vazbu antibiotika. Přítomnost takových mutací byla popsána u řady rezistentních kmenů stafylokoků a streptokoků (CHAMBERS 1999).

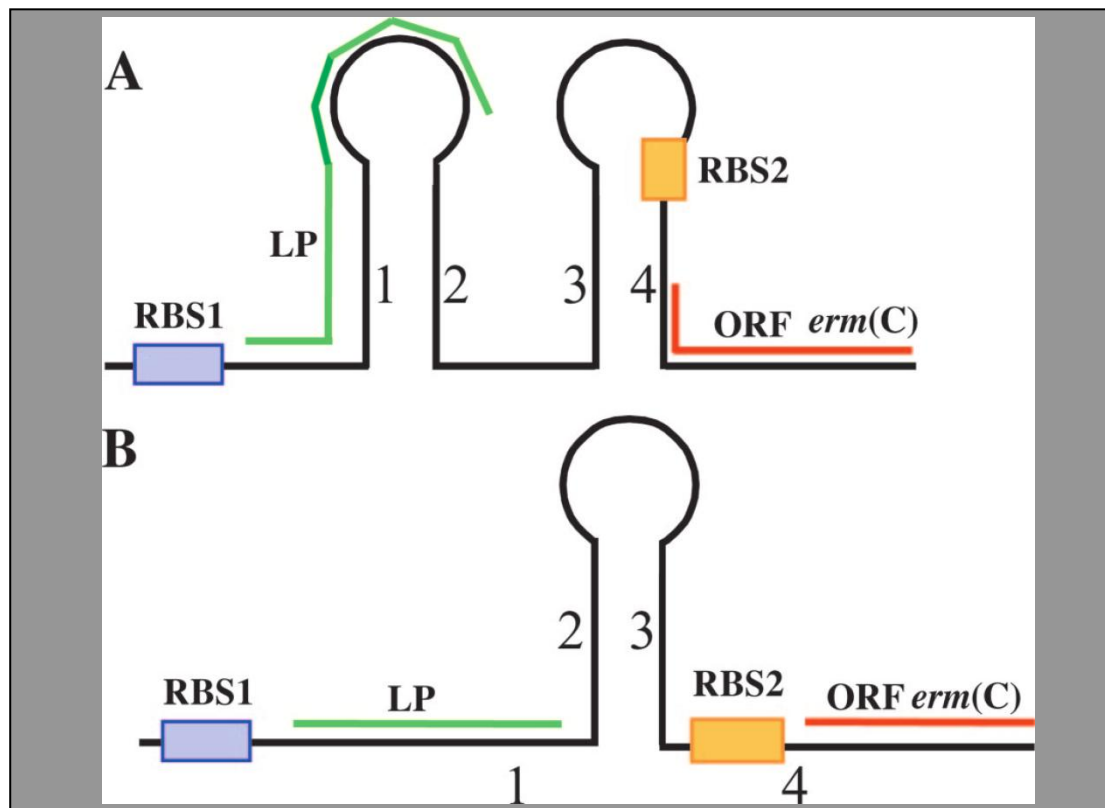
3.3.2. Makrolidy

Další klinicky hojně využívanou skupinou antibiotik jsou makrolidová antibiotika s nejnámějším zástupcem erythromycinem a jeho deriváty - azithromycinem, klarithromycinem a dalšími. Základním rysem struktury makrolidů je přítomnost makrolaktonového kruhu, na které jsou napojené molekuly deoxycukrů, např. desosaminu a kladinosy u erythromycinu. Makrolidová antibiotika se podle počtu uhlíkových atomů v kruhu rozlišují na 14 až 16 členné a patří do skupiny polyketidových sekundárních metabolitů (WALSH 2003).

Makrolidová antibiotika inhibují proteosyntézu vazbou na velkou podjednotku bakteriálního ribozómu, čímž brání translokaci peptidyl-tRNA. Jsou účinné vůči grampozitivním a gramnegativním patogenům rezistentním k penicilinům, a navíc vůči mykoplazmám a chlamydiím.

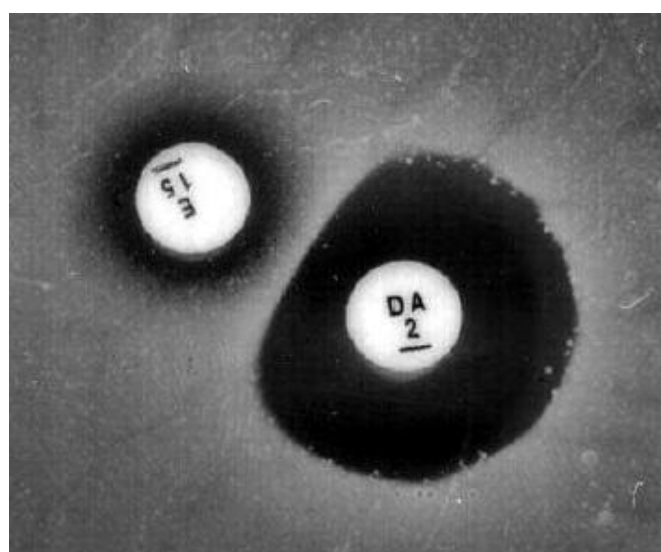
Rezistence k makrolidům je ve většině případů dána činností methyltransferasy methylující adenin v pozici A2058 na 23S ribozomální RNA a znemožňující tím vazbu antibiotika na ribozóm. Tento mechanismus je společný pro rezistence k linkosamidům a streptograminům B, které se také vážou na ribozóm (tzv. MLS rezistence). Varianty genu kódujícího 23S rRNA methyltransferasu, *ermA*, *B* a *C*, byly popsány u různých patogenních mikroorganismů (DEPARDIEU *et al.* 2007).

Studiem genu *ermC* na plazmidu pE194 ze stafylokoků bylo zjištěno, že kmeny nesoucí daný plazmid jsou rezistentní k tzv. indukujícím antibiotikům, jako erythromycin a jeho deriváty, a naopak jsou citlivé k neindukujícím 16ti členným makrolidům, např. spiramycinu, a dále k linkosamidům a streptograminům B (HORINOUCI a WEISBLUM 1980, WEISBLUM 1995). Indukce rezistence probíhá na postranskripční úrovni pomocí mechanismu atenuace translace. Na 5' konci mRNA genu *ermC* se nachází vedoucí sekvence, atenuátor, a čtyři invertované repetice. Invertované repetice v nepřítomnosti indukujícího antibiotika tvoří dvě smyčky tak, že oddělují vazebné místo pro ribozóm od iniciačního kodónu, čímž zabraňují translaci (Obr. 10A). Za nízkých koncentrací erythromycinu dochází k vazbě antibiotika na ribozóm a zastavení jeho funkce. Zastavení činnosti ribozómu navazaného na mRNA *ermC* genu v oblasti vedoucí sekvence vede k destabilizaci a reorganizaci smyček tvořených invertovanými repeticemi. Vzniká alternativní smyčka, která nebrání translaci pomocí ribozómů bez navázaného antibiotika nebo s methylovanou 23S rRNA (Obr. 10B). Na struktuře jednotlivých atenuátorů závisí, které antibiotikum může indukovat rezistenci. Erythromycin indukuje expresi *ermC* a *ermA* genů u stafylokoků, kdežto spiramycin je běžný induktor genů *ermB* u streptokoků a enterokoků (DEPARDIEU *et al.* 2007). Schopnost určitého antibiotika indukovat expresi genu *ermC* může být testována diskovou difuzní metodou: umístění disku s neindukujícím antibiotikem, ke kterému je bakterie citlivá, poblíž disku s induktorem (např. erythromycinem) vede k indukci rezistence a tím i ke vzniku inhibiční zóny růstu ve tvaru písmena D (Obr. 11). U často pasážovaných klinických izolátů byla pozorována konstitutivní rezistence k makrolidům vyvolaná mutacemi nebo delecí oblasti atenuátoru (SCHMITZ *et al.* 2002). Rezistence k makrolidům může být vyvolána i přítomností genu *msrA*, kódujícího ABC transporter pro 14 a 15 členná makrolidová antibiotika z buňky (ROSS *et al.* 1990).



Obr. 10: Alternativní konformace mRNA inducibilně exprimovaného genu *ermC* z plazmidu pE194.

Konformace mRNA v nepřítomnosti A), nebo v přítomnosti B) erythromycinu. RBS, vazebné místo pro ribozóm; LP, kontrolní peptid; ORF, otevřený čtecí rámec; 1, 2, 3, a 4, invertované repetice. Zelená a červená čára, kódující sekvence (převzato z DEPARDIEU *et al.* 2007).



Obr. 11: Diskový indukční test.

DA – klindamycin (2 µg), E – erythromycin (15 µg). Erythromycin indukuje rezistenci u kmene za neindukčních podmínek citlivého ke klindamycinu (převzato z NOVOTNÁ 2007).

3.3.3. Tetracykliny

Tetracykliny jsou polyketidová antibiotika účinná proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím a některým prvokům. V současné době jsou především používána k léčbě akné a ve veterinární medicíně. Tetracykliny inhibují proteosyntézu tak, že se vážou na malou podjednotku bakteriálního ribozómu a brání tím navázání aminoacyl-tRNA. Hlavním mechanismem rezistence vůči tetracyklinům jsou transportní proteiny vylučující antibiotikum z buňky ven (WALSH 2003).

3.3.4. Aminoglykosidy

Nejznámějším zástupcem skupiny aminoglykosidových antibiotik je streptomycin, který se skládá ze tří molekul cukrů: N-methyl-L-glukosaminu, streptosy a streptidinu. Streptomycin a další aminoglykosidy jsou účinné proti gramnegativním bakteriím, např. pseudomonádám, akinetobakteriím a enterobakteriím a také *Mycobacterium tuberculosis*. Antibakteriální působení streptomycinu spočívá ve vazbě antibiotika na malou podjednotku ribozómu, čímž dochází k inhibici translokace peptidyl-tRNA z A místa na místo P a zastavení proteosyntézy. Nejrozšířenějším mechanismem rezistence k aminoglykosidům je modifikace molekuly antibiotika pomocí enzymů N-acetyltransferasy, O-adenyltransferasy a O-fosfotransferasy, což dělá antibiotikum nefunkčním. Dalšími mechanismy jsou transport antibiotika z buňky a mutační změna vazebného místa na ribozómu (WALSH 2003).

3.3.5. Glykopeptidy

Glykopeptidy jsou neribozomálně syntetizované peptidy, ornamentované molekulami cukrů. Klinicky nejvýznamnějšími zástupci jsou vankomycin, teikoplanin a bleomycin. Používají se k léčbě infekcí způsobených grampozitivními koky, často jako antibiotikum „poslední volby“ u multirezistentních patogenů, např. *Staphylococcus aureus* rezistentního k methicilinu (WALSH 2003). Glykopeptidy se vážou na dipeptid D-alanyl – D-alanin v buněčné stěně bakterií a brání tím transpeptidačnímu a transglykosylačnímu spojení jednotlivých molekul peptidoglykanu. Rezistence k vankomycinu je většinou indukována přítomností antibiotika v prostředí. Signál je přenášen pomocí dvoukomponentového systému kinasy VanS a regulačního proteinu VanR. VanR funguje jako transkripční aktivátor shluku genů pro biosyntézu D-alanyl – D-laktátu nebo D-alanyl – D-serinu, které se zabudovávají do buněčné stěny místo dvojice D-alaninů. Takovým způsobem je amidová skupina, důležitá pro vazbu antibiotika, nahrazena skupinou esterovou, což

výrazně snižuje vazebnou afinitu k vankomycinu a zabraňuje jeho interakci s buněčnou stěnou (DEPARDIEU *et al.* 2007, HONG *et al.* 2008).

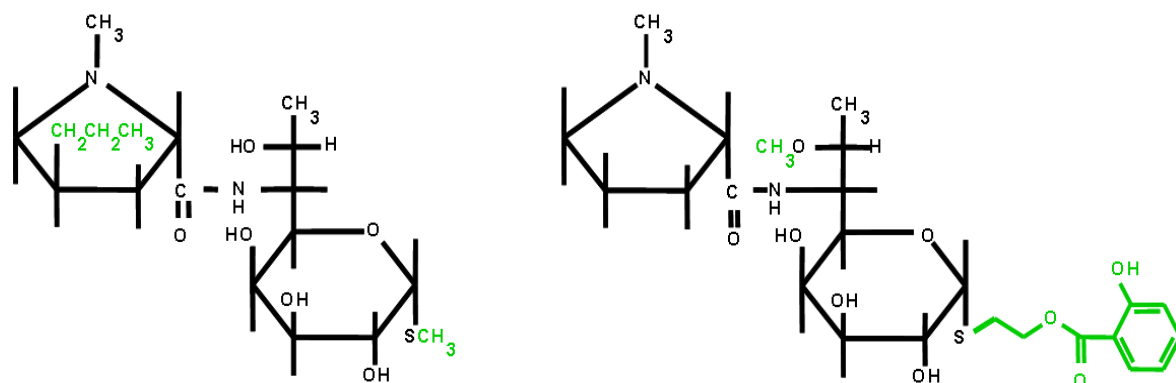
3.3.6. Linkosamidy

Do skupiny linkosamidových antibiotik patří přirozené sloučeniny linkomycin a celesticetin. Klinicky významnější linkomycin A (dále linkomycin) je složen z cukerné a aminokyselinové části (Obr. 12). Cukerná složka linkomycinu, 6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-galaktooktopyranosid, je triviálním názvoslovím označována jako methylthiolinkosamid (MTL) (SCHROEDER *et al.* 1967). K ní je amidovou vazbou připojen aglykon, trans-N-methyl-4-n-propyl-L-prolin, triviálním názvem kyselina propylhygrová (PHA) (MAGERLEIN *et al.* 1967). Molekula celesticetinu má jednak aminocukr s mírně odlišnou ornamentací, než MTL, jednak je v ní místo PHA zabudován prolin. Navíc tato molekula obsahuje salicylátovou složku (Obr. 12) (HOEKSEMA 1968). Linkomycin je klinicky používán proti grampozitivním kokům, např. stafylokokům a streptokokům (SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004a).

Jedním z přirozených derivátů linkomycinu je linkomycin B produkovaný společně s linkomycinem jako minoritní frakce, jehož aglykonem je N-methyl-4-n-ethylprolin. Řada dalších derivátů linkomycinu byla izolována po změně fermentačního média producentů (ARGOUDELIS *et al.* 1970, SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004b).

Velké množství derivátů linkomycinu bylo připraveno též semisyntetickou nebo kompletní chemickou cestou. Tyto deriváty často vykazovaly lepší antimikrobiální účinnost a také farmakologické vlastnosti než linkomycin (MAGERLEIN 1971). Jedním z nejúčinnějších derivátů je klindamycin, připravený záměnou hydroxyskupiny v pozici C7 cukerné části linkomycinu za chlór (Obr. 13).

Klindamycin má širší spektrum účinku a vyšší antimikrobiální aktivitu, než linkomycin. Kromě použití ve stejných případech jako linkomycin, je klindamycin navíc aplikován proti anaerobním mikroorganismům, některým prvokům (*Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*) a v kombinaci s jinými antimalariky při léčbě malárie způsobené *Plasmodium falciparum* (SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004a, KREMSNER a KRISHNA 2004, BORMANN *et al.* 2006).

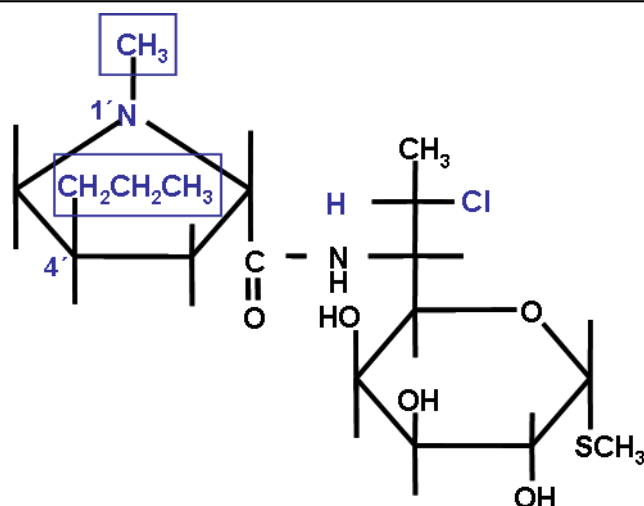


Linkomycin

Celesticetin

Obr. 12: Chemická struktura přirozených linkosamidů linkomycinu A a celesticetinu.

Zeleně jsou označeny skupiny, kterými se molekuly liší.



	<i>Staphylococcus aureus</i> OSU 284	<i>Streptococcus faecalis</i> UC 76
Linkomycin	0,4	12,25
Klindamycin	0,125	6,2
C1' C4'		
-CH ₃ -C ₄ H ₉	0,1	1,6
-CH ₃ -C ₅ H ₁₁	0,05	0,4
-H -C ₃ H ₇	0,05	1,6
-H -C ₄ H ₉	0,05	1,6
-H -C ₅ H ₁₁	0,025	0,05
-H -C ₆ H ₁₃	0,025	0,05

Obr. 13: Chemická struktura klindamycinu a minimální inhibiční koncentrace linkomycinu, klindamycinu a derivátů klindamycinu (převzato z MAGERLEIN 1971).

Mnohem účinnější skupinou látek jsou deriváty klindamycinu, u nichž se místo propylu v pozici C4' nachází delší alkylový řetězec, přičemž nejúčinnějším se ukázaly být deriváty s pětičlenným nebo delším alkylem. Pokud dané deriváty navíc neobsahují methyl na dusíkovém atomu v pozici 1', je jejich antimikrobiální a antimalarická aktivita několikanásobně vyšší, než u methylovaných derivátů (MAGERLEIN a KAGAN 1969). Zajímavostí je, že podobná demethylace v případě linkomycinu vede naopak k významnému poklesu jeho účinnosti (MAGERLEIN 1971).

Dalším semisyntetickým derivátem klindamycinu používaným ve veterinární medicíně je pirlimycin, který obsahuje v aminokyselinové části místo pětičlenného kruhu kruh šestičlenný a je demethylován v pozici 1' (AHONKHAI *et al.* 1982).

Většina derivátů linkomycinu a klindamycinu vyžaduje složitou a nákladnou chemickou syntézu, což limituje jejich zavedení do klinické praxe.

Linkosamidy jsou z pohledu mechanismu účinku, a tedy i rezistence, řazeny do skupiny MLS antibiotik společně s makrolidy a streptograminy B. Antibiotika této skupiny se vážou na velkou podjednotku bakteriálního ribozómu blízko peptidyltransferasového centra katalyzujícího tvorbu peptidových vazeb při elongaci proteinu a způsobují tak disociaci peptidyl-tRNA z ribozómu (TENSON *et al.* 2003).

Mechanismus rezistence k linkosamidům se částečně překrývá s makrolidovými a streptograminovými antibiotiky (viz 3.3.2.). Společným mechanismem je methylace 23S rRNA pomocí RNA monomethyltransferas, jejichž příkladem je LmrB z linkomycinového biosyntetického shluku (PESCHKE *et al.* 1995) a dimethyltransferas, například ErmC stafylokoků (THAKKER-VARIA *et al.* 1985). Specifickým mechanismem rezistence k linkosamidům je naopak modifikace antibiotika pomocí nukleotidyltransferasy kódované genem *lnuA* katalyzující adenylaci linkosamidů (BRISSON-NOEL a COURVALIN 1986).

Rezistence k linkosamidům může být způsobena i aktivním efluxem antibiotika z buňky. Tento typ rezistence je zajištěn dvěma skupinami transportních proteinů.

První je skupina MFS (major facilitator superfamily) transportérů, které pro export látek využívají protonový gradient, a dále ABC (ATP binding cassette) transportéry, které získávají energii pro transport hydrolýzou ATP. Do první skupiny patří protein LmrA a do druhé LmrC. Oba proteiny patří do genového shluku pro biosyntézu linkomycinu (ZHANG *et al.* 1992, PESCHKE *et al.* 1995). U klinických izolátů byl popsán i další ABC transportér Vga_{ALC}, který zprostředkovává aktivní

transport streptograminu A a linkosamidů u *Staphylococcus haemolyticus*. Zajímavým faktem je, že protein Vga_{ALC} se liší od příbuzného transportéru VgaA, udílejícího rezistenci jen k streptograminu A, pouze záměnou sedmi aminokyselin (NOVOTNÁ a JANATA 2006).

3.4. Antibiotika – způsoby vyhledávání nových antibiotik

Rostoucí počet patogenních kmenů, např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* a dalších, rezistentních k používaným antibiotikům, je celosvětovým problémem současné doby. Tyto bakterie mohou být buď přirozeně rezistentní, nebo získat rezistenci z okolního prostředí. Předpokládá se, že se geny pro rezistenci k antibiotikům vyvinuly v environmentálních bakteriálních společenstvích a následně byly přeneseny do patogenních bakterií (MARTINEZ 2009). Zajímavostí je, že geny rezistence k některým antibiotikům objevené u patogenních bakterií se fylogeneticky liší od funkčně podobných genů producentů antibiotik, což poukazuje na jejich odlišný evoluční původ (AMINOV a MACKIE 2007).

Potřeba nových antimikrobiálních látek stále existuje nejen kvůli známým rezistentním patogenům, ale také z důvodu se nově objevujících původců nemocí a toxicity současně používaných přípravků (DEMAIN 2009).

Nyní používaná antibiotika byla převážně objevena v 40. až 70. letech minulého století, tzv. „zlatém věku“ antibiotik izolací mikroorganismů a jejich kultivací klasickými metodami (WALSH 2003). Počet kmenů izolovaných těmito metodami a produkujících zatím nepopsaná antibiotika postupně klesal, což vedlo k zaměření pozornosti na vývoj moderních vysokoúčinných kultivačních, izolačních a molekulárně-biologických přístupů k vyhledávání nových antimikrobiálních látek (KOEHN 2008, DONADIO *et al.* 2009, VAN WEZEL *et al.* 2009)

V současnosti základní výzkum a vývoj antibiotik se stává doménou malých biotechnologických firem a výzkumných institucí. Velké farmaceutické firmy od toho ustupují a investují buď do vylepšení vlastností již známých antibiotik anebo kupují licence na velmi slibné a účinné látky. Důvodem poklesu zájmu jsou vysoké náklady a časové nároky nutné na objev a zavedení nového antibiotika na trh, spojené s rizikem rychlého vzniku rezistence (KATZ *et al.* 2006).

Poslední dobou roste snaha o hledání antimikrobiálních látek působících na jiná zásahová místa, než dosud používaná antibiotika. Byly popsány antibakteriální

sloučeniny negativně působící na syntézu mastných kyselin, dělení bakteriální buňky a také na signální kaskádu pro spouštění virulence (WANG *et al.* 2006, HAYDON *et al.* 2008, RASKO *et al.* 2008).

Velké úsilí se též klade na objevování nových zdrojů antimikrobiálních látek. Mikroorganismy izolované z mořské vody a dalších extrémních lokalit se zdají být slibnými producenty zajímavých bioaktivních látek (Kap. 3.4.1.). Neustálé přibývající údaje o genomech bakterií umožňují vyhledávání shluků genů pro nová, zatím neznámá, antibiotika (Kap. 3.4.2. a 3.4.3.).

Pomocí molekulárně biologických metod mohou být získány látky odvozené z již známých antibiotik, které mají lepší účinnost či nižší toxicitu. Takové látky vznikají buď kombinací chemických a biologických postupů nebo jen pomocí geneticky upraveného producenta (Kap. 3.4.4. a 3.4.5.).

3.4.1. Izolace a kultivace nových producentů

Producenti nyní používaných antibiotik byli z převážné části izolováni z půdního prostředí. Poslední dobou vzrostl počet případů znovuzobjevení známých látek při izolaci dalších kmenů z běžných typů půd. Proto se pozornost obrátila na zatím neprozkoumaná prostředí, jako např. mořská povrchová voda a sedimenty. Byl vysloven názor, že podmínky života v moři se liší od podmínek v půdě, proto mořské mikroorganismy mohou produkovat odlišné sekundární metabolity s novými vlastnostmi (LAM 2006).

Skutečně, mořské aktinomycety se ukázaly být výborným zdrojem nových bioaktivních látek. Tyto aktinomycety byly nalezeny v povrchové mořské vodě, sedimentech a také jako symbionty mořských hub a korálů (JENSEN *et al.* 2005). Za posledních několik let byla izolována celá řada mořských sekundárních metabolitů se zajímavými antimikrobiálními a protinádorovými účinky (LAM 2006). Z tohoto množství se tři látky zdají být nejslibnějšími z hlediska klinického využití. Abyssomicin C inhibuje syntézu kyseliny listové a je účinný vůči grampozitivním bakteriím včetně rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (BISTER *et al.* 2004). Širokospektré antibiotikum diazepinomicin má také protinádorové a protizánětlivé účinky (CHARAN *et al.* 2004). Salinosporamid A produkovaný aktinomycetou *Salinispora tropica* působí jako inhibitor proteazómů a indukuje apoptózu buněk myelomu (FELING *et al.* 2003). Tato látka se stala prvním zástupcem mořských bioaktivních metabolitů, který vstoupil do klinických zkoušek pro účely léčby

nádorových onemocnění. Všechny tyto látky mají unikátní molekulární strukturu odlišnou od již známých látek.

Podobně, izolace aktinomycet z půdního prostředí s extrémními hodnotami pH, teploty, koncentrace soli apod., může taktéž vést k nalezení nových kmenů produkujících zajímavé sloučeniny (ROY a SEN 2002, OKORO *et al.* 2009).

V posledních letech vzrostl počet nově popsanych tzv. „vzácných“ druhů aktinomycet. Do této skupiny patří např. *Micromonospora*, *Catenulispora*, *Actinospica* a další. Tyto mikroorganismy rostou za běžných kultivačních velmi pomalu nebo dokonce nerostou vůbec. Vývoj nových kultivačních metod a zařízení umožňuje pěstovat tyto bakterie a tím studovat jejich fyziologii a produkční potenciál (BUSTI *et al.* 2006, BREDHOLDT *et al.* 2007).

Pozoruhodným faktem je, že mikroorganismy produkující známá antibiotika za klasických kultivačních podmínek mohou být rovněž zdrojem nových látek. Změna podmínek kultivace, např. složení kultivačního média, stupeň vzdušnění, objem kultivační nádoby, přidání inhibitorů nebo aktivátorů enzymů, může indukovat u těchto kmenů syntézu nových sloučenin neprodukovaných za běžných laboratorních podmínek. Pomocí tohoto přístupu nazývaného „jeden kmen – mnoho sloučenin“ lze stanovit až dvacet různých sekundárních metabolitů u jednoho kmene. Takovýto postup byl použit např. u kmene *S. parvulus* Tü 64 (BODE *et al.* 2002).

Zajímavým způsobem hledání nových látek je kultivace několika různých kmenů ve společné nádobě (PETTIT 2009). Tato metoda je založena na teorii nutriční kompetice mikroorganismů v jednom prostředí vedoucí k indukci produkce antimikrobiálních látek (Kap. 3.2.1.). V řadě příkladů bylo prokázáno zvýšení produkce antibiotik, produkce nových látek a analogů látek známých při společné kultivaci produkčního organismu v přítomnosti organismu „indukčního“ (SLATTERY *et al.* 2001, PETTIT 2009).

Pro zvýšení účinnosti izolace aktinomycet ze vzorků půdy nebo vody byla vyvinuta řada technologií umožňující kultivace velkého počtu kmenů najednou, např. mikrokapsule pro pěstování jednotlivých buněk (ZENGLER *et al.* 2005).

3.4.2. Metody nezávislé na kultivaci

Odhaduje se, že pouze 1% všech mikroorganismů je za běžných laboratorních podmínek kultivovatelné. To znamená, že produkční potenciál ostatních mikroorganismů musí být zkoumán pomocí upravených podmínek kultivace (ALAIN

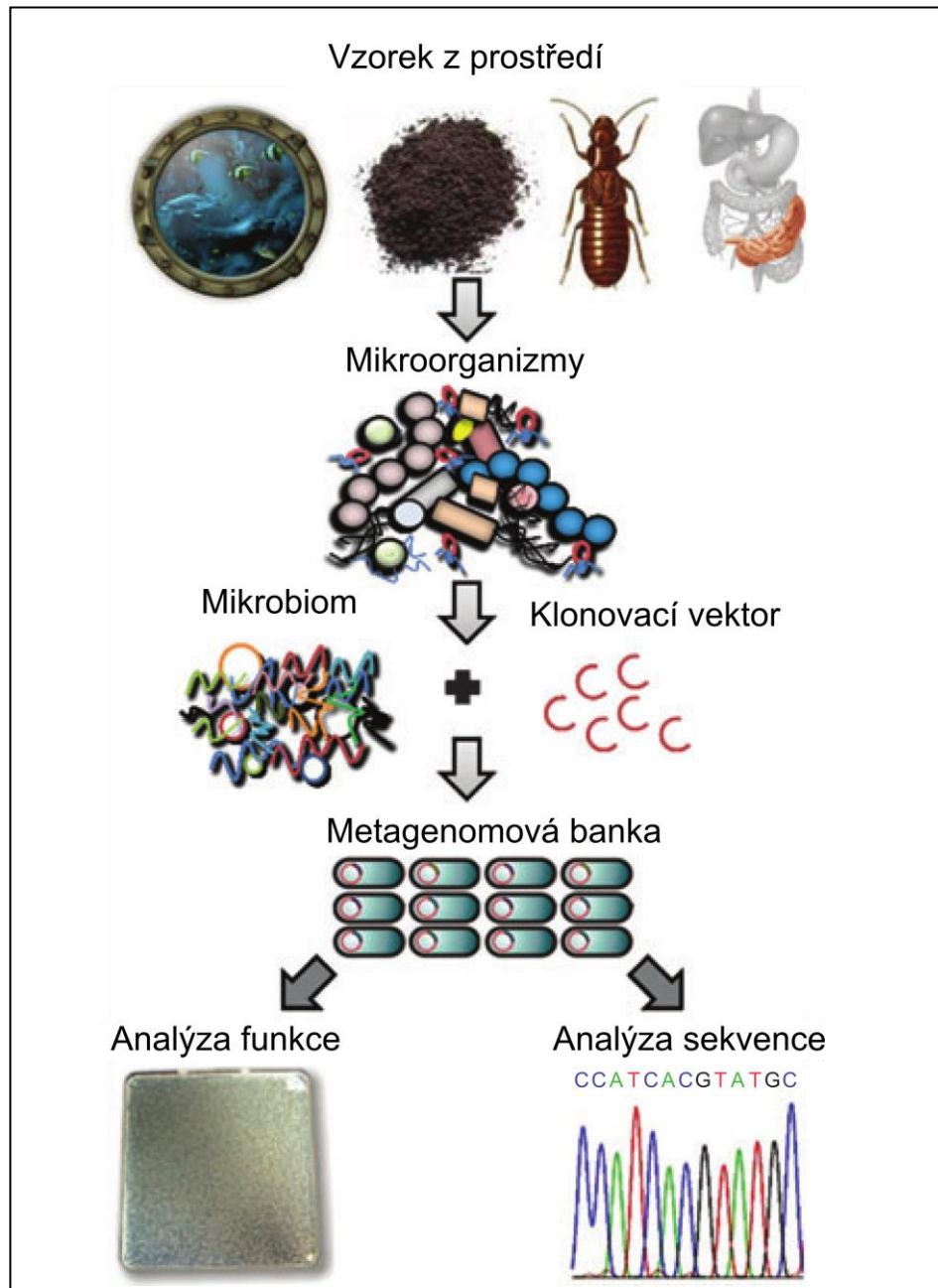
a QUERELLOU 2009) nebo metodami na kultivaci nezávislymi, jako metagenomové knihovny a heterologní exprese.

Metagenomika je rychle vývíjecí oborem pro studium biologické a metabolické diverzity nekultivovatelných mikroorganismů z půdního a vodního prostředí, a také z trávících systémů lidí a zvířat. Princip přípravy metagenomových knihoven spočívá ve vložení chromozomální DNA z environmentálních vzorků do vhodných vektorů, např. bakteriálních úmělých chromozómů nebo kosmidů, pro následnou kultivaci a v rychlé rostoucích streptomycetách nebo jiném náhradním (heterologním) hostiteli. Data získaná kultivacemi mohou být analyzována z hlediska funkce a sekvence. Funkční metagenomika se zabývá vyhledáváním určitého fenotypu, např. produkce sekundárních metabolitů, rezistence k antibiotikům, zajímavé enzymatické aktivity, a následnou fylogenetickou analýzou klonované DNA (SLEATOR *et al.* 2008) (Obr. 14).

Na druhé straně, analýza sekvencí slouží k taxonomické identifikaci mikroorganismu pomocí sekvence 16S rRNA a zjišťování dalších zajímavých genů, genových shluků nebo celých genomů (RIESENFELD *et al.* 2004). Tato metoda se především osvědčila při hledání genových shluků nových sekundárních metabolitů mořských a suchozemských bakteriálních symbiontů (BODE 2009, FENICAL a JENSEN 2006).

Jako indikátory shluků mohou posloužit tzv. sondy – sekvence již známých biosyntetických nebo příslušných rezistenčních genů, s jejichž pomocí můžeme vyhledávat homologní geny v environmentální DNA nebo také u jednotlivých izolovaných kmenů aktinomycet. Charakterizace vzorků na přítomnost zajímavých genů, v současné době se nejvíc vyhledávají geny pro biosyntézu peptidových a makrolaktonových antibiotik, může pomoci k vytipování lokalit bohatých na mikroorganismy produkující antibiotika nebo také k nalezení jednotlivých nových kmenů s produkčním potenciálem (WAWRIK *et al.* 2005).

Heterologní exprese umožňuje práci s genovými shluky z environmentálních knihoven, ale také ze známých málo kultivovatelných kmenů pomocí vložení a exprese jejich DNA v náhradním hostiteli. Většina používaných hostitelských kmenů má známou sekvenci genomů a vypracované genetické metody, což značně zjednodušuje práci s daným organismem (WENZEL a MÜLLER 2005).



Obr. 14: Schematické znázornění postupu přípravy a analýzy metagenomové knihovny. Funkční analýza je zaměřena na vyhledávání nových procesů a proteinů, zatímco analýza sekvencí studuje metabolický potenciál a ekologickou diverzitu hledáním homologů v DNA databázích (převzato ze SLEATOR *et al.* 2008).

3.4.3. Analýza sekvencí

Sekvenování genomů známých producentů, jako např. *S. coelicolor*, *S. avermitilis* a *S. griseus*, vedlo k objevení většího množství biosyntetických genových shluků pro, než je známo pro dané producenty sekundárních metabolitů (BENTLEY *et al.* 2002, IKEDA *et al.* 2003 a OHNISHI *et al.* 2008). Tyto kryptické shluky, kódující neznámé produkty, nejsou přepisovány za běžných laboratorních podmínek. Mohou mít narušenou regulaci, třeba z důvodů absence aktivátorů. Produkční potenciál mikroorganismů je tedy nutno zkoumat nejenom pomocí tradičních kultivačních metod, ale je nutná i analýza genetické informace.

Vyhledávání je zjednodušeno skutečností, že geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů jsou uspořádány ve shlucích. Metodou genome mining se dá *in silico* (pomocí počítačových programů) předpovědět z genetického složení shluku a znalosti známých biosyntetických drah nejen typ kódovaného metabolitu, ale v některých případech i jeho přesná struktura. Nejlépe je to popsáno na příkladech shluků pro polyketidová a peptidová antibiotika, kde se na základě jednotného biosyntetického pravidla a specifity určitých enzymů dá určit pořadí zabudovávaných syntetických jednotek (ZERIKLY a CHALLIS 2009, podrobný popis biosyntézy těchto látek je v Kap. 3.5.).

Alternativní metoda skenování genomu (angl. genom scanning) hledá sekvence potenciálně kódující sekundární látky náhodným sekvenováním mnoha krátkých úseků DNA z genomových knihoven (VAN LANEN a SHEN 2006). Tyto krátké úseky pak slouží jako sondy pro izolaci celého biosyntetického shluku. Pomocí této metody byly nalezeny genové shluky pro enedynová antibiotika u 70 kmenů aktinomycet, u kterých předtím produkce těchto látek prokázána nebyla. Na základě získaných informací byla provedena úprava kultivačních médií a podmínek, což vedlo k zahájení produkce enedynů těmito kmeny (ZAZOPOULOS *et al.* 2003).

3.4.4. Cílené zásahy do biosyntézy antibiotik – semisyntetické metody

Nové látky mohou být připraveny také chemickou syntézou. Na jednu stranu vznikají látky s velkou strukturální variabilitou, na druhou, tyto metody jsou velice náročné a finančně nákladné ve srovnání s biologickými.

Semisyntetické metody kombinují chemickou a biologickou syntézu. Nejjednodušší metodou je biosyntéza řízená prekurzorem, která spočívá v přidávání chemicky připraveného analogu(ů) prekurzoru(ů) přirozeně produkovaného

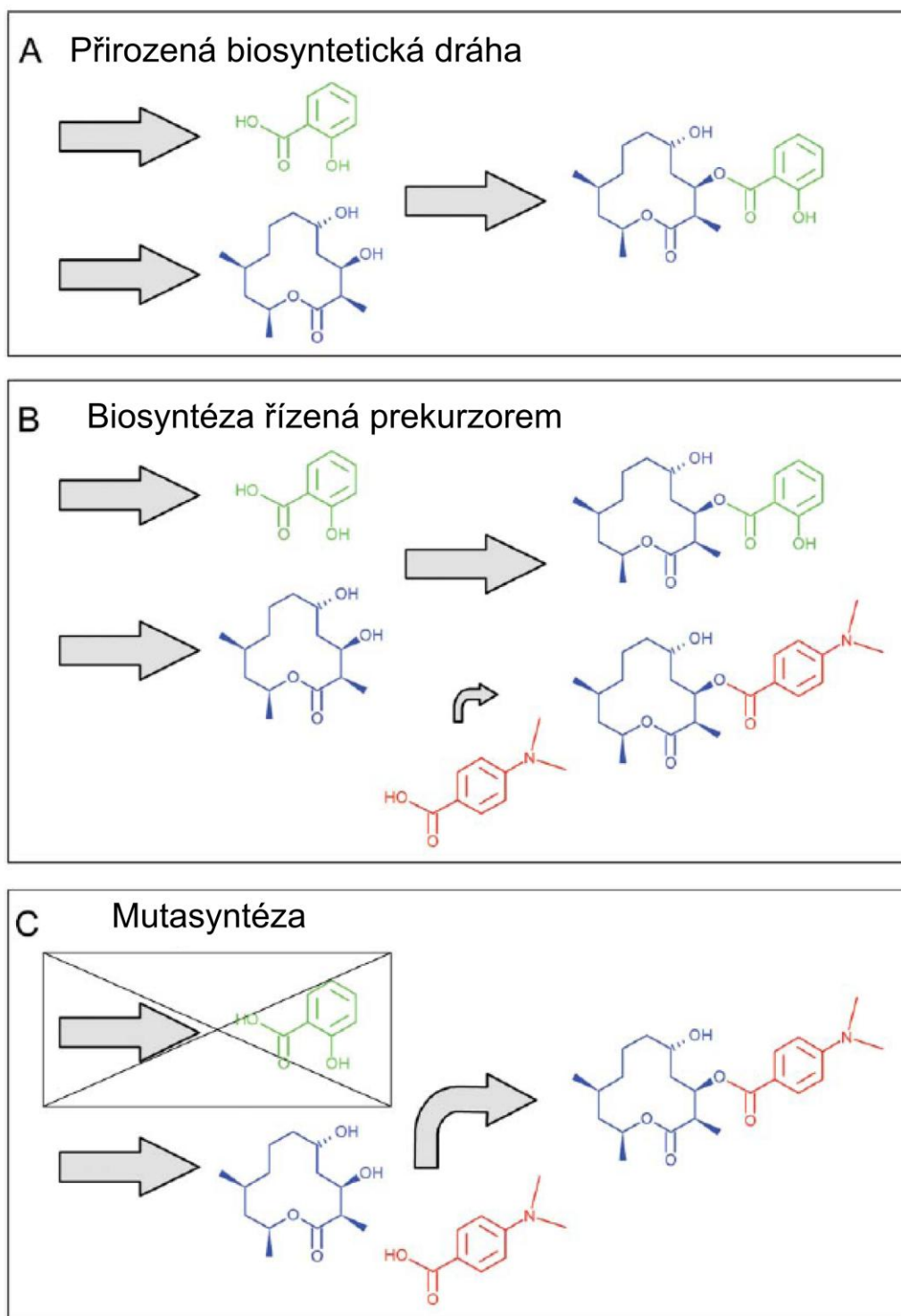
antibiotika do fermentačního média producenta (KENNEDY 2008, Obr. 15). Substrátový analog soutěží s přirozeným prekurzorem a vzniklá směs látek obsahuje jak přirozené antibiotikum, tak i jeho formu se zabudovaným analogem. Tímto způsobem lze získat velké množství nových látek často s lepší aktivitou a farmakologickými vlastnostmi (DEMAIN a ELANBER 1999)

Tento přístup je limitován substrátovou specifitou klíčových enzymů (ů) spojujícího(cích) tyto prekurzory. Širší enzymová specifita umožňuje přidávání analogů o různé strukturní diverzitě. Tato metoda má ovšem i řadu nedostatků: potřeba přidávat vysoké koncentrace analogu pro kompetici s přirozeným prekurzorem; složité čištění nové látky ze směsi s původním antibiotikem, vedoucí ke ztrátám a nižším výtěžkům (KENNEDY 2008).

Tyto nedostatky jsou eliminovány při mutasyntéze, ve které se používá kmen defektní v biosyntéze jedné ze strukturních složek (prekurzoru) antibiotika. Derivát daného prekurzoru je pak přidáván do fermentačního média (Obr. 15). Tato metoda eliminuje kompetici mezi přirozenými a nepřirozenými prekurzory a na konci vzniká pouze žádoucí derivát antibiotika. Mutasyntéza byla úspěšně využita pro přípravu nových látek na bázi makrolidových, aminokumarinových a dalších skupin antibiotik (GUPTA *et al.* 2008, HEIDE 2009, WEIST *et al.* 2004).

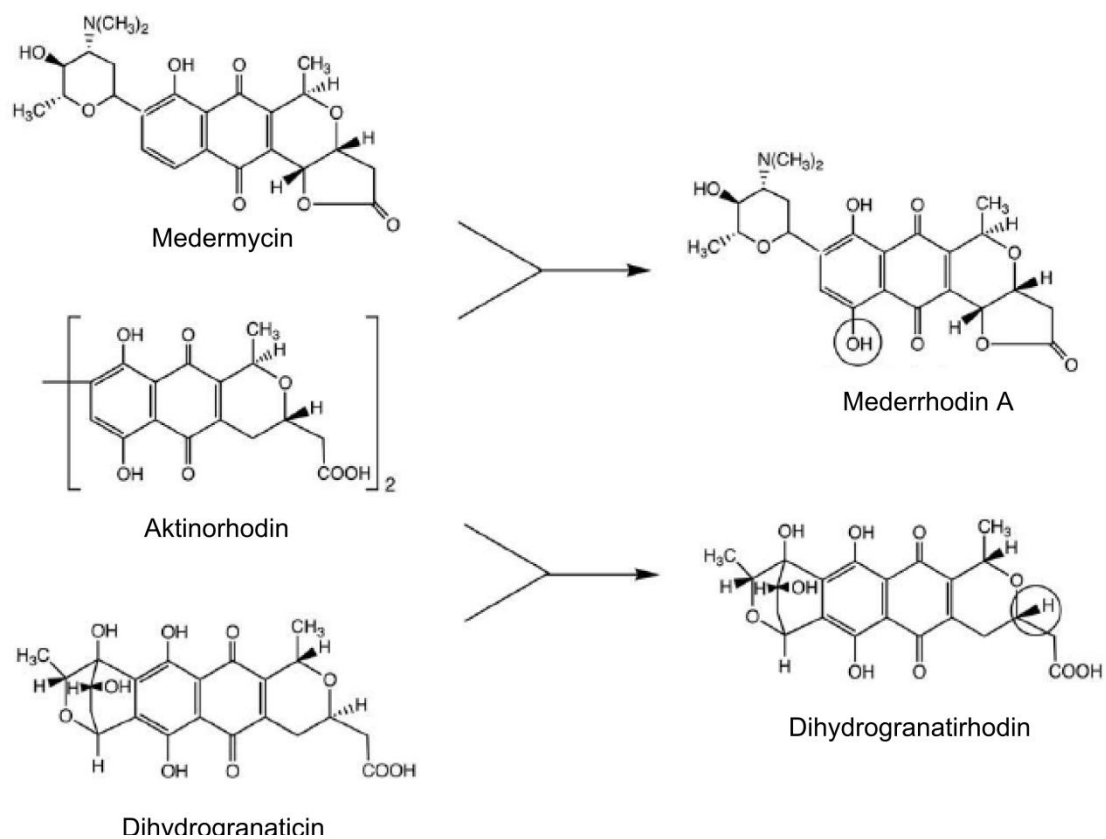
3.4.5. Cílené zásahy do biosyntézy antibiotik – kombinatorní biosyntéza

Poslední dobou se velká pozornost věnuje vypracování postupů pro přípravu nových biosyntetických drah kombinací různých enzymů ze stejného nebo příbuzného organismu, neboli kombinatorní biosyntéze. Nepřirozená kombinace genů přepisovaných v původním producentu nebo heterologním hostiteli vede ke vzniku tzv. hybridních antibiotik. Hybridní antibiotika jsou definována, jako antibiotika syntetizovaná enzymy kódované geny ze dvou či více kmenů (HOPWOOD 1981). Další definice těchto látek je - antibiotika produkovaná uměle biosyntetickými drahami, které byly připraveny pomocí technologie rekombinantní DNA. První hybridní antibiotikum mederrhodin bylo popsáno v roce 1985 a bylo připraveno vložením genů pro syntézu aktinorhodinu do producentu medermycinu (HOPWOOD *et al.* 1985) (Obr. 16).



Obr. 15: Schematické znázornění principu semisyntetických metod pro přípravu derivátů známých antibiotik.

V přirozené biosyntetické dráze prekurzory vznikají nejdříve odděleně a pak jsou spojeny do finálního produktu (A). Při přidání derivátu jednoho z prekurzorů je tvořen finální produkt a zároveň jeho derivát (B). Při inaktivaci jedné z biosyntetických větví a přidání příslušného derivátů vzniká pouze derivát finální látky (C) (převzato a upraveno z KENNEDY 2008).



Obr. 16: Vznik a struktura prvních hybridních antibiotik.

Kombinací genů z různých biosyntetických shluků došlo ke vzniku hybridních látek s vlastnostmi obou přirozených molekul (převzato z FLOSS 2006).

Jaké jsou současné strategie pro přípravu hybridních látek? Nejjednodušší je inaktivace biosyntetického(ých) genu(ů) a izolace meziproductů nebo látek upravených jinými enzymy producenta. Zajímavým příkladem kombinace genů z jednoho organismu je vznik nových derivátů makrolidových antibiotik methymycinu a pikromycinu pomocí inaktivace genů v *Streptomyces venezuelae*. V této streptomycetě byl inaktivován gen pro jeden z kroků biosyntézy cukru desosaminu. Intermediát cukru se hromadil v buňce a činností ketoreduktasy přítomné v buňce, ale nepatřící do této biosyntetické dráhy, byl přeměněn na jiný cukr a připojen pomocí glykosyltransferasy k aglykonu. Vznikl tak nový analog methymycinu neomethymycin (BORISOVA *et al.* 1999).

Dalším zajímavým přístupem je vložení genů kodujících různé glykosyltransferasy do producenta vankomycinu, což vedlo ke vzniku glykosylovaných derivátů tohoto antibiotika (SOLEMBERG *et al.* 1997).

Pracnější a složitější variantou je kombinace inaktivace genu(ů) v jednom kmenu a přenosu genu(ů) nebo i celých biosyntetických drah z jiného organismu. Několik příkladů bylo popsáno u makrolidů, aminokumarinů, peptidových a dalších antibiotik (REEVES a RODRIGUEZ 2009, HEIDE 2009, WALSH 2002).

Expresi celé biosyntetické dráhy lze popsat na následujícím příkladu. Geny kódující biosyntézu dNTP-D-desozaminu byly přeneseny do heterologního hostitele *S. lividans*. Do takto připravené bakterie byla následně vnesena knihovna plazmidů kodujících syntézu různých makrolaktonů a byla sledována produkce nových makrolidů (TANG a McDANIEL 2001).

Při cílených zásazích do biosyntetické dráhy musíme vždy uvažovat o kritických bodech, které mohou mít vliv na úspěšnost celého pokusu. Mezi tyto body patří specifita klíčového enzymu, dostupnost potřebného prekursoru v náhradním hostiteli, regulační dráhy, které se mohou negativně ovlivňovat vznik nového produktu, atd. (FLOSS 2006).

3.5. Biosyntéza antibiotik využitelných pro účely kombinatorní biosyntézy

Poslední dobou roste počet izolovaných a plně osekvenovaných genových shluků pro biosyntézu antibiotik. Sekvenační data umožňují doplnit informace o biosyntetických drahách získané chemickou a biochemickou analýzou. Podrobná znalost těchto drah je pak využívána k návrhu a přípravě hybridních antibiotik. Ke dnešnímu dni bylo nejvíc kombinatorně biosyntetických pokusů uskutečněno na polyketidech a neribozomálně syntetizovaných peptidech, a dále na aminokumarinové skupině antibiotik.

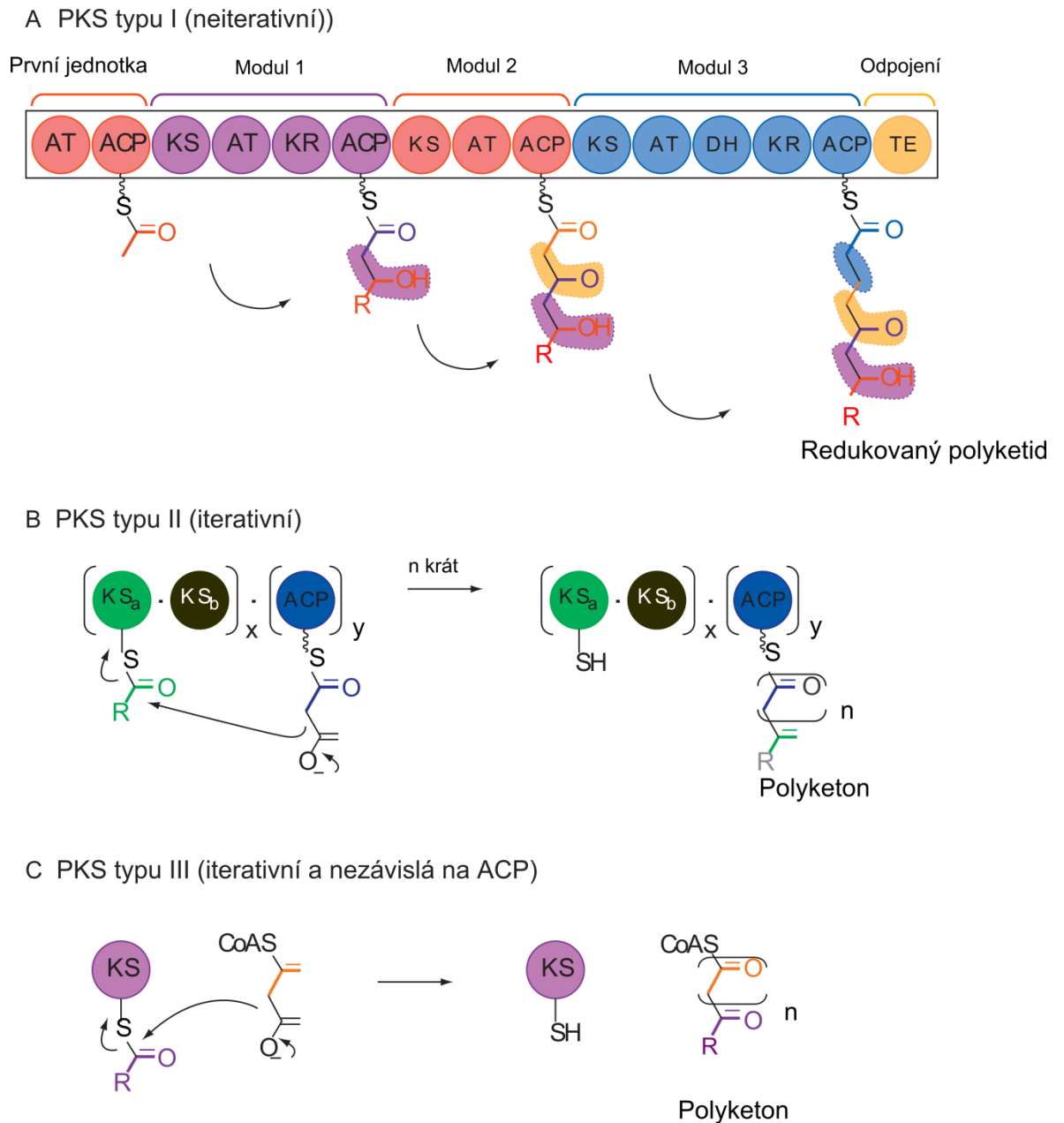
3.5.1. Polyketidová a neribozomálně syntetizovaná peptidová antibiotika

Polyketidová antibiotika podle struktury a biosyntézy se dělí na aromatickou skupinu, zahrnující např. patří tetracyklin, a makrolaktonovou, s nejznámějším zástupcem erythromycinem (WALSH 2003). Biosyntéza těchto poměrně komplikovaných látek se podobá biosyntéze mastných kyselin. Vychází z acyl-KoA a je katalyzována polyketidovými synthetasami (PKS) dvou základních typů. Modulární PKS typu I jsou velké proteinové komplexy, které se skládají z opakujících se jednotek, známých jako moduly, zodpovědných za jednotlivé biosyntetické kroky (CORTES *et al.* 1990, DONADIO *et al.* 1991). Každý modul obsahuje minimálně tři funkční domény, dvě s katalytickou funkcí a jednu vazebnou doménu, které se společně podílejí na vzniku základního řetězce. Dále obsahuje domény katalyzující různé specifické modifikace (redukce, dehydratace, methylace, cyklizace, ale i ukončení syntézy) zvyšující strukturní variabilitu produktu. Každý modul se účastní přidání jedné jednotky za celý biosyntetický cyklus (pravidlo kolinearity). Prekurzorový acyl-KoA (nejčastěji propionyl-KoA, malonyl-KoA a methylmalonyl-KoA) je rozpoznán a aktivován pomocí adenylace acyltransferasovou (AT) doménou. Aktivovaný prekurzor je přenesen na fosfopantetheinový zbytek posttranslačně navázaný na tzv. acyl carrier protein (ACP). Při tomto přenosu dochází k odštěpení molekuly AMP a tvorbě thioesterové vazby mezi acylovou skupinou a fosfopantetheinovým zbytkem. Ketosynthetasová (KS) doména katalyzuje dekarboxylativní kondenzaci dvou sousedících acylových skupin na rostoucí řetězec. Další domény s enzymatickými aktivitami, jako je ketoreduktasa (KR), dehydratasa (DH) a enoylreduktasa (ER), se podílí na modifikaci rostoucího řetězce. Obvykle poslední doménou PKS I je thioesterasa (TE), která katalyzuje uvolnění a cyklizaci kompletního řetězce. Struktura konečného polyketidu je závislá na struktuře

modulárního enzymu, tj. na pořadí a počtu modulů. V enzymech mohou být některé moduly použity opakovaně nebo naopak přeskočeny, což vede k syntéze kratšího konečného produktu, nebo mohou být domény v modulech neobvykle uspořádány. Tyto abnormality zvyšují biosyntetický potenciál těchto enzymů.

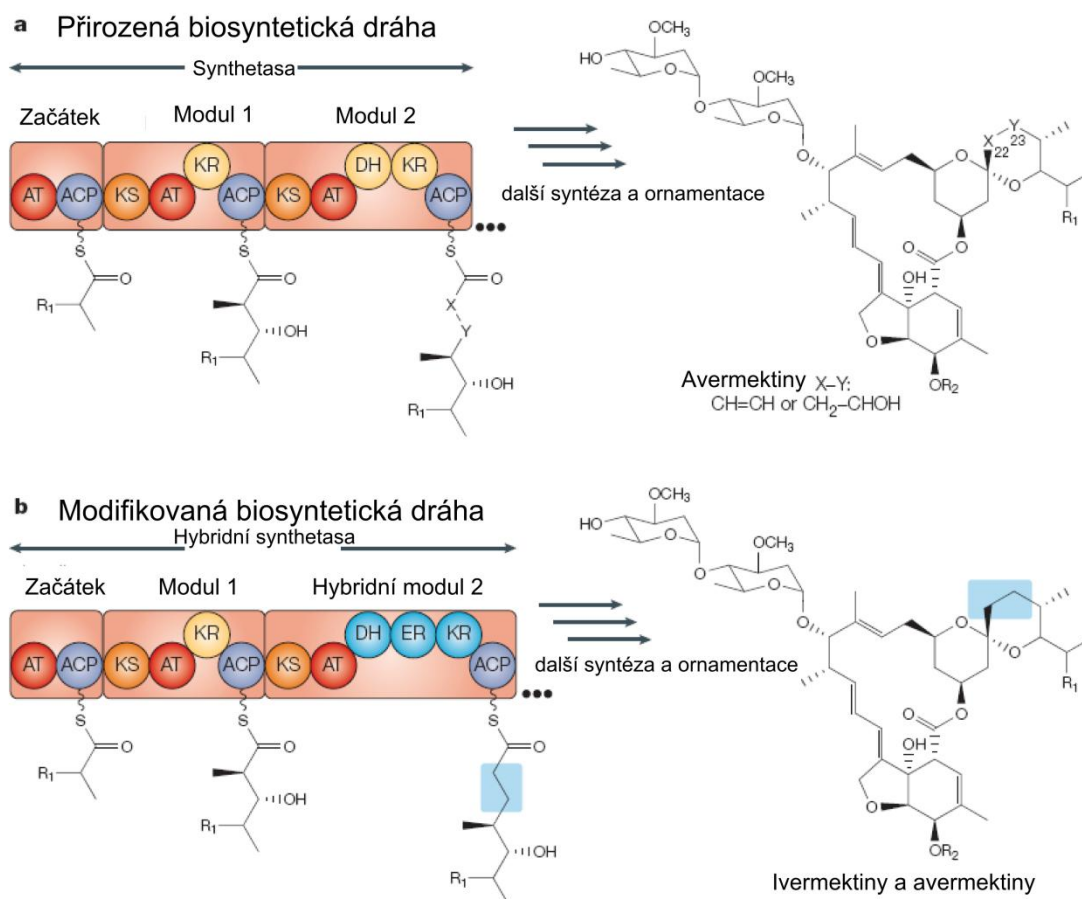
PKS typu II (repetitivní) jsou vícepodjednotkové enzymy. Jejich monofunkční podjednotky provádějí při syntéze polyketidu stejnou funkci opakovaně v každém cyklu (HERTWECK 2007). PKS typu III (iterativní) nepotřebuje ACP protein k aktivaci acylCoA substrátů (FUNA *et al.* 1999) (Obr. 17 a 18).

Peptidová antibiotika, jako vankomycin, bacitracin, B-laktamy a další, jsou syntetizovaná modulárními neribozomálními peptidovými synthetasami (NRPS). Uspořádání těchto modulárních enzymů je podobné PKS typu I. Například, jednotlivé aminokyseliny heptapeptidového základu vankomycinu jsou spojovány pomocí synthetasy Cep, která má ve třech podjednotkách dohromady sedm modulů, po jednom pro jednotlivé aminokyseliny. Stejně jako při biosyntéze polyketidů v každém z modulů dochází k aktivaci příslušné aminokyseliny adenylační doménou (A-doménou), následným přenosem na PCP (peptide carrier protein) a spojením s aminokyselinou ze sousedního modulu činností kondenzační domény. Moduly také mohou obsahovat další domény, například epimerasovou a methyltransferasovou. Poslední doménou je i v případě neribozomálních synthetas TE doména s thioesterasovou funkcí, která uvolňuje a cyklizuje finalní produkt. Po syntéze základního makrolaktonového nebo peptidového kruhu dochází k dalším „ornamentujícím“ úpravám činnosti „tailoring“ enzymů, do kterých patří např. oxygenasy a glykosyltransferasy (WALSH 2002, 2003).



Obr. 17: Schematické znázornění struktury polyketidových syntetas různých typu (převzato a upraveno z WEISSMAN 2009).

PKS – polyketid syntetasa, AT – adenylační doména, ACP – přenašeč aktinovaného acylu, KS – ketosyntetasa, KR – ketoreduktasa, DH – dehydratasa, TE – thioesterasa

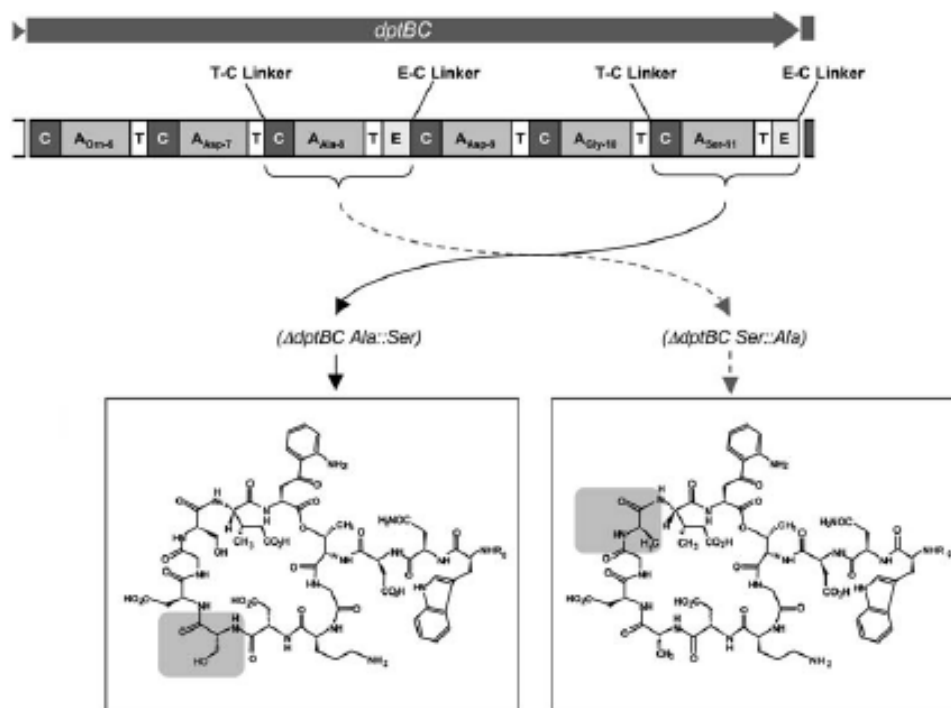


Obr. 18: Přírozená biosyntetická dráha avermektinu a její genetická modifikace vedoucí ke vzniku hybridních látek. K těmto účelům byla vnesena navíc doména s enoyl redukční funkcí (ER) (převzato a upraveno z WEISSMAN a LEADLAY 2005).

Při kombinatorní biosyntéze polyketidových a peptidových antibiotik se pozornost zaměřuje na změnu pořadí modulů a jednotlivých domén nebo jejich záměnu na moduly z jiných biosyntetických drah, což vede ke vzniku molekul s jiným uspořádáním stavebních podjednotek (REEVES *et al.* 2004, NGUYEN *et al.* 2006) (Obr. 19). Velký důraz se také klade na změnu specifity adenylačních (A-domén) NRPS syntetas rozlišujících jednotlivé aminokyseliny a tím určující složení peptidového kruhů. Strukturální analýzou adenylační domény pro fenylalanin a bioinformatickou analýzou 150 sekvencí dalších A-domén byl určen „kód“ pro rozpoznávání různých aminokyselin aktivním místem těchto domén (STACHELHAUS *et al.* 1999). Také ornamentující enzymy, jako glykosyltransferasy, se dají využít pro přípravu nových látek. Tyto enzymy mající širokou substrátovou specifitu mohou připojovat na základní kruh celou řadu různých cukrů a tak zvyšovat strukturální pestrost finálních produktů. Pro účely těchto pokusů mohou být geny kódující různé cukry vloženy do jednotlivých plazmidů a vneseny do producentů peptidových či polyketidových antibiotik (SALAS a MENDEZ 2007). Dalším zajímavým příkladem byla záměna enzymu ketoreduktasy z biosyntézy doxorubicinu a daunorubicinu. Tento enzym, katalyzující vznik cukru v jedné sterické konformaci, byl deletován v produkčním kmenu *S. peuceticus*. Do takto připraveného mutantního kmene byly vneseny ketoreduktasy s jinou stereospecifitou z producentů avermektinu a erythromycinu, což vedlo ke vzniku epimeru cukru a následně i hybridní látky – 4'-epidoxorubicinu (MADDURI *et al.* 1998). Jednotlivými přístupy nebo kombinacemi výše uvedených byla získána celá řada hybridních polyketidových a peptidových antibiotik (REEVES a RODRIGUEZ 2009, WALSH 2002).

3.5.2. Aminokumariny

Aminokumarinová antibiotika novobiocin, chlorobiocin a koumermycin jsou účinnými inhibitory bakteriální gyrazy (MAXWELL a LAWSON, 2003). Novobiocin a chlorobiocin se skládají ze tří základních částí: 3-dimethylallyl-4-hydrobenzoylového zbytku (tzv. kruh A), 3-amino-4,7-dihydroxykumarinového zbytku (kruh B), který má v pozici 8 methylovou skupinu nebo atom chlóru, a 5-methyl-L-ramnosy (kruh C) (Obr. 20).



Obr. 19: Příklad kombinatorní biosyntézy peptidových antibiotik.

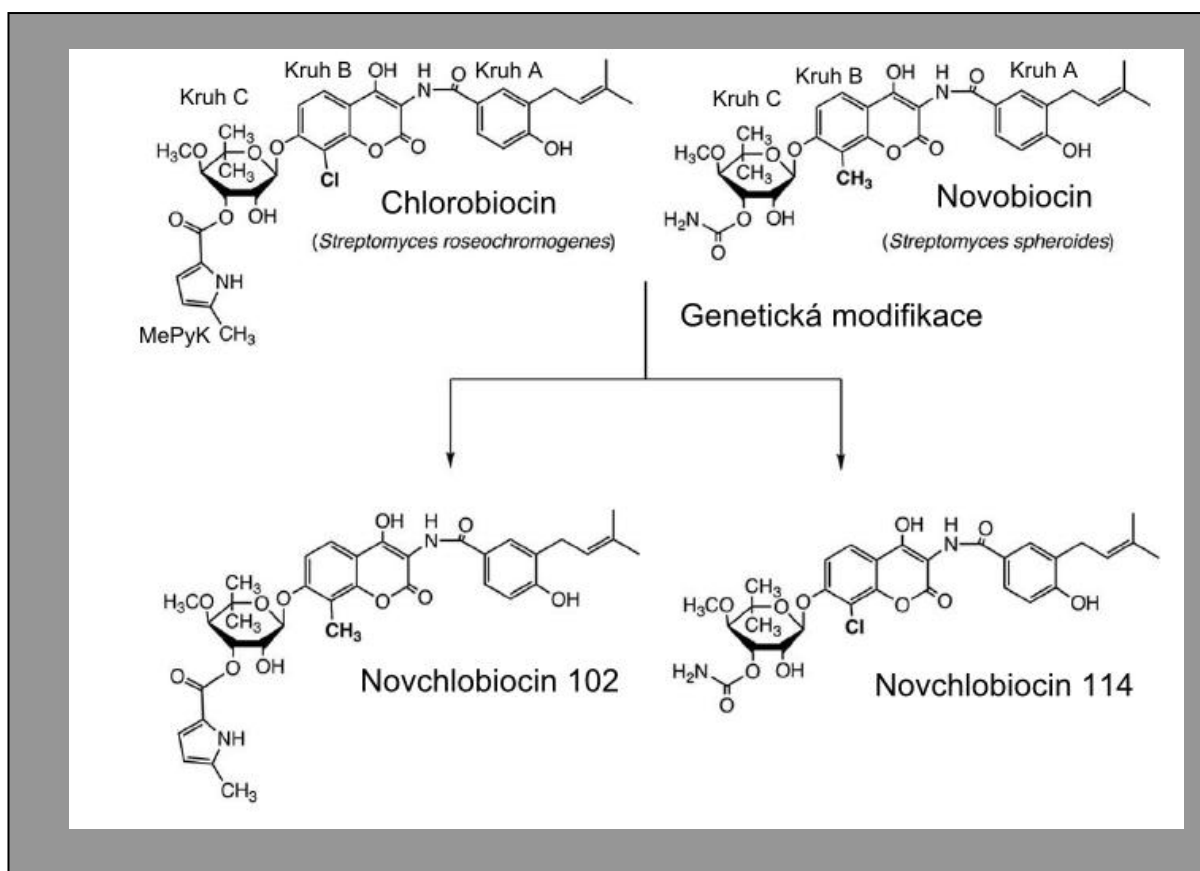
Záměna adenylačních domén pro alanin a serin v NRPS synthetase daptomycinu vedla ke vzniku jeho derivátů. Obě molekuly měly antimikrobiální aktivitu podobnou daptomycinu (převzato z BALTZ *et al.* 2006).

Biosyntéza jednotlivých částí probíhá odděleně a kruhy jsou na konci spojeny do intermediátové molekuly, která je pak upravena činností dalších enzymů na finální antibiotikum (HEIDE 2009). Koumermycin a chlorobiocin mají na kruhu C navíc připojeny 5-methyl-pyrrol-2 -karboxylový zbytek. Tato molekula vzniká z L-prolinu sérií reakcí katalyzovaných adenylační doménou, přenašečem aktivovaných aminokyselin a dehydrogenázou. Na rozdíl od adenylačních domén modulárních NRPS enzymů, tato doména patří do skupiny samostatných adenylačních domén, aktivujících např. L-prolin (GARNEAU *et al.* 2005).

Bylo popsáno i pár dalších zástupců aminokumarinové skupiny, simocyklinon D8 a rubradirin. Zajímavostí je, že simocyklinon D8 působí na jinou podjednotku gyrasy, než výše uvedená antibiotika, a rubradirin nereaguje s gyrasou vůbec (FLATMAN *et al.* 2005, KIM *et al.* 2008). Další aminokumarinová antibiotika zatím nebyla objevena, což vedlo k předpokladu, že chemická diverzita aminokumarinů je v přírodě omezena (HEIDE 2009). Vzhledem k vysoké účinnosti těchto antibiotik vůči grampozitivním patogenům se přirozené aminokumariny a jejich deriváty zdají být slibnou alternativou ostatních skupin klinicky používaných látek.

Chemická syntéza aminokumarinů je možná, ale je technicky a finančně náročná. Proto byla v posledních letech vyvinuta řada genetických a biotechnologických metod pro přípravu nových látek na bázi aminokumarinů. Byly sekvenovány genové shluky pro biosyntézu novobiocinu, chlorobiocinu a koumermycinu (STEFFENSKY *et al.* 2000, POJER *et al.* 2002, WANG *et al.* 2000), následně klonovány do vektorů a vneseny do heterologního hostitele *S. coelicolor*. Produkce v heterologním hostiteli probíhala na stejné úrovni jako v původním producentovi (EUSTAQUIO *et al.* 2005a).

Další vývoj hybridních aminokumarinů byl založen na principu metabolického inženýrství - vyřazení jednoho biosyntetického genu a vnesení genu s jinou funkcí a z jiného mikroorganismu. Cílová místa pro modifikace byly pozice 8 na kruhu B a 3 na kruhu C. Jako příklad uvedeme inaktivaci genu *novO* v novobiocinovém genovém shluku. Tento gen kóduje methyltransferasu, která methyloje novobiocin v pozici 8. Heterologní kmen nesoucí takto upravený shluk produkoval derivát novobiocinu s vodíkem v pozici 8. Následně byl do tohoto producenta na expresním vektoru vnesen gen pro halogenasu, která na stejnou pozici připojuje atom chlóru. Ve výsledku byla stanovena hybridní látka novchlobiocin 114, nesoucí vlastností obou biosyntetických drah (EUSTAQUIO *et al.* 2004) (Obr. 20).



Obr. 20: Chemická struktura aminokumarinových antibiotik chlorobiocinu a novobiocinu a jejich hybridních derivátů.

Novchlorbiocin 102 na rozdíl od novobiocinu na kruhu C navíc obsahuje zbytek MePyK z chlorobiocinu. Novchlorbiocin 114 je na kruhu B v pozici 8 chlorován halogenasou z producenta chlorobiocinu (převzato a upraveno z FLOSS 2006).

Kruh A - 3-dimethylallyl-4-hydroxybenzoylový zbytek

Kruh B - 3-amino-4,7-dihydroxykumarinový zbytek

Kruh C - 5-methyl-L-ramnosa

MePyK - 5-methyl-pyrrol-2 -karboxylový zbytek

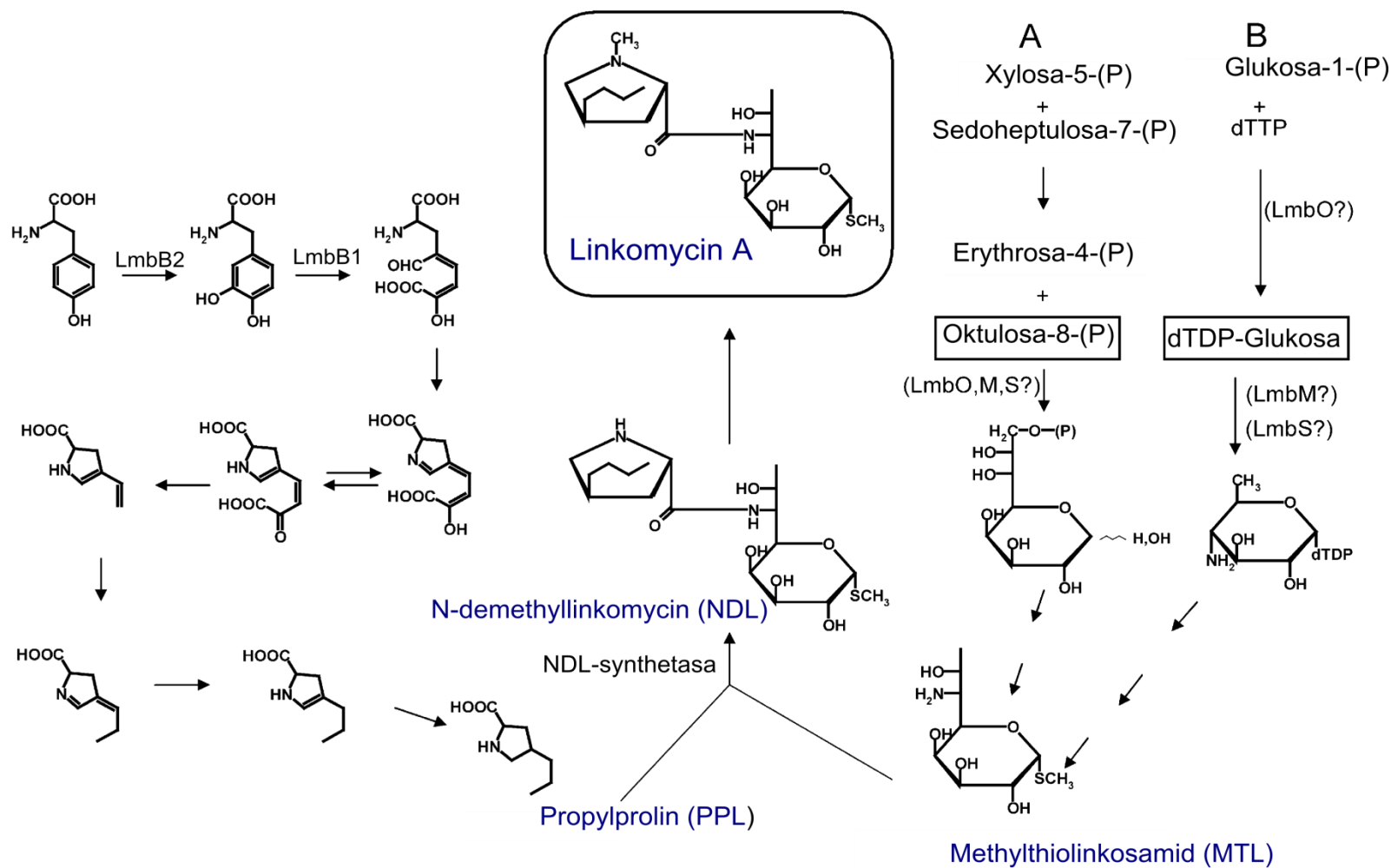
3.6. Biosyntéza linkosamidů

3.6.1. Biosyntetická dráha linkosamidů

Linkomycin, komerčně vyráběný fermentací, byl poprvé izolován z fermentačního média *Streptomyces lincolnensis* (BERGY *et al.* 1963). Později byl také popsán i u řady dalších aktinomycet, např. *Streptomyces spinozus* (ARGOUDELIS *et al.* 1972), *Actinomyces roseolus* (KUZNETSOV *et al.* 1974), *Micromonospora halophytica* (BIBIKOVA *et al.* 1989).

Biosyntetická dráha linkomycinu nebyla zatím podrobně popsána. Schematické znázornění dráhy bylo navrženo na základě obohacovacích pokusů spojených s NMR a MS analýzou. V biosyntéze linkomycinu dochází k oddělené syntéze dvou prekurzorů propylprolinu (PPL) a methylthiolinkosamidu (MTL), které jsou kondenzací spojeny na N-demethyllinkomycin (NDL) a ten je methylován na výsledný linkomycin (Obr. 21) (BRAHME *et al.* 1984a; BRAHME *et al.* 1984b, CHUNG *et al.*, 1997). Aglykonová složka molekuly, PPL, vzniká z aminokyseliny L-tyrosinu. V prvním kroku biosyntetické větvi je L-tyrosin přeměněn na dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) činností enzymu tyrosin hydroxylasy (NOVOTNÁ 2008). Další krok je katalyzován dioxygenasou a spočívá v 2,3-extradiolovém štěpení aromatického kruhu L-DOPA, s následnou cyklizací produktu za vzniku pyrrolového kruhu (NOVOTNÁ *et al.* 2004). Zbývající kroky biosyntézy PPL nebyly zatím přesně popsány a jsou schematicky znázorněny na Obr. 21 (BRAHME *et al.* 1984b, KUO *et al.* 1992).

Biosyntetická dráha cukerné složky linkomycinu MTL byla navržena podobně jako v případě PPL z výsledků analýzy obohacovacích pokusů, na základě kterých se předpokládalo, že uhlíková kostra MTL vychází s pentosového cyklu (BRAHME *et al.* 1984a). Žádný intermediát této dráhy zatím nebyl identifikován. K modifikaci takto navržené dráhy pomohly výsledky sekvenování linkomycinového shluku, které ukázaly, že geny pro biosyntézu MTL se nacházejí v tzv. cukerném shluku (PESCHKE *et al.* 1995). Na základě analýzy homologie těchto genů s jinými geny sekundárního metabolismu se předpokládá, že na začátku dráhy vzniká dTDP-aktivovaná glukosa. Ta je následně konvertována na dTDP-deoxyamino intermediát, z něhož glykosylací vzniká C₈-cukerná složka (PESCHKE *et al.* 1995). S-methylová skupina na C₁ uhlíku pravděpodobně pochází z S-adenosylmetioninu (CHUNG *et al.* 1997).



Obr. 21: Biosyntéza linkomycinu. Pro biosyntézu cukerné části jsou znázorněny dvě alternativní cesty: z pentosového cyklu (A) a glukosy (B) (převzato ze SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004b).

Kondenzace PPL a MTL je zajišťována činností vícepodjednotkové NDL-synthetasy, která je závislá na ATP a jejíž jednotlivé podjednotky nejsou identifikovány (CHUNG *et al.* 1997).

Závěrečným krokem biosyntézy linkomycinu je N-methylace molekuly NDL za vzniku linkomycinu. Tuto reakci katalyzuje enzym NDL-methyltransferasa a nezbytným kofaktorem pro reakci je S-adenosylmethionin (CHUNG *et al.* 1997, KADLEC 2000) (Obr. 21).

Druhé linkosamidové antibiotikum celesticetin je produkováno kmenem *Streptomyces caelestis* (HOEKSEMA 1968). Na základě podobnosti molekulárních struktur se dá usoudit, že tato antibiotika pravděpodobně sdílejí cukernou a kondenzační část biosyntetické dráhy (Obr. 12). Na rozdíl od linkomycinu chybí v biosyntéze celesticetinu biosyntéza aglykonu PPL. Místo něj je v molekule celesticetinu zabudován prolin z aminokyselinového „poolu“ buňky. Navíc, celesticetin obsahuje methyl v pozici C7 a molekulu salicylátu v pozici C1 (JELÍNKOVÁ *et al.* 2004).

3.6.2. Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu

Sekvence genového shluku pro biosyntézu linkomycinu (dále *lmb* shluk) byla nejprve popsána u nadprodukcčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995). Tento shluk o velikosti cca 36 kb obsahuje 29 otevřených čtecích rámců, kódujících jak biosyntetické proteiny, tak i proteiny zajišťující rezistenci k linkomycinu (JANATA *et al.* 2001). Nedávno byla publikována i sekvence *lmb* shluku z typového producenta *S. lincolnensis* ATCC 25466 (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008)

Experimentálně byly prokázány funkce jen několika genů. Funkce zbývajících genů byly předpovězeny na základě homologie s dostupnými sekvencemi v databázích (Tab. 1).

Shluk *lmb* genů (Obr. 22) obsahuje tři geny pro rezistenci: *lmrA*, kódující membránový protein pro transport antibiotika z buňky pomocí protonového gradientu; *lmrB*, na proteinové úrovni podobný 23S rRNA methyltransferasám; a *lmrC*, kódující pravděpodobný ABC transportní protein (ZHANG *et al.* 1992, PESCHKE *et al.* 1995).

Dalších 26 genů shluku má prokázanou či předpokládanou biosyntetickou nebo regulační funkci (Tab. 1). Nejucelenější skupinu tvoří tzv. cukerný podshluk, sestávající ze shodně orientovaných genů *lmbLMNZPOSRQTV* (PESCHKE *et al.* 1995,

KOBĚRSKÁ *et al.* 2008). Homology většiny genů z podshluku byly nalezeny i v jiných producentech antibiotik, kde kódují enzymy pro syntézu deoxyaminocukrů. Geny *lmbO* a *lmbM* pravděpodobně kódují synthetasu a dehydratasu TDP-D-glukosy, zatímco *lmbS* na proteinové úrovni se podobá aminotransferasám. Funkce ostatních genů podskupiny nejsou zatím přesně známy, ale podle předpokladu se příslušné proteiny účastní přeměny TDP-4,6-deoxy-4-amino-D-glukosy na MTL (NEDAL a ZOTCHEV 2004). Podobná podskupina genů byla nalezena i v genovém shluku pro biosyntézu příbuzného antibiotika celesticetinu (dále *ccb* shluk) (KOBĚRSKÁ *et al.* 2005, ČERMÁK *et al.* 2007) (Obr. 22).

Druhou podskupinu tvoří geny *lmbA*, *B1*, *B2*, *W*, *X* a *Y*, jejichž homology byly nalezeny v genových shlucích pro biosyntézu pyrrolobenzodiazepinových antibiotik anthramycinu, tomaymycinu a sibiromycinu (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, b). Tato antibiotika sdílejí s linkomycinem některé kroky pro biosyntézu derivátu prolinu (HURLEY 1980). Funkce proteinů LmbB1 a LmbB2 v prvních dvou krocích syntézy PPL byla prokázána biochemicky (NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNA *et al.* 2004). Obohacovací pokusy s kmenem *S. lincolnensis*, ve kterém byl inaktivován gen *lmbX*, potvrdily účast tohoto genu v biosyntéze PPL (SMUTNÁ 2007). Funkce ostatních genů zatím nebyla experimentálně potvrzena.

Produktu genu *lmbC* byla přiřazena funkce jedné z podjednotek NDL-synthetasy. Biochemicky bylo prokázáno, že LmbC protein adenyluje PPL a tím ho aktivuje pro následující kondenzaci s MTL. LmbC patří do skupiny samostatných adenylačních domén, podobně jako adenylační domény v biosyntéze aminokumarinů (Kap. 3.5.2.) (KADLČÍK *et al.* 2007). Další podjednotky NDL-synthetasy zatím známé nejsou. Předpokládá se, že protein LmbE, který obsahuje katalytickou doménu pro tvorbu a štěpení amidové vazby, může spojovat PPL a MTL (NOVOTNA 2008).

Gen *lmbJ* kóduje NDL-methyltransferasu, katalyzující finální metylaci NDL za vzniku linkomycinu (KADLEC 2000).

Homology genu *lmbU* byly nalezeny u řady jiných biosyntetických shluků: *novE* z novobiocinového, *cloE* z chlorbiocinového a *couE* z koumermycinového shluků (STEFFENSKY *et al.* 2000, POJER *et al.* 2002, WANG *et al.* 2000). Delece genu *novE* vede k poklesu produkce novobiocinu, proto se předpokládá, že tento gen a jeho homology nemají esenciální biosyntetickou funkci, ale spíše působí jako pozitivní regulátory biosyntézy (DANGEL *et al.* 2008).

Geny *lmbIH* a *Q* jsou si částečně homologní navzájem a mají konzervovanou doménu, která byla nalezena u rodiny TldD/TldE proteinů - modulátoru DNA gyrasy (MURAYAMA *et al.* 1996). Protein LmbIH, ve srovnání s proteinem LmbJ s prokázanou biosyntetickou funkcí, je v buňce přítomen v nízké koncentraci po krátkou dobu. Tento fakt naznačuje, že LmbIH může mít spíš regulační roli (HOLÁ *et al.* 2003). Regulační funkce je předpokládána i u dalšího, homologního s LmbIH, proteinu CalR6 z biosyntézy sekundárního metabolitu kalicheamicinu (AHLERT *et al.* 2002).

Tab. 1. Prokázané a předpokládané funkce Lmb proteinů.

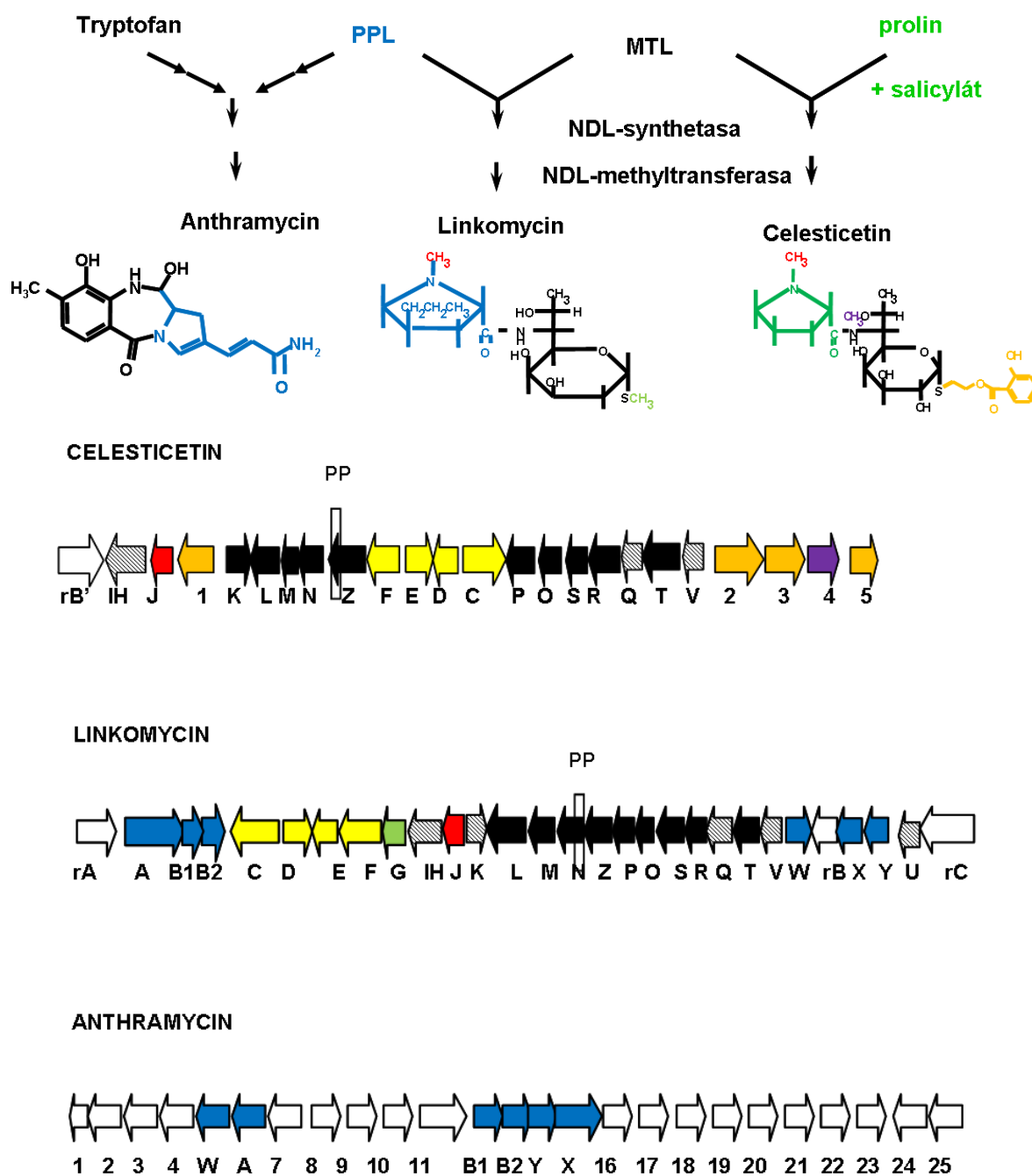
Protein	Homologní proteiny	Prokázaná funkce	Předpokládaná funkce
LmrA	Nadrodina MFS proteinů		Transport linkomycinu z buňky, rezistence
LmbA	γ -glutamyltranspeptidasy (AM)	-	-
LmbB1	Dioxygenasy (AM)	DOPA extradiol dioxygenasa	
LmbB2	-	Tyrosin hydroxylasa	
LmbC	Adenylační domény PKS a NRPS (zejména samostatné A-domény)	Adenylace PPL - aktivace pro vstup do kondenzační reakce	
LmbD	-		Podjednotka NDL-synthetasy
LmbE	Tvorba a štěpení amidové vazby		Katalytická podjednotka NDL-synthetasy
LmbF	Aminotransferasy		Podjednotka NDL-synthetasy
LmbG	methyltransferasy		Methylace MTL v pozici C1
LmbIH	TldD proteasy		Regulační (podpůrná)
LmbJ	SAM-dependentní methyltransferasy	NDL-methyltransferasa	
LmbK	Hydrolasy, fosfatasy (CM)		Regulační, biosyntéza MTL
LmbL	Dehydrogenasy (CM)		Biosyntéza MTL

LmbM	4,6-dehydratasy (CM)		Biosyntéza MTL
LmbN	ACP proteiny (acyl carrier proteins), Isomerasy (CM)		Podjednotka NDLSynthetasy, biosyntéza MTL
LmbZ	Dehydrogenasy (CM)		Biosyntéza MTL
LmbP	Kinasy cukrů (CM)		Biosyntéza MTL
LmbO	Nukleotidyltransferasy (CM)		Biosyntéza MTL
LmbS	Aminotransferasy (CM)		Biosyntéza MTL
LmbR	Transaldolasy (CM)		Biosyntéza MTL
LmbQ	TldD proteasy		Regulační (podpůrná)
LmbT	Glykosyltransferasy (CM)		Biosyntéza MTL, regulační
LmbV	-		Biosyntéza MTL, regulační
LmbW	Methyltransferasy (AM)		Biosyntéza PPL, methylace postranního řetězce v pozici C4
LmrB	23S rRNA methyltransferasy		Modifikace 23S rRNA, rezistence
LmbX	Biosyntéza fenazinů (AM)	Biosyntéza PPL	
LmbY	Flavin dependentní oxidoreduktasy (AM)		Biosyntéza PPL
LmbU	Předpokládané regulátory biosyntézy aminokumarinů (CloE, NovE a CouE)		Regulační
LmrC	ABC transportéry		Transport linkomycinu z buňky, rezistence

Proteiny jsou uspořádány podle pořadí genů v *lmb* shluku (Obr. 22)

CM – enzymy pro metabolismus cukrů

AM – enzymy pro metabolismus aminokyselin



Obr. 22: Biosyntetické genové shluky pro biosyntézu linkosamidových antibiotik a anthramycinu. Homologní geny a části molekul, jejichž syntézy se geny účastní, jsou označeny stejnou barvou (upraveno podle KOBĚRSKÁ *et al.* 2005, 2008, HU *et al.* 2007).

Modře jsou označeny geny podle předpokladů se účastníci biosyntézy PPL; černě – MTL; žlutě – předpokládané podjednotky NDL-synthetasy, k nim řadíme i přenašeč aminokyseliny (PP) označeny rámečkem; šedě – pravděpodobné regulační proteiny; červeně – NDL – methyltransferasa; oranžově – syntéza salicylátu; fialově – methylace v pozici C7 u celesticetinu; zeleně – methylace v pozici C1 linkomycinu; bíle – rezistence.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Bakteriální kmeny

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355):** typový kmen produkující linkomycin. Kmen byl získán ze sbírky Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

***Streptomyces lincolnensis* jΔX:** kmen odvozený z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Kmen má inaktivovaný gen *lmbX* metodou REDIRECT targeting system a tím zastavenou produkci PPL a linkomycinu. Kmen byl připraven v rámci diplomové práce Mgr. Yvonou Smutnou (SMUTNÁ 2007).

***Streptomyces lincolnensis* ΔIH** – kmen odvozený z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Kmen má inaktivovaný gen *lmbIH* metodou REDIRECT targeting system. Kmen byl připraven Mgr. Markétou Koběorskou (OLŠOVSKÁ *et al.* 2007).

***Streptomyces lincolnensis* ΔQ** – kmen odvozený z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Kmen má inaktivovaný gen *lmbQ* metodou REDIRECT targeting system. Kmen byl připraven Mgr. Markétou Koběorskou.

***Streptomyces lincolnensis* ΔU** – kmen odvozený z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Kmen má inaktivovaný gen *lmbU* metodou REDIRECT targeting system. Kmen byl připraven Mgr. Markétou Koběorskou.

***Escherichia coli* DH5α:** kmen s genotypem F⁻, φ80dlacZΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Takara, Japonsko).

***Escherichia coli* JM109:** kmen s genotypem e14-(McrA⁻), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (rk⁻ mk⁺), *supE44*, *relA1*, Δ(*lac-proAB*), [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*] (Promega, USA)

***Escherichia coli* DH5α/pIJ773:** kmen s genotypem F⁻, φ80dlacZΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, nesoucí plazmid pIJ773. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* BW25113/pIJ790:** kmen s genotypem ($\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-4}$), $\text{lacI}p\text{-4000}(\text{lacI}^Q)$, λ^- , $\text{rpoS369}(\text{Am})$, rph-1 , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, hsdR514), nesoucí plazmid pIJ790. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* ET12567/pUZ8002:** nemethylující kmen s genotypem dam dcm hsdS , nesoucí plazmid pUZ8002. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* GM2929:** kmen s genotypem $\text{dam13:Tn9}(\text{Cam}^r)$ $\text{dcm-6 mcrB1 hsdR2}(\text{rk}^- \text{mk}^+)$ mcrA recF143 – nemethylující kmen (zachována jen protektivní methylace) (New England Biolabs).

***Escherichia coli* BT340:** Kmen DH5 α s genotypem: F^- , $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$, $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$, deoR , recA1 , endA1 , $\text{hsdR17}(\text{rk}^- \text{mk}^+)$, phoA , supE44 , λ^- , thi-1 , gyrA96 , relA1 , nesoucí plazmid pCP20. Kmen byl získán z *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, USA.

***Kocuria rhizophila* CCM 552:** indikátorový kmen citlivý k linkomycinu. Kmen byl získán ze sbírky Czech Collection of Microorganisms.

***Escherichia coli* CCM 3988:** indikátorový kmen citlivý k linkomycinu. Kmen byl získán ze sbírky Czech Collection of Microorganisms.

Sbírka klinických izolátů stafylokoků: klinické izoláty koagulasa-negativních methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus* z českých nemocnic (Brno Bohumín (BB), Krč (KR), Královské Vinohrady (KV), Olomouc (OL), Ostrava (OV), Plzeň (PL), Ústí nad Labem (UL)) Rezistenční fenotypy a genotypy těchto kmenů byly charakterizovány v naší laboratoři (NOVOTNÁ *et al.* 2005, NOVOTNÁ 2007).

***Staphylococcus aureus* ATCC 29213:** kontrolní kmen citlivý k linkosamidům (ze sbírky American Type Culture Collection).

***Staphylococcus aureus* CIP 107907:** kmen nesoucí gen *vgaA* pro rezistenci k streptograminům B (ze sbírky Institut Pasteur Collection).

Sbírka půdních aktinomycet: kmeny byly izolovány v naší laboratoři z různých typů půd metodou popsanou ve článku ČERMÁK *et al.* 2008.

4.1.2. Plazmidy

pIJ773 – konstrukt je odvozen od vektoru pBluescriptKS(+) (Stratagene) a nese inaktivační kazetu. Součástí inaktivační kazety jsou: gen kódující rezistenci k apramycinu (*aac(3)IV*), počátek replikace plazmidu pRP4 (*oriT*), a cílová FRT místa rozpoznávaná FLP rekombinací (Obr. 23).

pIJ790 – konstrukt s teplotně senzitivním počátkem replikace (repA101ts), který nese gen kódující rezistenci ke chloramfenikolu (cat). Konstrukt dále nese geny (*gam*, *bet* a *exo*), jejichž proteinové produkty napomáhají homologní rekombinaci mezi okolím inaktivovaného genu a homologní sekvencí vloženou do inaktivační kazety. Geny *gam*, *bet* a *exo* jsou pod kontrolou arabinosou indukovatelného promotoru P araBAD. Plazmid se replikuje při 30°C, jeho ztráta je navozena při 37°C.

pUZ8002 – konstrukt, který slouží k „*in trans*“ mobilizaci kosmidu nesoucího inaktivační kazetu s *oriT*. pUZ8002 postrádá „*in cis*“ fungující lokus pro vlastní transfer. Konstrukt nese gen pro rezistenci ke kanamycinu.

pCP20 – konstrukt s teplotně senzitivním počátkem replikace nese geny kódující rezistenci ke chloramfenikolu a ampicilinu a dále gen kódující FLP rekombinasi; FLP rekombinasa rozpoznává FRT sekvenci inaktivační kazety a odstraňuje její centrální část. Na místě kazety je zanechán 81 pb dlouhý úsek DNA, tzv. jizvu. Plazmid se replikuje ve 30°C. Syntéza FLP rekombinasy je indukována ve 42°C a zároveň je navozena ztráta pCP20.

LK6 – kosmid odvozený od vektoru SuperCos1 (Stratagene, USA). Konstrukt nese cca 40 000 pb dlouhý fragment chromozomální DNA *S. lincolnsensis* ATCC 25466, který obsahuje úplnou sekvenci linkomycinového biosyntetického shluku. Kosmid nese geny pro kanamycinovou a karbenicilinovou rezistenci (KOBERSKÁ *et al.* 2008).

pGEM-T – konstrukt o velikosti 3 kpb dodávaný v komerční soupravě pGEM-T Vector System (Promega, USA) v linearizované formě. Na obou koncích má po jednom přesahujícím thyminu a je používán pro vysoce účinné AT klonování. Plazmid dále obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu, gen *lacZ* umožňující modrobílou selekci a místa pro nasedání primerů pUCM13 forward a pUCM13 reverse.

pOSV556 – konstrukt o velikosti 9 kpb nese konstitutivní promotor genu *ermE* a *oriT* místo. Může být pomnožen v *E. coli* a pak pomocí konjugace přenesen do streptomycety. Má integrační *att* místo, přes které se může vkládat do *attB* místa v chromozómu (pokud je tam přítomno). Dále plazmid obsahuje geny pro rezistenci k ampicilinu a hygromycinu. Plazmid byl získán darem od Dr. Gregory Challise (University of Warwick, Velká Británie).

4.1.3. Enzymy a chemikálie

Enzym	Výrobce
Restrikční endonukleasy	New England Biolabs

DyNAzyme II DNA polymerase	Finnzymes
LA DNA Polymerases Mix	Top Bio
T4 DNA ligasa	Promega
Lysozym	Sigma

Použité chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty (zakoupeno od Lachemy (Česká republika) nebo Sigma-Aldrich (Německo)). Chemikálie pro UPLC byly kvality HPLC grade.

Prekurzory linkomycinu PPL, MTL, NDL a také deriváty prolinu 4-L-butylprolin a 4-L-pentylprolin byly připraveny chemickou syntézou v laboratořích Mikrobiologického ústavu, v.v.i. AV ČR. Postup přípravy MTL, NDL, PPL je uveden ve článku KAMENÍK *et al.* 2009; 4-L-butylprolin (BUPL) a 4-L-pentylprolin (PEPL) byly připraveny Dr. Radkem Gažákem z Laboratoře biotransformací, Mikrobiologický ústav, v.v.i. (dále jen MBÚ) a podrobný postup je uveden v příloze k dizertační práci.

4.1.4. Kultivační média

LB médium

trypton	10 g
kvasniční extrakt	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH 7,5	

LB agar

LB médium	1000 ml
agar	15 g

SOC médium:

kvasniční extrakt	5,5 g
trypton	20 g
NaCl 1 M	10 ml
KCL 1 M	2,5 ml
dH ₂ O	970 ml
pH 7,0	
<i>po sterilizaci přidat</i>	
2 M MgCl ₂	10 ml
2 M glukosa	10 ml

MS agar:

agar	20 g
manitol	20 g
sójová mouka	20 g
vodovodní H ₂ O	do 1000 ml
pH neupravováno	

YEME:

kvasniční extrakt	3 g
pepton	5 g
sladový extrakt	3 g
sacharosa	340 g
glukosa	10 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH 7,2	
<i>po sterilizaci přidat:</i>	2,5 M MgCl ₂ 2 ml

YEME produkční:

kvasniční extrakt	4 g
pepton	5 g
sladový extrakt	10 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH 7,2	

GYM agar:

kvasniční extrakt	4 g
sladový extrakt	10 g
glukosa	4 g
CaCO ₃	2 g
agar	12 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH 7,2	

AVM médium:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
kvasniční extrakt	2 g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	50 mg
CaCO ₃	5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	50 mg
MnSO ₄ . 7H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	100 mg
dH ₂ O	ad 880 ml

pH 7,4

po sterilizaci přidat:

25% glukosa	120 ml
-------------	--------

2 x YT médium:

trypton	16 g
kvasniční extrakt	10 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	do 1000 ml

MH agar

MH agar (Merck)	34 g
dH ₂ O	do 1000 ml

DNA agar:

Difco Nutrient Agar	23 g
dH ₂ O	do 1000 ml

B1 agar:

Hovězí extrakt	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH 7,2	

R2YE agar:

Sacharosa	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,12 g
Glukosa	10 g
kasaminové kys.	0,1 g
Agar	20 g
dH ₂ O	ad 800 ml

pH 7,2

Po sterilizaci přidat:

kvasniční extrakt (10%)	50 ml
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	10 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O (3,68%)	80 ml
L-prolin (20%)	15 ml
TES (5,73%, pH 7,2)	100 ml
stopové prvky	2 ml
1M NaOH	5 ml

Stopové prvky:

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	10 mg
dH ₂ O	do 1000 ml

4.1.5. Roztoky a pufry

TE pufr: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TE⁻¹ pufr: 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

TE⁻¹ RNAsa A: TE⁻¹, 20 µg/ml ribonukleasa A

TAE pufr: 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,0

10x DNA vzorkový pufr: 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 20% glycerol, 0,002% bromfenolová modř, pH 8,0

TES pufr: 20 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, pH 7,5

T pufr:

sacharosa	25 ml
H ₂ O	75 ml
stopové prvky	0,2 ml
K ₂ HPO ₄ (2,5%)	1 ml
K 9,3 ml směsi přidat:	
CaCl ₂	0,2 ml
1M Tris/kys. maleinová (pH 8,0)	0,5 ml

P pufr :

sacharosa	103 g
K ₂ SO ₄	0,25g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,02g
stopové prvky	2 ml
Doplnit dH ₂ O na 800ml	
<i>Po sterilizaci k 80 ml přidat:</i>	
K ₂ HPO ₄ (0,5%)	1 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O (3,68%)	10 ml
TES pufr (5,73%, pH 7,2)	10 ml

Izolace plazmidové DNA (miniprep)

Roztok I: 25 mM Tris.HCl, 50 mM glukosa, 10 mM EDTA, pH 8,0

Roztok II: 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS (připravován vždy čerstvý)

Roztok III: 3M CH₃COOK pH 4,8 (pH upraveno ledovou kyselinou octovou)

Zásobní roztoky antibiotik (1000x koncentrované)

Ampicilin, Karbenicilin 100 mg/ml (rozpuštěno v dH₂O)

Apramycin 50 mg/ml (rozpuštěno v dH₂O)

Kanamycin 50 mg/ml (rozpuštěno v dH₂O)

Hygromycin 50 mg/ml (rozpuštěno v dH₂O)

Chloramfenikol 25 mg/ml (rozpuštěno v 100% ethanolu)

Kyselina nalidixová 25 mg/ml (rozpuštěno v 0,3 M NaOH)

Do média byla přidávána antibiotika v poměru 1:1000 (1 ml zásobního roztoku do 1000 ml média).

Všechna antibiotika byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Disky napouštěné klindamycinem (2 µg/disk), linkomycinem (2 µg/disk) a erythromycinem (15 µg/disk) byly zakoupeny u firmy Oxoid (Velká Británie).

Roztoky pro modrobílou selekci:

Agar pro modrobílou selekci byl připraven podle následujícího postupu. Do 1 litru rozehrátého agaru bylo přidáváno 1,5 ml zásobního roztoku Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranosid) (20 mg/ml DMSO) do finální koncentrace 30 μ g/ml) a 0,4 ml zásobního roztoku IPTG (isopropyl- β -thiogalakto-pyranosid) (1M) do finální koncentrace 0,4 mM.

4.1.6. Komerční soupravy

Izolace plazmidové DNA z *E. coli* – Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a JETSTAR Plasmid Midiprep (Genomed).

Izolace DNA z agarosového gelu a PCR reakční směsi – Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Čištění PCR produktů – Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) a MinElute PCR purification kit (Qiagen).

TA klonování - pGEM T Vector system (Promega). Souprava obsahuje linearizovaný vektor pGEM s T-přesahem na obou koncích, T4 DNA ligasu a kompetentní buňky JM109.

Standard molekulových velikostí pro DNA elektroforézu v agarosovém gelu- 1kb PLUS DNA ladder (Gibco). Standard obsahuje 20 fragmentů od 100 bp do 12000 bp.

Při použití všech komerčních souprav se postupovalo přesně podle návodu od výrobce.

Desky pro tenkovrstvou chromatografii – Desky TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) jsou pokryty sorbentem silikagelem, který je polární a představuje pevnou stacionární fázi. Desky rovněž obsahují fluorescenční indikátor, F254, který excituje při vlnové délce 254 nm.

4.2. Metody4.2.1. Kultivace *E. coli*

Buňky *E. coli* byly kultivovány v tekutých mediích nebo na pevných agarových plotnách (LB, SOC) při 37°C, nebo se kultivační teplota řídila vektorem, který buňky nesly. Tekuté kultury byly inkubovány na rotační třepačce při 200 RPM. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

4.2.2. Příprava kompetentních buněk

SOC médium (250 ml) bylo zaočkováno přes noc narostlou kulturou na OD₅₅₀=0,01. Kultivace probíhala na rotační třepačce do dosažení OD₅₅₀ = 0,4 - 0,6.

Poté byla kultura chlazená 10 min v ledové lázni a buňky byly odděleny centrifugací (10 min, 4°C, 1500x g), promyty 10% glycerolem za týchž podmínek a resuspendovány v 1 ml 10% glycerolu. Suspenze buněk byla rozdělena na alikvoty a zamražena při -70 °C, nebo přímo použita k transformaci.

4.2.3. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA elektroporací

K 50 µl čerstvě připravené suspenze kompetentních buněk bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA v objemu 2 µl. Suspenze byla promíchána a inkubována 20 min v ledu. Poté byly buňky vystaveny pulzu elektrického napětí v ledově vychlazených elektroporačních kyvetách v FPP elektroporátoru (vyroben v dílnách MBÚ) nastaveném na 300 V, 32 µF. Po něm byly ihned resuspendovány v 1 ml LB média, 10 min chlazeny na ledu a poté kultivovány při 37°C nebo 30°C po dobu 1 - 1,5 h. Po ukončení kultivace byla kultura vyseta na misky se selekční půdou obsahující příslušné antibiotikum.

4.2.4. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA teplotním šokem

K 50 µl suspenze kompetentních buněk JM109 (Promega) bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA v objemu 2 µl. Suspenze byla promíchána a inkubována 20 min v ledu. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku při 42°C po dobu 50 s. Po šoku byly buňky inkubovány 2 min v ledu, pak bylo přidáno 950 µl SOC média předeřhátého na 37°C. Buňky byly kultivovány při 37°C po dobu 1,5 hod. Po ukončení kultivace byla kultura vyseta na misky se selekční půdou obsahující příslušné antibiotikum a pěstována při 37°C přes noc .

4.2.5. Kultivace aktinomycet

Buňky *Streptomyces lincolnensis* (dále *S. lincolnensis*) byly kultivovány v tekutých mediích (YEME, AVM) nebo na pevných půdách (R2YE, MS, DNA, GYM) při 28 – 30°C. Tekuté kultury byly inkubovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml, které byly opatřeny vlisy pro zabránění tvorby shluků mycelia, na rotační třepače při 230 RPM. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

Půdní aktinomycety byly kultivovány buď v tekutém nebo na pevném GYM médiu při 28°C.

4.2.6. Příprava spor *S. lincolnensis*

Jeden mililitr přes noc narostlé kultury *S. lincolnensis* byl vyset na misky s MS agarem o průměru 8 cm. Po pěti dnech byla mycelia se spory setřena, pomocí vortexu resuspendována v odpovídajícím množství sterilní destilované vody a suspenze byla zfiltrována přes sterilní vatový filtr. Spory byly ze suspenze odděleny centrifugací (4000x g, 10 min, 20°C) a resuspendovány ve 20% glycerolu. Suspenze byla rozdělena na alikvoty a uchována při – 20°C.

4.2.7. Kultivace *S. lincolnensis* pro sledování produkce linkomycinu

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média spory ze šikmého GYM agaru a kultivací na třepačce po dobu 30 h. AVM médium (25 ml) bylo zaočkováno 1,25 ml inokula. Kultivace probíhala na rotační třepačce při 28°C a po pěti dnech byla narostlá kultura oddělena centrifugací (4000x g, 10 min, 20°C). Supernatant (fermentační médium) byl použit k další analýze.

4.2.8. Kultivace půdních aktinomycet pro sledování produkce sekundárních metabolitů

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml tekutého GYM média spory z GYM agaru a kultivací na třepačce po dobu 30 h. Čerstvé GYM médium (50 ml) bylo zaočkováno 2,50 ml inokula. Kultivace probíhala na rotační třepačce při 28°C a po deseti dnech byla kultura oddělena centrifugací (4000x g, 10 min, 20°C). Supernatant (fermentační médium) byl použit k další analýze.

4.2.9. Příprava protoplastů *S. lincolnensis*

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média s 10% sacharosou a 5 mM MgCl₂ spory ze šikmého agaru a inkubací na třepačce ve 28°C po dobu 24 h. Poté byl 1 ml inokula přeočkován do čerstvého YEME média s 10% sacharosou, 5 mM MgCl₂ a 0,5% glycinem a kultura byla inkubována na třepačce ve 28°C po dobu 16-17 h. Buňky byly odděleny centrifugací (10 min, 12°C, 6000x g), dvakrát promyty 15 ml P pufru za týchž podmínek a resuspendovány v 10 ml P pufru s lysozymem (2 mg/ml). Suspenze buněk byla inkubována ve 30°C s občasným promícháním. Tvorba protoplastů byla sledována mikroskopicky. Zbytky mycelia byly odstraněny centrifugací (10 min, 20°C, 1000x g). Protoplasty byly přefiltrovány přes sterilní vatový filtr, centrifugovány (10 min, 20°C, 3000x g) a dvakrát promyty P pufrům za týchž podmínek. Nakonec byly sedimentované protoplasty resuspendovány ve 200 µl P pufru a ihned použity pro transformaci.

4.2.10. Transformace protoplastů *S. lincolnensis*

Pět mikrolitrů plazmidové DNA (100 ng/μl) bylo smícháno s 5 μl 50% sacharosy a ke směsi bylo přidáno 100 μl suspenze protoplastů. Po promíchání bylo k suspenzi přidáno 200 μl T pufu, suspenze protoplastů byla opět promíchána a ihned vyseta na R2YE agar. Po 16 h inkubace ve 30°C byla miska s protoplasty přelita 1 ml vodného roztoku odpovídajícího antibiotika (zde kanamycinu o koncentraci 200 μg/ml R2YE agaru) a inkubována ve 30°C dalších 7-10 dnů.

4.2.11. Transformace *S. lincolnensis* plasmidovou DNA mezidruhovou konjugací s *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 byly elektroporací transformovány kosmidem LK6 s inaktivační kazetou a selektovány na LB médiu s apramycinem (50 μg/ml) a karbenicilinem (100 μg/ml). Jedna kolonie byla zaočkována do 10 ml LB média obsahujícího apramycin (50 μg/ml), chloramfenikol (25 μg/ml) a kanamycin (50 μg/ml) a kultivována přes noc. Sto mikrolitrů narostlé kultury bylo přeočkováno do 10 ml čerstvého LB média obsahujícího apramycin (50 μg/ml), chloramfenikol (25 μg/ml) a kanamycin (50 μg/ml) a inkubováno na třepačce do dosažení $OD_{600} = 0,4$ (3 - 4 h). Antibiotika byla z kultury odstraněna dvojnásobným promytím buněk 10 ml LB média a centrifugací (1000x g, 10 min, 20°C). Buňky byly poté resuspendovány v 1 ml LB média. K 10 μl sporové suspenze *S. lincolnensis* (10^8 cfu) bylo přidáno 500 μl 2 × YT média, spory byly podrobeny tepelnému šoku v 50°C po dobu 10 min a ochlazeny na laboratorní teplotu. Pak 0,5 ml suspenze buněk *E. coli* bylo smícháno s 0,5 ml sporové suspenze *S. lincolnensis* a centrifugováno (10000x g, 5 s, 20°C). Sediment byl resuspendován v 50 μl reziduálního média. Ze suspenze byla připravena ředící řada od 10^{-1} to 10^{-4} (suspenze byla ředěna sterilní dH₂O). Sto mikrolitrů z každého ředění bylo vyseto na MS agar s 10 mM MgCl₂ bez selekce a inkubováno ve 30°C. Po 16-20 h byla každá miska o průměru 9 cm rovnoměrně přelita 1 ml sterilní destilované H₂O obsahující 0,5 mg kyseliny nalidixové a 1,25 mg apramycinu a dále inkubována ve 30°C po dobu 3 - 5 dnů.

4.2.12. Obohacovací pokusy s mutantními kmeny *S. lincolnensis*

Obnovení produkce linkomycinu přídatkem meziproductů jeho biosyntézy anebo produkce derivátů linkomycinu po přidání derivátů prolinu bylo ověřováno biologickým testem. Linkomycin, produkováný po přidání chybějícího prekurzoru, difunduje z agarového bločku a zabíjí citlivý organizmus (*Kocuria rhizophila* CCM 552), a na misce je patrná inhibiční zóna. Agarový bloček, vyrobený nalitím 200 μl

GYM agaru do jamky mikrotitrační destičky, byl zaočkován 10 µl sporové suspenze *S. lincolnensis*. Prekurzory linkomycinu byly přidávány do agaru do konečné koncentrace 200 µg/ml. Destička byla inkubována ve 30°C po dobu sedmi dnů. Na misku s B1 agarem bylo nanášeno 1 ml suspenze buněk *K. rhizophila* ve sterilním 150 mM NaCl (zákal mezi 0,5 - 1 McFarlandovy stupnice). Suspenze byla rozetřena po povrchu misky a zbytek odebrán pipetou. Agarový bloček s kulturou *S. lincolnensis* byl vyjmut z mikrotitrační destičky a přenesen na misku zaočkovanou *K. rhizophila*. Miska byla inkubována ve 30°C přes noc a inhibiční zóny byly dokumentovány naskenováním.

Pro účely obohacovacích pokusů v tekutém médiu byla napěstována kultura v YEME médiu a příslušný intermediát byl přidáván na začátku kultivace do AVM média v konečné koncentraci 100 nebo 200 µg/ml. Zbytek kultivace probíhal stejně jako v případě sledování produkce linkomycinu (Kap. 4.2.7.).

4.2.13. Kultivace *K. rhizophila*

Buňky *K. rhizophila* byly kultivovány na B1 agaru při 37°C po dobu 16 h.

4.2.14. Kultivace klinických izolátů stafylokoků

Kmeny stafylokoků byly kultivovány na MH agaru ve 37°C po dobu 24 - 30 h.

4.2.15. Diskový difuzní test

Diskový difuzní test byl proveden podle manuálu URBÁŠKOVÁ 1998. Kultura stafylokoků byla zaočkována na misky s MH agarem a pěstována při teplotě 37°C po dobu 16 h. Buňky byly rovnoměrně kličkou rovnoměrně rozetřeny po celé ploše Petriho misky s MH agarem. Na takto připravenou misku byly pokládány disky obsahující příslušné antibiotikum (2 µg/disk). Misky s disky byly inkubovány ve 37°C po dobu 16 - 24 h. Velikost inhibiční zóny byla odečtena pomocí pravítka.

4.2.16. Agarová diluční metoda

Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena pomocí agarové diluční metody v mikrotitrační destičce. Kultura stafylokoků byla zaočkována na misky s MH agarem a pěstována při teplotě 37°C po dobu 16 h. Narostlé buňky byly použité pro přípravu inokula. Vatovou tyčinkou byl proveden stěr z agaru a buňky byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku (0,15 M NaCl). Výsledný zákal odpovídal zákalu 0,5 - 1 McFarlandovy stupnice. Do 1 ml MH agaru temperovaného při 55°C byla přidávána taková množství zásobních roztoků antibiotik (1 mg/ml), aby finální koncentrace byly

v rozmezí: linkomycin 0,25 – 256 µg/ml, klindamycin 0,125 – 16 µg/ml, PELIN 0,25 – 128 µg/ml. Do jamek mikrotitrační destičky pak bylo pipetováno po 100 µl MH agaru od každého ředění pro každý testovaný kmen. Destičky s agarem byly sušeny ve flow-boxu po dobu 15 min. Do jamek bylo nanášeno po 2 µl inokula. Destičky byly pak inkubovány při 37°C po dobu 24 h.

4.2.17. Izolace plazmidové DNA z *E. coli* alkalickou lyzí

Kolonie *E. coli* byla zaočkována do 5 ml LB média a inkubována na třepače přes noc. Poté byly buňky odděleny centrifugací (4000x g, 4°C, 10 min) a sediment byl resuspendován ve 100 µl Roztoku I. Buňky byly lyzovány přidáním Roztoku II a suspenze byla promíchána převrácením. Směs byla ihned neutralizována přidáním 150 µl Roztoku III a promíchána převrácením. Sražená chromozomální DNA byla odstraněna centrifugací (5 min, 13000x g, 20°C). K supernatantu bylo přidáno 400 µl směsi chloroform/fenol (1:1) a po promíchání a 2 min inkubaci v laboratorní teplotě byla směs centrifugována (5 min, 13000x g, 20°C). Vodná fáze, která obsahovala plazmidovou DNA, byla přenesena do čisté mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 600 µl 2-propanolu. Precipitovaná plazmidová DNA byla oddělena centrifugací (20 min, 13000x g, 20°C) a sediment byl promyt 200 µl 70% ethanolu za týchž podmínek. Sediment byl poté vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v 50 µl sterilní destilované vody.

4.2.18. Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli* komerční soupravou

Pro izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Princip metody je obdobný jako v předchozím případě, DNA však není po renaturaci precipitována alkoholem, nýbrž přečištěna vazbou na aktivované sklo v kolonce. Při používání soupravy bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

4.2.19. Izolace kosmidové DNA komerční soupravou

Pro izolaci kosmidové DNA byla použita komerční souprava JETSTAR (Genomed). Izolace používá iontoměničové kolonky a umožňuje získávat velké molekuly DNA ve vysoké koncentraci. Při používání soupravy bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

4.2.20. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

Restrikční reakce obsahovala 1/10 objemu restrikčního pufru, 1/100 BSA (bovine serum albumin), restrikční enzym 5 U/ μ g DNA, DNA 5 - 10 μ g a vodu do finálního objemu 100 - 200 μ l. Restrikční reakce probíhala při 37°C po dobu 2 - 3 h. Restrikční enzymy byly inaktivovány zahřátím reakční směsi na 65°C.

4.2.21. Ligace

Ligační směs obsahovala 1/10 objemu ligačního pufru s ATP, vektorovou a inzertovou DNA v molárním poměru 1:3, T4 DNA ligasu 1 U a vodu do finálního objemu 10 - 20 μ l. Ligace probíhala při 17°C po dobu 2 - 16 h.

4.2.22. Izolace genomové DNA ze streptomycet fenolovou extrakcí

Buňky z 50 ml kultury byly odděleny centrifugací (10 min, 4°C, 4000x g) a promyty 50 ml TE pufrem za týchž podmínek. Sediment byl zvážen, 0,3 g buněk byly resuspendovány v 0,5 ml TES pufru a k suspenzi bylo přidáno 25 μ l zásobního roztoku lysozymu o koncentraci 20 mg/ml. Suspenze byla promíchána a inkubována ve 37°C do začátku lyze (30 - 40 min), což se projevilo zvýšením hustoty suspenze. K lyzátu bylo přidáno 14 μ l zásobního roztoku proteinasy K o koncentraci 0,5 mg/ml a 60 μ l 10% SDS a lyzát byl inkubován 2 h v 55°C. Lyzát byl pak protřepán se stejným objemem směsi fenolu/chloroformu/isoamylalkoholu (25/24/1, pH 8,0), centrifugován (13000x g, 5 min, 20°C) a DNA, přítomná v horní vodné fázi, byla převedena do čisté zkumavky. Tento krok byl jednou opakován. Poté byl k roztoku DNA přidán stejný objem chloroformu, směs byla protřepána, centrifugována (13000x g, 5 min, 20°C) a DNA, přítomná v horní vodné fázi, byla převedena do čisté zkumavky. DNA byla pak precipitována přidáním 0,6 objemu 2-propanolu a 0,1 objemu 3 M octanu sodného, jehož pH bylo upraveno kyselinou octovou na 4,7. Precipitovaná DNA byla natočena na skleněné tyčinky, opláchnuta ethanolem, vysušena a rozpuštěna v TE pufru při 4°C.

4.2.23. DNA elektroforéza

Elektroforetická separace DNA je založena na rozdílné pohyblivosti molekul DNA v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti, tvaru a flexibilitě. Elektroforetická separace DNA byla, podle velikosti analyzovaných molekul, prováděna v 1,0% - 1,5% agarosovém gelu v TAE pufru. Pro zviditelnění DNA pod UV lampou byla DNA barvena ethidiumbromidem, který byl přidáván do agarosy v konečné koncentraci

0,005%. Před nanesením DNA byl ke vzorkům přidáván DNA vzorkový pufr v poměru 1:9. Molekuly DNA byly separovány při konstantním napětí 3 - 5 V/cm².

4.2.24. Izolace DNA fragmentu z agarosového gelu

Po elektroforetické separaci byl proužek gelu obsahující požadovaný DNA fragment vyříznut a DNA byla izolována z agarosového gelu pomocí komerční soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) podle pokynů výrobce. Při izolaci byla agarosa rozložena působením chloristanu sodného a uvolněná DNA byla zachycena na kolonce obsahující aktivované sklo, promyta a následně eluována roztokem o nízké iontové síle nebo sterilní destilovanou H₂O.

4.2.25. Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) byla prováděna v přístrojích T1 Thermocycler 96 (Biometra) v objemu 50 µl. Hybridizační teploty primerů (T_{ann}) byly navrženy podle teploty tání (T_m) vypočítané ze vzorce 4*(G + C) + 2*(A + T). DyNAzyme II DNA polymerasa byla používána pro syntézu inaktivačních kazet. Pro účely ověřovací a koloniové PCR byla používána LA polymerasa. V tomto případě byla elongační teplota 68°C.

Reakční složení:

Pufr s přidaným MgCl ₂	5 µl
Primer forward (10 pmol)	2 µl
Primer reverse (10 pmol)	2 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Demethylsulfoxid (DMSO)	2,5 µl
Templátová DNA (10 – 50 ng)	1 µl
Polymerasa (1U/ µl)	1 µl
Voda	35,5 µl

Reakční podmínky:

- **Syntéza inaktivační kazety**

Denaturace	94°C, 2 min	
Přidání polymerasy (hot start)	68°C	
Denaturace	94°C, 45 s	} 10 cyklů
Nasedání primerů	50°C, 45 s	
Elongace	72°C, 90 s	
Denaturace	94°C, 45 s	} 15 cyklů
Nasedání primerů	55°C, 45 s	
Elongace	72°C, 90 s	
Závěrečná elongace	72°C, 5 min	

- **Ověřovací PCR**

Denaturace	94°C, 2 min	
Přidání polymerasy (hot start)	68°C	
Denaturace	94°C, 45 s	} 30 cyklů
Nasedání primerů	55°C, 45 s	
Elongace	68°C, 90 s	
Finální elongace	68°C, 5 min	

4.2.26. Koloniová PCR

Pro ověření vložení inaktivační kazety do genomu *S. lincolnensis* a testování sbírky půdních aktinomycet na přítomnost hledaných genů byla použita metoda koloniové PCR. Metoda byla převzata a upravena z publikace GATHOGO *et al.* 2003.

Reakční složení:

- **Ověření vložení kazety**

Primery forward a reverse (10 pmol)	po 2 µl
Pufr (Kompletní pro LA polymerasu)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
DMSO	5 µl
Nonident P40	0,5 µl
Voda	34 µl
LA polymerasa (hot start)	0,5 µl

- **Půdní aktinomycety**

Pufr (pro LA polymerasu, bez MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂	3 µl
Primery forward a reverse (10 pmol)	po 2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
100xBSA	3 µl
DMSO	2,5 µl
Nonident P40	0,5 µl
Voda	30,5 µl
LA polymerasa (hot start)	0,5 µl

Templát:

Z misky s narostlou kulturou bylo bambusovým párátkem odebráno malé množství buněk, přeneseno do mikrozkušavky s reakční směsí a promícháno.

Reakční podmínky:

Denaturace	98 °C	10 min	
Přidání polymerasy	68 °C		
Denaturace	95 °C	1 min	} 35 cyklů
Nasedání primerů	55 °C	45 s	
Elongace	68 °C	1, 5 min	
Finální elongace	68 °C	10 min	

4.2.27. Seznam primerů

- Primery pro inaktivaci *lmb* genů

Primer	Sekvence	Inaktivované geny
Nr	5' <u>TGAACCCGGCTCCGCCGGTGACGCAGTACCGCCCGCTCAT</u> GT AGGCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	<i>lmbN</i>
Nr2	5' <u>TGCCGGCTCCCCGCCTTCTCCAGGATCAGGGCGCGTGCTGT</u> AGGCTGGAGCTGCTTC3'	
Nf	5' <u>CACCGCCGCGACACCCTCACCTGGGAGAAACCGTGAGCAT</u> TCCGGGGATCCGTCGACC 3' Start	
N-Cf	5' <u>CCGGCCGCCATCGCCGCGACGGTGGCCCGTATCACCCATTGA</u> ATTCCGGGGATCCGTCGACC3' Stop	3' konec <i>lmbN</i> (v kombinaci s Nr)
N-PPr	5' <u>GGACAGGAGGTTCTCACAACACTCACAGGGGTCTCCTCTG</u> TAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	5' konec <i>lmbN</i> (v kombinaci s Nf)
IHf	5' <u>GCCGCTACCACGTGTCCGTCTACGCCGGGGCGCACGGTGATT</u> CCGGGGATCCGTCGACC 3' Start	<i>lmbIH</i>
IHr	5' <u>GTGAAACGTTCGTGTGAACGGGCGGTTGTGGGGTGGTCA</u> TG TAGGCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	
Kf	5' <u>TGGCCACTCGGCGAGCGGCCGCAGGGAGACGGTGGCATGAT</u> TCCGGGGATCCGTCGACC 3' Start	<i>lmbK</i>
Kr	5' <u>CCGGTGGCATGCCGCCCCGTGACCCGCCCCACCGTCA</u> TGT AGGCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	
Qf	5' <u>GGCCGACGCCGCGGTCGACAGGCTGGCCGAGGTGTCATGAT</u> TCCGGGGATCCGTCGACC 3' Start	<i>lmbQ</i>
Qr	5' <u>GAGCGAGGAAGCTCGGAGGTGCTGAGCGGGGGCGGGCTA</u> TG TAGGCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	

Uf	5' <u>CCAAAGGCAAGAGCGTGAGAAAGGGATGGCAGCCGCGTGA</u> TTCCGGGGATCCGTCGACC 3' Start	<i>lmbU</i>
Ur	5' <u>ACCGCCCGCGGGCGGCAGGGCGGGGGCTCAGAGTTAT</u> GTAG GCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	
Tf	5' <u>GGCGCCAGGTGGCTGCCGGCGGCGTGGCCGGCTATGTGATTCC</u> GGGGATCCGTCGACC 3'	<i>lmbT</i>
Tr	5' <u>GGCGTCGGCCAACTCCCGGACGTTGGGGCGGAAGTCGAATGTAG</u> GCTGGAGCTGCTTC 3'	
Vf	5' <u>CCCGGAAGCTGGGAGAGAGCCATTTACGCCATCGAGTTG</u> ATTCC GGGGATCCGTCGACC 3' Start	<i>lmbV</i>
Vr	5' <u>CGAAGGCGAGCGCGCGCCCCGTTCCGTCCGCGCCGTC</u> ATGTAG GCTGGAGCTGCTTC 3' Stop	

Podškrtnuté jsou úseky homologní okolí inaktivovaného genu, zbytek primeru je homologní sekvencím FRT oblastí. Start a stop kodony inaktivovaných genů jsou vyznačeny tučným písmem.

- Ověřovací primery

Primer	Sekvence
testNf	5' ACCGTCACCCGCCAGGAGTT 3'
testNr	5' AGCCCGTGAGCTCTTCGGTG 3'
chIHf	5' GCAACGCCTCCCACACCAACG 3'
chIHr	5' ACACGGAGCTGGACCTGATGG 3'
chKf	5' GGCCACACGTCGTAGACA 3'
chKr	5' CGCCCTGCCAGAACTC 3'
chQf	5' TGCCGGCAGCCACTGTTCCACC 3'
chQr	5' CCGACGAGCGGCGGAGGATGC 3'
chTf	5' GCCGAACTCGTACTGACC 3'
chTr	5' GCGGGCGAACCTCA 3'
chUf	5' TTCGTCGCGCCCCGGCGCACG 3'
chUr	5' GCGCGACATCGATGAGCGTGG 3'
chVf	5' GCCCCGACGGATAGT 3'
chVr	5' AGCAGATTCCGCACATAG 3'

- Primery pro klonování genu *lmbU*

Primer	Sekvence
klonUf	5' GGG AAGCTT GGGCAAGAGCGTGAGAAAAG 3' HindIII
klonUr	5' AA ACTCGAGT GATGGCTGGTGGGCAGA 3' XhoI

- Degenerované primery

Primer	Sekvence
rC4f ¹	5' CTSGACGARCCSACYAA 3'
rC4r	5' GKYSGTSGGCTCGTC 3'
rB1f ²	5' ARCWCGGYCAGAAAYTTYCT 3'
rB1r	5' CGSGCSACYTCCCAYTG 3'
16Seu27f ³	5' AGAGTTTGTATAGAGTTTGATCMTGGCKCAG 3'
16Seu783r (směs primerů)	5' CTACCAGGGTATCTAATCCTG 3' 5' CTACCGGGTATCTAATCCCG 3' 5' CTACCGGGTATCTCTACCGGGTATCTAATCCCG 3'

Označení bází: S – C nebo G; K – G nebo T; R – A nebo G; Y – C nebo T; W – A nebo T; M – A nebo C.

¹ primery rC4 pro vyhledávání homologů *lmrC* (KOPECKÝ, osobní sdělení).

² primery rB1f pro vyhledávání homologů *lmrB* (ČERMÁK *et al.* 2008).

³ primery 16Seu – pro amplifikaci 16S rRNA (SAKAI *et al.* 2004).

- Sekvenační primery

Primer	Sekvence
pUCM13f	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
pUCM13r	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

4.2.28. TA klonování

LA polymerasa přidává jeden adenin na 3' konec PCR fragmentu. Takové PCR produkty mohou být vloženy do vektoru, obsahujícího na koncích přesahující thyminy. Pro tzv. TA klonování byla používána komerční souprava pGEM-T Vector System (Promega). Při používání soupravy bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce. PCR produkt byl po přečištění ligován do pGEM vektoru. Ligace probíhala při 4°C po dobu 16 h. Dva mikrolitry ligační směsi pak byly transformovány do kompetentních buněk JM109 podle pokynů výrobce. Buňky byly vysety na LB agar

s IPTG a X-Gal a inkubovány při 37°C, 16 hod. K další analýze byly vybrány bílé kolonie.

4.2.29. Sekvenační analýza

Sekvenační analýza byla provedena na servisním pracovišti Mikrobiologického ústavu, v.v.i. (MBÚ) a dále firmou Macrogen (Korea).

Vzorek DNA byl dodáván ve formě vodného roztoku, v koncentraci požadované pracovištěm. Všechny další úpravy vzorků před sekvenční analýzou byly prováděny laborantkou sekvenačního pracoviště. Pro přípravu sekvenační reakce byl používán BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) Potřebná sekvence byla připravena sekvenační reakcí s použitím fluorescenčně značených nukleotidů. Fluorescenční signál byl zpracován na sekvenačním přístroji ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer (MBÚ) a 3730XL Genetic Analyzer (Macrogen).

4.2.30. Metoda inaktivace genů na chromozómu streptomycet

Pro inaktivaci *lmb* genů byl použit systém „REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ (GUST *et al.* 2003). Podrobný protokol lze nalézt na webových stránkách:

http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf.

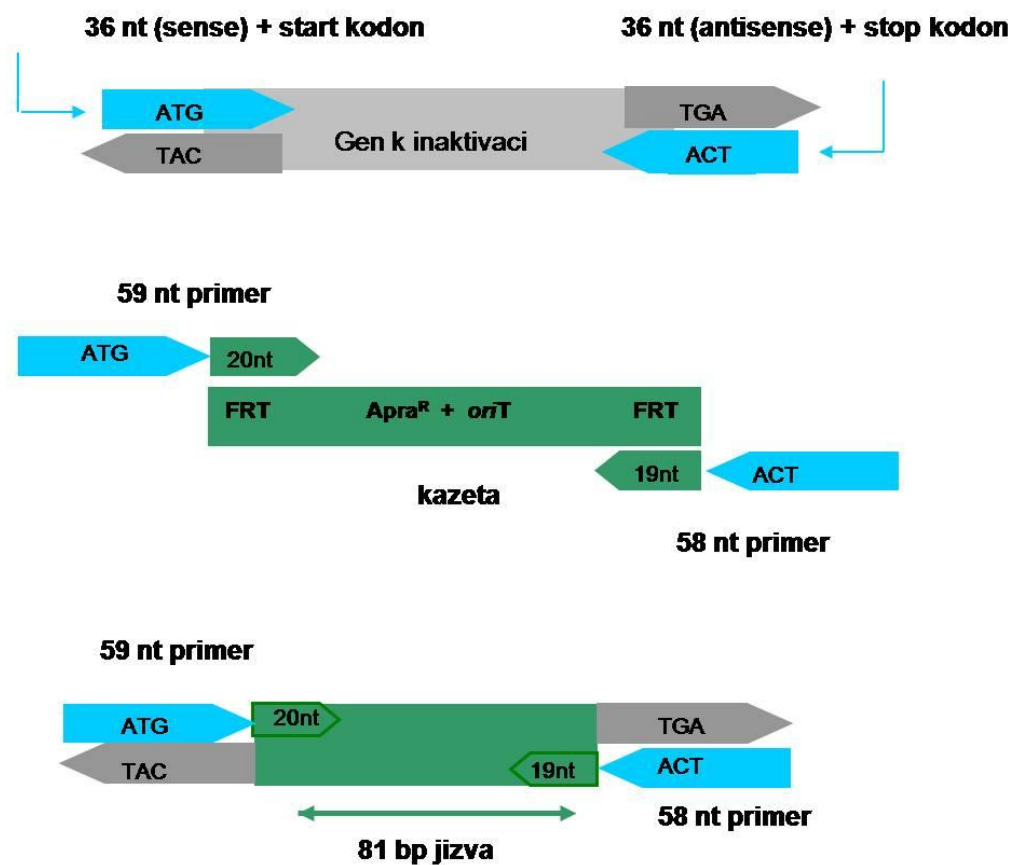
Metody inaktivace genů u streptomycet jsou často založeny na homologní rekombinaci, tj. výměně homogních úseků dvojitým „crossing-over“, při které je gen, nebo jeho část nahrazena inaktivační kazetou.

V systému REDIRECT je součástí inaktivační kazety (Obr. 23) gen kódující rezistenci k apramycinu; *oriT*, který umožňuje mobilizaci konstruktů; FRT sekvence, které jsou cílovým místem pro FLP rekombinasi a sekvence homologní k okolí inaktivovaného genu, které jsou vneseny do kazety v PCR reakci tak, že jsou součástí primerů (Obr. 23). Primer po směru genu (dále „forward“) obsahuje homologní oblast před start kodonem inaktivovaného genu, včetně start kodonu, zatímco primer proti směru („reverse“) – oblast za stop kodonem, včetně stop kodonu. Každý homologní úsek má délku 39 nt. K primeru „forward“ se pak přidává 20 nt dlouhá sekvence homologní s „levým“ koncem inaktivační kazety, a k primeru „reverse“ – 19 nt z „pravého“ konce kazety.

V první fázi inaktivace probíhá rekombinační výměna (Obr. 24) chromozomálního genu, klonovaného v kosmidu SuperCos1, za inaktivační kazetu. Rekombinace probíhá v kmenu *E. coli* BW25113 s plazmidem pIJ790, který nese geny

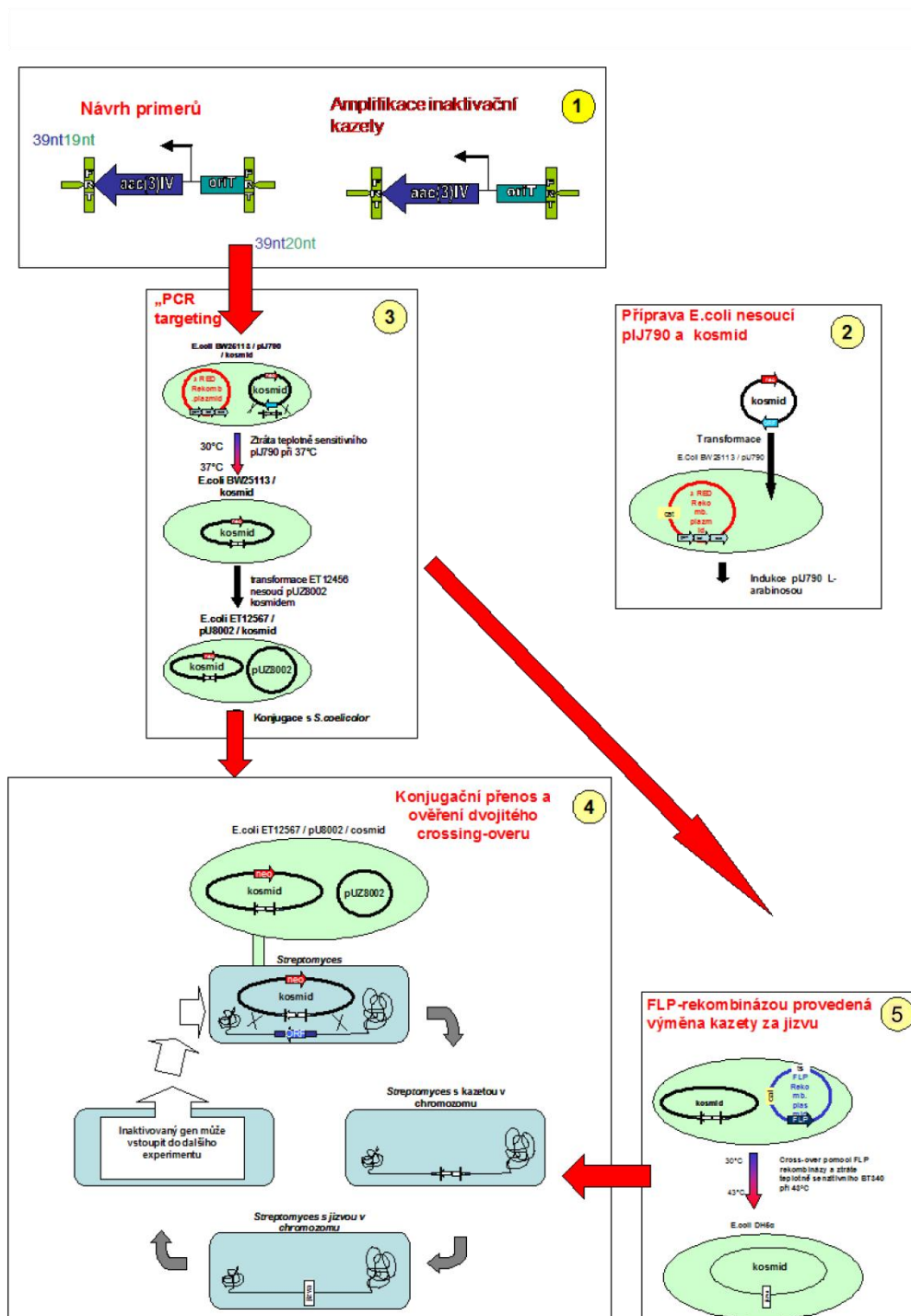
(*gam*, *bet* a *exo*), jejichž proteinové produkty napomáhají homologní rekombinaci mezi okolím inaktivovaného genu a jeho homologní sekvenci vložené do inaktivační kazety. Tak vzniká kosmid s mutací v definované oblasti, v němž je inaktivovaný gen nahrazen inaktivační kazetou. Přítomnost *oriT* v inaktivační kazetě umožňuje přenos mutovaného kosmidu do streptomycet mezidruhovou konjugací, za pomoci proteinových produktů genů, kódovaných plazmidem pUZ8002. Tento plazmid postrádá „*in cis*“ fungující lokus pro vlastní transfer. V buňce streptomycet pak dochází k rekombinaci mezi okolím chromozomálního genu, který má být inaktivován, a homologní sekvencí v okolí inaktivační kazety. Takto je chromozomální gen nahrazen inaktivační kazetou (Obr. 24).

Ve druhé fázi je v mutovaném kosmidu kazeta nahrazena krátkou „in frame“ sekvencí, která nenese stop kodon z genu pro rezistenci k apramycinu a označuje se jako „*jizva*“ (Obr. 23). K výměně kazety za „*jizvu*“ dochází v kmenu *E. coli* BT340 činností FLP rekombinasy, která je kódována genem neseným na plazmidu pCP20. FLP rekombinasa rozpoznává FRT sekvenci v inaktivační kazetě a odstraňuje centrální část inaktivační kazety. Na jejím místě zanechá 81 pb dlouhý úsek DNA – „*jizvu*“, která nemá polární efekt na přepis genů ve stejné transkripční jednotce. Mutovaný kosmid s *jizvou* je pak vnesen do buněk streptomycetového kmene, který má již příslušný gen nahrazen za inaktivační kazetu. Homologní rekombinací je inaktivační kazeta vyměněna za *jizvu* (Obr. 24).



Obr. 23: Schematické znázornění navržení primerů pro inaktivační pokusy.

Modře a šedě jsou označeny sekvence okolí inaktivovaného genu (36 nukleotidů a 3 nukleotidy start nebo stop kodónů), zeleně – sekvence z FRT úseků inaktivační kazety (20 nukleotidů u „forward“ primeru a 19 nukleotidů u „reverse“ primeru) (obrázek byl převzat z diplomové práce SMUTNÁ 2007).



Obr. 24: Schéma postupu inaktivace genu podle protokolu REDIRECT.

1. Návrh primerů a amplifikace inaktivační kazety
2. Transformace kosmidu obsahujícího gen k inaktivaci do *E. coli* BW25113/pIJ790
3. Vložení kazety do kosmidu homolgní rekombinací v *E. coli* BW25113/pIJ790
4. Konjugační přenos kosmidu s inaktivovaným genem a vložení kazety do chromozómu streptomycety
5. Příprava jizvy a přenos kosmidu s jizvou do streptomycety, kde dojde k výměně kazety za jizvu (obrázek převzat z diplomové práce SMUTNÁ 2007).

4.2.31. Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii

Příprava vzorků pro účely UPLC a HPLC analýzy a samotná analýza byly provedeny Mgr. Zdeňkem Kameníkem z Laboratoře genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub (MBÚ) podle protokolu popsaného v OLŠOVSKÁ *et al.* 2007.

Linkomycin a jeho deriváty jsou produkovány do média, proto bylo médium před vlastním stanovením od mycelia odděleno centrifugací (4000x g, 15 min, 4°C). Poté bylo 3 ml média nanášeno na předem ekvilibrovanou (3 ml metanolu a následně 3 ml vody) SPE kolonu (SPE Oasis HLB 3cc, Waters). Soli a polární látky byly odstraněny promytím 3 ml vody a 1 ml 10% methanolu. Linkomycin byl eluován 80% methanolem (1 ml), vysušen a před analýzou rozpuštěn v methanolu. Při analýze média typového produkčního kmene byl vzorek rozpuštěn v takovém množství methanolu, aby finální objem vzorku k analýze byl 15x koncentrován oproti vzorku média. V případě mutantních kmenů, u kterých se očekávala nízká až žádná produkce linkomycinu, byl vzorek 30x koncentrován. Deriváty linkomycinu byly z SPE kolony eluovány 100% methanolem a vzorek k analýze byl desetkrát koncentrován.

V některých případech byl linkomycin extrahován z agarových bločků methanolem. Bločky o objemu 0,5 ml byly homogenizovány v 1 - 1,5 ml metanolu. Zbytky agaru a buněk byly odstraněny centrifugací (4000x g, 5 min, 20°C). Poté nadbytečný methanol byl odpařen na finální objem 0,1 ml. Tento extrakt byl aplikován přímo na chromatografickou kolonu.

4.2.32. Stanovení linkomycinu metodou UPLC

Linkomycin byl v produkčním médiu stanovován metodou UPLC (ultra performance liquid chromatography) na kapalinovém chromatografu UPLC, systém Acquity s PDA detektorem 2996 (Waters). Data byla procesována softwarem Empower 2 (Waters).

Na analytickou kolonu BEH C 18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7μm, nepolární stacionární fáze) (Waters) temperovanou při teplotě 35°C bylo dávkováno 5 μl vzorku. Analyt byl izokraticky eluován dvousložkovou mobilní fází (1mM mravenčan amonný, pH 9.0 : acetonitril, 76:24 (v/v)), při průtokové rychlosti 0,4 ml/min a detekován při vlnové délce $\lambda = 194$ nm. Po každé analýze (3,5 min) byla kolona 1 min promývána 100% acetonitrem a 0,5 min ekvilibrována při počátečních podmínkách složení mobilní fáze (tj. 1mM mravenčan amonný, pH 9 : acetonitril, 76:24 (v/v)). K identifikaci linkomycinu byla použita metoda srovnávání retenčních

časů a UV spekter se standardem linkomycinu a pro kvantifikaci byla sestrojena kalibrační křivka.

4.2.33. Stanovení derivátů linkomycinu metodou UPLC

Deriváty linkomycinu byly stanovovány na kapalinovém chromatografu UPLC, systém Acquity s PDA detektorem 2996 (Waters).

Na analytickou kolonu BEH C18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μm) (Waters) temperovanou při teplotě 35°C bylo dávkováno 5 μl vzorku. Analyt byl eluován mobilní fází ze složky A, 1 mM mravenčan amonný (pH 9.0), a složky B, acetonitril; lineární gradientová eluce min/%B: 0/22, 3/22, 10/52.5; průtoková rychlost, 0,4 ml/min. Po každé analýze následoval výplach kolony (100% acetonitril, 1 min) a její ekvilibrace (1,5 min).

Pro preparativní účely analýza probíhala za podmínek lineární gradientové eluce min/%B: 0/5, 10/52.5 pro 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycin (PELIN) a izokratické eluce (24%B) pro 4'-butyl-4'-depropyl-linkomycin (BULIN). Eluent za kolonou obsahující PELIN (retenční čas 6,40 min) nebo BULIN (retenční čas 5,10 min) byl odebrán, vysušen do sucha a použit pro hmotnostní spektrometrii.

4.2.34. Stanovení prekurzorů linkomycinu

Prekurzory linkomycinu (PPL, MTL a NDL) byly stanovovány podle postupu, popsaného v publikaci KAMENÍK *et al.* 2009. Jako standardy byly používány roztoky PPL (50 μg/ml), MTL a NDL (oboje 30 μg/ml).

Po ukončení kultivace (Kap. 4.2.7.) byly buňky odděleny centrifugací (4000x g, 15 min, 4°C). Fermentační médium bylo použito pro přípravu vzorků ke stanovení PPL a NDL.

V případě stanovení MTL, byly buňky a fermentační médium sonikovány (6 pulzů po 30 s, 50 W, 30s přestávka mezi jednotlivými pulzy); sonikátor Ultrasonic apparatus BBraun (Melsungen, Německo). Zbytky buněk byly odděleny centrifugací (4000x g, 15 min, 4°C). Supernatant (dále jen vzorek) byl použit pro přípravu vzorků ke stanovení jednotlivých biosyntetických intermediátů:

- Derivatizace PPL

Sto mikrolitrů 10 mM roztoku chloraminu-T v 400 mM Na₃BO₃ (pH 9.5) a DMSO, 4:1 (v/v) bylo předeštěno ve vodní lázni (70°C) po dobu 1 min. Do této směsi bylo přidáno 100 μl roztoku standardu PPL nebo vzorku. Směs byla zamíchána a inkubována ve vodní lázni 1 min. Dále bylo přidáno 100 μl 300 mM NaBH₄ v 600 mM

LiOH, směs byla zamíchána a inkubována při 70°C. Po 10 min byla reakční směs centrifugována (12000× g, 5 min, laboratorní teplota). Do 45 µl supernatantu bylo přidáno 10 µl derivatizačního činidla. Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 mg o-ftaldialdehydu v 50 µl acetonitrilu. Takto připravený roztok byl pak ředěn 50 µl 200 mM Na₃BO₃ (pH 9.5) a 4 µl merkaptoethanolu.

- Derivatizace MTL a NDL

Dvě stě mikrolitrů standardního roztoku MTL a NDL nebo vzorku bylo smícháno s 250 µl roztoku 4-chlor-7-nitrobenzofurazanu (30 µg/ml, rozpuštěno v methanolu) a 50 µl 1 M NaHCO₃. Směs byla vortexována po dobu 20 s, inkubována ve vodní lázni (70 °C) po dobu 4 h a pak inkubována 20 min v -20°C.

- Stanovení intermediátů metodou HPLC

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC na kapalinovém chromatografu HPLC Waters s pumpou 600, dávkovačem 717 a fluorescenčním detektorem 474. Data byla zpracována pomocí programu Millenium 32.

Derivatizované vzorky byly nanášeny na analytickou kolonu Luna C₁₈ (250 × 4.6 mm I.D.; průměr částic, 5 µm; Phenomenex), temperovanou při laboratorní teplotě. Mobilní fáze se skládala ze složky A, 20 mM mravenčan amonný (pH 4.7) a acetonitril (10:1 v/v); a složky B, acetonitril.

Derivatizovaný vzorek PPL (25 µl) byl eluován při průtokové rychlosti 1,25 ml/min, s následnou lineární gradientovou elucí (min/%B): 0/30; 1/30; 13/65; 15/100. Po každé analýze byla kolona vypláchnuta (100% acetonitril, 4 min) a ekvilibrována před další analýzou (7 min). Eluent za kolonou byl analyzován fluorescenčním detektorem ($\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 417 \text{ nm}$) se změnou hodnoty gain (nastavení citlivosti detektoru) z 10 do 100 v 6. minutě.

Derivatizovaný vzorek MTL a NDL (10 µl) byl eluován při průtokové rychlosti 1 ml/min, s následnou lineární gradientovou elucí (min/%B): 0/15; 5/33; 15/44; 16/100. Po každé analýze kolona byla vypláchnuta (100% acetonitril, 4 min) a ekvilibrována před další analýzou (7 min). Eluent za kolonou byl analyzován fluorescenčním detektorem ($\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) s nastavenou hodnotou gain 100 po dobu celé analýzy.

4.2.35. Tenkovrstvá chromatografie

Fermentační média půdních aktinomycet byla analyzována na přítomnost sekundárních metabolitů metodou TLC (thin layer chromatography – tenkovrstvé chromatografie). Na desku pokrytou sorbentem silikagelem (TLC Silica gel 60 F₂₅₄,

Merck) bylo nanášeno 30 μ l fermentačního média (Kap. 4.2.8.). Po zaschnutí naneseného vzorku byla deska umístěna do vyvíjecí komory, která byla předem ekvilibrována mobilní fází po dobu 1 h. Sloučeniny byly děleny podle síly adsorpce ke stacionární fázi v použitém eluentu po dobu 1 h. Po ukončení eluce deska byla vyjmuta z komory a vysušena. Přítomnost látek, které byly za daných podmínek eluovány, byla detekována pomocí UV světla o vlnových délkách 254 a 366 nm, a dále reakcí s detekčními činidly. Orcinolové a anisaldehydové činidla byla nanášena postříkem, po uschnutí byla deska zahřívána při 100°C po dobu 5 min. Při dalším způsobu detekce byly krystalky jódu nasypány na dno čisté vyvíjecí komory a TLC deska byla umístěna nad ně. Látky, které reagovaly s párami jódu, se zabarvily dožluta.

Pomocí anisaldehydového činidla se dá detekovat celou řadu molekul s různými reakčními skupinami. Orcinol naopak specificky reaguje s molekulami obsahujícími cukernou část, proto se používá také pro detekci linkomycinu. Jód má afinitu k nenasyceným a aromatickým sloučeninám.

Retenční faktor pro jednotlivé látky byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{Start - detekovaná látka (cm)} \div \text{start - čelo (cm)}$$

Roztoky pro TLC

Mobilní fáze:

- A. Diethylether : methanol : 25% roztok amoniaku amoniak (90:9:2)
- B. Chloroform : methanol : 25% roztok amoniaku amoniak (12:3:0,1)
- C. Ethylacetát : methanol : 25% roztok amoniaku (85:10:5)
- D. n-butanol : kyselina mravenčí : voda (6:5:7)

Detekční činidla:

- Orcinolové činidlo: 250 mg orcinol (3,5-dihydroxytoluen), 44 ml ethanol, 6 ml H_2SO_4
- Anisaldehydové činidlo: ethanol (200 ml): H_2SO_4 (10 ml); p-anisaldehyd (10 ml)
- Krystalický jód – páry jódu

4.2.36. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla provedena Dr. Miroslavem Šulcem z Laboratoře charakterizace molekulární struktury (MBÚ).

Hmotnostní spektra linkomycinu a jeho derivátů byla měřena na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation reflectron time-of-flight) ultraFLEX (Bruker-Daltonics, Bremen, Německo). Pozitivní spektra byla externě kalibrována s použitím monoizotopního $[M+H]^+$ iontu lidského angiotensinu I (1296,69 m/z), peptidu MRFA (Methionin-Arginin-Fenylalanin-Alanin, 524,26 m/z) a matricový pík CCA (kyselina alfa-kyanoskořicová, 379,09 m/z). Jako MALDI matrice byl použit roztok kyselina alfa-kyanoskořicové nebo 2,5 - dihydrobenzoové kyseliny (10 mg/ml 50% MeCN/0.3% kyseliny octové).

Jeden mikrolitr matricového roztoku byl smíchán s 0,5 μ l vzorku rozpuštěného v methanolu. Jeden mikrolitr směsi byl nanesen na terčik a po uschnutí byl vzorek analyzován.

4.2.37. SOFTWARE

Sekvence shluků genů pro biosyntézu linkomycinu *S. lincolnensis* 78-11 a *S. lincolnensis* ATCC 25466, uložené v databázi GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) pod přístupovými čísly X79146 a EU124663, byla analyzována pomocí programu BLAST – Basic Local Alignment Search Tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Analýzy sekvencí byly prováděny pomocí programu LASERGENE (DNASTAR).

Fylogenetické stromy byly sestaveny pomocí programu PHYLIS (<http://www.eve.ucdavis.edu/rcthompson/phylis/>). Stromy byly vyrobeny Ing. Janem Kopeckým z Výzkumného ústavu rostlinné výroby s použitím metody „bootstrapping“. Hodnota „bootstrap“ udává míru spolehlivosti a důvěryhodnosti větví fylogenetického stromu (EFRON *et al.* 1996).

5. VÝSLEDKY

5.1. Inaktivace *lmb* genů s předpokládanou funkcí

Tato část práce byla věnována vyhledávání a mutační analýze *lmb* genů se zatím neprokázanou funkcí. Geny byly vytipovány na základě počítačové srovnávací analýzy shluků genů pro biosyntézu antibiotik linkomycinu a celesticetinu. Pak byla provedena mutační analýza určených genů. V kapitole 5.1.1. jsou uvedeny výsledky mutační analýzy genu *lmbN* podle předpokladu kódujícího jednu z klíčových součástí NDL-synthetasy. Kapitola 5.1.2. popisuje analýzu genů *lmbIH*, *K*, *Q*, *T*, *U* a *V* s neznámou funkcí.

5.1.1. Mutační analýza genu *lmbN* a jeho částí

5.1.1.1. Srovnávací analýza genu *lmbN* a jeho homologu v *ccb* shluku

Srovnávací analýza sousedících genů *lmbN* a *lmbZ* a jejich homologů v celesticetinovém shluku, *ccbN* a *ccbZ*, ukázala na přítomnost sekvence kódující proteinový modul o velikosti 80 AK s vazebným místem pro 4'-fosfopantethein (PP vazebný protein) a vysokým stupněm homologie s ACP doménami proteinů z biosyntézy polyketidových antibiotik (Obr. 17). Pozoruhodným faktem je rozdílné umístění této sekvence v *ccb* a *lmb* shlucích. Zatímco v případě *lmb* shluku je umístěna na 5' konci genu *lmbN*, v případě *ccb* shluku se nachází na 3' konci genu *ccbZ*. Zbývající větší části genů *lmbN* (3' konec) i *ccbZ* (5' konec) kódují proteiny účastnící se syntézy cukru MTL (Obr. 22). Na základě databázové analýzy byl udělán předpoklad, že PP vazebný protein by mohl přenášet aminokyselinový prekurzor linkosamidů (PPL nebo prolin) při jeho kondenzaci s cukernou složkou MTL.

Pro další studium a analýzu tohoto proteinu byla provedena série inaktivačních pokusů, ve kterých byl z chromozómu *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 odstraněn jednak celý gen *lmbN* a jednak jeho jednotlivé konce. Inaktivační pokusy byly provedeny s použitím protokolu REDIRECT PCR targeting system (Kap. 4.2.30.).

5.1.1.2. Inaktivace genu *lmbN* a jeho částí

a. Navržení inaktivačních primerů

Primery pro zavedení oblastí homologie do inaktivační kazety byly navrženy podle schématu na Obr. 25. K navrhování primerů byla použita sekvence *lmb* shluku z produkčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 přístupná v databázi pod číslem X79146 (PESCHKE *et al.* 1995). Gen *lmbN* je ve shluku orientován v opačném (antisense) směru. Primer Nf a Nr obsahovaly přirozené start a stop kodony genu *lmbN*, kdežto primer N-Cf měl uměle zavedený stop kodon pro vznik zkráceného genu *lmbN* obsahujícího pouze 5' koncovou část (PP modul). Očekávané konstrukty po inaktivaci se zavedenou jizvou a ohraničené start a stop kodony jsou uvedeny na Obr. 25.

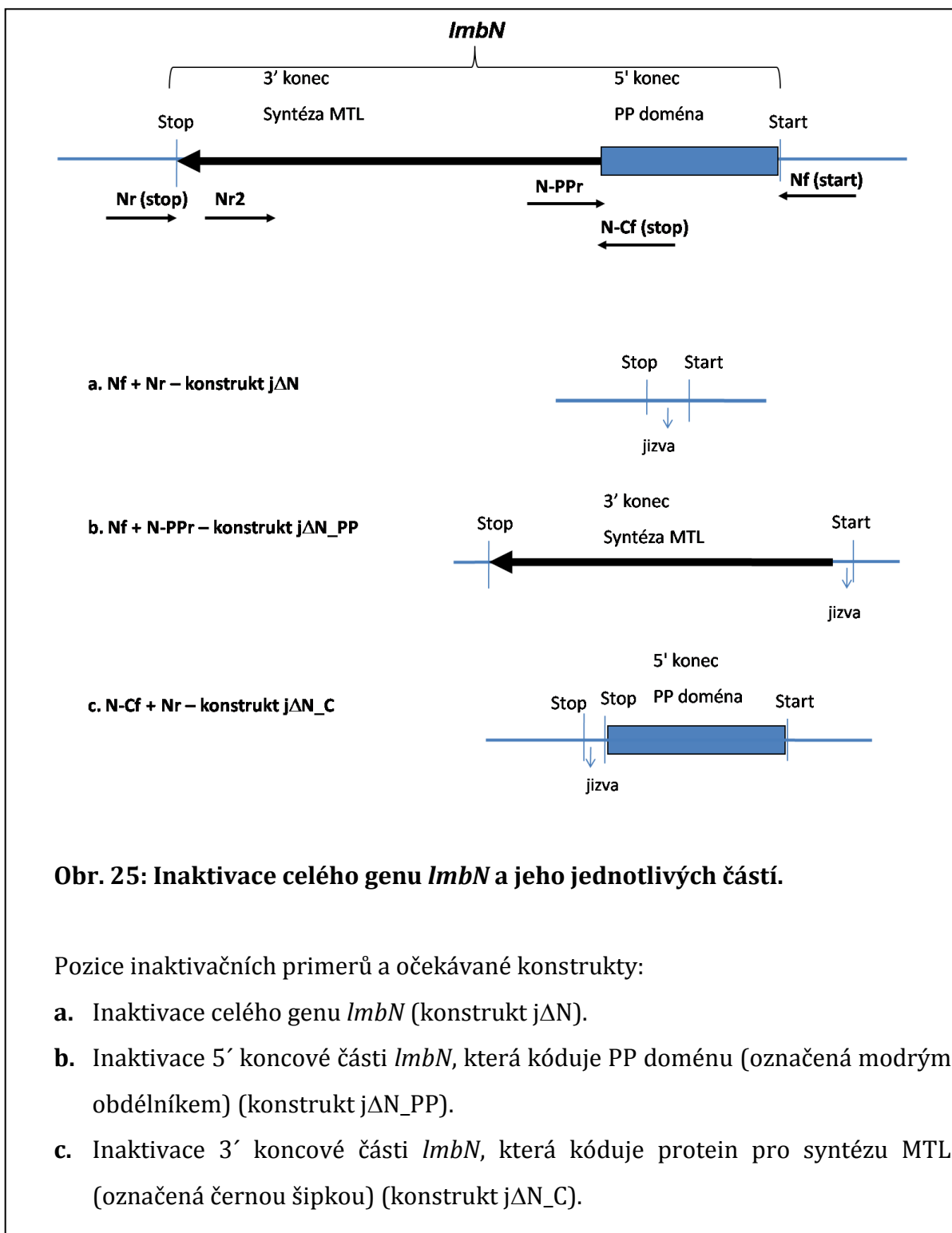
b. Příprava templátu pro PCR a vnesení oblastí homologie do inaktivační kazety

Pro PCR na namnožení inaktivační kazety se zavedenými úseky homologie se nedoporučuje používat jako templát plazmid nesoucí tuto kazetu. Důvodem je možná kontaminace následné transformační reakce cirkulární formou plazmidu, což může vést k selekci falešně pozitivních kolonií. Proto kazeta o délce (1382 pb) byla vyštěpena z plazmidu pIJ773 (4334 pb) restrikcími enzymy EcoRI a HindIII. Fragment (1396 pb) obsahující kazetu (1382 pb) a její krátké okolí (14 pb) byl pak izolován z gelu a použit jako templát pro PCR.

PCR byla namíchána a provedena za podmínek popsaných v Kap. 4.2.25. Byly použity následující kombinace primerů:

- a. Nf a Nr – zavedení homologie okolí celého *lmbN* genu
- b. Nf a N-PPr – zavedení homologie okolí 5' konce genu *lmbN* a 3' konce PP modulu
- c. N-Cf a Nr – zavedení homologie okolí 3' konce genu *lmbN*

Výsledky reakcí byly analyzovány elektroforézou v agarosovém gelu. Produkty reakce, fragmenty o délce 1460 pb (inaktivační kazety prodloužené o úseky homologie, které byly vneseny jako součást primerů, Obr. 26) byly po separaci vyříznuty z gelu.



c. Integrace inaktivační kazety do kosmidu nesoucího *lmb* shluk

Integrace inaktivační kazety do kosmidu LK6 (Kap. 4.1.2.) výměnou za inaktivovaný gen probíhala v buňkách *E. coli* BW25113/pIJ790. Plazmid pIJ790 kóduje DNA-vazebný protein a exonukleasu, které umožňují vysokoúčinnou rekombinaci mezi lineárním DNA fragmentem a cirkulárním kosmidem. Tento plazmid má teplotně senzitivní počátek replikace, proto byl kmen pěstován při teplotě 30°C.

Buňky *E. coli* BW25113/pIJ790 byly nejprve transformovány kosmidem LK6 elektroporační metodou (Kap. 4.2.3.). Transformanty *E. coli* BW25113/pIJ790/LK6 byly selektovány na LB agaru s chloramfenikolem (25 µg/ml), kanamycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100 µg/ml) při 30°C.

Buňky *E. coli* BW25113/pIJ790/LK6 pak byly elektroporačně transformovány inaktivačními kazetami (purifikované produkty PCR) a selektovány na LB agaru s apramycinem (50 µg/ml), kanamycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100 µg/ml) při 37°C. Po 16 h inkubace byly vybrány velké kolonie transformovaných buněk (platí pravidlo, čím větší jsou kolonie, tím víc kopií mutovaného kosmidu nesou). Z těchto kolonií byla izolována kosmidová DNA metodou alkalické lyze. Kosmidy s deletovaným genem nebo jeho částmi byly označeny symbolem Δ a jménem genu či části (platí obecně i pro další pokusy):

- a. *E. coli* BW25113/ LK6ΔN – výměna celého genu *lmbN* za kazetu
- b. *E. coli* BW25113/ LK6ΔN_PP – výměna 5' konce *lmbN* (kóduje PP doménu)
- c. *E. coli* BW25113/ LK6ΔN_C - výměna 3' konce *lmbN* (kóduje protein pro syntézu MTL)

d. Ověření integrace kazety do kosmidové DNA

Pro ověření integrace kazet do LK6 byla použita dvojice primerů testNf a testNr. Primery byly navrženy na základě sekvencí nacházejících se ve vzdálenosti cca 200 pb od 5' a 3' konců genu *lmbN*. Ověření bylo provedeno pomocí PCR (Kap. 4.2.25.). Jako templát byla použita kosmidová DNA z klonů LK6ΔN, LK6ΔN_PP a LK6ΔN_C. Kosmid LK6 s nemutovanou („wild type“) formou genu *lmbN* byl použit jako kontrola. Výsledky PCR byly analyzovány na agarosové elektroforéze (Obr. 27 (dráha 3, 4, 5 a

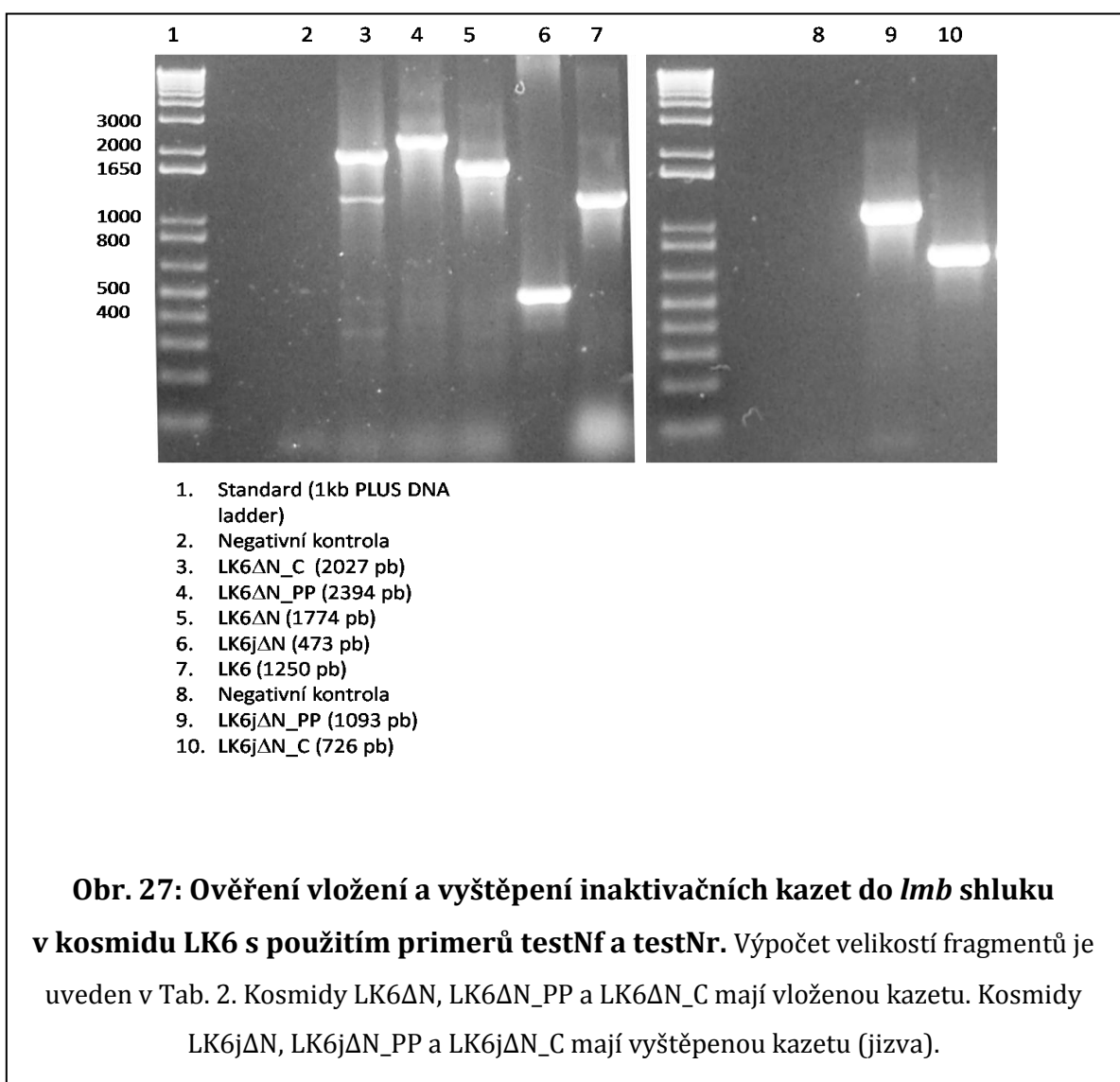
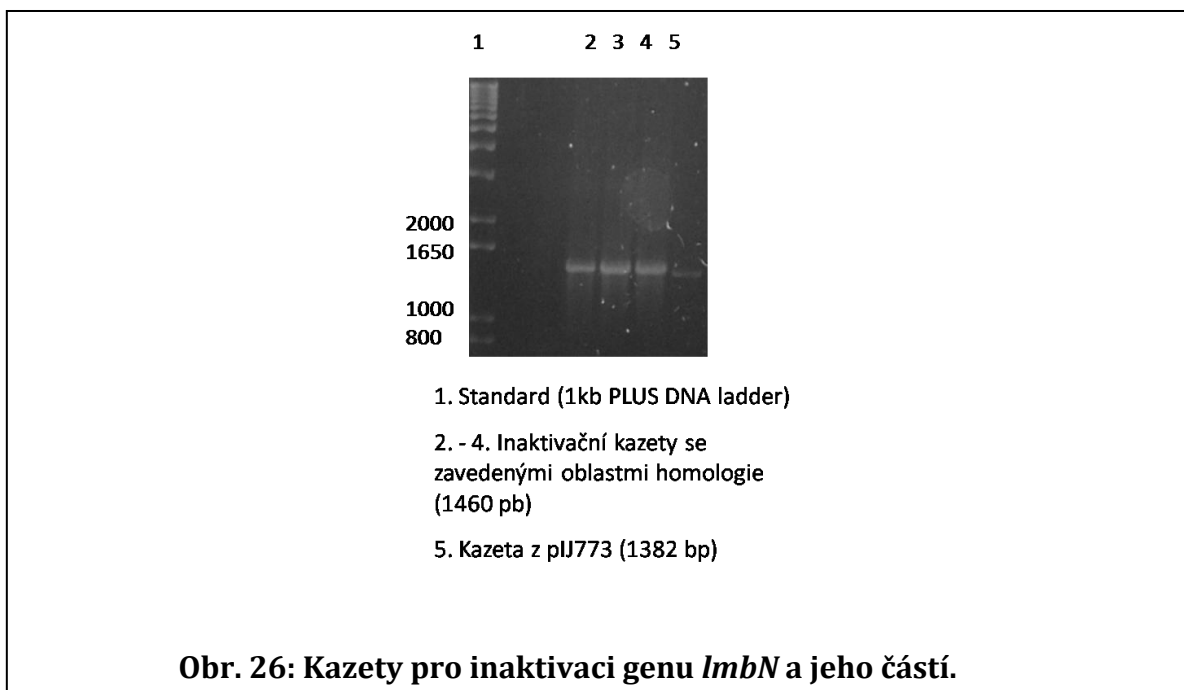
7)). Délky jednotlivých fragmentů s genem *lmbN* a třemi druhy inaktivačních kazet jsou uvedeny v Tab. 2.

Bylo prokázáno, že DNA z klonů LK6ΔN a LK6ΔN_PP obsahovala pouze kosmidy s inaktivační kazetou, zatímco DNA z klonů LK6ΔN_C měla navíc i kopie intaktního kosmidu. Intaktní kosmid byl eliminován následnou transformací do buněk do *E. coli* ET12567/pUZ8002 a selekcí na agaru s apramycinem.

Tab. 2: Výpočet očekávaných velikostí ověřovacích PCR fragmentů při přípravě kosmidů s inaktivovaným genem *lmbN* a jeho částmi.

Inaktivovaný úsek (velikost (pb))	WT ¹	Kazeta ²	Jizva ³
Celý <i>lmbN</i> (858 pb)	1250 pb	1774 pb	473 pb
5' konec <i>lmbN</i> (253 pb)	1250 pb	2394 pb	1093 pb
3' konec <i>lmbN</i> (620 pb)	1250 pb	2027 pb	726 pb

1. Stav v typovém kmenu *S. lincolnensis* ATCC 25466 - velikost fragmentu nesoucího gen *lmbN* (858 pb) a jeho okolí (392 pb)
2. Stav po vložení kazety místo genu *lmbN* nebo jedné z jeho částí - velikost kazety (1382 pb) a okolí genu (392 pb). V případě inaktivace jen jedné části genu se započítává velikost zbývající části genu (5' konec *lmbN* (253 pb) a 3' konec *lmbN* (620 pb)).
3. Stav po vložení jizvy místo genu *lmbN* nebo jedné z jeho částí - velikost jizvy (81 pb) a okolí genu (392 pb). V případě inaktivace jen jedné části genu se započítává velikost zbývající části genu (5' konec *lmbN* (253 pb) a 3' konec *lmbN* (620 pb)).



e. Integrace inaktivačních kazet do chromozómu *S. lincolnensis* ATCC 25466

Kosmidy LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C byly elektroporací vneseny do *E. coli* ET12567/pUZ8002 a transformanty *E. coli* ET12567/pUZ8002/LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C byly selektovány na LB agaru s apramycinem (50 μ g/ml) a karbenicilinem (100 μ g/ml). Poté byly kosmidy LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C mezidruhovou konjugací přeneseny do *S. lincolnensis* ATCC 25466 a transkonjuganty *S. lincolnensis* s kosmidy LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C byly selektovány přelitím MS agaru vodním roztokem kyseliny nalidixové (finální koncentrace 25 μ g/ml) a apramycinu (finální koncentrace 50 μ g/ml). Po 6 dnech inkubace byly transkonjuganty *S. lincolnensis* přeočkovány na DNA agar s kyselinou nalidixovou (25 μ g/ml), apramycinem (50 μ g/ml) a s/bez kanamycinu (50 μ g/ml). U klonů rezistentních k apramycinu a senzitivních ke kanamycinu došlo k výměně chromozomálního genu *lmbN* anebo jeho částí za inaktivační kazetu. Od každého typu inaktivace bylo vybráno po jednom klonu, které byly označeny *S. lincolnensis* Δ N, *S. lincolnensis* Δ N_PP a *S. lincolnensis* Δ N_C.

f. Ověření integrace kazety do chromozómu *S. lincolnensis*

Pro ověření přítomnosti mutace v chromozómu byla z transkonjugant *S. lincolnensis* Δ N, Δ N_PP a Δ N_C izolována chromozomální DNA, která byla použita jako templát pro PCR s ověřovacími primery testNf a testNr. Podmínky PCR byly stejné jako při ověřování vložení kazety do kosmidové DNA. Výsledky reakce byly kontrolovány na agarosové elektroforéze. Všechny kmeny obsahovaly fragmenty očekávané délky, odpovídající vložení kazety do správného místa v chromozómu (Obr. 28).

g. Vyštěpení inaktivační kazety z kosmidové DNA

Kosmidy LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C byly elektroporačně vneseny do *E. coli* BT340 nesoucího plazmid pCP20 s genem pro FLP rekombinasy. Transformanty byly selektovány na LB agaru s apramycinem (50 μ g/ml) a chloramfenikolem (25 μ g/ml) při 30°C, vzhledem k teplotně senzitivnímu počátku replikace plazmidu pCP20.

Jednotlivé kolonie transformantů *E. coli* BT340 LK6 Δ N, LK6 Δ N_PP a LK6 Δ N_C byly zaočkovány na LB agar bez antibiotik a inkubovány přes noc ve 42°C. Při této teplotě došlo k indukci exprese FLP rekombinasy a vyštěpení kazety z kosmidu. Pak byly jednotlivé kolonie testovány na senzitivitu k apramycinu (50 μ g/ml) a rezistenci

ke kanamycinu (50 µg/ml). U těchto klonů došlo činností FLP rekombinasy k vystřížení střední části kazety, ležící mezi FRT rozpoznávacími místy a z původní inaktivační kazety zbyl úsek 81 bp, tzv. jizva. Ze získaných *apra*^S a *kan*^R klonů byla izolována kosmidová DNA a přítomnost jizev byly ověřena metodou PCR s primery *testNf* a *testNr*. Výsledek PCR byl analyzován DNA elektroforézou v agarosovém gelu. Kosmidy LK6jΔN, LK6jΔN_PP a LK6jΔN_C (j – jizva) obsahovaly fragmenty očekávané délky, odpovídající velikosti jizvy s okolím genu (Tab. 2, Obr. 27 (dráha 6, 9 a 10)). Kosmidová DNA byla transformována do nemetylujícího kmene *E.coli* GM2929 a nemetylovaná DNA byla izolována kitem JETSTAR.

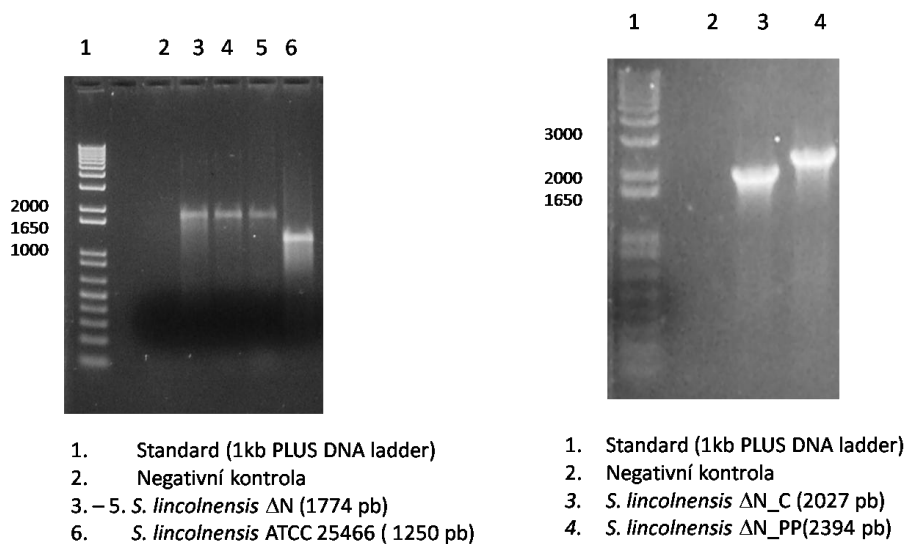
h. Odstranění inaktivačních kazet z chromozómů *S. lincolnensis*

Protoplasty *S. lincolnensis* ΔN, ΔN_PP a ΔN_C byly transformovány kosmidy LK6jΔN, LK6jΔN_PP a LK6jΔN_C a selektovány přelitím R2YE agaru 1 ml vodného roztoku kanamycinu (finální koncentrace 200 µg/ml). Transformanty byly zaočkovány na MS agar bez antibiotik. Jednotlivé kolonie pak byly testovány na senzitivitu k apramycinu a kanamycinu.

U klonů senzitivních k apramycinu i kanamycinu došlo homologní rekombinací k výměně inaktivační kazety (v chromozómu) za úsek s jizvou (v kosmidu).

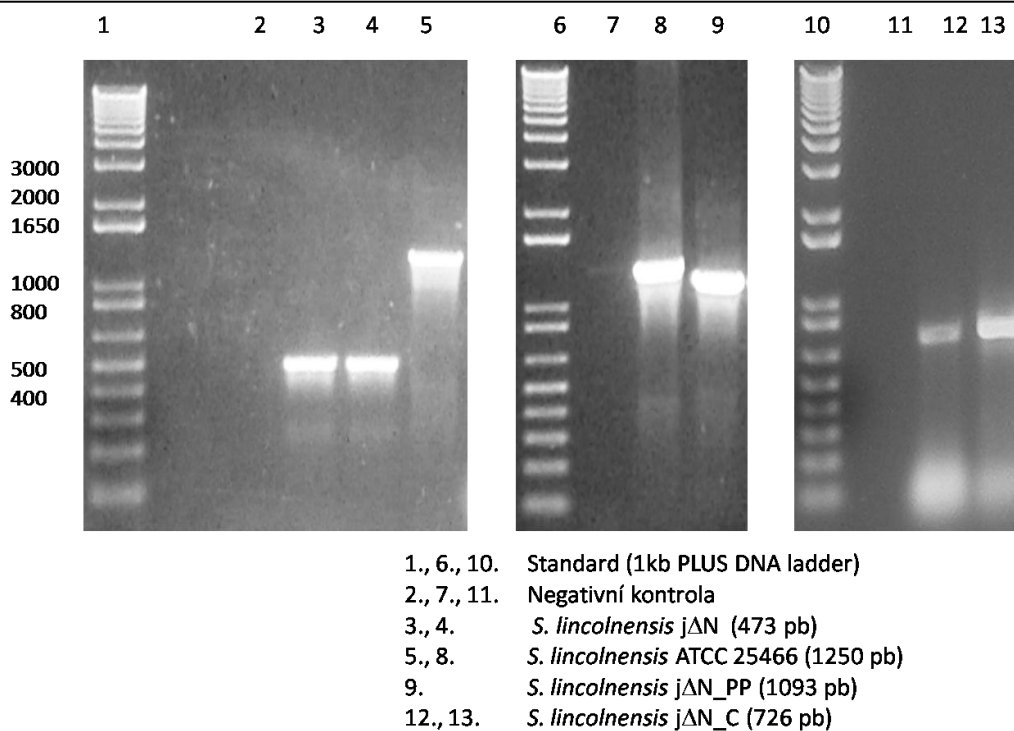
Ověření tohoto procesu bylo provedeno pomocí PCR. Z buněk *apra*^S a *kan*^S byla izolována chromozomální DNA, která byla použita jako templát pro PCR s ověřovacími primery *testNf* a *testNr*. Výsledek PCR byl analyzován elektroforézou v agarosovém gelu. Produkty reakce měly očekávanou velikost, odpovídající velikosti jizvy (81 pb) s okolím genu (Tab. 2, Obr. 29). Kmeny s jizvami byly označeny:

- a. *S. lincolnensis* jΔN – inaktivovaný celý gen *lmbN*
- b. *S. lincolnensis* jΔN_PP – inaktivovaná 5' koncová část, kódující PP doménu
- c. *S. lincolnensis* jΔN_C – inaktivovaná 3' koncová část, kódující isomerasu pro syntézu MTL



Obr. 28: PCR ověření vložení inaktivačních kazet do chromozomální DNA *S. lincolnensis*, primery testNf a testNr.

Výpočet velikostí fragmentů je uveden v Tab. 2.



Obr. 29: PCR ověření vložení jizev do chromozomální DNA *S. lincolnensis*, primery testNf a testNr.

Výpočet velikostí fragmentů je uveden v Tab. 2.

5.1.1.3. Stanovení produkce linkomycinu a jeho prekurzorů

Kmeny *S. lincolnensis* jΔN, *S. lincolnensis* jΔN_PP a *S. lincolnensis* jΔN_C byly testovány na schopnost produkovat linkomycin. Příslušný kmen byl kultivován v AVM médiu 5 dní (Kap. 4.2.7), pak byly buňky odděleny centrifugací, fermentační médium bylo přečištěno na koloně SPE a analyzováno pomocí kapalinové chromatografie UPLC s UV detekcí. Typový produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl používán jako kontrolní produkující kmen. Výsledky stanovení jsou uvedeny na Obr. 30.

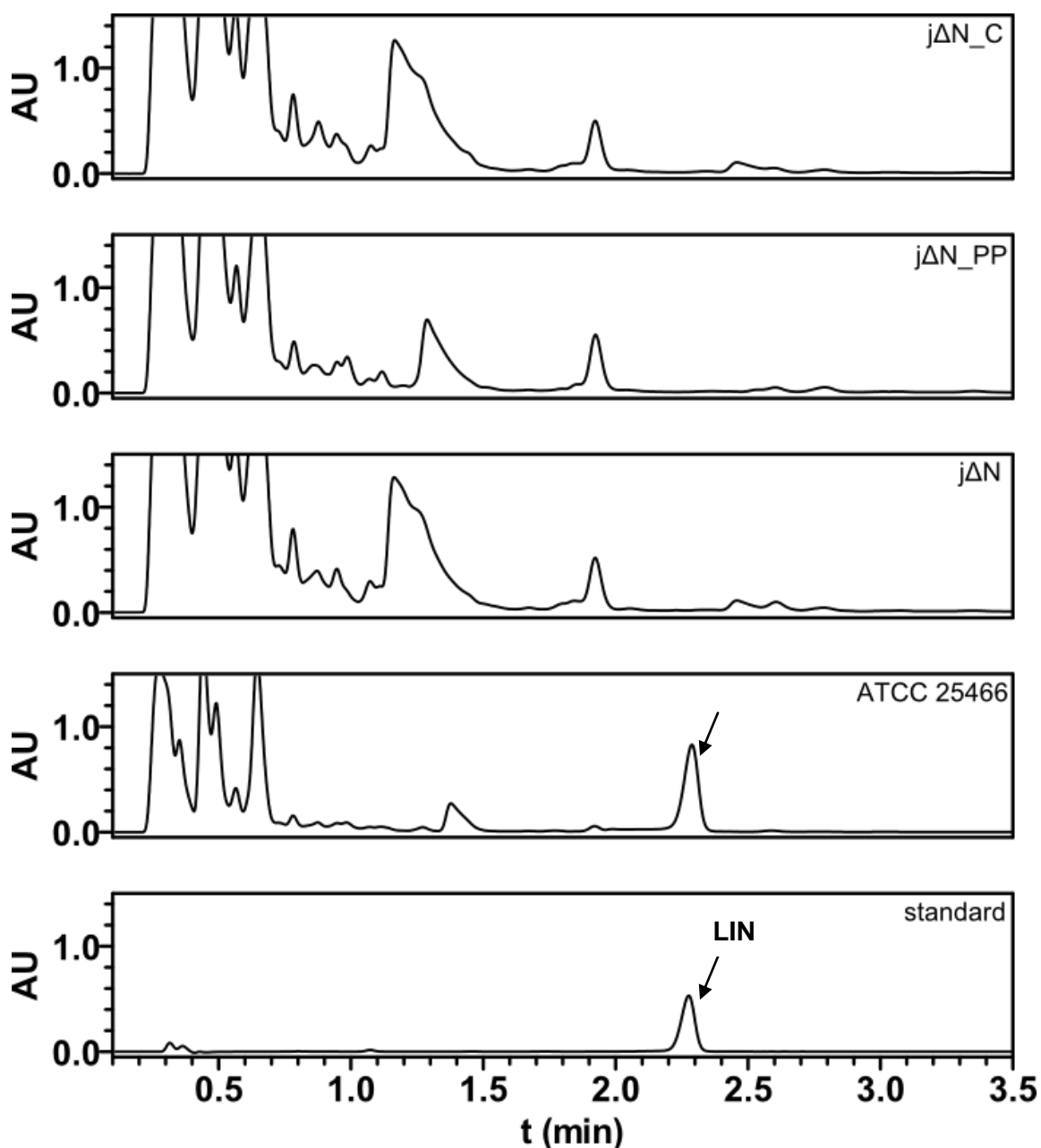
Analýza vzorku z média typového producenta linkomycinu *S. lincolnensis* ATCC 25466 ukázala přítomnost látky s retenčním časem (2,3 min), který odpovídal retenčnímu času linkomycinu. Spektrum látky rovněž odpovídalo spektru standardu linkomycinu. Koncentrace linkomycinu (30 μg/ml), stanovená v případě dokumentovaném na Obr. 30, byla v rozmezí obvykle dosahovaných hladin produkce (20 - 70 μg/ml).

Naopak, ve vzorcích z *S. lincolnensis* jΔN, jΔN_PP a jΔN_C nebyla produkce linkomycinu zjištěna (Obr. 30). Mez detekce linkomycinu je 1 μg/ml. Objemy buněčné masy kontrolního a mutantních kmenů byly srovnatelné. Dá se tedy soudit, že kmeny s mutacemi linkomycin neprodukovaly, nebo produkovaly v množství menším než je mez detekce.

Stanovení prekurzorů linkomycinu v médiích typového a mutantních kmenů prokázala zvýšenou produkci PPL kmenem *S. lincolnensis* jΔN_PP (11 μg/ml) (Obr. 31). V dalších analyzovaných vzorcích nebyla zjištěna přítomnost prekurzorů nad mez kvantifikace (2,50, 3,75 a 3,75 μg/ml pro MTL, NDl a PPL).

5.1.1.4. Testování obnovení produkce linkomycinu

Schopnost obnovení produkce linkomycinu u kmenů *S. lincolnensis* jΔN, jΔN_PP a jΔN_C po obohacení média o PPL nebo MTL bylo testováno pomocí citlivého organismu *K. rhizophila* CCM 552. Typový kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl použit jako kontrolní produkující kmen. Kmeny *S. lincolnensis* jΔN, jΔN_PP a jΔN_C byly pěstovány na agarových bločcích s přísávkem PPL a MTL po dobu 7 dní (Kap. 4.2.12.). Kontrolní kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 rostl na agaru bez přísávků



Obr. 30: UPLC chromatogramy fermentačních médií:

jΔN_C, jΔN_PP, jΔN – mutantní kmeny *S. lincolnensis* jΔN_C, jΔN_PP a jΔN

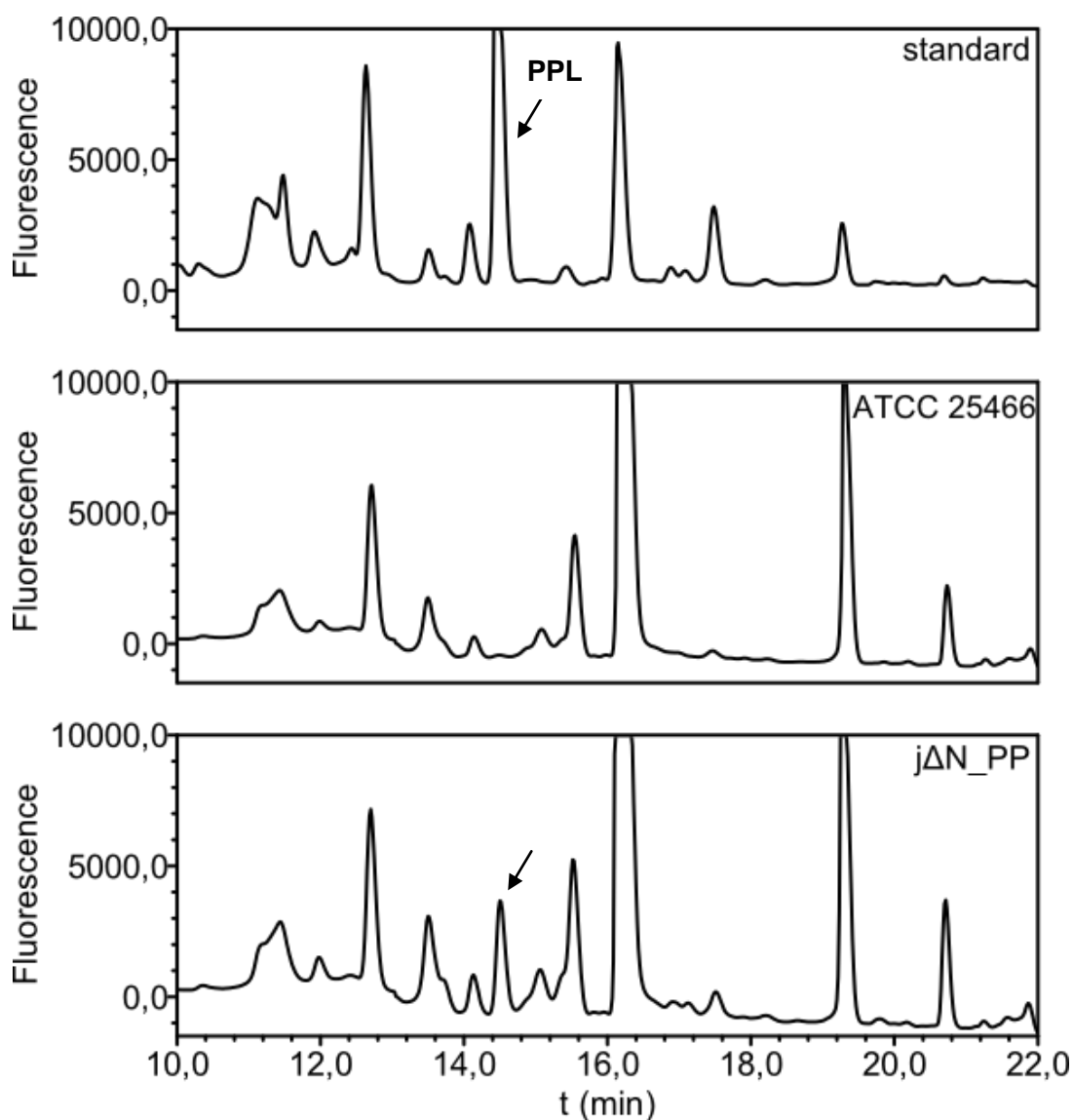
ATCC 25466 – typový produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

Standard – standard linkomycinu (250 μg/ml)

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími linkomycinu, jsou označeny šipkami.

Vzorky jΔN_C, jΔN_PP, jΔN byly před analýzou 30x koncentrovány. Vzorek ATCC 25466 byl před analýzou 15x koncentrován.

Podmínky UPLC analýzy: analytická kolona BEH C 18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7μm), mobilní fáze 1mM mravenčan amonný, pH 9.0 : acetonitril, 76:24 (v/v), průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce při vlnové délce $\lambda = 194$ nm.



Obr. 31: HPLC chromatogramy fermentačních médií:

Standard – standard PPL (50 µg/ml) v kultivačním médiu

jΔN_PP – mutantní kmen *S. lincolnensis* jΔN_PP

ATCC 25466 – typový produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími PPL, jsou označeny šipkami.

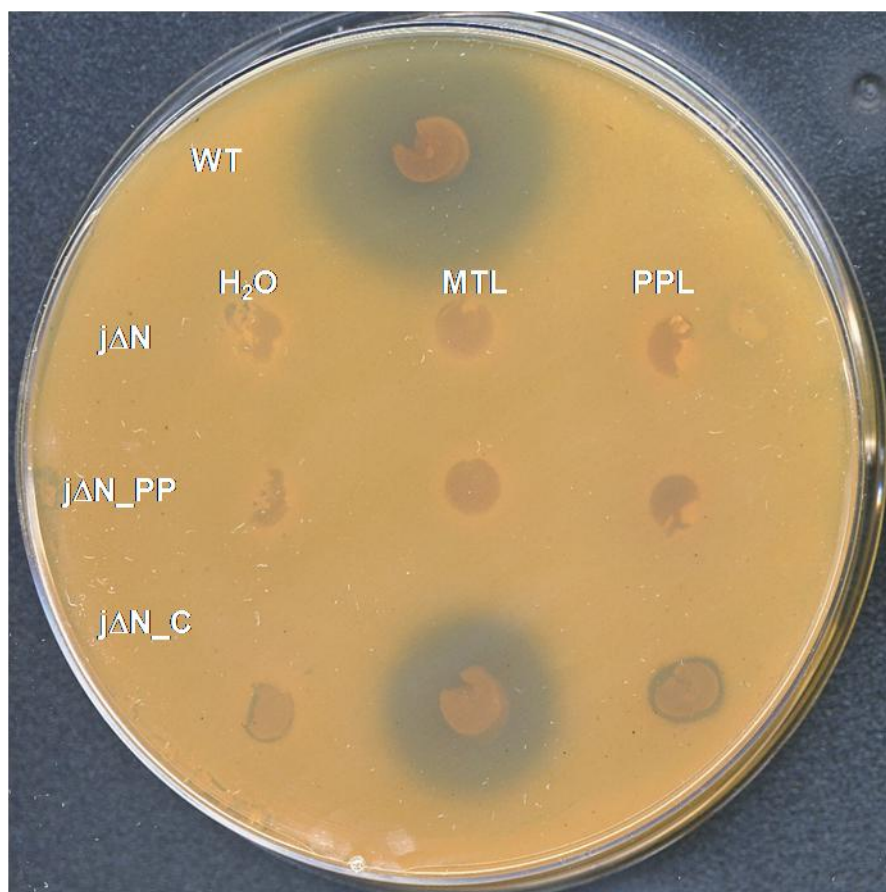
Podmínky HPLC: Luna C₁₈ (250 × 4.6 mm I.D.; průměr částic, 5 µm; Phenomenex), laboratorní teplota. Mobilní fáze: složka A, 20 mM mravenčan amonný (pH 4.7) a acetonitril (10:1 v/v); a složka B, acetonitril; průtoková rychlost 1,25 ml/min, s následnou lineární gradientovou elucí (min/%B): 0/30; 1/30; 13/65; 15/100; fluorescenční detekce ($\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 417 \text{ nm}$).

Poté byly bločky umístěny na misku přelitou suspenzí *K. rhizophila* a miska byla inkubována přes noc. Produkovaná antimikrobiální látka, difundující z bloček, brzdila růst citlivého kmene *K. rhizophila* a vedla k tvorbě inhibičních zón v okolí bločku.

Inhibiční zóny byly pozorovány v okolí bloček s narostlým typovým kmenem a dále jen v případě kmene ΔN_C rostoucího na agaru s přísadkou MTL (Obr. 32). To znamená, že produkce antibiotika zrušená inaktivací 3'koncové části *lmbN* genu byla přidáním MTL obnovena. Agarový bloček byl extrahován methanolem a extrakt byl analyzován metodou UPLC, která potvrdila přítomnost látky s retenčním časem shodným s linkomycinovým standardem.

5.1.1.5. Nová inaktivace N

Při anotaci nově sekvenovaného shluku pro biosyntézu linkomycinu z *S. lincolnensis* ATCC 25466 (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008) byly nalezeny četné odlišnosti od již známého shluku z nadprodukcčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995). Mimo jiné, bylo zjištěno, že konec genu *lmbN* v *S. lincolnensis* ATCC 25466 se překrývá se začátkem genu *lmbM*, na rozdíl od *lmb* shluku kmene *S. lincolnensis* 78-11, kde *lmbN* končí o několik párů nukleotidů dříve. V počátečních pokusech byl primer Nr navržen podle sekvence z kmene *S. lincolnensis* 78-11 tak, že při inaktivaci celého genu *lmbN* shluku *S. lincolnensis* ATCC 25466 a jeho 3' koncové části současně došlo ke zrušení start kodonu genu *lmbM*. Pro účely nové inaktivace genu *lmbN* a jeho 3' koncové části byl proto navržen primer Nr2, při jehož použití byla sekvence start kodonu genu *lmbM* zachována (Obr. 25). Nové inaktivační pokusy s kombinacemi primerů Nf a Nr2 (celý gen) a N-Cf a Nr (3' konec) byly provedeny podle postupu uvedeného v Kap. 5.1.1.2. Nově získané kmeny *S. lincolnensis* $\Delta N2$ a ΔN_C2 , nesoucí inaktivační kazety, byly použity k obohacovacím pokusům s PPL a MTL, podobně jak bylo popsáno v Kap. 5.1.1.4. Zóny inhibice růstu *K. rhizophila* byla pozorována i v tomto případě pouze v okolí bločku *S. lincolnensis* ΔN_C2 , který byl pěstován na agaru s MTL, tedy shodně s prvním pokusem.



Obr. 32: Obohacovací pokus s kmeny *S. lincolnensis* mutantními v genu *lmbN* (jΔN), jeho 5' a 3' koncových částech (jΔN_PP a jΔN_C).

wt – typový produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

MTL – cukerná složka linkomycinu (200 µg/ml)

PPL – aminokyselinová složka linkomycinu (200 µg/ml)

5.1.2. Mutační analýza genů *lmbIH, K, Q, T, U* a *V*

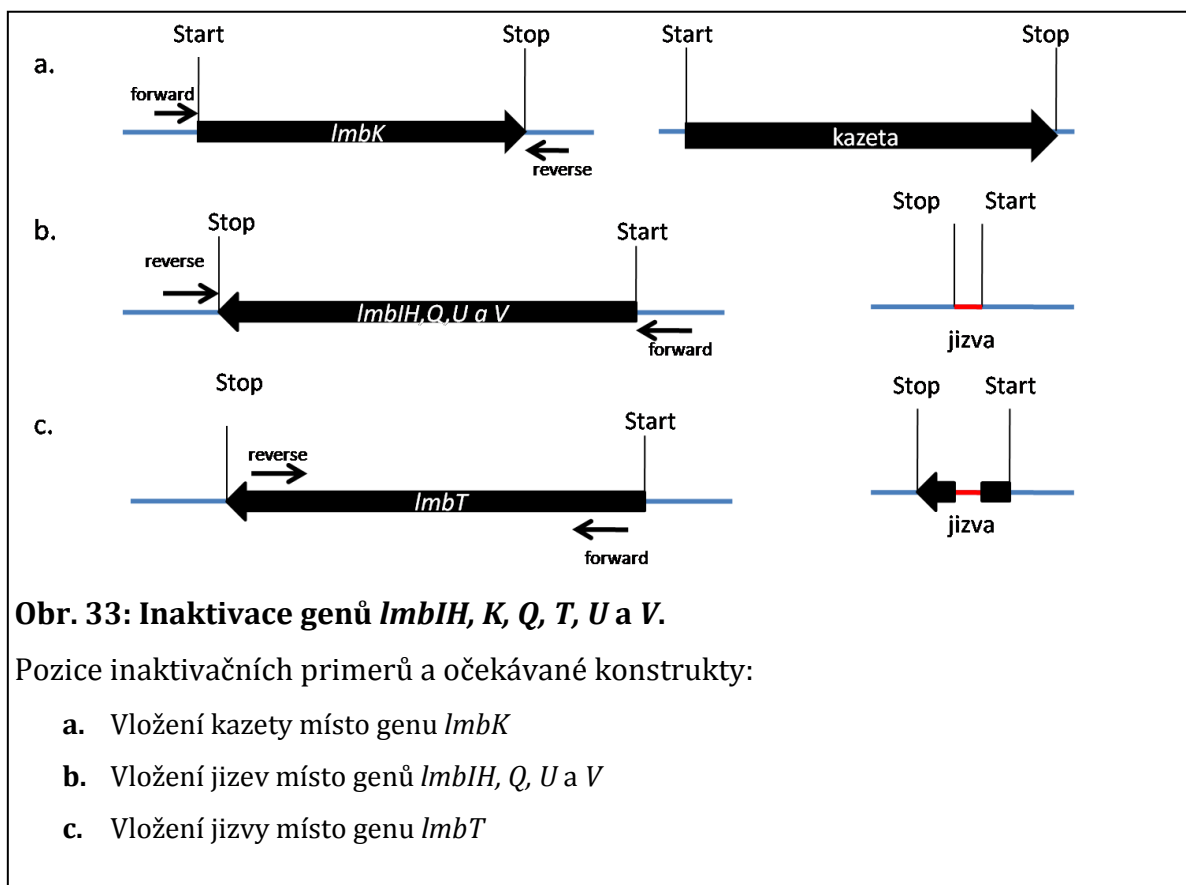
Další část práce byla zaměřena na analýzu *lmb* genů s předpokládanou regulační či nedořešenou funkcí.

V linkomycinovém shluku byly vytipovány geny *lmbU, lmbIH, lmbQ, lmbT, lmbK* a *lmbV* s nejasnou funkcí, pravděpodobně regulační či podpůrnou (Kap. 3.6.2.). Gen *lmbU* je specifický pro *lmb* shluk, zatímco ostatní geny mají své homology též v *ccb* shluku, což indikuje jejich možnou roli v některých krocích společných pro obě biosyntetické dráhy: syntéza MTL, kondenzace obou prekurzorů nebo regulace. Pro analýzu těchto genů byla zvolena inaktivace genů pomocí metody REDIRECT. Kmeny *S. lincolnensis* ΔIH , ΔQ a ΔU , které měly geny *lmbIH, lmbQ* a *lmbU* nahrazené inaktivační kazetou, byly připraveny Mgr. Markétou Koběorskou. V rámci této práce byly kazety v kmenech *S. lincolnensis* ΔIH , ΔQ a ΔU vyměněny za jizvy a dále byly provedeny celé inaktivační pokusy s geny *lmbT, lmbK* a *lmbV*.

5.1.2.1. Inaktivace genů *lmbK, lmbT* a *lmbV*

Inaktivační primery byly navrženy podle sekvence *lmb* shluku z kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466, nově sekvenovaného v naší laboratoři (KOBĚRSKÁ et al. 2008) a jsou uvedeny v Kap. 4.2.27. Primery pro vnesení oblastí homologie do kazety pro inaktivaci *lmbK* a *lmbV* byly navrženy tak, aby primer „forward“ obsahoval sekvenci start kodonu inaktivovaného genu a „reverse“ – sekvenci stop kodonu. V případě genu *lmbT*, jehož stop kodon se překrývá se start kodonem genu *lmbQ*, byl primer „reverse“ posunut o několik párů bází dovnitř genu, stejně tak i primer „forward“ z důvodu vzniku nesespecifického produktu při použití primeru se začátkem genu *lmbT* (Obr. 33). Ověřovací primery zachycovaly oblasti po obou stranách inaktivovaných genů o souhrnné velikosti 300 - 400 pb. PCR na namnožení inaktivační kazety se zavedenými úseky homologie byla namíchána a provedena za podmínek uvedených v Kap. 4.2.25. Velikosti PCR fragmentů intaktních forem genů a genů s vloženou inaktivační kazetou jsou pro jednotlivé geny uvedeny v Tab. 3.

Provedení inaktivačních pokusů systémem REDIRECT bylo metodicky podobné inaktivaci genu *lmbN* popsané v Kap. 5.1.1.2. Jedinou výjimkou bylo ověření vložení kazet do chromozómu *S. lincolnensis* ATCC 25466, které bylo provedeno metodou koloniové PCR s ověřovacími primery.



Tab. 3: Výpočet očekávaných velikostí ověřovacích PCR fragmentů při přípravě kosmidů s inaktivovanými *lmb* geny.

Inaktivovaný gen (pb)	Ověřovací primery	WT ¹	Kazeta ²	Jizva ³
<i>lmbIH</i> (1450)	chIHf/r	1699 pb	1631 pb	330 pb
<i>lmbK</i> (573)	chK f/r	885 pb	1687 pb	-
<i>lmbQ</i> (1104)	chQ f/r	1342 pb	1620 pb	319 pb
<i>lmbT</i> (1236)	chTf/r	1471 pb	1610 pb	316 pb
<i>lmbU</i> (675)	chUf/r	920 pb	1627 pb	326 pb
<i>lmbV</i> (717)	chVf/r	1032 pb	1690 pb	396 pb

- Stav v typovém kmenu *S. lincolnensis* ATCC 25466 - velikost fragmentu nesoucího příslušný gen a jeho okolí
 - Stav po vložení kazety místo příslušného genu - velikost kazety (1382 pb) a okolí genu.
 - Stav po vložení jizvy místo příslušného genu - velikost jizvy (81 pb) a okolí genu.
- (-) - nepřipravováno

Jako templát pro reakci posloužilo mycelium, sebrané z povrchu DNA agaru. Výsledek PCR byl analyzován elektroforézou v agarosovém gelu.

Získané kmeny *S. lincolnensis* s vloženými kazetami místo genů *lmbK* (Obr. 34), *lmbT* a *lmbV* byly označeny jako *S. lincolnensis* ΔK , *S. lincolnensis* ΔT a *S. lincolnensis* ΔV . Všechny tyto kmeny obsahovali fragmenty očekávané délky, odpovídající vložení kazety do správného místa v chromozómu (Tab. 3).

5.1.2.2. Výměna kazety za jizvu u *S. lincolnensis* ΔIH , ΔQ , ΔT , ΔU a ΔV

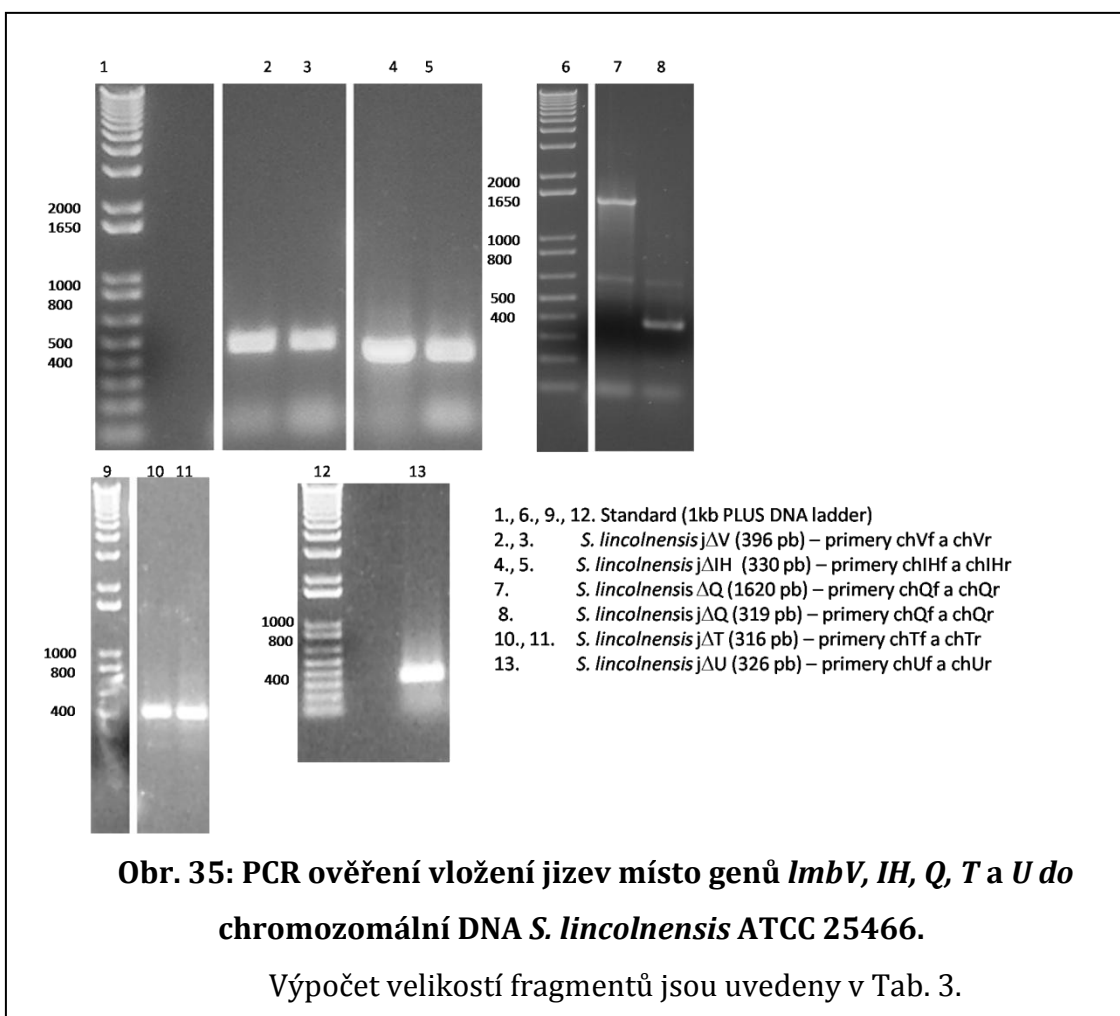
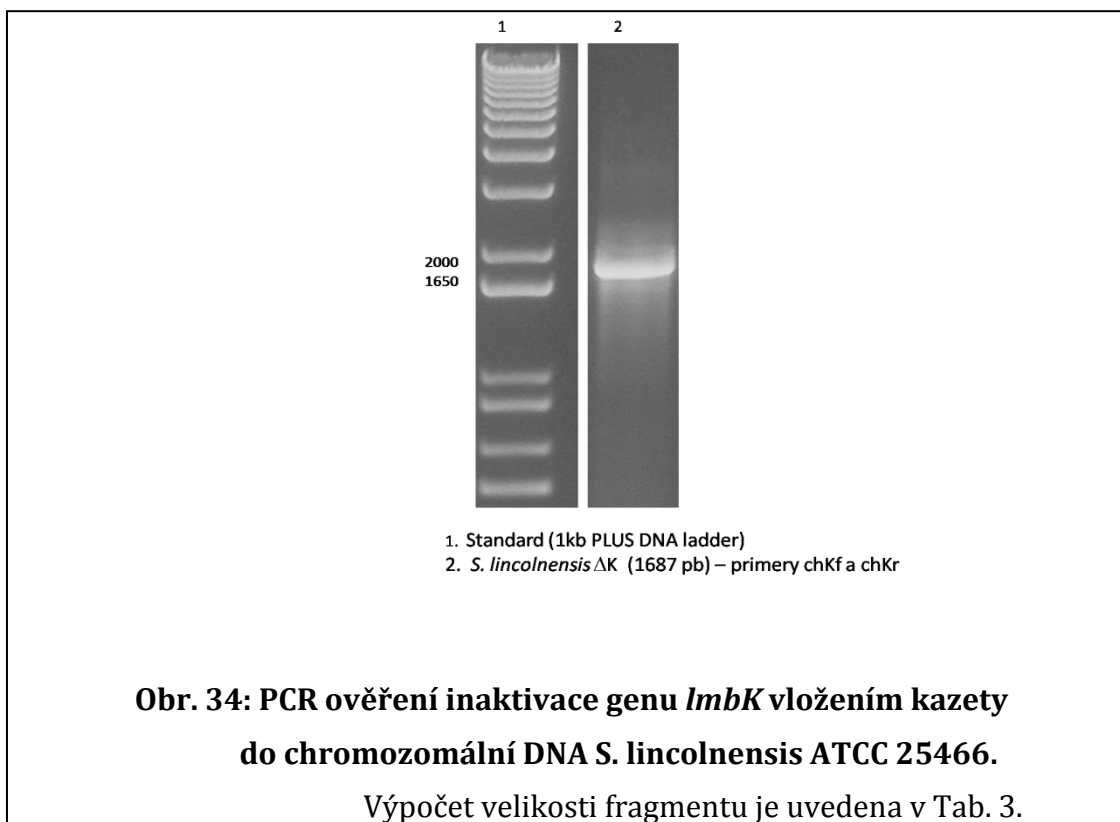
Odstranění kazety z chromozómu bylo provedeno pouze v případě inaktivace genů *lmbIH*, *lmbQ*, *lmbT*, *lmbU* a *lmbV*, které tvoří samostatné transkripční jednotky, kdy přítomnost kazety může ovlivňovat přepis „downstream“ genů. Toto ovšem nebylo nutné v případě genu *lmbK*, který tvoří samostatnou transkripční jednotku. Odstranění kazet z kosmidové DNA a následné vnesení kosmidu s jizvou do kmenu streptomycet bylo provedeno stejně jako v Kap. 5.1.1.2.

Ověření výměn kazet za jizvy u klonů senzitivních k apramycinu i kanamycinu bylo provedeno metodou koloniové PCR s ověřovacími primery. Jako templát pro reakci posloužilo mycelium, sebrané z povrchu DNA agaru. Výsledek PCR byl analyzován elektroforézou v agarosovém gelu. Produkty reakce měly očekávanou velikost, odpovídající velikosti jizvy s okolím genů (Tab. 3, Obr. 35). Kmeny s jizvami místo příslušných genů byly označeny *S. lincolnensis* $j\Delta IH$, $j\Delta Q$, $j\Delta T$, $j\Delta U$ a $j\Delta V$.

5.1.2.3. Stanovení produkce linkomycinu a jeho prekurzorů

Schopnost produkce linkomycinu kmeny *S. lincolnensis* $j\Delta IH$, ΔK , $j\Delta Q$, $j\Delta T$, $j\Delta U$ a $j\Delta V$ byla zjišťována pomocí UPLC analýzy fermentačního média. Typový kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl použit jako pozitivní kontrola. Kultury buněk, předpěstované v YEME médiu, byly kultivovány pět dní v AVM médiu, pak byly odděleny centrifugací. Fermentační médium bylo přečištěno na koloně SPE a analyzováno na analytické koloně metodou UPLC.

V mediích kmenů *S. lincolnensis* $j\Delta IH$, ΔK , $j\Delta Q$ a ATCC 25466 byla zjištěna přítomnost látky s retenčním časem (2,3 min) a spektrem odpovídajícím standardu linkomycinu. Koncentrace linkomycinu byla stanovena s využitím kalibrační křivky a pro jednotlivé kmeny je uvedena v Tab. 4.



Frakce z jednotlivých vzorků s retenčním časem kolem 2,3 min byly extrahovány a přítomnost linkomycinu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií.

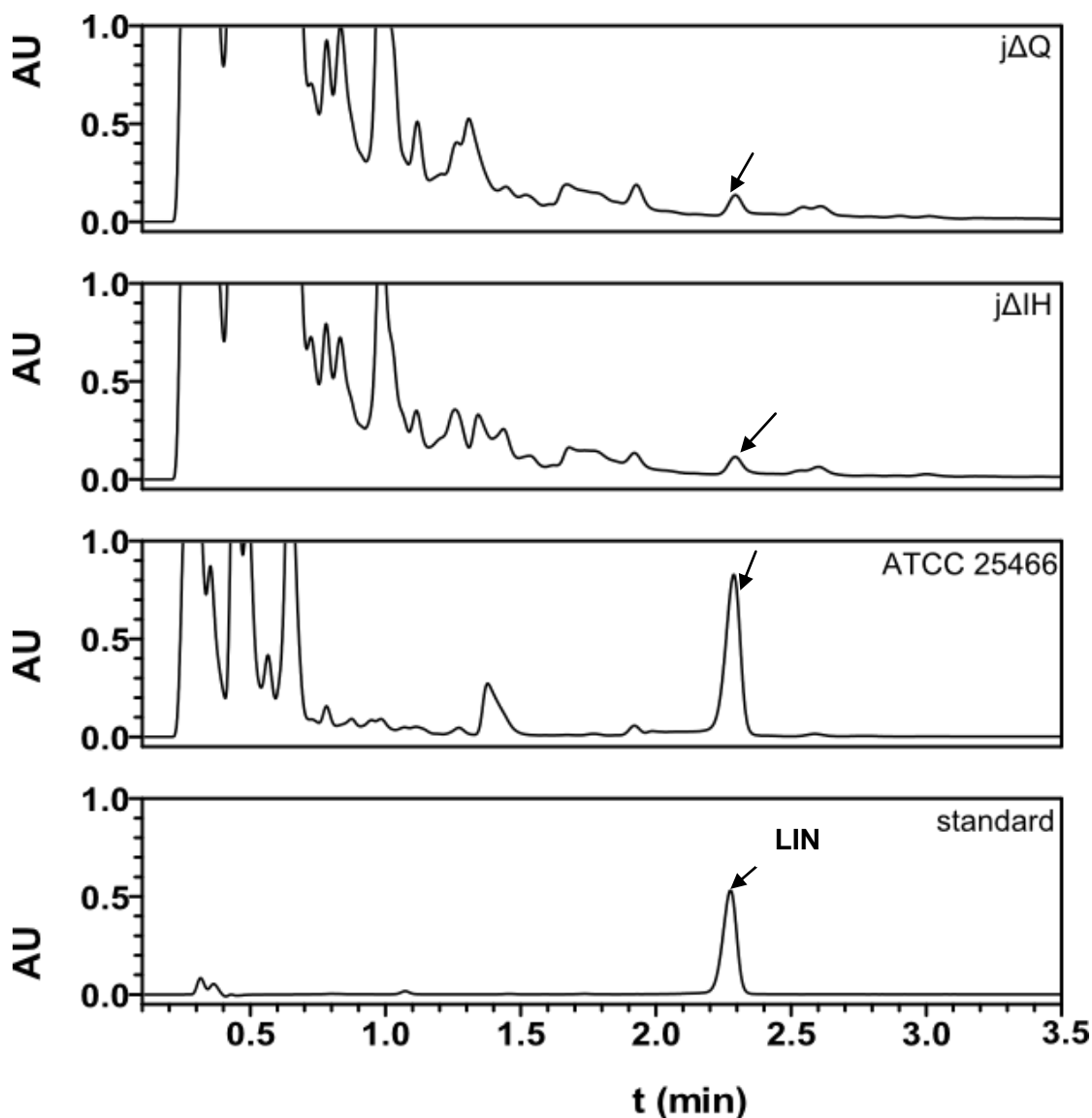
Produkce linkomycinu byla u kmenů *S. lincolnensis* jΔIH a jΔQ prokázána, avšak jen těsně nad limitem detekce (1 μg/ml) (Tab. 4, Obr. 36). V médiu kmene *S. lincolnensis* ΔK byla přítomnost linkomycinu zjištěna na hranici meze detekce a byla potvrzena další kultivační metodou (Kap. 5.1.2.4., Obr. 40).

Naopak, v mediích kmenů *S. lincolnensis* jΔT, jΔU a jΔV linkomycin detekován nebyl vůbec (Obr. 37). Dá se proto usoudit, že u daných mutant byla produkce linkomycinu zastavena. Analýza fermentačních médií všech mutovaných kmenů na přítomnost prekurzorů linkomycinu PPL, MTL a NDL, prokázala zvýšenou koncentraci PPL pouze u kmene *S. lincolnensis* jΔV (Tab. 4, Obr. 38). PPL a ostatní prekurzory ve vzorcích medií dalších kmenů byly stanoveny pod mez kvantifikace (Tab. 4).

Tab. 4: Stanovení linkomycinu a jeho prekurzorů ve fermentačním médiu

Kmen <i>S.lincolnensis</i>	PPL (μg/ml)	MTL (μg/ml)	NDL (μg/ml)	Linkomycin (μg/ml)
ΔU	<LLOQ*	<LLOQ	<LLOQ	<LOD**
ΔT	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LOD
ΔV	13.5	<LLOQ	<LLOQ	<LOD
ΔIH	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	1,4
ΔK	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	1
ΔQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	1,6
ATCC 25466	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

*<LLOQ – pod mez kvantifikace (lower limit of quantification) (2,50, 3,75 a 3,75 μg/ml pro MTL, NDL a PPL), ** <LOD – pod mez detekce (limit of detection) (1 μg/ml)



Obr. 36: UPLC chromatogramy fermentačních médií:

jΔQ a jΔIH – mutantní kmeny *S. lincolnensis* jΔQ a jΔIH

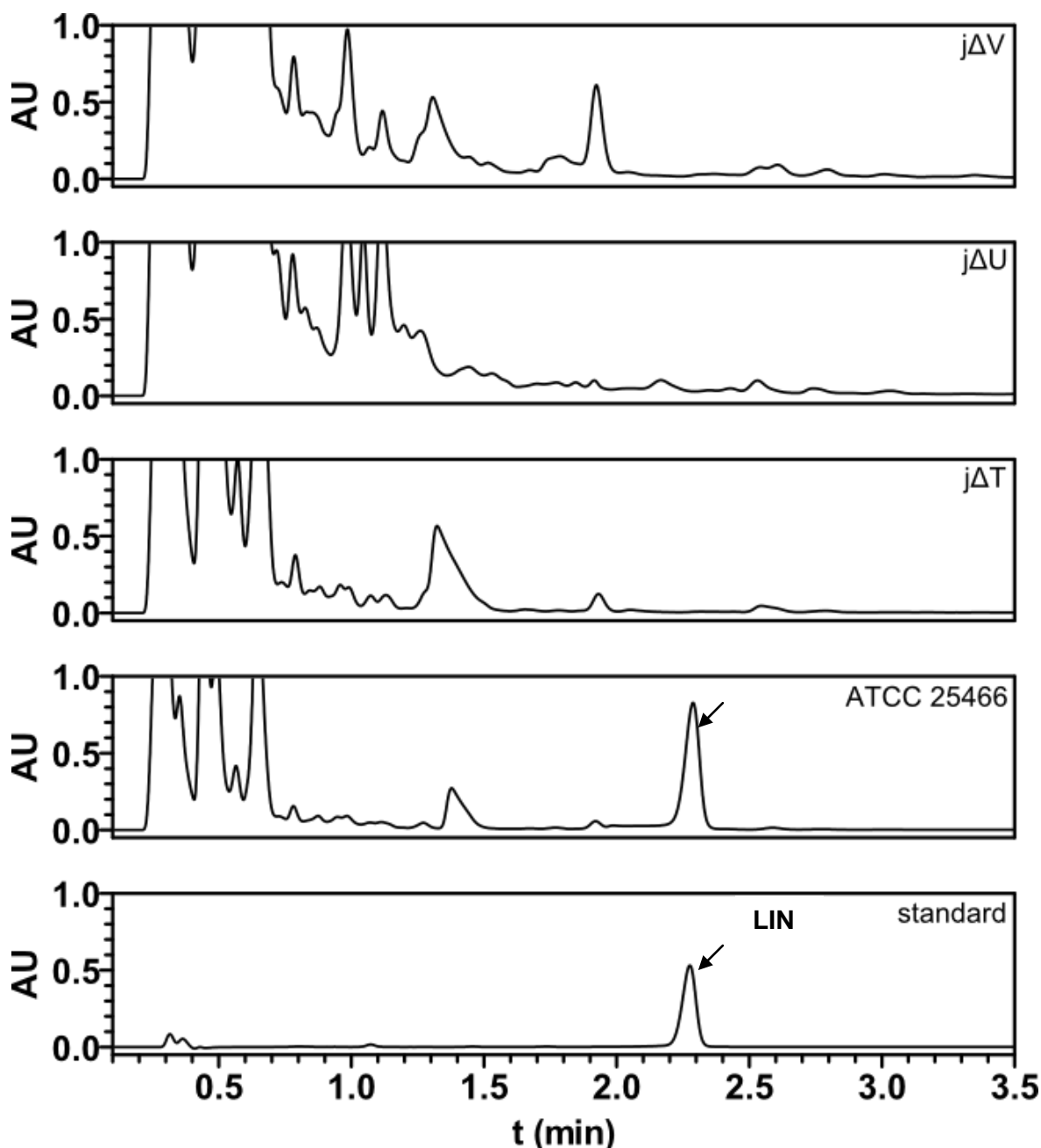
ATCC 25466 – produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

Standard – standard linkomycinu (250 μg/ml)

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími linkomycinu, jsou označeny šipkami.

Vzorky jΔQ a jΔIH byly před analýzou 30x koncentrovány. Vzorek ATCC 25466 byl před analýzou 15x koncentrován.

Podmínky UPLC analýzy: analytická kolona BEH C 18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μm), mobilní fáze 1mM mravenčan amonný, pH 9.0 : acetonitril, 76:24 (v/v), průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce při vlnové délce $\lambda = 194$ nm.



Obr. 37: UPLC chromatogramy fermentačních médií:

jΔV, jΔU a jΔT – mutantní kmeny *S. lincolnensis* jΔV, jΔU a jΔT

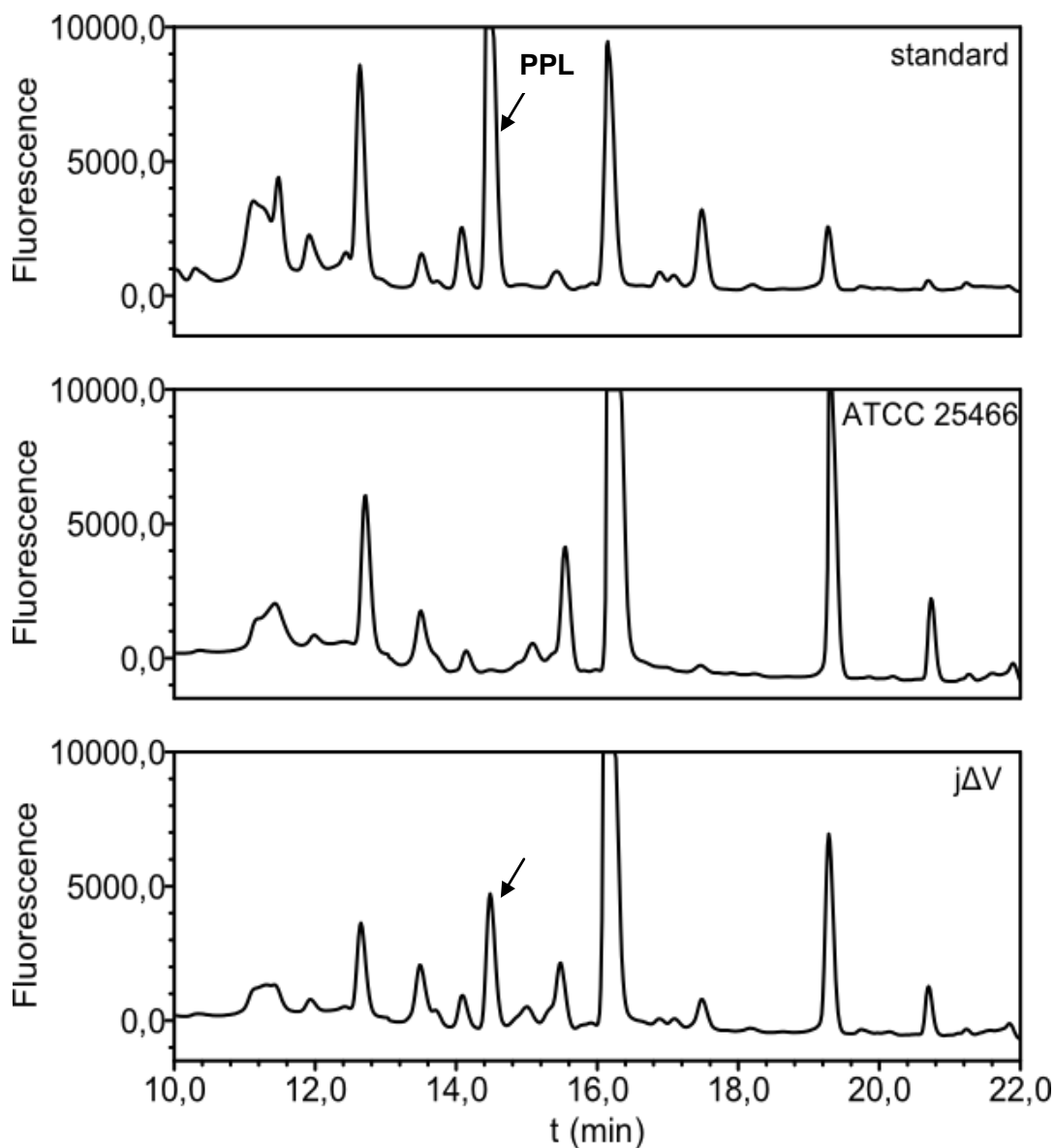
ATCC 25466 – produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími linkomycinu, jsou označeny šipkami.

Vzorky jΔV, jΔU a jΔT byly před analýzou 30x koncentrovány. Vzorek ATCC 25466 byl před analýzou 15x koncentrován.

Standard – standard linkomycinu (250 μg/ml).

Podmínky UPLC analýzy: analytická kolona BEH C 18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μm), mobilní fáze 1mM mravenčan amonný, pH 9.0 : acetonitril, 76:24 (v/v), průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce při vlnové délce $\lambda = 194$ nm.



Obr. 38: HPLC chromatogramy fermentačních médií:

Standard – standard PPL (50 µg/ml) v kultivačním médiu

jΔV – mutantní kmen *S. lincolnensis* jΔV

ATCC 25466 - produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími PPL, jsou označeny šipkami.

Podmínky HPLC: Luna C₁₈ (250 × 4.6 mm I.D.; průměr částic, 5 µm; Phenomenex), laboratorní teplota. Mobilní fáze: složka A, 20 mM mravenčan amonný (pH 4.7) a acetonitril (10:1 v/v); a složka B, acetonitril; průtoková rychlost 1,25 ml/min, s následující lineární gradientovou elucí (min/%B): 0/30; 1/30; 13/65; 15/100; fluorescenční detekce ($\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 417 \text{ nm}$).

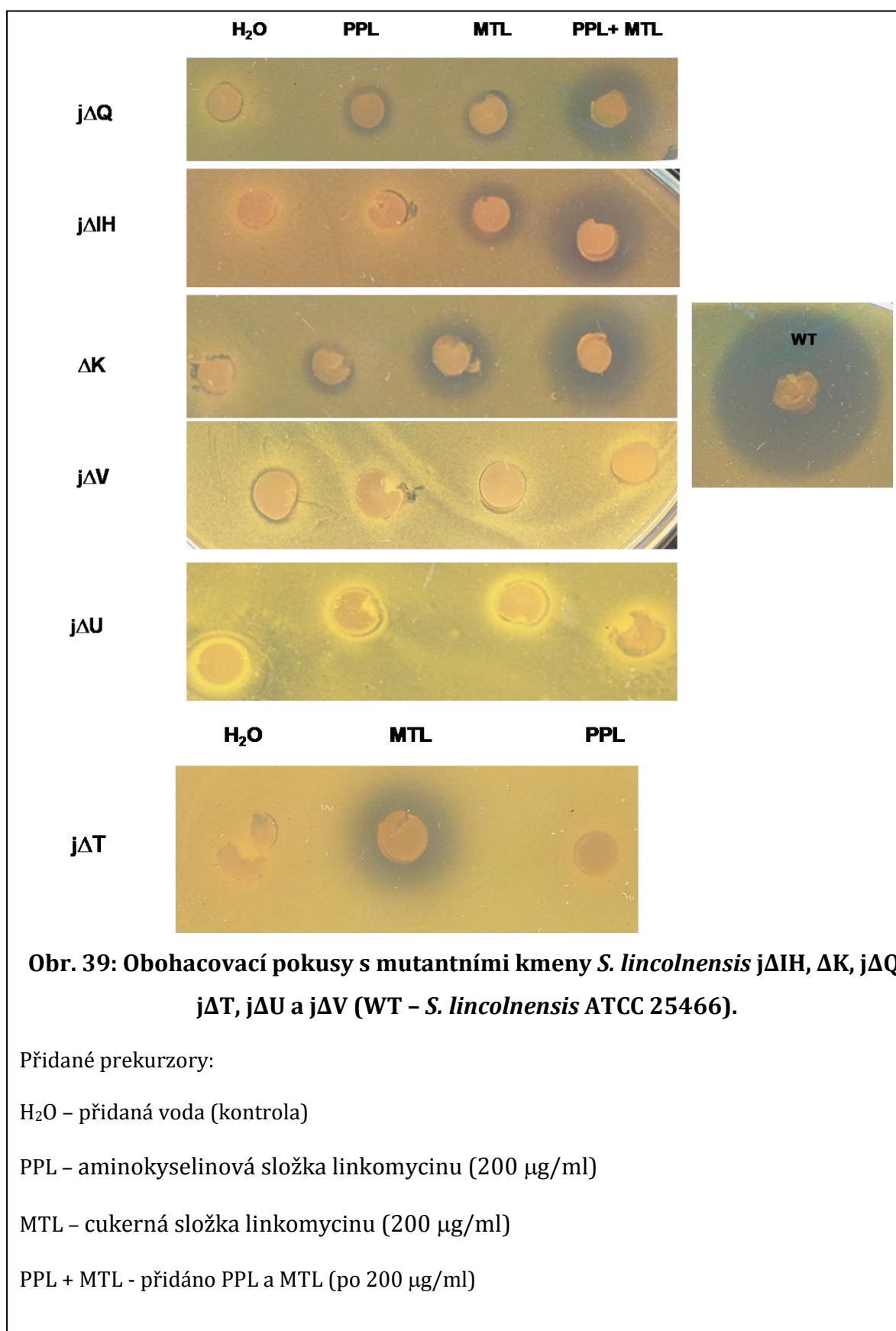
5.1.2.4. Obohacovací pokusy

U kmenů *S. lincolnensis* jΔIH, ΔK, jΔQ, jΔT, jΔU a jΔV byla sledována schopnost obnovit produkci linkomycinu po přidání jeho prekurzorů do media. Spory kmenů byly zaočkovány na bločky agarů s přidavkem jednotlivých prekurzorů PPL a MTL. Kmeny *S. lincolnensis* jΔIH, ΔK, jΔQ, jΔU a jΔV byly zaočkovány také na agar obohacený o oba prekurzory linkomycinu. Po týdnu kultivace v 28°C byly bločky přemístěny na agarovou plotnu převrstvenou suspenzí *K. rhizophila*, a po 16 h byly odečteny zóny inhibice růstu.

Produkce linkomycinu byla u kmenu *S. lincolnensis* jΔT obnovena po přidání MTL, což ukazuje na roli *lmbT* v biosyntéze této cukerné molekuly (Obr. 39).

Kmeny *S. lincolnensis* jΔIH, ΔK a jΔQ produkují linkomycin v nízkých koncentracích i bez přidavku PPL a MTL, avšak žádné zóny kolem kontrolních bloček s vodou zaznamenány nebyly. Zóny, indikující zvýšení produkce u těchto tří kmenů, byly ale zaznamenány v okolí bloček jak s jednotlivými prekurzory, tak i s jejich kombinací. V druhém případě produkce byla výrazně větší, což může být vyvoláno nadbytkem obou prekurzorů v médiu (Obr. 39). Pro potvrzení přítomnosti linkomycinu ve vzorcích kmenů *S. lincolnensis* jΔIH, ΔK a jΔQ byly bločky agarů homogenizovány v methanolu a analyzovány metodou UPLC (ukázka UPLC chromatogramů pro kmen *S. lincolnensis* ΔK je na Obr. 40). Frakce s retenčním časem standardu linkomycinu byly extrahovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií, která potvrdila přítomnost linkomycinu ve vzorcích médií kmenů *S. lincolnensis* jΔIH, ΔK a jΔQ před a po obohacovacích pokusech (ukázka hmotnostního spektra linkomycinu je na Obr. 41).

V okolí bloček, na kterých byly pěstovány kmeny jΔU a jΔV, nebyly zaznamenány žádné zóny (Obr. 39).



Obr. 39: Obohacovací pokusy s mutantními kmeny *S. lincolnensis* *jΔIH*, ΔK , *jΔQ*, *jΔT*, *jΔU* a *jΔV* (WT - *S. lincolnensis* ATCC 25466).

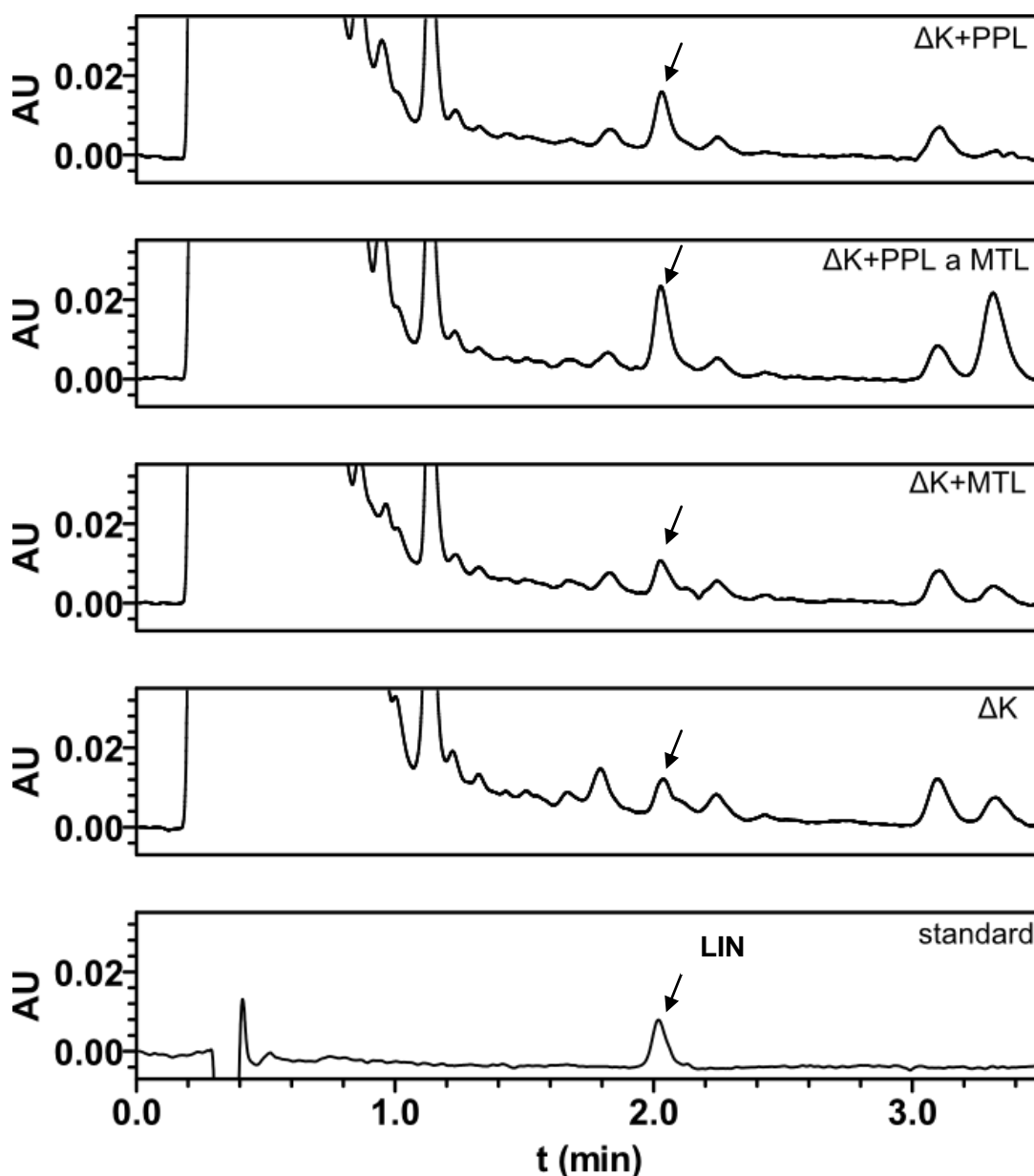
Přidané prekurzory:

H₂O - přidaná voda (kontrola)

PPL - aminokyselinová složka linkomycinu (200 µg/ml)

MTL - cukerná složka linkomycinu (200 µg/ml)

PPL + MTL - přidáno PPL a MTL (po 200 µg/ml)



Obr. 40: UPLC analýza extrahovaných agarových bločků z obohacovacích pokusů:

ΔK+PPL – kmen *S. lincolnensis* ΔK, který rostl na agaru obohaceném o PPL

ΔK+ PPL a MTL – kmen *S. lincolnensis* ΔK, který rostl na agaru obohaceném o PPL a MTL

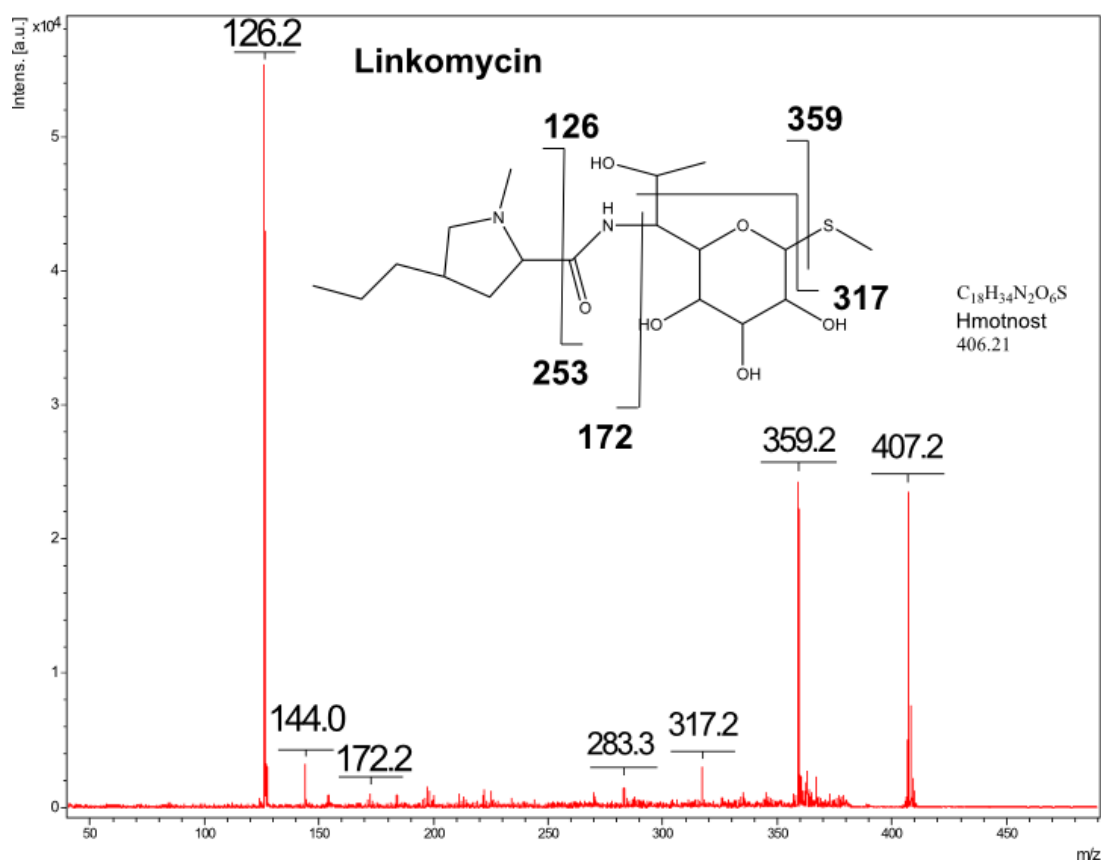
ΔK+MTL – kmen *S. lincolnensis* ΔK, který rostl na agaru obohaceném o PPL

ΔK – kmen *S. lincolnensis* ΔK, který rostl na neobohaceném agaru

Standard – standard linkomycinu (3,9 μg/ml)

Látky s retenčním časem a spektrem, odpovídajícími linkomycinu, jsou označeny šipkami.

Podmínky UPLC analýzy: analytická kolona BEH C 18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μm), mobilní fáze 1mM mravenčan amonný, pH 9.0 : acetonitril, 76:24 (v/v), průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce při vlnové délce $\lambda = 194$ nm.



Obr. 41: MS/MS spektrum linkomycinu, m/z 406,21.

Čísla u jednotlivých fragmentů vyjadřují molekulovou hmotnost těchto fragmentů.

5.1.2.5. Nadprodukce genu *lmbU*

Pro účely vložení další kopie potenciálního regulačního genu *lmbU* (Kap. 3.6.2.) do produkčního kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl použit integrační plazmid pOSV556. Gen *lmbU* bez vlastního promotoru byl namnožen pomocí PCR s primery klonUf (začátek genu, vnesení restrikčního místa HindIII) a klonUr (konec genu, vnesení restrikčního místa XhoI). PCR fragment o velikosti cca 800 pb byl přečištěn a štěpen enzymy XhoI a HindIII. Pak fragment byl vložen do vektoru ošetřeného stejnými enzymy. Restrikce inzertu a vektoru dvěma enzymy zajistila vložení genu ve správné orientaci ke konstitutivnímu promotoru *ermE*.

Plazmid s vloženým genem *lmbU* byl transformován do buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002 a transformanty *E. coli* ET12567/pUZ8002/pOSV556+U byly selektovány na LB agaru s hygromycinem (50 µg/ml). Poté byl plazmid mezidruhovou konjugací přenesen do *S. lincolnensis* ATCC 25466 a transkonjuganty byly selektovány přelitím MS agaru vodním roztokem kyseliny nalidixové (finální koncentrace 25 µg/ml) a hygromycinu (50 µg/ml). Kmen *S. lincolnensis* s integrovaným plazmidem pOSV556+U byl pak přeočkován na agar GYM s hygromycinem.

Po deseti dnech kultivace ve 28°C byl kmen *S. lincolnensis* s dodatečnou kopií genu *lmbU* zaočkován do YEME média a po 30 h kultivace byl přeočkován do AVM média. Produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl pěstován za stejných podmínek. Kultivace byly provedeny v triplikátech. Po ukončení kultivace bylo fermentační médium analyzováno na přítomnost linkomycinu metodou UPLC.

Srovnání zjištěných koncentrací linkomycinu u produkčního kmene (50 - 70 µg/ml) a kmene s další kopií genu *lmbU* (100 - 120 µg/ml) ukázala přibližně dvojnásobné zvýšení produkce v druhém případě.

5.2. Cílená manipulace biosyntetické dráhy linkomycinu

Řada derivátů linkomycinu byla získána chemickou syntézou. Mezi ně patří i látky s delším alkylovým řetězcem v pozici C4' - 4'-butyl-4'-depropyl-linkomycin a 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycin (dále BULIN a PELIN, MAGERLEIN 1971).

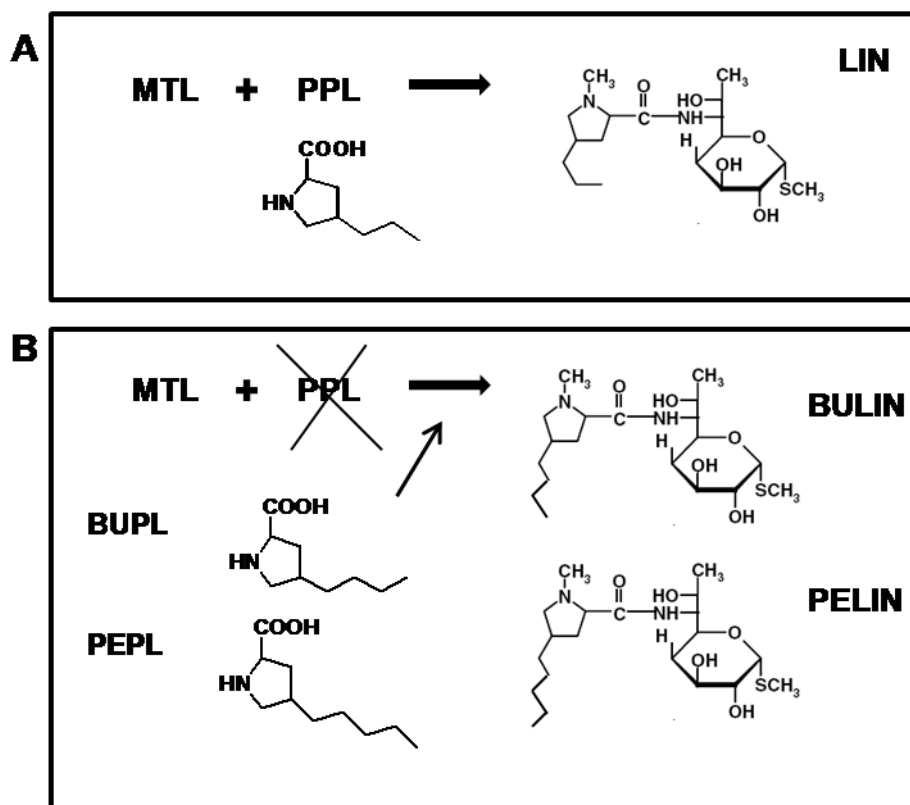
Pro získání těchto derivátů linkomycinu cílenou úpravou biosyntetické dráhy byl použit mutasyntetický přístup – přidávání derivátů prolinu s delším alkylovým řetězcem do fermentačního média kmene *S. lincolnensis* jΔX, defektního v biosyntéze daného prekursoru linkomycinu (Obr. 42). Tento kmen byl odvozen od typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 a měl inaktivovaný gen *lmbX*. Role genu *lmbX* v biosyntéze PPL byla prokázána obohacovacími testy. V důsledku inaktivace kmen ztratil schopnost produkovat linkomycin (SMUTNÁ 2007).

5.2.1. Mutasyntéza derivátů linkomycinu

Spory kmene *S. lincolnensis* jΔX byly zaočkovány na agarové bločky obohacené o BUPL a PEPL. Jako pozitivní a negativní kontroly byly na bločky bez přísad derivátů prolinu zaočkovány kmeny *S. lincolnensis* ATCC 25466 a *S. lincolnensis* jΔX. Po týdnu kultivace v 28°C byly bločky přemístěny na agarovou plotnu převrstvenou suspenzí *K. rhizophila*. Zóny inhibice růstu indikující přítomnost antimikrobiální látky byly pozorovány po 16 h kultivace. Zóny byly zjištěny v okolí bloček s narostlým kontrolním kmenem *S. lincolnensis* ATCC 25466 (30 mm) a mutantním kmenem *S. lincolnensis* jΔX rostoucím na médiu s přidáním BUPL (15 mm) a PEPL (30 mm). Mutantní kmen rostoucí na médiu bez přísad antimikrobiální látku neprodukoval.

Dále byly provedeny obohacovací pokusy v tekutém médiu. Kmen *S. lincolnensis* jΔX byl kultivován v AVM médiích s přísadkou PPL, BUPL a PEPL (200 µg/ml) po dobu 5 dnů (Kap. 4.2.12.). Pak bylo mycelium odstraněno centrifugací, fermentační média byla přečištěna na SPE koloně a analyzována metodou UPLC s lineární gradientovou elucí (Kap. 4.2.31. a 4.2.33.). Retenční čas standardu linkomycinu za těchto podmínek byl 3,00 min.

Produkce linkomycinu nebyla zaznamenána u kmene *S. lincolnensis* jΔX jak v mediích bez přísad, tak i v mediích s BUPL a PEPL (Obr. 43). Minoritní pík s retenčním časem kolem 2,95 min měl UV spektrum odlišné od spektra linkomycinu.



Obr. 42: Schematické znázornění mutasyntetického pokusu:

- A. Biosyntéza linkomycinu v typovém produkčním kmenu *S. lincolnensis* ATCC 25466.
- B. Mutasyntéza v mutantním kmenu defektním v biosyntéze PPL. Po přidání derivátů prolinu vznikají deriváty linkomycinu.

(BUPL – 4-L-butylprolin, PEPL – 4-L-pentylprolin, LIN – linkomycin, BULIN – 4'-butyl-4'-depropyllinkomycin, PELIN – 4'-pentyl-4'-depropyllinkomycin).

Naopak, UPLC analýza prokázala přítomnost píku s retenčním časem a spektrem linkomycinu ve vzorku média obohaceného o PPL (Obr. 43). V médiích s BUPL a PEPL byly nalezeny píky s retenčními časy 5,10 a 6,40 min, odpovídající předpokládaným časům BULIN a PELIN a spektra podobnými linkomycinu (Obr. 43). Frakce s předpokládanými deriváty linkomycinu byly extrahovány a analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie, která potvrdila přítomnost BULIN a PELIN v těchto vzorcích (Obr. 44 a 45).

Pro ověření, zda koncentrace přidaného prekursoru může mít vliv na množství produkovaného derivátu linkomycinu byl proveden obohacovací pokus v tekutém médiu s BUPL a PEPL o finální koncentraci 100 µg/ml. UPLC analýzou bylo zjištěno, že při této koncentraci produkce derivátů linkomycinu zůstala řadově stejná (Tab. 5).

Pro srovnání byly obohacovací pokusy provedeny rovněž s typovým kmenem *S. lincolnensis* ATCC 25466. Do kultivačních médií bylo přidáno 200 µg/ml derivátů prolinu. Při stejném objemu biomasy byla v médiu pak zjištěna produkce jak linkomycinu, tak i jeho derivátu PELIN, ovšem v nižší koncentraci, než u kmene *S. lincolnensis* jΔX (Obr. 46, Tab. 5). Nízká produkce linkomycinu typovým produkčním kmenem na médiu obohaceném o BUPL se dá vysvětlit nepovedenou kultivací.

Tab. 5: Koncentrace linkomycinu (LIN) a jeho derivátů (BULIN a PELIN) ve obohacených fermentačních médiích typového a mutantního kmenů.

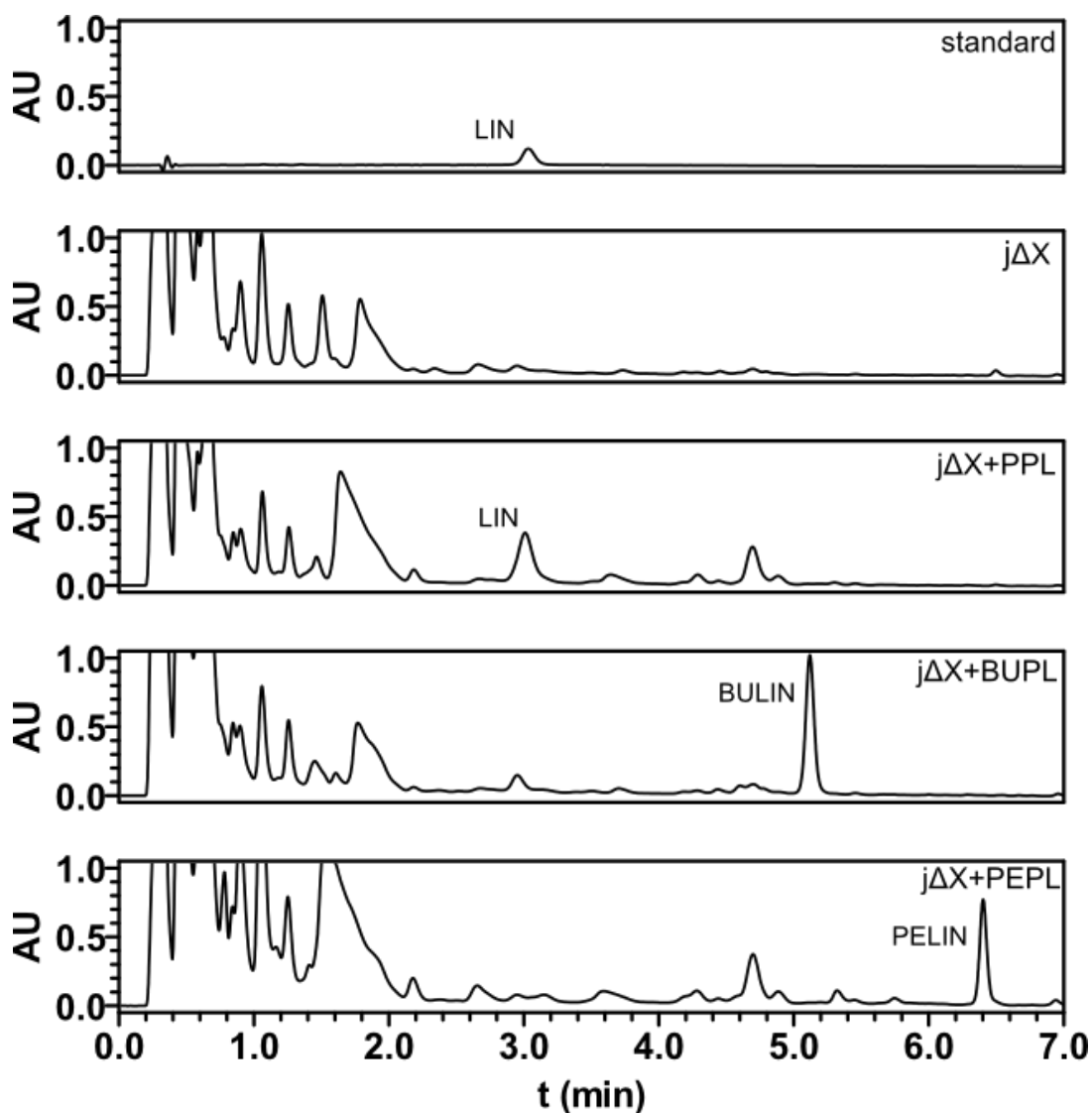
Kmen	LIN	BULIN	PELIN
WT	80		
jΔX	-		
jΔX+PPL	36		
WT+BUPL	2	8	
jΔX+BUPL (200)		57	
jΔX+BUPL (100)		52	
WT+PEPL	15		24
jΔX+PEPL (200)			38
jΔX+PEPL (100)			49

Koncentrace linkomycinu a jeho derivátů (µg/ml) byla stanovena podle kalibrační křivky standardu linkomycinu.

WT – typový kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

jΔX – kmen *S. lincolnensis* s inaktivovaným genem lmbX

200/100 – přidáno 200 nebo 100 µg/ml derivátu prolinu



Obr. 43: UPLC chromatogramy fermentačních médií:

Standard – standard linkomycinu (62,5 µg/ml)

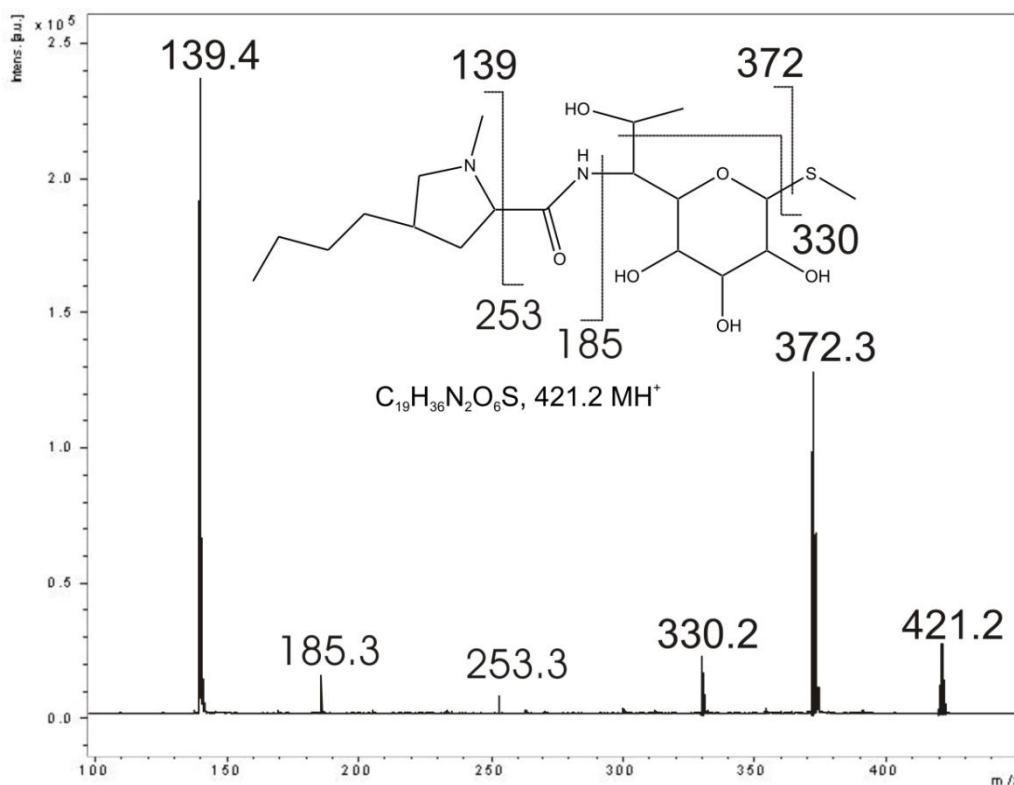
jΔX – mutantní kmen *S. lincolnensis* jΔX

jΔX +PPL, BUPL a PEPL – mutantní kmen *S. lincolnensis* jΔX rostoucí na médiích obohacených o PPL, BUPL a PEPL

Vzorky byly před analýzou 10 x koncentrovány.

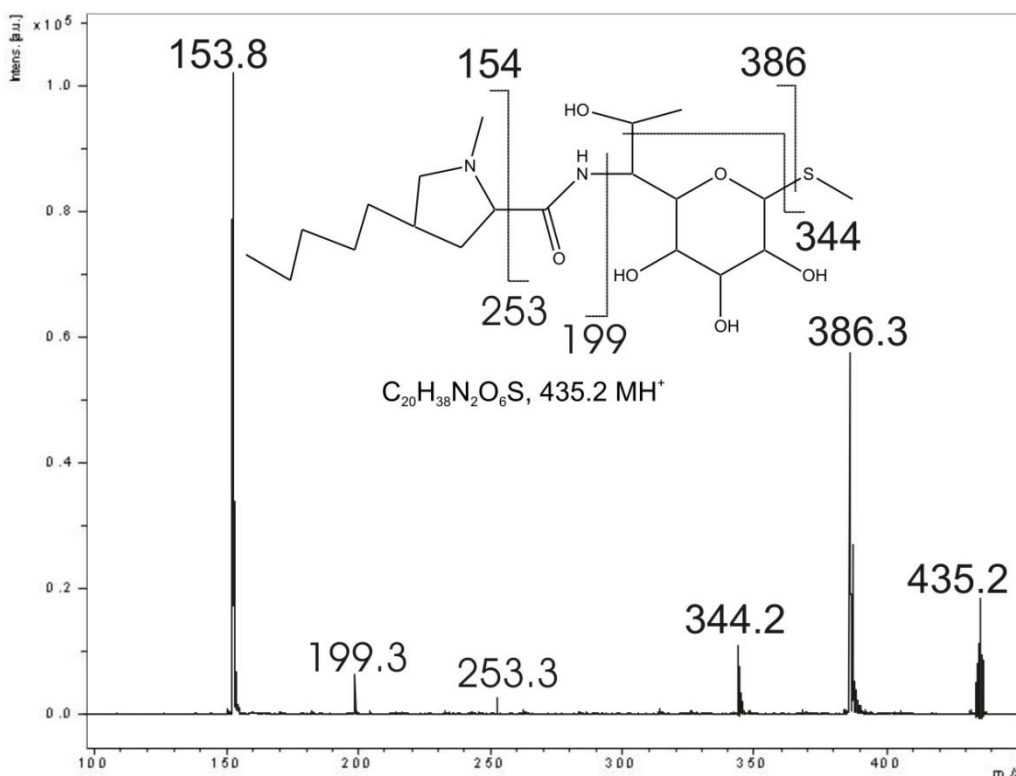
Podmínky UPLC:

analytická kolona BEH C18 (50 × 2,1 mm I. D., průměr částic 1,7µm) 35°C, dávkováno 5 µl, mobilní fáze ze složky A, 1 mM mravenčan amonný (pH 9.0), a složky B, acetonitril; lineární gradientová eluce min/%B: 0/22, 3/22, 10/52.5; průtoková rychlost, 0,4 ml/min.



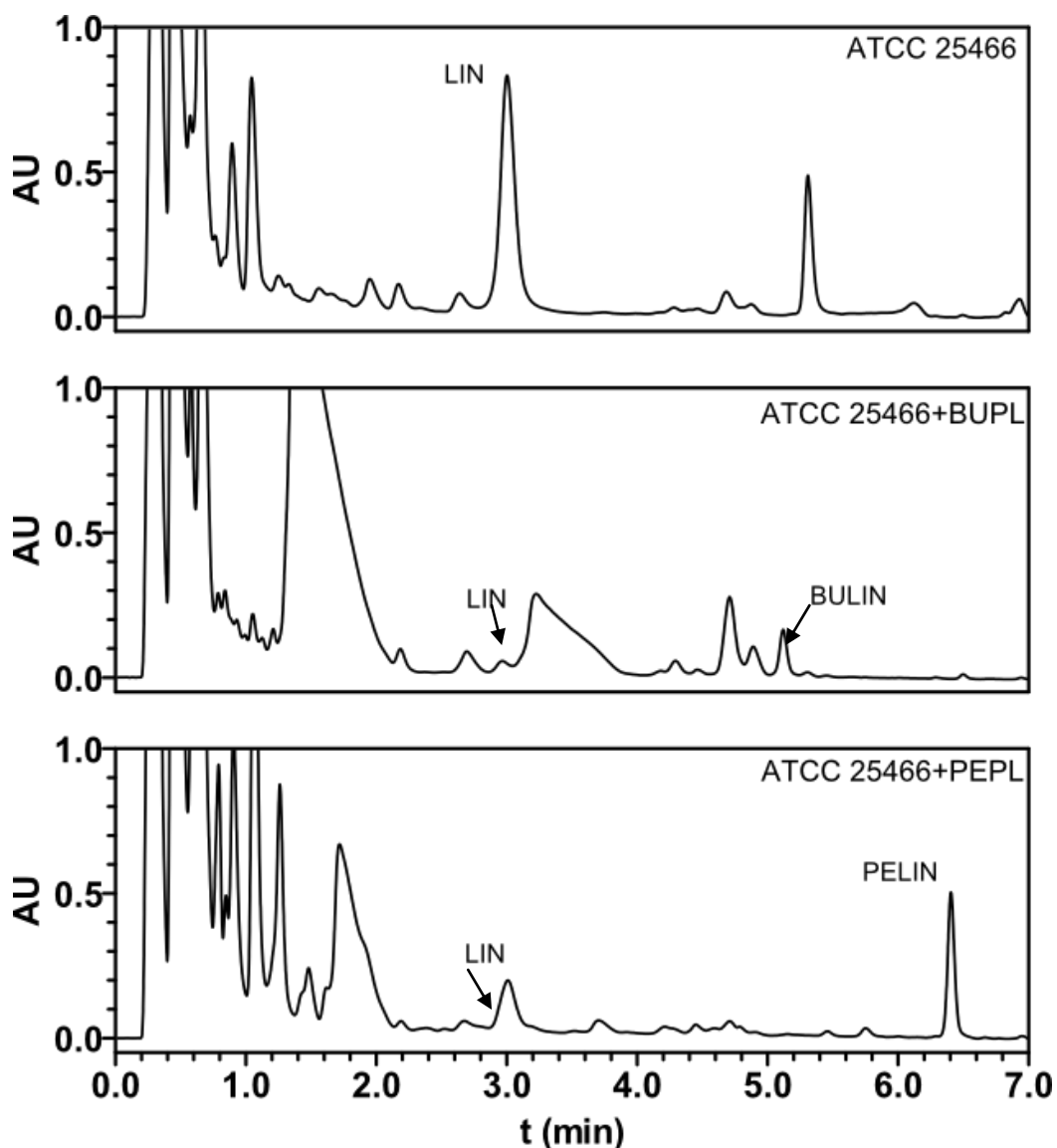
Obr. 44: MS/MS spektrum BULIN, m/z 421,2.

Čísla u jednotlivých fragmentů vyjadřují molekulovou hmotnost těchto fragmentů.



Obr. 45: MS/MS spektrum PELIN, m/z 435,2.

Čísla u jednotlivých fragmentů vyjadřují molekulovou hmotnost těchto fragmentů.



Obr. 46: UPLC chromatogramy fermentačních médií:

ATCC 25466 – produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466

ATCC 25466+BUPL a PEPL – produkční kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 rostoucí na médiích obohacených o BUPL a PEPL

Vzorky byly před analýzou 10 x koncentrovány.

Podmínky UPLC:

analytická kolona BEH C18 (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μ m) 35°C, dávkováno 5 μ l, mobilní fáze ze složky A, 1 mM mravenčan amonný (pH 9.0), a složky B, acetonitril; lineární gradientová eluce min/%B: 0/22, 3/22, 10/52.5; průtoková rychlost, 0,4 ml/min.

5.2.2. Testování citlivosti klinických izolátů rodu *Staphylococcus*

Pro testování antimikrobiálního potenciálu derivátů linkomycinu připravených mutasyntézou byly použity některé kmeny ze sbírky klinických izolátů koagulasa-negativních stafylokoků s definovaným rezistenčním genotypem. K vyšetření citlivosti byly vybrány kmeny s různými rezistenčními profily charakterizovanými v předešlých publikacích skupiny (NOVOTNÁ *et al.* 2005, NOVOTNÁ a JANATA 2006, NOVOTNÁ *et al.* 2007). Obsahovaly jednak geny udílející vysokou rezistenci k linkosamidovým antibiotikům (*ermC*, *ermA*), dále geny pro střední až nízkou rezistenci (*lnuA*, *vgaA_{LC}*) a nakonec geny rezistence pro jiné skupiny antibiotik (*msrA* (některé makrolidy) a *vgaA* (streptograminy A)). Kmeny nesly buď jeden rezistenční gen, nebo kombinaci několika genů. Jako kontrola byly použity indikátorové kmeny, citlivé k linkosamidům, mezi které patřily jak klinické izoláty (1180L a 174KV), tak i sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Část vybraných kmenů byla testována na citlivost k BULIN a PELIN diskovou difuzní metodou. Disky napuštěné 2 a 5 µg antimikrobiální látky byly umístěny na misku s čerstvě naočkovanou kulturou stafylokoků. Komerčně dostupné disky s linkomycinem a klindamycinem (oboje po 2 µg/disk) byly použity jako kontrola. Inhibiční zóny byly odečteny po 24 h kultivace ve 37°C. Výsledky testu jsou uvedeny v Tab. 6. Všechny izoláty byly rezistentní k linkomycinu. Izoláty nesoucí geny *ermC*, *ermA* a *vgaA_{LC}* byly rezistentní ke všem testovaným linkosamidům, ovšem u dvou kmenů s *vgaA_{LC}* byla naměřena o něco větší zóna (10 – 13 mm) u klindamycinu a derivátů linkomycinu s nanesením 5 µg na disk. U všech sedmi kmenů s geny *msrA* a *lnuA* byly pozorovány zóny kolem disků s klindamycinem (15 – 30 mm) a u třech z nich - zóny mezi 10 – 14 mm kolem disků s 5 µg BULIN a PELIN.

Následující stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) bylo provedeno u kmenů, které měly inhibiční zónou kolem disků s deriváty linkomycinu. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena agarovou diluční metodou. Do testovaného souboru byly dále přidány kmeny *Staphylococcus haemolyticus* a *Staphylococcus epidermidis* s inducibilními a konstitutivními *ermC* geny, a také kmeny se samostatnými *lnuA*, *msrA* a *vgaA* geny. Tak bylo dosaženo vyšší variability rezistenčních profilů testovacího souborů kmenů. Indikátorový kmen *S. aureus* ATCC 29213 byl použit ke stanovení hodnot MIC pro citlivý organismus. Na základě výsledků diskových testů byl k dalšímu testování použit už jen více účinný PELIN a

také komerčně zakoupený klindamycin a linkomycin. Z důvodu malého množství dostupného derivátu linkomycinu bylo měření provedeno v mikrotitračních destičkách. Agary s různými koncentracemi antibiotik byly rozpipetovány do jednotlivých jamek v destičkách (Kap. 4.2.16.). Jamky byly následně zaočkovány suspenzí testovaných kmenů. Destičky byly inkubovány ve 37°C a minimální inhibiční koncentrace byly odečteny po 24 h kultivace. Hodnoty MIC pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v Tab. 7. Kmeny s konstitutivními *ermC* a *vgaA_{LC}* geny měly vysoké hodnoty MIC pro všechna použitá linkosamidová antibiotika. Naopak, kmeny nesoucí *ermCⁱ* geny s inducibilní expresí, byly ke všem linkosamidům citlivé. Stejně tak i kmeny se samostatným genem *msrA*, neudílejícím rezistenci k linkosamidům, byly podle očekávání ve všech případech citlivé. Kmeny se samostatným genem *lnuA*, podobně jako v kombinaci s *msrA*, byly vysoce rezistentní k linkomycinu. Hodnoty MIC pro PELIN u kmenu s *lnuA* genem se blížily hodnotám pro klindamycin. PELIN tedy měl mnohem lepší antimikrobiální účinky vůči těmto kmenům než linkomycin.

Pro zjištění, zda PELIN umí indukovat expresi *ermC* genu, byl proveden diskový indukční test. K tomuto účelu byly vybrány kmeny s inducibilním a konstitutivním genem *ermC*, které byly naočkovány na agarové plotny. Na tyto plotny byly pak umístěny disky s indukujícím antibiotikem erythromycinem a v jejich blízkosti disky s PELIN a kontrolním neindukujícím linkomycinem nebo klindamycinem. Plotny byly inkubovány při 37°C po dobu 16 h. Inhibiční zóny ve formě písmene D u kmenu s inducibilními geny *ermC* a *ermA* prokázaly, že PELIN je, podobně jako linkomycin a klindamycin, neindukujícím antibiotikem (Obr. 47).

VÝSLEDKY

Tab. 6: Testování citlivosti kmenů stafylokoků diskovou difuzní metodou.

Kmen ^a	Druh ^b	Rezistenční geny	Rezistence ^c	Inhibiční zóna (mm)			
				LIN (2 µg)*	KLI (2 µg)*	BULIN (2 µg/5 µg)*	PELIN (2 µg/5 µg)*
1043UL	STHA	<i>ermC</i>	ELK	5	5	5	5
1770L	STEP	<i>ermA</i>	ELK	5	5	5	5
2220L	STHA	<i>vgaALC</i>	LK	5	12	5/7	5/13
290L	STHA	<i>vgaALC</i>	LK	5	10	5/10	5/10
140UL	STHA	<i>vgaALC</i>	LK	5	5	5	5
45PL	STHA	<i>vgaALC</i>	LK	5	8	5	5
1036UL	STEP	<i>ermC, vgaALC</i>	ELK	5	5	5	5
1032UL	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	15	5/7	5/13
1001KR	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	18	7/10	8/14
141KV	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	18	5/7	13/14
59BB	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	28	5	8
1130L	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	30	5	5
590V	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	35	5	5
227KR	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	5	30	5	10
64BB	STHA	<i>ermC, msrA, vgaALC</i>	ELK	5	5	5	5
71BB	STHA	<i>vgaALC</i>	ELK	5	5	5/5	5
320L	STEP	<i>lnuA, msrA, vgaALC</i>	ELK	5	10	5/5	5
citlivé							
1180L	ST			30	28	30	33
174KV	ST			40	40	40	40

*LIN – linkomycin, KLI – klindamycin, oboje disky Oxoid (2 µg/disk), BULIN a PELIN připravené disky po 2 a 5 µg/disk. Průměr disku je 5 mm. Velikost zóny se počítala společně s velikostí disku.

^aDvě písmena v názvu izolátu označují název nemocnice, odkud kmen pochází (Kap. 4.1.1.).

^bSTHA – *S. haemolyticus*, STEP – *S. epidermidis*, STAU – *S. aureus*, ST - *Staphylococcus*

^cE – erythromycin; L – linkomycin; K – klindamycin

Hraniční průměr inhibičních zón pro citlivé kmeny stafylokoků je v případě klindamycinu větší nebo se rovná 21 mm (URBÁŠKOVÁ 1998).

VÝSLEDKY

Tab. 7: Stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC).

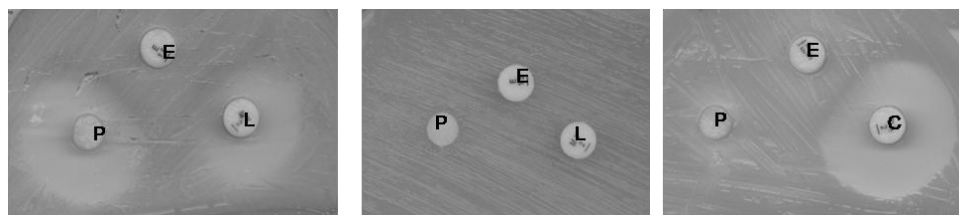
Kmen ^a	Druh ^b	Rezistenční geny	Rezistence	LIN	MIC µg/ml	
					KLI	PELIN
44KR	STEP	<i>ermC</i>	ELK	64	>16	64
134PL	STHE	<i>ermC</i>	ELK	32	>16	32
32PL	STEP	<i>ermCⁱ</i>	ELiKi	1	0,125	0,25
31UL	STHA	<i>ermCⁱ</i>	ELiKi	1	0,5	0,5
29OL	STHA	<i>vgaA_{LC}</i>	LK	64	16	32
222OL	STHA	<i>vgaA_{LC}</i>	LK	64	16	32
65OL	STHA	<i>ermC, vgaA_{LC}</i>	ELK	128	4	128
1036UL	STEP	<i>ermC, vgaA_{LC}</i>	ELK	>256	>16	64
129OV	STEP	<i>msrA</i>	E	1	0,25	0,25
202BB	STHA	<i>msrA</i>	E	1	0,125	0,25
167KV	STHA	<i>msrA</i>	E	1	0,125	0,25
102OL	STEP	<i>lnuA</i>	L	64	1	2
123PL	STHA	<i>lnuA</i>	L	128	2	8
59BB	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	64	1	8
227KR	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	128	1	16
1032UL	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	64	0,5	8
1001KR	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	256	0,25	8
141KV	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	128	1	8
113OL	STHA	<i>msrA, lnuA</i>	EL	128	1	8
32OL	STEP	<i>msrA, lnuA, vgaA_{LC}</i>	ELK	>256	16	64
CIP 107907	STAU	<i>vgaA</i>		4	0,25	0,5
ATCC 29213	STAU			1	0,125	0,25

^aKap. 4.1.1.

^bSTHA – *S. haemolyticus*, STEP – *S. epidermidis*, STAU – *S. aureus*

^cE – erythromycin; L – linkomycin; K – klindamycin; Li, Ki – inducibilní rezistence.

Hraniční koncentrace klindamycinu pro citlivé kmeny stafylokoků je menší nebo se rovná 0,5 µg/ml (URBÁŠKOVÁ 1998).



Kmen	181KV	64BB	125KR
Rezistenční profil	ELiKiPi	ELKP	ELKiP
Rezistenční geny	<i>ermCⁱ, msrA</i>	<i>ermC^c, msrA</i>	<i>ermAⁱ, lnuA</i>

Obr. 47: Diskový indukční test.

Kmeny 181KV a 125KR nesou geny *ermC* a *ermA* s inducibilní expresí.

Kmen 64BB nese *ermC*, který je přepisován konstitutivně.

E – erythromycin (15 µg/disk) – induktor rezistence

L – linkomycin (2 µg/disk) – neindukující antibiotikum

C – klindamycin (2 µg/disk) – neindukující antibiotikum

P – PELIN (2 µg/disk)

ELiKiPi – inducibilní rezistence k lincomycinu, klindamycinu a PELIN

ELKP – konstitutivní rezistence

5.3. Testování („screening“) sbírky půdních aktinomycet

Poslední část předkládané práce měla za cíl prozkoumání a posouzení přírodních zdrojů homologů genů specifických pro biosyntetické shluky linkosamidových antibiotik.

V předchozích letech byly k těmto účelům provedeny odběry vzorků půd z různých lokalit v České republice, Rakousku a Itálii (SÁGOVÁ-MAREČKOVÁ *et al.* 2008, ČERMÁK *et al.* 2008, SÁGOVÁ-MAREČKOVÁ a KOPECKÝ, osobní sdělení). Tyto lokality se lišily pH, typem půdy a rostlinnými společenstvími (Tab. 8). Aktinomycety z půdních vzorků byly selektivně izolovány na agarových plotnách s cykloheximidem podle protokolu popsáno v ČERMÁK *et al.* 2008. Všechny izolované kmeny (celkem 719 kmenů) byly testovány na schopnost produkce antimikrobiálních látek vyšetřením citlivostí indikátorových kmenů *K. rhizophila* CCM 552 a *E. coli* CCM 3988 (PLHÁČKOVÁ, osobní sdělení).

Pro zjištění četnosti výskytu a diverzity producentů sekundárních metabolitů, tedy potenciálního zdroje nových genů, v různém půdním prostředí byla provedena PCR analýza vybraných kmenů z této sbírky. Kmeny byly vybírány podle morfologických znaků, typických pro aktinomycety, a dále na základě výsledků testů citlivosti. Srovnání podle těchto dvou parametrů vyloučilo potenciálně stejné mikroorganismy a celkový počet k analýze byl tak zredukován na 386 kmenů.

Tab. 8: Názvy a vlastností pokusných lokalit. Počty testovaných kmenů z jednotlivých lokalit.

Lokality	pH půdy	podloží	vegetace	počet kmenů
Srbsko (SR)	7,7	kambizem	smíšený les	52
Třeboň (TR)	4	podzol	smíšený les	73
Děvín (DĚ)	7,8	rendzina	step	42
Oblík (OB)	7,9	kambizem	step	7
Nechranice (NE)	6,1	smonica	lístnatý les	12
Zakopané (ZA)	3,7	ns	borovice	9
Gargano (GA)	ns	ns	ns	15
Stampftal (ST)	7,62	rendzina	borovice	62
Merkenstein (ME)	8,1	rendzina	borovice	114

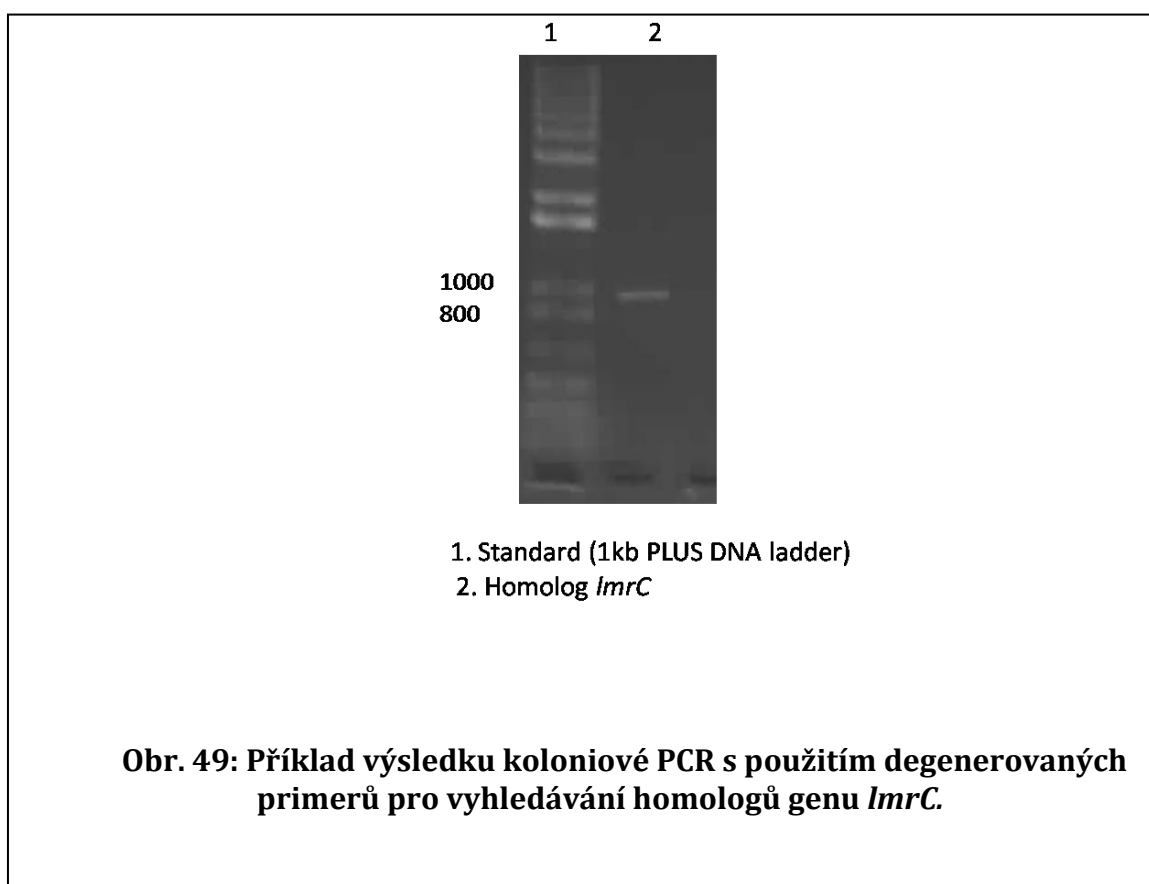
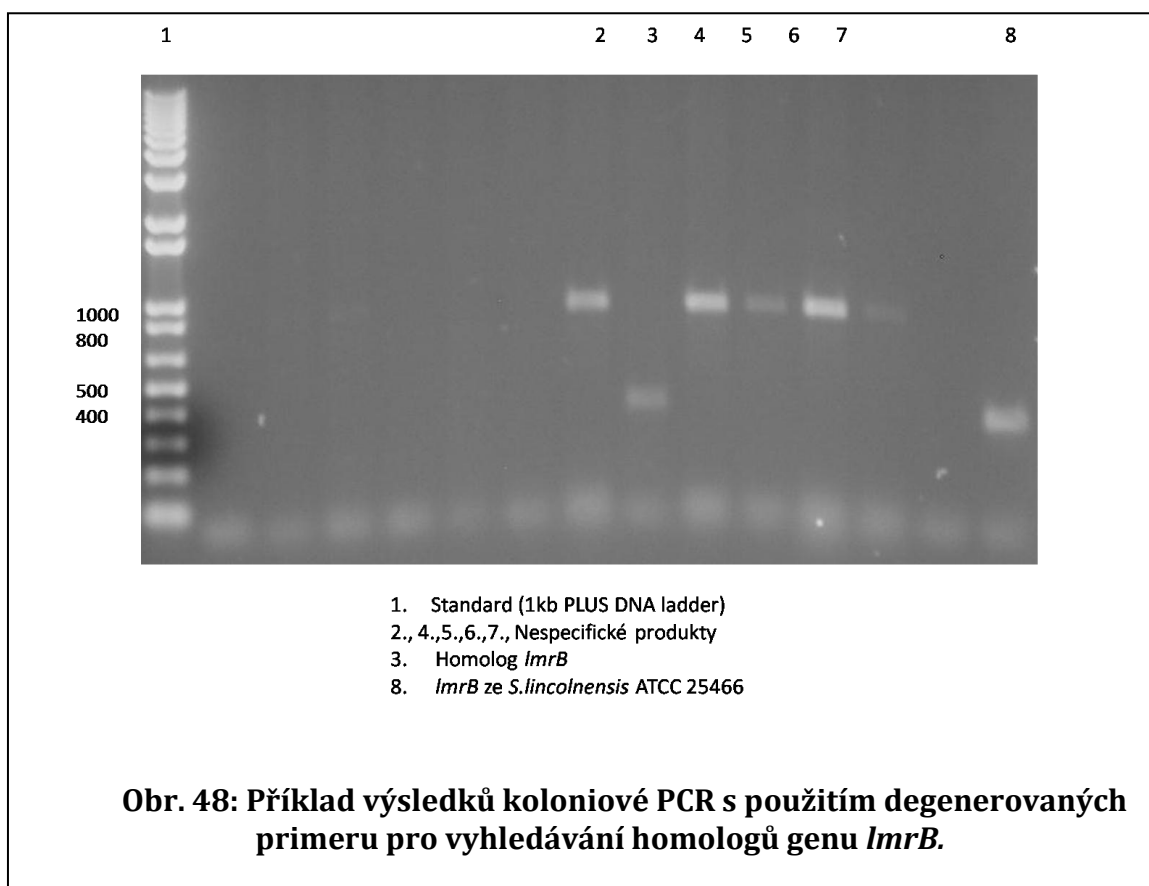
ns- nebylo stanoveno

5.3.1. Testování kmenů na přítomnost genů rezistence

Jako „sondy“ potenciálně nových genových shluků, byly vybrány geny rezistence k linkomycinu – *lmrB*, kódující 23S rRNA methyltransferasu a *lmrC*, jehož proteinový produkt patří do rodiny ABC transportérů. K jejich vyhledávání u jednotlivých kmenů byly použity degenerované primery, navržené na základě srovnávací analýzy konzervovaných úseků příbuzných rRNA methyltransferas a ABC transportérů. Testování sbírky půdních aktinomycet na přítomnost hledaných genů bylo provedeno pomocí metody koloniové PCR. Mikroorganismy byly pěstovány na plotnách s GYM agarem po dobu 5 – 7 dnů a malé množství narostlého mycelia bylo odebráno a použito jako templát do reakce. Složení a podmínky PCR jsou uvedeny v Kap. 4.2.26. Produkty PCR o očekávané velikosti kolem 450 pb (Obr. 48) byly přečištěny soupravou MinElute PCR purification kit (Qiagen) a vloženy do plazmidu pGEM pomocí TA klonování (Kap. 4.2.28.). Ligační směs byla transformována teplotním šokem do buněk *E. coli* JM109. Buňky byly selektovány modrobílou selekcí. Bílé kolonie byly testovány na přítomnost plazmidu s vloženým inzertem koloniovou PCR. Fragmenty PCR o velikosti cca 700 pb (450 pb – inzert a cca 200 pb – okolí inzerčního místa) byly přečištěny soupravou a sekvenovány z sekvenačních primerů pUCM13.

Jako první byly vyhledávány homology genu *lmrB* pomocí primerů rB1f a rB1r. 23S rRNA methyltransferasy byly nalezeny u 7 (1,8%) ze všech testovaných kmenů. Nejvíce pozitivních kmenů pocházelo z rakouských oblastí Merkenstein (4 kmeny). Další dva kmeny byly ze Srbska a jeden z Nechranic (tab. 9).

Ve spolupráci s Petrou Šanderovou z Výzkumného ústavu rostlinné výroby bylo provedeno vyhledávání homologů dalšího rezistenčního genu *lmrC* s využitím primerů rC4f a rC4r. Produkty koloniové PCR o velikosti kolem 900 pb (Obr. 49) byly klonovány do plazmidu pGEM a sekvenovány. Homology *lmrC* byly nalezeny u 6,2% kmenů (v tomto případě bylo testováno pouze 341 kmenů). U dvou kmenů byly nalezeny najednou dva ABC transportéry homologní *lmrC*. Některé kmeny byly zároveň pozitivní i na *lmrB* homology. I v tomto případě nejvíce kmenů bylo původem z lokalit Merkenstein a Stampftal (Tab. 9).



5.3.2. Fylogenetická analýza kmenů

Další analýza byla provedena jen s kmeny obsahujícími homology *lmr* genů (37 kmenů). Naprostá většina kmenů v souboru pocházelo z rakouských oblastí Merkensteinu a Stampftalu (33 kmenů).

Pro určení druhové diverzity souboru u všech 37 kmenů byla udělána sekvenační analýza 16S rRNA. Úseky 16S rRNA byly namnoženy pomocí koloniové PCR s použitím univerzálních primerů 16Seu27f a 16Seu783r. Produkty PCR o velikosti 800 pb byly přečištěny a sekvenovány z primeru 16Seu27f. Ze získaných sekvencí 16S rRNA byl sestaven fylogenetický strom, do kterého pro srovnání byly přidány sekvence 16S rRNA známých kmenů. Pomocí analýzy 16S rRNA se zjistilo, že testovaný soubor byl celkem různorodý, a některé kmeny byly blízce příbuzné již známým producentům antibiotik. Dále se zjistilo, že soubor obsahuje několik mikroorganismů se stejnou sekvencí 16S rRNA a také jednu bakterií jiného rodu, které byly z výběru vyloučeny. Celkem zbylo 24 kmenů (Tab. 9, Obr. 50).

K účelům fylogenetické analýzy *lmr* homologů byly vybrány geny jen z kmenů s odlišnou sekvencí 16S rRNA. Z DNA sekvencí homologů *lmrB* (7 sekvencí) a *lmrC* (23 sekvence) byly sestaveny fylogenetické stromy. Pro srovnání byly přidány sekvence *lmrB* a *lmrC* ze *S. lincolnensis* ATCC 25466.

Gen *lmrB* z *S.lincolnensis* tvořil fylogeneticky příbuznou větev se třemi geny z celkových sedmi analyzovaných homologů (Obr. 51). Gen *lmrC* tvořil fylogeneticky příbuznou větev jen s jedním homologem z celkových 23 (Obr. 52).

5.3.3. Testování produkčního potenciálu

U vybraných 24 kmenů byla provedena chromatografická analýza fermentačního média na přítomnost sekundárních metabolitů. Co se týče antimikrobiálních profilů, výběr obsahoval kmeny produkující látky s bioaktivitou proti *K. rhizophila* (14 kmenů) a kmeny s žádnou aktivitou (10 kmenů). Kultury byly pěstovány po dobu 10 dnů v 50 ml GYM média (Kap. 4.2.8.), pak byly buňky odděleny centrifugací a 30 μ l fermentačního média bylo nanášeno na hliníkovou desku pokrytou silikagelem. Linkomycin (2 μ g) byl nanášen jako standard.

Tab. 9: Souhrnná tabulka výsledků analýzy 24 kmenů půdních aktinomycet.

Kmen	Lokalita	<i>lmrB</i>	<i>lmrC</i>	TLC	Bioaktivita
528	DĚ		+	-	+
1	ME	+		-	+
22	ME		+	-	-
32b	ME		+	-	-
80	ME	+		1	-
83	ME		+	3	-
116	ME	+	+	2	+
118	ME	+	+	1	+
803	ME		+	-	+
815	ME		+	-	-
818	ME		+	-	-
829	ME		+	2	-
830	ME		+	-	-
905	ME		+	-	+
229	NE	+		3	-
150	OB		+	1	+
49	SR	+	+	1	+
87	SR	+	+	2	+
870	ST		+	1	+
928	ST		++	1	+
930	ST		+	-	-
931	ST		++	1	-
934	ST		+	2	+
937	ST		+	-	+

Kmen – popisné číslo kmenu

Lokalita – lokalita, kde byl kmen izolován (viz Tab. 8)

lmrB – (+) kmen obsahuje gen homologní *lmrB* ze *S. lincolnensis*

lmrC – (+) a (++) kmen obsahuje jeden nebo dva geny homologní *lmrC* ze *S. lincolnensis*

TLC – počet detekovaných metabolitů pomocí tenkovrstvé chromatografie (systém B, detekce UV světlem a postříkáním orcinolovým činidlem)

Bioaktivita – kmen produkuje (+) nebo neprodukuje (-) látky s aktivitou proti *K. rhizophila*

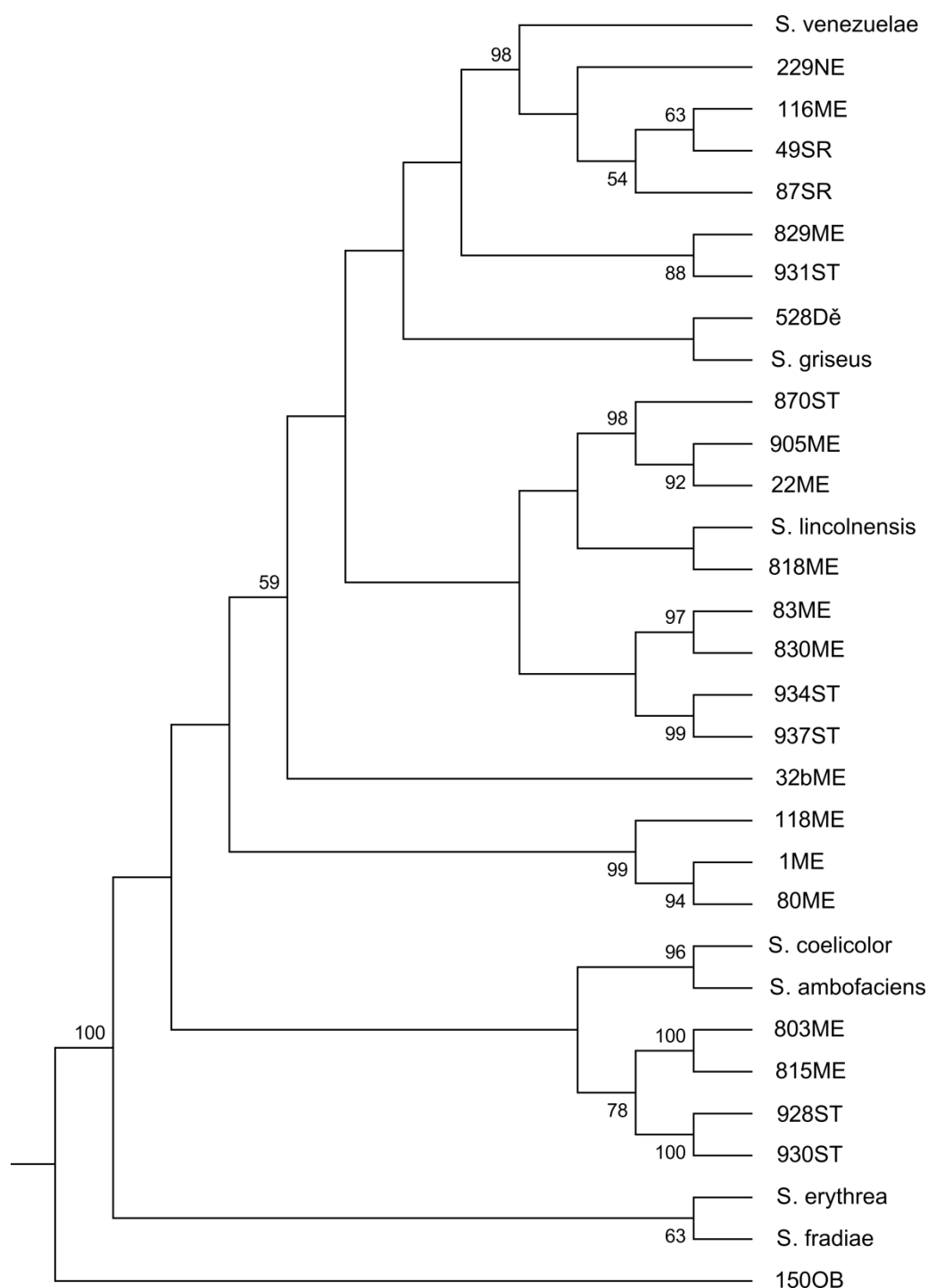
Pro výběr vhodné mobilní fáze byla nejprve provedena chromatografická analýza médií dvou vybraných kmenů a linkomycinu se čtyřmi různými směsmi o rozdílné polaritě (Kap. 4.2.35.). Látky byly detekovány pod UV světlem, postřikem orcinolovým a anisaldehydovými činidly, a dále párami jódu.

Lepšího rozdělení a detekce více látek z testovaných vzorků bylo dosaženo při použití mobilní fáze B (chloroform, methanol a amoniak), která se běžně používá pro analýzu linkomycinu (Tab. 10). Proto pro analýzu dalších fermentačních médií se používala tato soustava v kombinaci s detekcí UV světlem a orcinolovým činidlem. Počet detekovaných látek u jednotlivých kmenů je zaznamenán v Tab. 9.

Tab. 10: TLC analýza linkomycinu a fermentačních médií dvou náhodně vybraných kmenů.

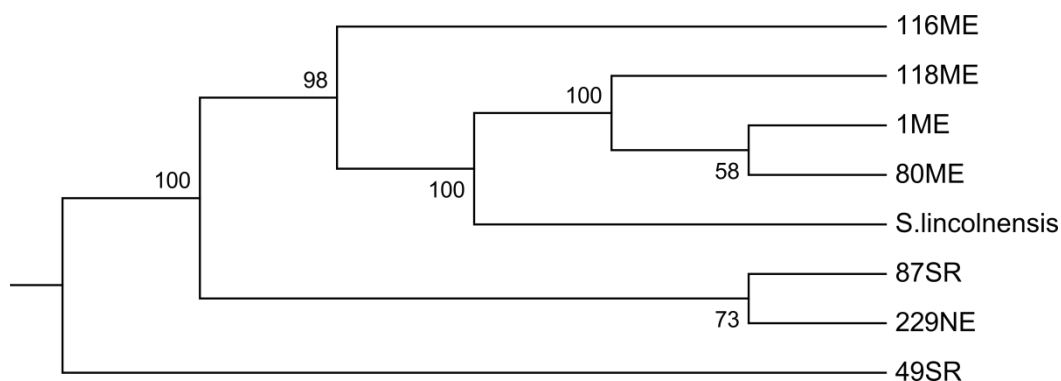
Mobilní fáze/detekce	Retenční faktor		
	Linkomycin*	Kmen č.1	Kmen č.2
A (diethylether)/UV, anisaldehyd	0,06	0,45 a 0,85	0,3
B (chloroform)/UV, orcinol	0,43	0,42 a 0,73	0,09; 0,16; 0,43 a 0,57
C (ethylacetát)/UV, anisaldehyd	0,15	0,55 a 0,72	0,47
D (n-butanol)/UV, jód	0,29	0,67	0,35 a 0,78

TLC analýza byla provedena s různými mobilními fazemi a detekčními činidly. Linkomycin byl vždy detekován reakcí s orcinolovým činidlem



Obr. 50: Fylogenetický strom příbuznosti kmenů na základě sekvence 16S rRNA.

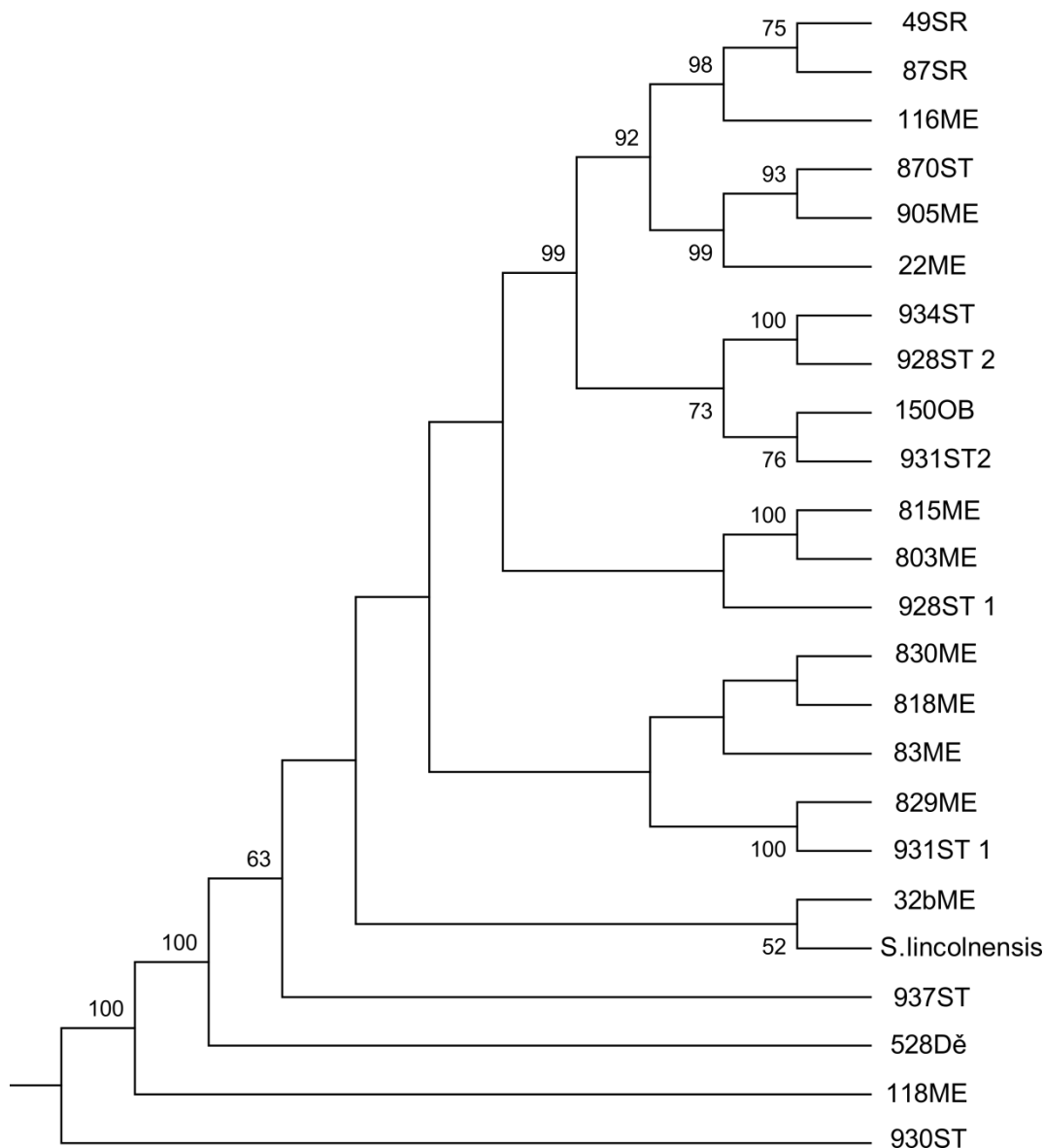
K sestavení stromu byly použity získané sekvence 16S rRNA z půdních kmenů aktinomycet (na obrázku jsou uvedena popisná čísla kmenů a dvě počáteční písmena z názvu lokality) a 16S rRNA známých producentů antibiotik. Strom byl sestaven metodou „bootstrapping“ s 1000 replikami. Hodnoty „bootstrap“ u jednotlivých větví vyjadřují v procentech množství replik, ve kterých se tvořily dané skupiny. Tato hodnota tedy udává míru spolehlivosti fylogenetických větví.



Obr. 51: Fylogenetický strom příbuznosti skupin homologů *lmrB*.

K sestavení stromu byly použity získané sekvence homologů *lmrB* z půdních kmenů aktinomycet (na obrázku jsou uvedena popisná čísla kmenů a dvě počáteční písmena z názvu lokality) a genu *lmrB* z typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 (*S. lincolnensis*).

Strom byl sestaven metodou „bootstrapping“ s 1000 replikami. Hodnoty „bootstrap“ u jednotlivých větví vyjadřují v procentech množství replik, ve kterých se tvořily dané skupiny. Tato hodnota tedy udává míru spolehlivosti fylogenetických větví.



Obr. 52: Fylogenetický strom příbuznosti skupin homologů *lmrC*.

K sestavení stromu byly použity získané sekvence homologů *lmrC* z půdních kmenů aktinomycet (na obrázku jsou uvedena popisná čísla kmenů a dvě počáteční písmena z názvu lokality) a genu *lmrC* z typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 (*S. lincolnensis*). Čísla 1 a 2 u kmenů 928 a 931 označují různé geny izolované ze stejného kmene.

Strom byl sestaven metodou „bootstrapping“ s 1000 replikami. Hodnoty „bootstrap“ u jednotlivých větví vyjadřují v procentech množství replik, ve kterých se tvořily dané skupiny. Tato hodnota tedy udává míru spolehlivosti fylogenetických větví.

6. DISKUZE

Linkosamidová antibiotika, např. linkomycin a celesticetin, mají ve srovnání s ostatními typy antibiotik poměrně jednoduchou molekulární strukturu. Nicméně tyto molekuly obsahují místa tzv. „horké body“, jejichž modifikace vede ke vzniku účinnějších látek. Velké množství zejména linkomycinových derivátů bylo připraveno v 60 - 70. letech minulého století chemickou či semisyntetickou cestou. Klindamycin, vytvořený chlorací linkomycinu, je jako jediný z těchto derivátů klinicky používán. Je účinný proti aerobním a anaerobním grampozitivním bakteriím a v kombinaci s dalšími antimalariky při léčbě malárie (SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004a). Další semisyntetický derivát, pirlimycin, je využíván ve veterinárním lékařství. Ostatní, často mnohem účinnější deriváty, nebyly zavedeny do klinické praxe především kvůli jejich nákladné chemické syntéze. Proto je důležité hledat jiné, méně nákladné způsoby přípravy těchto i možných dalších účinnějších derivátů. Jedním ze způsobů je genetická modifikace produkčního kmene, která by vedla ke tvorbě hybridních látek na bázi linkosamidů.

Výzkum v naší laboratoři je zaměřen na výzkum biosyntetických drah obou linkosamidových antibiotik. Podrobná znalost funkcí jednotlivých genů v těchto drahách je základem pro vznik hybridních látek na bázi linkosamidů. Jako modelový organizmus je používán kmen producenta linkomycinu *S. lincolnensis* ATCC 25466. Na tomto kmenu byla v minulosti provedena série pokusů vedoucí k objasnění funkcí několika genů účastnících se biosyntézy linkomycinu.

Cílem předložené dizertační práce bylo studium *lmb* genů využitelných pro přípravu hybridních látek. První část práce byla zaměřena na analýzu genů se zatím neznámou či předpokládanou funkcí v biosyntéze linkomycinu. Tyto geny byly vytipovány na základě srovnávací analýzy shluků pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu, které byly sekvenovány v naší laboratoři (KOBĚRSKÁ *et al.* 2005, 2008, KOBĚRSKÁ *et al.* článek v přípravě).

Pomocí této analýzy byla nalezena jedna z potenciálních podjednotek NDL-synthetasy, fosfopantethein (PP) vazebná doména, která funguje jako přenašeč aktivované aminokyseliny před její kondenzací s aminocukrem. Zajímavostí je, že gen kódující tento protein nebyl nalezen jako samostatný gen, ani jako součást genů kódujících potenciální podjednotky NDL-synthetasy (NOVOTNA 2008). Potenciální

přenašeč tvořil v *lmb* shluku N-koncovou část proteinu kódovaného genem *lmbN*, zatímco jeho analog byl v *ccb* shluku nalezen jako C-koncová doména proteinu CcbZ. Takové uspořádání, tedy propojení s geny nesouvisející funkce, je výjimečné, navíc pozoruhodný je pohyb PP modulu mezi sousedícími geny. Pro analýzu genu *lmbN* byl navržen inaktivační pokus tak, aby byl celý gen *lmbN* nebo jeho jednotlivé koncové části v chromozómu *S. lincolnensis* ATCC 25466 nahrazeny tzv. „jizvami“, které nezabraňují transkripci dalších genů ve stejném čtecím rámci. U mutantních kmenů byla sledována produkce linkomycinu a zkoušena komplementace funkcí obou částí genu *lmbN* přidáním jednotlivých prekurzorů antibiotika.

Inaktivační a následné fermentační pokusy prokázaly, že *lmbN* gen a obě jeho části jsou nezbytné pro biosyntézu linkomycinu, jelikož všechny tři mutantní kmeny ztratily schopnost produkovat linkomycin. Pomocí obohacovacích testů bylo zjištěno, že u kmene s odstraněnou C-koncovou doménou došlo při růstu na médiu s přidaným MTL k obnovení produkce linkomycinu. Tento výsledek potvrdil předpokládanou roli C-koncové části proteinu LmbN v biosyntéze cukerného prekurzoru linkomycinu. Zároveň tento pokus prokázal, že potencionální přenašeč, je aktivní i jako samostatná doména, nezávisle na přítomnosti zbytku proteinu. To znamená, že LmbN bude s největší pravděpodobností bifunkčním proteinem, jehož domény se účastní dvou různých částí biosyntetické dráhy. Podobný protein EntB byl popsán v biosyntéze sideroforu enterobactinu. Na C-koncovou doménu EntB je posttranslačně navázán fosfopantetheinový zbytek a protein má funkci přenašeče arylu. Zbytek proteinu má lyasovou aktivitu (GEHRING *et al.* 1997). Nelze vyloučit ani to, že dochází ke štěpení proteinu LmbN na dvě odděleně fungující části. Avšak pro tuto možnost na druhé straně není žádný důkaz.

Jedním z dalších důkazů funkce proteinu LmbN jako podjednotky NDL-synthetasy je jeho interakce s proteinem LmbE, pravděpodobnou katalytickou doménou, zodpovědnou za vznik amidové vazby mezi oběma stavebními kameny (NOVOTNÁ 2008). Analýza přítomnosti prekurzorů linkomycinu ve fermentačním médiu kmene *S. lincolnensis* ΔN_PP zjistila, že absence přenašeče aktivovaného PPL vede k hromadění tohoto prekurzoru v médiu. Podobný jev nebyl pozorován v případě inaktivace isomerasy a celého *lmbN* genu, ačkoliv nebyl zřetelně blokován žádný krok biosyntézy PPL. To může napovídat o společné regulaci produkce obou prekurzorů. Pokud je blokována syntéza jednoho z prekurzorů, není aktivní ani druhá biosyntetická větev. Zajímavým faktem ovšem je, že u kmene *S. lincolnensis* ΔN_PP

zároveň s hromadícím se PPL nebyla zjištěna zvýšená koncentrace MTL. Významné koncentrace prekursoru MTL nebyly zjištěny vůbec u žádných z testovaných kmenů. Možným vysvětlením je citlivější regulace jeho produkce nebo rychlá spotřeba k jiným buněčným procesům.

Další inaktivační pokusy byly provedeny s geny *lmbIH*, *K*, *Q*, *T*, *U* a *V*:

Proteiny LmbIH a LmbQ mají vzájemnou homologii (46% shody v úseku o délce 50 aminokyselin) a patří do skupiny TldD/TldE proteinů. U proteinů TldD a TldE byla navržena funkce modulátorů aktivity DNA gyrasy (MURAYAMA *et al.* 1996). Mechanismus působení zatím není přesně znám, předpokládá se jejich proteolytická aktivita, které buď přímo, nebo nepřímo ovlivňuje štěpení prekursoru mikrocinu – peptidového inhibitoru gyrasy – za vzniku jeho aktivní formy. Tato forma je pak sekretována z buňky ven. Proteolytická aktivita byla prokázána nepřímo genetickými pokusy (hromaděním prekursoru mikrocinu v buňkách mutantních kmenů), potvrzení na proteinové úrovni zatím provedeno nebylo (RODRIGUEZ-SAINZ *et al.* 1990, ALLALI *et al.* 2002). Tato skupina proteinů je vysoce konzervována a přítomna u mnoha druhů archebakterií a eubakterií, včetně aktinomycet. Většinou se nachází v párech se vzájemnou homologií, z čehož se dá předpokládat jejich širší fyziologickou roli, než maturace mikrocinu (ALLALI *et al.* 2002). Další homolog genu *lmbIH* byl nalezen jako součást shluku genů účastnících se sekreční dráhy v *Bradyrhizobium japonicum* (MÜLLER *et al.* 1995). Protein LmbIH ve srovnání s biosyntetickým proteinem LmbJ je v buňkách přítomen v detekovatelné koncentraci jen po krátkou dobu, lze proto předpokládat spíše regulační roli daného proteinu (HOLÁ *et al.* 2003).

Inaktivace genů *lmbIH* a *lmbQ* vedla k poklesu produkce linkomycinu na 3% obvyklé produkce. To potvrzuje předpoklad, že jimi kódované proteiny nemají funkci biosyntetickou, ale spíš podpůrnou nebo regulační. Přidání jednoho či obou prekursorů do fermentačního agaru zvýšilo produkci, zvláště v posledně jmenovaném případě. Na základě daného pozorování lze předpokládat, že proteiny LmbIH a LmbQ zatím neznámým mechanismem ovlivňují aktivitu některého z kroků biosyntetické dráhy. Při absenci jednoho ze dvou proteinů může docházet ke snížení aktivity příslušného enzymu a tím i produkce linkomycinu, což je pravděpodobně kompenzováno přidáním MTL a PPL do média v nadbytku. Výsledky dvouhybridových testů prokázaly interakce LmbIH a LmbQ s potenciálními podjednotkami synthetasy LmbE a LmbD (NOVOTNÁ 2008), z čehož lze uvažovat o

pomocné funkci LmbIH a LmbQ při kondenzační reakci. Oba proteiny mají nízký stupeň homologie a jedním z hypotetických vysvětlení je, že se mohou navzájem v určité míře zastupovat. Ovšem není možná úplná komplementace funkce chybějícího proteinu druhým z dvojice. Stejný jev byl popsán rovněž u proteinů TldD a TldE (ALLALI *et al.* 2002). Regulační funkci budou s největší pravděpodobností mít i homologní proteiny z biosyntézy celesticetinu CcbIH a CcbQ (KOBĚRSKÁ, osobní sdělení). Další pokusy na úrovni proteinů jsou nutné pro potvrzení dané teorie a vysvětlení přesného mechanismu působení těchto proteinů.

Homology proteinů LmbK patří podle BLAST analýzy do velké skupiny HAD hydrolas (haloacid dehalogenase-like hydrolases). Tato skupina zahrnuje enzymy s funkcemi dehalogenasy, epoxid hydrolasy, fosfatasy a další. Všechny proteiny obsahují vysoce konzervovanou doménu a používají aspartátový zbytek pro fosforylační reakce. Nejbližším homologem proteinu LmbK je fosfatasa molekuly D-heptosa-1,7-bisfosfátu z biosyntézy D-glycero-D-manno heptosy. Tento enzym odštěpuje fosfát před navázáním cukerného zbytku na molekulu dGTP za vzniku dGDP-heptosy (KNEIDINGER *et al.* 2001). LmbK zřejmě má fosfatasovou funkci a vzhledem k podobnosti i lokalizaci ve shluku souvisí s biosyntézou cukerné složky linkomycinu.

Inaktivace genu *lmbK* redukovala produkci linkomycinu na 2% obvyklé produkce. Obohacovací experimenty měly podobný výsledek jako v případě genů *lmbIH* a *lmbQ*. Zachování produkce, byť i na nízké úrovni, opět indikuje roli proteinu LmbK spíše v regulaci biosyntézy. Na rozdíl od všech ostatních *lmb* genů má tento gen vegetativní promotor (KOPECKÝ, osobní sdělení). Lze proto předpokládat, že je přepisován od začátku růstu bakterie a může působit jako regulátor zahájení buď celé biosyntetické dráhy, nebo její části. S největší pravděpodobností by se jednalo o biosyntézu cukerného prekurzoru, jelikož byl homolog genu *lmbK* nalezen i v *ccb* shluku (KOBĚRSKÁ *et al.* 2005).

Protein LmbT má 24% homologií se skupinou bakteriálních glykosyltransferas GT-B typu. Glykosyltransferasy katalyzují přenos cukerného zbytku z dNDP-aktivovaného donoru na molekulu akceptoru za vzniku glykosylové vazby. Tyto enzymy se účastní biosyntézy oligo a polysacharidů, glykopeptidových, aminoglykosidových, makrolidových antibiotik a dalších glykosylovaných látek. Mají velkou strukturní diverzitu a širokou substrátovou specifitu (BRETON *et al.* 2006). Výsledky inaktivačních a obohacovacích pokusů skutečně potvrdily, že protein LmbT

je nezbytný pro biosyntézu cukerné složky linkomycinu. Málo je známo o biosyntetické dráze MTL, jelikož zatím nebyl izolován žádný z intermediátů této dráhy. Není proto jasné, jakou přesnou funkci má *LmbT* v této dráze. Pokud by biosyntéza MTL začínala aktivací glukosy a pokračovala posloupností modifikačních kroků na nejspíše dTDP aktivovaném cukerném intermediátu, jak navrhuje studie PESCHKE *et al.* z roku 1995, se dá předpokládat možná účast *LmbT* v přenosu cukerného prekursoru z aktivované formy do další, např. kondenzační, reakce.

Geny podobné dalšímu zkoumanému genu *lmbU* byly nalezeny u řady jiných aktinomycet, včetně producentů aminokumarinů a rubradirinu, a podle předpokladu mají regulační funkci (EUSTAQUIO *et al.* 2003). Inaktivace genu *novE* z biosyntézy aminokumarinového antibiotika novobiocinu vedla k výraznému poklesu produkce antibiotika na 0,7% původní produkce (DANGEL *et al.* 2008). U kmene *S. lincolnensis* mutantního v genu *lmbU* nebyla produkce linkomycinu detekována. Nicméně, hraniční stanovitelná koncentrace linkomycinu je 1 µg/ml (přibližně 2% původní produkce), zatímco u aminokumarinových antibiotik je tento limit nižší.

Produkce linkomycinu u kmene s inaktivovaným genem *lmbU* nebyla obnovena po obohacení média o prekuzory MTL a PPL, ani o jejich kombinaci, což by mohlo ukazovat na blok buď celé biosyntetické dráhy, nebo jen kondenzační části. V druhém případě by pak mělo docházet k hromadění prekuzorů v médiu, podobně jako v případě inaktivace 5' koncové domény *lmbN* nebo jiného z potenciálně regulačních genů *lmbV*. V případě *S. lincolnensis* ΔU ovšem nebyla vyšší koncentrace žádného z prekuzorů zjištěna, z čehož se dá usoudit, že byla spíše zasažena buď celá dráha nebo přinejmenším biosyntéza PPL.

Vložení další kopie genu *lmbU* s konstitutivním promotorem do produkčního kmene *S. lincolnensis* naopak vedlo k dvojnásobnému zvýšení produkce antibiotika, stejný efekt byl popsán i při nadprodukcí genu *novE* (DANGEL *et al.* 2008). Jedním z vysvětlení může být, že se jedná o konstitutivní přepis genu, což vede k časnějšímu zahájení produkce antibiotika a vyšším celkovým výtěžkům. V sekvenci genu *lmbU* byl taktéž nalezen kodon TTA pro leucin, který má podle předpokladů roli v regulaci sekundárního metabolismu streptomycet (LESKIW *et al.* 1993). Tyto výsledky korespondují se studií na aminokumarinových antibioticích a potvrzují hypotézu, že *LmbU* pozitivně reguluje celou biosyntetickou dráhu zatím neznámým mechanismem, který je ovšem konzervován u aktinomycet produkujících antibiotika. Vzhledem k tomu, že gen *lmbU* chybí ve shluku genů pro biosyntézu celesticetinu (KOBĚRSKÁ *et*

al. 2005), lze usuzovat o jeho roli v regulaci syntézy PPL, např. v koordinaci s produkcí cukerného prekurzoru.

Nejtěžší určení funkce z testovaných genů má gen *lmbV*, jehož jediný nejbližší homolog byl nalezen v *ccb* shluku (KOBĚRSKÁ *et al.* 2005). Funkce tohoto genu zůstává nejasná i po inaktivačních a obohacovacích pokusech. Podobně jako po vyřazení genu *lmbU*, došlo po inaktivaci genu *lmbV* ke ztrátě schopnosti produkovat linkomycin, která nebyla obnovena v žádném z obohacovacích pokusů. Zajímavostí je, že v mutantním kmenu byla stanovena zvýšená koncentrace prekurzoru PPL, podobně jako u kmene *S. lincolnensis* Δ N_PP, kde chybí jedna z podjednotek NDL-synthetasy. To může svědčit o vlivu *lmbV* nejspíš až na kondenzační reakci.

Na základě výše uvedených výsledků inaktivačních a obohacovacích pokusů je těžké vytvořit jednoznačný obraz regulace biosyntézy linkomycinu. Jednoznačné je pouze zařazení *lmbT* mezi geny biosyntézy MTL, čímž se rozšiřuje „cukerný“ podshluk na region *lmbK-lmbT*. Ani u jednoho z testovaných genů nelze považovat za jednoznačně prokázanou jeho regulační funkci. Přesto lze vytvořit hypotézu složenou na základě dílčích poznatků, údajů z literatury i dle příslušnosti proteinů do proteinových rodin v těch případech, kdy ji vůbec lze přisoudit. Naše hypotéza předpokládá trojici genů s regulační úlohou, každý z nich souvisí s jinou částí biosyntetické dráhy, tj. syntézou MTL, PPL a kondenzací. Souhra všech regulátorů je pak nezbytná pro vznik konečného produktu.

Gen *lmbK* má několik znaků podporujících jeho úlohu v řízení biosyntézy antibiotika. Jako jediný z celého shluku má vegetativní promotor, lze tedy předpokládat jeho přítomnost i v době před produkcí antibiotika, je tedy vhodným nástrojem pro přenos zahajovacího signálu z regulátoru vyššího stupně. Dalším předpokladem pro regulační a nikoliv biosyntetickou funkci je zjištění, že jeho inaktivace biosyntézu antibiotika zcela neruší, pouze ji výrazně snižuje. Lze jej i zařadit ke konkrétní biosyntetické větvi, biosyntéze MTL. Geny *lmbK/ccbK* ve shluku linkomycinu i celesticetinu jsou připojeny k „cukerné“ části shluku, a jejich proteinové produkty jsou podobné proteinům metabolismu cukrů, konkrétně fosfatasám. Taktéž výsledky obohacovacích pokusů naznačují souvislost *LmbK* s biosyntézou MTL, jeho přidavek do média mutantního kmene obnoví zřetelně větší produkci antibiotika než přidavek druhé stavební jednotky PPL. Předpokládáme tedy, že právě tento gen je „spouštěčem“ biosyntézy MTL a současně snad i celé biosyntetické dráhy.

Inaktivační pokusy totiž naznačují spřažení biosyntézy PPL s MTL. Bohužel se v ani jednom případě nepodařilo prokázat přítomnost MTL v měřitelném množství a to ani při inaktivaci genů blokující následný kondenzační stupeň. Nicméně inaktivace celého genu *lmbN*, kdy není zasažen žádný krok biosyntézy PPL, pouze MTL a kondenzační reakce, nevede k hromadění PPL. PPL se hromadí jen v případě uvolnění bloku v biosyntéze MTL, tj. při inaktivaci části genu kódující složku NDL-synthetasy. Z toho usuzujeme, že PPL je produkováno pouze tehdy, je-li přítomna druhá stavební jednotka, MTL. Právě toto spřažení může být řízeno dalším kandidátem regulačního genu, *lmbU*. Je jediným ze souboru testovaných genů specifickým jen pro linkomycinový shluk, bez protějšku v biosyntéze celesticetinu (KOBĚRSKÁ, osobní sdělení). Jeho homolog není dokonce ani ve shlucích anthramycinových antibiotik s biosyntézou derivátů PPL (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a,b). Ale ani to není překvapivé, protože tam není nutné řešit spřažení dvojice biosyntetických větví aminokyselinové a cukerné. Naopak aminokumarinové biosyntetické shluky s vysoce homologními geny k *lmbU* aminokyselinovou a cukernou stavební jednotku obsahují. Role *lmbU* ovšem musí být složitější než jen synchronizace obou větví. Obohacení média kmene *S. lincolnensis* ΔU o oba prekurzory totiž nevedlo k obnovení produkce linkomycinu, což indikuje i jeho možný vliv na kondenzační reakci. V literatuře uvedené inaktivační experimenty, prováděné na aminokumarinovém protějšku *lmbU* (DANGEL *et al.* 2008), vyústily v závěr, že se jedná právě o regulační gen. Naše inaktivační pokusy (včetně zvýšení počtu kopií genů) dopadly prakticky stejně, jediným rozdílem je, že po inaktivaci jsme namísto snížené produkce antibiotika nedetkovali produkci žádnou. Ovšem mez detekce byla v našem případě vyšší než naměřená zbytková produkce v případě aminokumarinových antibiotik. Včlenění genu *lmbU* do *lmb* shluku navíc svědčí o komplikovanější historii interakcí biosyntetických shluků, nejde jen o prostou fúzi linkosamidových a antramycinových genů.

Nejproblematictěji lze přisuzovat funkci genu *lmbV*. V databázích sekvencí neexistují geny ani vzdáleně podobné. Ve shluku linkomycinu i celesticetinu (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008 a KOBĚRSKÁ, osobní sdělení) je sice podobně jako *lmbK* připojen k cukernému podshluku, výsledky inaktivací a obohacování však vylučují jeho spojitost s biosyntézou MTL. Naopak hromadění PPL v médiu po inaktivaci *lmbV* odpovídá bloku v kondenzační reakci (shodný projev jako při inaktivaci části genu *lmbN* s funkcí v kondenzačním stupni). Z výsledků nelze rozhodnout mezi

funkcí biosyntetickou nebo regulační, proti biosyntetické však hovoří zmíněná nepodobnost s jakýmkoliv známým proteinem.

Taktéž dvojice vzájemně homologních genů *lmbIH* a *lmbQ* snad souvisejí s kondenzačním stupněm biosyntézy linkomycinu. V tomto případě tomu nasvědčuje prokázaná interakce jimi kódovaných proteinů s několika pravděpodobnými podjednotkami NDL-synthetasy (NOVOTNÁ 2008). To, že inaktivace nevede k úplnému zrušení biosyntézy antibiotika, však svědčí nikoliv pro biosyntetickou, ale spíše podpůrnou funkci, podobně jako se předpokládá pro dvojice jim podobných proteinů v jiných systémech (ALLALI *et al.* 2002). Přesná funkce této poměrně široké rodiny proteinů zůstává nejasná.

Další součástí dizertační práce byla cílená modifikace biosyntetické dráhy za účelem tvorby 4'-butyl-4'-depropyl-linkomycinu a 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycinu. Tyto deriváty linkomycinu byly již dříve připraveny jak chemickou cestou (MAGERLEIN 1971), tak i obohacením média produkčního kmene o deriváty prolinu, neboli biosyntézou řízenou prekurzorem (VISSER 1972). Obě látky byly před mnoha léty testovány na aktivitu vůči patogenním organizmům a ukázaly větší účinnost, než linkomycin (MAGERLEIN 1971). Nevýhoda chemického syntetického přístupu spočívá v nákladném a složitém provedení. V druhém případě vzniká směs přirozeného a nepřirozeného produktu, což komplikuje purifikaci žádané látky. Také výtěžky derivátu mohou být redukovány z důvodu kompetice přirozeného a derivatizovaného prekurzoru.

Pro eliminaci dvou uvedených nedostatků byl zvolen mutasyntetický přístup, pomocí kterého byla v poslední době připravena řada derivátů známých antibiotik (WEIST a SÜSSMUTH 2005). Do kultivačního média kmene *S. lincolnensis* ΔX , defektního v biosyntéze PPL a tím i linkomycinu (SMUTNÁ *et al.* 2007), byly přidávány deriváty prolinu 4-L-butylprolin nebo 4-L-pentylprolin. Analýza fermentačních médií pak prokázala produkci pouze derivátů linkomycinu s delším alkylovým řetězcem v pozici 4' bez kontaminace linkomycinem.

Podobný obohacovací pokus byl proveden i s produkčním kmenem *S. lincolnensis* ATCC 25466. Zjistilo se, že tento produkuje dané deriváty v nižších koncentracích ve srovnání s mutantním kmenem, což ukazuje na výše uvedený problém kompetice prekurzorů. Navíc poměr koncentrací derivátů a linkomycinu byl výrazně vyšší ve prospěch obou derivátů, což svědčí o preferenci BUPL a PEPL před přirozeným prekurzorem PPL. Lze předpokládat, že tento jev mohl být vyvolán buď

nadbytkem přidaného prekurzoru v médiu, nebo vyšší substrátovou afinitou klíčového enzymu. Biochemická měření afinity proteinu LmbC, který je adenylační podjednotkou synthetasy, k různým derivátům prolinu potvrdila druhou variantu (KADLČÍK, osobní sdělení).

Výsledky obohacovacích pokusů poukázaly na širokou substrátovou specifitu dvou klíčových enzymů – adenylační domény LmbC NDL-synthetasy, která rozpoznává a aktivuje aminokyselinu před kondenzační reakcí (KADLČÍK *et al.* 2007) a finální NDL-methyltransferasy LmbJ (KADLEC 2000). Tak široká specifita je obecným rysem enzymů sekundárního metabolismu, což umožňuje vznik látek o velké strukturní diverzitě (LAU *et al.* 2000, SALAS a MENDEZ 2007).

Aktivita mutasynteticky vzniklých derivátů linkomycinu byla testována na klinických kmenech stafylokoků. Na základě diskových difuzních testů byl k další analýze vybrán účinnější PELIN. Analýzou minimálních inhibičních koncentrací kmenů s různými rezistenčními profily se zjistilo, že PELIN měl ve srovnání s linkomycinem větší aktivitu vůči kmenům s genem *lnuA*, kódujícím enzym modifikující molekulu antibiotika. Hodnoty MIC pro PELIN v tomto případě se blížily hodnotám pro klindamycin. U kmenů s jinými geny rezistence výrazné změny aktivity zaznamenány nebyly.

Závěrem lze říct, že mutasyntetický pokus ukázal nové alternativní možnosti pro syntézu derivátů linkomycinu a dalších úprav vzniklých látek. Slibnou se například zdá být příprava kmene, mutantního jak v biosyntéze PPL, tak i ve finální methylaci, s následnými obohacovacími pokusy. Očekávaný produkt N-demethylpentyllinkomycin se po chloraci v pozici C7 mění na nejúčinnější antimalarikum z celé série testovaných látek na bázi linkomycinu a klindamycinu (MAGERLEIN a KAGAN 1969). Poznatky získané mutasyntézou mohou též být prvním krokem pro přípravu nových hybridních látek pokročilejší metodou kombinatorní biosyntézy.

Účelem poslední součásti práce bylo prozkoumání sbírky kmenů aktinomycet izolovaných z různých oblastí jako zdroje nových producentů a genů sekundárního metabolismu. Lokality, ze kterých kmeny pocházely, se lišily jak fyzikálními vlastnostmi, tak i typem půd a vegetací (SÁGOVÁ-MÁREČKOVÁ *et al.* 2008, SÁGOVÁ-MÁREČKOVÁ a KOPECKÝ, osobní sdělení). Navíc dvě z testovaných lokalit, Merkenstein a Stamftal, byly na základě analýz T-RFLP profilů bakteriálního společenství vytipovány jako oblasti bohaté na aktinomycety (HACKL *et al.* 2004).

Výběrem co nejodlišnějších lokalit se očekávalo dosažení větší jak taxonomické, tak i produkční diverzity finálního souborů kmenů.

Jako indikátory potenciálních shluků sekundárních metabolitů byly vybrány geny rezistence k linkomycinu *lmrB* a *lmrC*. Geny rezistence v genomech producentů antibiotik jsou většinou součástí shluku genů pro biosyntézu příslušného antibiotika. Gen *lmrB* kóduje 23S rRNA methyltransferasu a patří do skupiny genů typu *erm* udílejících rezistenci ke skupině MLS antibiotik a gen *lmrC* kóduje ABC transporter (PESCHKE *et al.* 1995). Testování kmenů bylo provedeno metodou PCR za použitím degenerovaných primerů. Degenerované primery pro vyhledávání homologů *lmrB* genu byly navrženy na základě konzervovaných úseků *erm* genů, které byly nalezeny v chromozómech GC bohatých grampozitivních bakterií, především aktinomycet. Pro navržení primerů pro vyhledání homologů genu *lmrC* byly v databázi vyhledány o nejméně homologní sekvence z jiných producentů antibiotik s vysokým obsahem GC párů v genomu (ČERMÁK *et al.* 2008, KOPECKÝ, osobní sdělení).

Největší nález homologů *lmr* genů byl zaznamenán u kmenů právě z lokalit Merkenstein a Stamftal bohatých na aktinomycety. Většina kmenů, u kterých byly nalezeny homology genů *lmrB* a *lmrC*, pocházely právě z daných lokalit. Stejně tak i kmeny, které byly podle 16S rRNA stromu nejméně příbuzné se *S. lincolnensis*. Podobnost homologních genů ovšem nebyla natolik vysoká, aby se dalo usoudit o přítomnosti v jejich okolí genů příbuzných biosyntetickým *lmb* genům.

U části kmenů pozitivních na *lmr* homology byla zjištěna produkce antimikrobiálních látek. U některých kmenů žádná bioaktivita zaznamenaná nebyla, což ovšem nemusí svědčit o absenci biosyntetických shluků. V těchto případech je nutné vyzkoušet víc kultivačních přístupů.

Výsledky analýzy ukázaly, že lokality Merkenstein a Stamftal se jeví být slibným zdrojem nových produkčních kmenů. Tato metoda proto přináší hodnotné výsledky k posouzení taxonomické a produkční diverzity lokality, ale z hlediska vyhledávání konkrétních biosyntetických shluků je poněkud problematictější.

7. ZÁVĚRY

1. Mutační analýza genu *lmbN* prokázala jeho bifunkční povahu, jak i bylo předpokládáno na základě sekvenční analýzy. 5' koncová část genu kóduje potenciální podjednotku NDL-synthetasy s funkcí přenašeče aktivované aminokyseliny. Tato doména se ukázala být funkční i v nepřítomnosti zbytku proteinu, který se účastní biosyntézy cukerné složky linkomycinu.
2. U genu *lmbT* byla potvrzena role při biosyntéze cukerného prekurzoru MTL. Podobně byl i gen *lmbK* přirazen k biosyntetické větvi MTL, a to jako pravděpodobný regulátor zahájení biosyntézy této látky a současně snad i celé biosyntetické dráhy.
3. Inaktivační pokusy naznačily spřažení biosyntézy PPL s MTL. Jako možný regulátor synchronizace obou větví byl navržen produkt genu *lmbU*. Navíc přidání další kopie genu *lmbU* do produkčního kmene vedlo k zvýšení výtěžků linkomycinu.
4. Výsledky analýzy rovněž svědčí pro podpůrnou funkci dvojice vzájemně homologních genů *lmbIH* a *lmbQ* v kondenzační reakci.
5. V případě *lmbV* je určení funkce poněkud složitější. Z výsledků nelze rozhodnout mezi funkcí biosyntetickou nebo regulační, proti biosyntetické však hovoří nepodobnost s jakýmkoliv známým proteinem.
6. Deriváty linkomycinu s delším alkylovým řetízkem byly získány po obohacení média kmene mutantního v biosyntéze PPL o deriváty daného prekurzoru. Bioaktivita derivátů byla testována na souboru klinicky izolovaných kmenů stafylokoků s různými rezistenčními profily. Byla zjištěna lepší účinnost jednoho z derivátů ve srovnání s linkomycinem u kmenů s *lnuA* genem, který kóduje nukleotidyltransferasu.
7. Testováním sbírky půdních kmenů bylo vytipována přírodní lokalita s hojným výskytem kmenů producentů sekundárních metabolitů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahlert, J., Shepard, E., Lomovskaya, N., Zazopoulos, E., Staffa, A., Bachmann, B.O., Huang, K., Fonstein, L., Czisny, A., Whitwam, R.E., Farnet, C.M., and Thorson, J.S. (2002) The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* 297:1173-1176.

Ahonkhai, V.I., Cherubin, C.E., Shulman, M.A., Jhagroo, M., and Bancroft, U. (1982) In vitro activity of U-57930E, a new clindamycin analog, against aerobic gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 21:902-905.

Alain, K., and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13:583-594.

Allali, N., Afif, H., Couturier, M., and Van Melderen, L. (2002) The highly conserved TldD and TldE proteins of *Escherichia coli* are involved in microcin B17 processing and in CcdA degradation. *J Bacteriol* 184:3224-3231.

Aminov, R.I., and Mackie, R.I. (2007) Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 271:147-161.

Anderson, T.B., Brian, P., and Champness, W.C. (2001) Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 39:553-566.

Argoudelis A.D., C.J.H., Pykes T.R. (1972) Lincomycin production. US patent 3697380.

Argoudelis, A.D., Eble, T.E., and Mason, D.J. (1970) Studies on the biosynthesis of lincomycin. V. Effect of ethionine on fermentation of *S. lincolnensis*. *J Antibiot (Tokyo)* 23:1-8.

Baltz, R.H., Brian, P., Miao, V., and Wrigley, S.K. (2006) Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:66-74.

Bao, K., and Cohen, S.N. (2001) Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev* 15:1518-1527.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147.

Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58:1-26.

Bergy, M.E., Herr, R.R., and Joseph, M.D. (1963) Antibiotic lincolnensin and method of production, US3086912.

Bibb, M.J. (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8:208-215.

Bibikova, M.V., Singal, E.M., Ivanitskaia, L.P., and Zhdanovich Iu, V. (1989) [Production of lincomycin by *Micromonospora halophytica* culture]. *Antibiot Khimioter* 34:723-726.

- Bister, B., Bischoff, D., Strobele, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Bull, A.T., Zahner, H., Fiedler, H.P., and Sussmuth, R.D. (2004) Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucospora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:2574-2576.
- Bode, H.B. (2009) Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol* 13:224-230.
- Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R., and Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* 3:619-627.
- Borisova, S.A., Zhao, L., Sherman, D.H., and Liu, H.W. (1999) Biosynthesis of desosamine: construction of a new macrolide carrying a genetically designed sugar moiety. *Org Lett* 1:133-136.
- Borrmann, S., Lundgren, I., Oyakhrome, S., Impouma, B., Matsiegui, P.B., Adegnika, A.A., Issifou, S., Kun, J.F., Hutchinson, D., Wiesner, J., Jomaa, H., and Kreamsner, P.G. (2006) Fosmidomycin plus clindamycin for treatment of pediatric patients aged 1 to 14 years with *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2713-2718.
- Brahme, N.M., Gonzales, J.E., Rolls, J.R., Hessler, E.J., Mizesak, S., Hurley, L.H (1984a) Biosynthesis of the lincomycin, 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycin A and B. *J. Am. Chem. Soc.* 106:7873-7878.
- Brahme, N.M., Gonzales, J.E., Mizesak, S., Rolls, J.R., Hessler, E.J., Hurley, L.H (1984b) Biosynthesis of the lincomycins.2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J Am Chem Soc* 106.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., and Zotchev, S.B. (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* 9:2756-2764.
- Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J., and Imberty, A. (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16:29R-37R.
- Brisson-Noel, A., and Courvalin, P. (1986) Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* 43:247-253.
- Busti, E., Monciardini, P., Cavaletti, L., Bamonte, R., Lazzarini, A., Sosio, M., and Donadio, S. (2006) Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology* 152:675-683.
- Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* 14:313-319.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* 17:1714-1726.
- Cortes, J., Haydock, S.F., Roberts, G.A., Bevitt, D.J., and Leadlay, P.F. (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* 348:176-178.
- Čermák, L., Kopecký, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková, K., and Ságová - Marečková, M. (2008) Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Applied soil ecology* 40:348-358.

- Čermák, L., Novotná, J., Ságová-Marečková, M., Kopecký, J., Najmanová, L., and Janata, J. (2007) Hybridization analysis and mapping of the celesticetin gene cluster revealed genes shared with lincomycin biosynthesis. *Folia Microbiol (Praha)* 52:457-462.
- Dangel, V., Eustaquio, A.S., Gust, B., and Heide, L. (2008) novE and novG act as positive regulators of novobiocin biosynthesis. *Arch Microbiol* 190:509-519.
- D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374-377.
- Demain, A.L. (1998) Microbial natural products: alive and well in 1998. *Nat Biotechnol* 16:3-4.
- Demain, A.L. (2009) Antibiotics: Natural products essential to human health. *Med Res Rev*.
- Demain, A.L., and Elander, R.P. (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75:5-19.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., and Courvalin, P. (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 20:79-114.
- Donadio, S., Monciardini, P., and Sosio, M. (2009) Chapter 1. Approaches to discovering novel antibacterial and antifungal agents. *Methods Enzymol* 458:3-28.
- Donadio, S., Sosio, M., and Lancini, G. (2002) Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:377-380.
- Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J., and Katz, L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252:675-679.
- Efron, B., Halloran, E., and Holmes, S. (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7085-7090.
- Eustaquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Li, S.M., Chater, K.F., and Heide, L. (2005a) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol* 71:2452-2459.
- Eustaquio, A.S., Gust, B., Li, S.M., Pelzer, S., Wohlleben, W., Chater, K.F., and Heide, L. (2004) Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered *streptomyces coelicolor* strains. *Chem Biol* 11:1561-1572.
- Eustaquio, A.S., Li, S.M., and Heide, L. (2005b) NovG, a DNA-binding protein acting as a positive regulator of novobiocin biosynthesis. *Microbiology* 151:1949-1961.
- Eustaquio, A.S., Luft, T., Wang, Z.X., Gust, B., Chater, K.F., Li, S.M., and Heide, L. (2003) Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene novE and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch Microbiol* 180:25-32.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:355-357.
- Fenical, W., and Jensen, P.R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2:666-673.
- Fernandez-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1991) The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66:769-780.

- Flardh, K., and Buttner, M.J. (2009) Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 7:36-49.
- Flatman, R.H., Howells, A.J., Heide, L., Fiedler, H.P., and Maxwell, A. (2005) Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1093-1100.
- Floriano, B., and Bibb, M. (1996) afsR is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 21:385-396.
- Floss, H.G. (2006) Combinatorial biosynthesis--potential and problems. *J Biotechnol* 124:242-257.
- Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* 400:897-899.
- Garneau, S., Dorrestein, P.C., Kelleher, N.L., and Walsh, C.T. (2005) Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis. *Biochemistry* 44:2770-2780.
- Gathogo, E.W., Waugh, A.C., Peric, N., Redpath, M.B., and Long, P.F. (2003) Colony PCR amplification of actinomycete DNA. *J Antibiot (Tokyo)* 56:423-424.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A., and Walsh, C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* 36:8495-8503.
- Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., and Davies, J. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17025-17030.
- Gomez-Escribano, J.P., Martin, J.F., Hesketh, A., Bibb, M.J., and Liras, P. (2008) *Streptomyces clavuligerus* relA-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology* 154:744-755.
- Gramajo, H.C., Takano, E., and Bibb, M.J. (1993) Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol* 7:837-845.
- Gupta, S., Lakshmanan, V., Kim, B.S., Fecik, R., and Reynolds, K.A. (2008) Generation of novel pikromycin antibiotic products through mutasynthesis. *Chembiochem* 9:1609-1616.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1541-1546.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L., and Sessitsch, A. (2004) Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol* 70:5057-5065.
- Haydon, D.J., Stokes, N.R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J.M., Brown, D.R., Baker, P.J., Barynin, V.V., Rice, D.W., Sedelnikova, S.E., Heal, J.R., Sheridan, J.M., Aiwale, S.T., Chauhan, P.K., Srivastava, A., Taneja, A., Collins, I., Errington, J., and Czaplewski, L.G. (2008) An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science* 321:1673-1675.
- Heide, L. (2009) Aminocoumarins mutasynthesis, chemoenzymatic synthesis, and metabolic engineering. *Methods Enzymol* 459:437-455.

- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., and Bechthold, A. (2007) Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* 24:162-190.
- Hesketh, A., Chen, W.J., Ryding, J., Chang, S., and Bibb, M. (2007) The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol* 8:R161.
- Hoeksema, H. (1968) Celesticetin. V. The structure of celesticetin. *J Am Chem Soc* 90:755-757.
- Holá, K., Janata, J., Kopecký, J., and Spížek, J. (2003) LmbJ and LmbIH protein levels correlate with lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*. *Lett Appl Microbiol* 37:470-474.
- Hong, H.J., Hutchings, M.I., and Buttner, M.J. (2008) Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv Exp Med Biol* 631:200-213.
- Hopwood, D.A. (1981) The genetic programming of industrial microorganisms. *Sci Am* 245:90-102.
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A., Floss, H.G., and Omura, S. (1985) Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature* 314:642-644.
- Hopwood, D.A., and Wright, H.M. (1973) A plasmid of *Streptomyces coelicolor* carrying a chromosomal locus and its inter-specific transfer. *J Gen Microbiol* 79:331-342.
- Horinouchi, S. (2002) A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci* 7:d2045-2057.
- Horinouchi, S. (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus streptomyces. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:283-299.
- Horinouchi, S., and Beppu, T. (1992) Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 46:377-398.
- Horinouchi, S., and Weisblum, B. (1980) Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7079-7083.
- Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C.M., Zazopoulos, E., and Bachmann, B.O. (2007) Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem Biol* 14:691-701.
- Hurley, L.H., Rokem, J.S., and Petrusek, R.L. (1980) Proposed structures of the pyrrolo(1,4)benzodiazepine antibiotic-deoxyribonucleic acid adducts. *Biochem Pharmacol* 29:1307-1310.
- Chakraborty, R., and Bibb, M. (1997) The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* 179:5854-5861.
- Chambers, H.F. (1999) Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* 179 Suppl 2:S353-359.
- Chang, H.M., Chen, M.Y., Shieh, Y.T., Bibb, M.J., and Chen, C.W. (1996) The cutRS signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol* 21:1075-1085.

- Charan, R.D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., and Carter, G.T. (2004) Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod* 67:1431-1433.
- Chater, K.F. (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* 4:667-673.
- Chater, K.F. (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:761-768.
- Chen, C.W., Huang, C.H., Lee, H.H., Tsai, H.H., and Kirby, R. (2002) Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet* 18:522-529.
- Chung, S.T., Manis, J.J., McWethy, J., Patt, T.E., Witz, D.F., Wolf, H.J., Wovcha, M.G. (1997) Fermentation, biosynthesis and molecular genetics of linkomycin, *Biotechnology of industrial antibiotic*. Strohl W.R. (ed.) New York:165-186.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526-531.
- Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Beppu, T. (1992) A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* 174:7585-7594.
- Jakimowicz, D., Mouz, S., Zakrzewska-Czerwinska, J., and Chater, K.F. (2006) Developmental control of a parAB promoter leads to formation of sporulation-associated ParB complexes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 188:1710-1720.
- Jakimowicz, D., Zydek, P., Kois, A., Zakrzewska-Czerwinska, J., and Chater, K.F. (2007) Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces hyphae*. *Mol Microbiol* 65:625-641.
- Janata, J., Najmanova, L., Novotna, J., Hola, K., Felsberg, J., and Spizek, J. (2001) Putative lmbI and lmbH genes form a single lmbIH ORF in *Streptomyces lincolnensis* type strain ATCC 25466. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79:277-284.
- Jelínková, M., Koběrská, M., Čermák, L., Kopecký, J., Janata, J., and Spížek, J. (2004) Shared features and analysis of lincosamide and anthramycin antibiotic gene clusters. Kongres Československé společnosti mikrobiologické /23./, Brno, Česká republika
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., and Fenical, W. (2005) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:43-48.
- Kadlčík, S., Kopecký, J., and Janata, J. (2007) Activation and transfer of the amino-acid precursor 4-propyl proline in lincomycin biosynthesis 14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes.
- Kadlec, J. (2000) Závěrečný krok biosyntézy linkomycinu. *Universita Karlova, Praha*.
- Kamenik, Z., Kopecky, J., Mareckova, M., Ulanova, D., Novotna, J., Pospisil, S., and Olsovska, J. (2009) HPLC-fluorescence detection method for determination of key intermediates of the lincomycin biosynthesis in fermentation broth. *Anal Bioanal Chem* 393:1779-1787.
- Katz, M.L., Mueller, L.V., Polyakov, M., and Weinstock, S.F. (2006) Where have all the antibiotic patents gone? *Nat Biotechnol* 24:1529-1531.

- Keijser, B.J.F., van Wezel, G.P., Canters, G.W., and Vijgenboom, E. (2002) Developmental Regulation of the *Streptomyces lividans* ram Genes: Involvement of RamR in Regulation of the ramCSAB Operon. *J. Bacteriol.* 184:4420-4429.
- Kennedy, J. (2008) Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Nat Prod Rep* 25:25-34.
- Khokhlov, A.S., Tovarova, II, Borisova, L.N., Pliner, S.A., Shevchenko, L.N., Kornitskaia, E., Ivkina, N.S., and Rapoport, I.A. (1967) [The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 177:232-235.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. AND Hopwood, D.A., (2000) *Practical Streptomyces genetics*. Norwich, UK, John Innes Foundation.
- Kim, C.G., Lamichhane, J., Song, K.I., Nguyen, V.D., Kim, D.H., Jeong, T.S., Kang, S.H., Kim, K.W., Maharjan, J., Hong, Y.S., Kang, J.S., Yoo, J.C., Lee, J.J., Oh, T.J., Liou, K., and Sohng, J.K. (2008) Biosynthesis of rubradirin as an ansamycin antibiotic from *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Arch Microbiol* 189:463-473.
- Kinashi, H., Mori, E., Hatani, A., and Nimi, O. (1994) Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. *J Antibiot (Tokyo)* 47:1447-1455.
- Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T., and Yamada, Y. (1997) Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* 179:6986-6993.
- Kirby, R., and Hopwood, D.A. (1977) Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* 98:239-252.
- Kneidinger, B., Graninger, M., Puchberger, M., Kosma, P., and Messner, P. (2001) Biosynthesis of nucleotide-activated D-glycero-D-manno-heptose. *J Biol Chem* 276:20935-20944.
- Koběorská, M., Kopecký, J., Jelínková, M., Čermák, L., and Janata, J. (2005) Comparison of biosynthetic gene clusters of lincomycin and celesticetin. 12th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, Denmark.
- Koběorská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelínková, M., Ulanova, D., Man, P., Flieger, M., and Janata, J. (2008) Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol (Praha)* 53:395-401.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., and Willey, J.M. (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11448-11453.
- Koehn, F.E. (2008) High impact technologies for natural products screening. *Prog Drug Res* 65:175, 177-210.
- Kremsner, P.G., and Krishna, S. (2004) Antimalarial combinations. *Lancet* 364:285-294.
- Kuo, M.S., Yurek, D.A., Coats, J.H., Chung, S.T., and Li, G.P. (1992) Isolation and identification of 3-propylidene-delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J Antibiot (Tokyo)* 45:1773-1777.
- Kuznetsov, V.D., Bushueva, O.A., and Bryzgalova, L.S. (1974) [The variability of *Actinomyces roseolus*--a producer of lincomycin]. *Antibiotiki* 19:311-315.

- Lam, K.S. (2006) Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol* 9:245-251.
- Lau, J., Cane, D.E., and Khosla, C. (2000) Substrate specificity of the loading didomain of the erythromycin polyketide synthase. *Biochemistry* 39:10514-10520.
- Lawlor, E.J., Baylis, H.A., and Chater, K.F. (1987) Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev* 1:1305-1310.
- Lee, P.C., Umeyama, T., and Horinouchi, S. (2002) *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 43:1413-1430.
- Leskiw, B.K., Mah, R., Lawlor, E.J., and Chater, K.F. (1993) Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 175:1995-2005.
- Li, W., Chou, S., Khullar, A., and Gerratana, B. (2009) Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microbiol* 75:2958-2963.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., and Gerratana, B. (2009) Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl Environ Microbiol* 75:2869-2878.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993) The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* 10:923-933.
- Liu, G., Tian, Y., Yang, H., and Tan, H. (2005) A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Mol Microbiol* 55:1855-1866.
- Madduri, K., Kennedy, J., Rivola, G., Inventi-Solari, A., Filippini, S., Zanuso, G., Colombo, A.L., Gewain, K.M., Occi, J.L., MacNeil, D.J., and Hutchinson, C.R. (1998) Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat Biotechnol* 16:69-74.
- Magerlein, B.J. (1971) Modification of lincomycin. *Adv Appl Microbiol* 14:185-229.
- Magerlein, B.J., Birkenmeyer, R.D., Herr, R.R., and Kagan, F. (1967) Lincomycin. V. Amino acid fragment. *J Am Chem Soc* 89:2459-2464.
- Magerlein, B.J., and Kagan, F. (1969) Lincomycin. 8. 4'-Alkyl-1'-demethyl-4'-depropylclindamycins, potent antibacterial and antimalarial agents. *J Med Chem* 12:780-784.
- Martin, J.F. (2004) Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* 186:5197-5201.
- Martin, M.F., and Liras, P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 43:173-206.
- Martinez, J.L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276:2521-2530.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* 146:47-56.

- Maxwell, A., and Lawson, D.M. (2003) The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr Top Med Chem* 3:283-303.
- Miadow, S. (1997) *Atlas of Actinomycetes*. Society for Actinomycetes, Japan.
- Muller, P., Ahrens, K., Keller, T., and Klaucke, A. (1995) A TnpHoA insertion within the *Bradyrhizobium japonicum* sipS gene, homologous to prokaryotic signal peptidases, results in extensive changes in the expression of PBM-specific nodulins of infected soybean (*Glycine max*) cells. *Mol Microbiol* 18:831-840.
- Murayama, N., Shimizu, H., Takiguchi, S., Baba, Y., Amino, H., Horiuchi, T., Sekimizu, K., and Miki, T. (1996) Evidence for involvement of *Escherichia coli* genes pmbA, csrA and a previously unrecognized gene tldD, in the control of DNA gyrase by letD (ccdB) of sex factor F. *J Mol Biol* 256:483-502.
- Narva, K.E., and Feitelson, J.S. (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 172:326-333.
- Nedal, A., and Zotchev, S.B. (2004) Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:7-15.
- Neusser, D., Schmidt, H., Spizek, J., Novotna, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichy, P., and Piepersberg, W. (1998) The genes lmbB1 and lmbB2 of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch Microbiol* 169:322-332.
- Nguyen, K.T., Ritz, D., Gu, J.Q., Alexander, D., Chu, M., Miao, V., Brian, P., and Baltz, R.H. (2006) Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17462-17467.
- Nguyen, K.T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L.T., Nguyen, L.D., and Thompson, C.J. (2003) Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the adpA gene. *J Bacteriol* 185:7291-7296.
- Novotna, G. (2007) Rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům u koaguláza negativních stafylokoků v CR. *Universita Karlova, Praha*.
- Novotna, G., Adamkova, V., Janata, J., Melter, O., and Spizek, J. (2005) Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3586-3589.
- Novotna, G., and Janata, J. (2006) A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, Vga(A)LC, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4070-4076.
- Novotna, G., Spizek, J., and Janata, J. (2007) In vitro activity of telithromycin and quinupristin/dalfopristin against methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci with defined resistance genotypes. *Folia Microbiol (Praha)* 52:593-599.
- Novotná, J. (2008) Studium biosyntetické dráhy antibiotika linkomycinu. Přírodovědecká fakulta, *Universita Karlova* Dizertační práce.
- Novotna, J., Honzatko, A., Bednar, P., Kopecky, J., Janata, J., and Spizek, J. (2004) 1-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur J Biochem* 271:3678-3683.

- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., and Horinouchi, S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 190:4050-4060.
- Okoro, C.K., Brown, R., Jones, A.L., Andrews, B.A., Asenjo, J.A., Goodfellow, M., and Bull, A.T. (2009) Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:121-133.
- Olano, C., Lombo, F., Mendez, C., and Salas, J.A. (2008) Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng* 10:281-292.
- Olšovská, J., Jelínková, M., Man, P., Koběřská, M., Janata, J., and Flieger, M. (2007) High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr A* 1139:214-220.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z., and Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 16:1137-1156.
- Pettit, R.K. (2009) Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:19-25.
- Pojer, F., Li, S.M., and Heide, L. (2002) Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* 148:3901-3911.
- Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li de, R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R., and Sperandio, V. (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 321:1078-1080.
- Reeves, C.D., and Rodriguez, E. (2009) Genetic engineering to produce polyketide analogues. *Methods Enzymol* 459:295-318.
- Reeves, C.D., Ward, S.L., Revill, W.P., Suzuki, H., Marcus, M., Petrakovsky, O.V., Marquez, S., Fu, H., Dong, S.D., and Katz, L. (2004) Production of hybrid 16-membered macrolides by expressing combinations of polyketide synthase genes in engineered *Streptomyces fradiae* hosts. *Chem Biol* 11:1465-1472.
- Retzlaff, L., and Distler, J. (1995) The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol Microbiol* 18:151-162.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38:525-552.
- Richter, M., Willey, J.M., Sussmuth, R., Jung, G., and Fiedler, H.-P. (1998) Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tüml; 901/8c. *FEMS Microbiology Letters* 163:165-171.
- Rodriguez-Sainz, M.C., Hernandez-Chico, C., and Moreno, F. (1990) Molecular characterization of pmbA, an *Escherichia coli* chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. *Mol Microbiol* 4:1921-1932.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., and Wootton, J.C. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 4:1207-1214.

- Roy, R.N., and Sen, S.K. (2002) Survey of antimicrobial streptomycetes from soils of West Bengal: characterization and identification of potent broad spectrum antibiotic producing *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Hindustan Antibiot Bull* 44:25-33.
- Ruengjitchawalya, M., Nihira, T., and Yamada, Y. (1995) Purification and characterization of the IM-2-binding protein from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J Bacteriol* 177:551-557.
- Ryding, N.J., Anderson, T.B., and Champness, W.C. (2002) Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* 184:794-805.
- Ságová-Marečková, M., Čermák, L., Novotná, J., Plhačková, K., Forstová, J., and Kopecký, J. (2008) Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol* 74:2902-2907.
- Sakai, M., Matsuka, A., Komura, T., and Kanazawa, S. (2004) Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *J Microbiol Methods* 59:81-89.
- Salas, J.A., and Mendez, C. (2007) Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes. *Trends Microbiol* 15:219-232.
- Santos-Beneit, F., Rodriguez-Garcia, A., Sola-Landa, A., and Martin, J.F. (2009) Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol* 72:53-68.
- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., and Jiang, W. (2009) *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:1149-1160.
- Schmitz, F.J., Petridou, J., Astfalk, N., Kohrer, K., Scheuring, S., and Schwarz, S. (2002) Molecular analysis of constitutively expressed *erm(C)* genes selected in vitro by incubation in the presence of the noninducers quinupristin, telithromycin, or ABT-773. *Microb Drug Resist* 8:171-177.
- Schroeder, W., Bannister, B., and Hoeksema, H. (1967) Lincomycin. 3. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *J Am Chem Soc* 89:2448-2453.
- Slattery, M., Rajbhandari, I., and Wesson, K. (2001) Competition-Mediated Antibiotic Induction in the Marine Bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microb Ecol* 41:90-96.
- Sleator, R.D., Shortall, C., and Hill, C. (2008) Metagenomics. *Lett Appl Microbiol* 47:361-366.
- Smutná, Y. (2007) Analýza genu *lmbX* zahrnutého v biosyntéze propylprolinu. Přírodovědecká fakulta, katedra organické chemie. Universita Karlova, Praha.
- Sola-Landa, A., Moura, R.S., and Martin, J.F. (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6133-6138.
- Sola-Landa, A., Rodriguez-Garcia, A., Franco-Dominguez, E., and Martin, J.F. (2005) Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* 56:1373-1385.
- Solenberg, P.J., Matsushima, P., Stack, D.R., Wilkie, S.C., Thompson, R.C., and Baltz, R.H. (1997) Production of hybrid glycopeptide antibiotics in vitro and in *Streptomyces toyocaensis*. *Chem Biol* 4:195-202.

- Spizek, J., and Rezanka, T. (2004a) Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:455-464.
- Spizek, J., and Rezanka, T. (2004b) Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:510-519.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 6:493-505.
- Steffensky, M., Muhlenweg, A., Wang, Z.X., Li, S.M., and Heide, L. (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1214-1222.
- Stratigopoulos, G., Bate, N., and Cundliffe, E. (2004) Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TylR. *Mol Microbiol* 54:1326-1334.
- Süsstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 30:33-46.
- Suwa, M., Sugino, H., Sasaoka, A., Mori, E., Fujii, S., Shinkawa, H., Nimi, O., and Kinashi, H. (2000) Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. *Gene* 246:123-131.
- Takano, E. (2006) Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* 9:287-294.
- Takano, E., Gramajo, H.C., Strauch, E., Andres, N., White, J., and Bibb, M.J. (1992) Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 6:2797-2804.
- Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J.J., Gershater, C.J., Yamada, Y., and Bibb, M. (2000) Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem* 275:11010-11016.
- Tang, L., and McDaniel, R. (2001) Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity. *Chem Biol* 8:547-555.
- Tenson, T., Lovmar, M., and Ehrenberg, M. (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* 330:1005-1014.
- Thakker-Varia, S., Ranzini, A.C., and Dubin, D.T. (1985) Ribosomal RNA methylation in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: effect of the "MLS" (erythromycin resistance) methylase. *Plasmid* 14:152-161.
- Tillotson, R.D., Wosten, H.A., Richter, M., and Willey, J.M. (1998) A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol Microbiol* 30:595-602.
- Tomono, A., Tsai, Y., Yamazaki, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2005) Transcriptional control by A-factor of strR, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 187:5595-5604.
- Tsui, W.H., Yim, G., Wang, H.H., McClure, J.E., Surette, M.G., and Davies, J. (2004) Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem Biol* 11:1307-1316.

- Umeyama, T., and Horinouchi, S. (2001) Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J Bacteriol* 183:5506-5512.
- Umeyama, T., Lee, P.C., and Horinouchi, S. (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:419-425.
- Umeyama, T., Lee, P.C., Ueda, K., and Horinouchi, S. (1999) An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145 (Pt 9):2281-2292.
- Urbášková, P. (1998) Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Trios, Prague. .
- Van Lanen, S.G., and Shen, B. (2006) Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr Opin Microbiol* 9:252-260.
- van Wezel, G.P., McKenzie, N.L., and Nodwell, J.R. (2009) Chapter 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. *Methods Enzymol* 458:117-141.
- Visser, J. (July 1972) Preparation of lincomycin analogues. U.S. .
- Vogtli, M., Chang, P.C., and Cohen, S.N. (1994) afsR2: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* 14:643-653.
- Volff, J.N., and Altenbuchner, J. (2000) A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* 186:143-150.
- Waksman, S.A., Reilly, H.C., and Johnstone, D.B. (1946) Isolation of Streptomycin-producing Strains of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 52:393-397.
- Walsh, C. (2003) Antibiotics: Actions, origins, resistance. Washington, DC: ASM Press.
- Walsh, C.T. (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem* 3:125-134.
- Wang, J., Soisson, S.M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y.S., Cummings, R., Ha, S., Dorso, K., Motyl, M., Jayasuriya, H., Ondeyka, J., Herath, K., Zhang, C., Hernandez, L., Allocco, J., Basilio, A., Tormo, J.R., Genilloud, O., Vicente, F., Pelaez, F., Colwell, L., Lee, S.H., Michael, B., Felcetto, T., Gill, C., Silver, L.L., Hermes, J.D., Bartizal, K., Barrett, J., Schmatz, D., Becker, J.W., Cully, D., and Singh, S.B. (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441:358-361.
- Wang, L., Yu, Y., He, X., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K.F., and Tao, M. (2007) Role of an FtsK-like protein in genetic stability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 189:2310-2318.
- Wang, Z.X., Li, S.M., and Heide, L. (2000) Identification of the coumermycin A(1) biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3040-3048.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., and Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176:386-390.
- Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G.J., and Kukor, J.J. (2005) Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl Environ Microbiol* 71:2232-2238.
- Weisblum, B. (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39:797-805.

- Weissman, K.J. (2009) Introduction to polyketide biosynthesis. *Methods Enzymol* 459:3-16.
- Weissman, K.J., and Leadlay, P.F. (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol* 3:925-936.
- Weist, S., Kittel, C., Bischoff, D., Bister, B., Pfeifer, V., Nicholson, G.J., Wohlleben, W., and Sussmuth, R.D. (2004) Mutasynthesis of glycopeptide antibiotics: variations of vancomycin's AB-ring amino acid 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Am Chem Soc* 126:5942-5943.
- Weist, S., and Sussmuth, R.D. (2005) Mutational biosynthesis--a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:141-150.
- Wenzel, S.C., and Muller, R. (2005) Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 16:594-606.
- Wiener, P. (1996) Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evolutionary Ecology* 10:405-421.
- Wietzorrek, A., and Bibb, M. (1997) A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25:1181-1184.
- Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M., and Losick, R. (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* 65:641-650.
- Willey, J., Schwedock, J., and Losick, R. (1993) Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* 7:895-903.
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., and Rahman, S.K. (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* 52:1189-1208.
- Wosten, H.A., Richter, M., and Willey, J.M. (1999) Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol* 27:153-160.
- Zazopoulos, E., Huang, K., Staffa, A., Liu, W., Bachmann, B.O., Nonaka, K., Ahlert, J., Thorson, J.S., Shen, B., and Farnet, C.M. (2003) A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol* 21:187-190.
- Zengler, K., Walcher, M., Clark, G., Haller, I., Toledo, G., Holland, T., Mathur, E.J., Woodnutt, G., Short, J.M., and Keller, M. (2005) High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. *Methods Enzymol* 397:124-130.
- Zerikly, M., and Challis, G.L. (2009) Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem* 10:625-633.
- Zhang, C.C. (1996) Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* 20:9-15.
- Zhang, H.Z., Schmidt, H., and Piepersberg, W. (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 6:2147-2157.

9. PŘÍLOHA

Příprava derivátů prolinu (GAŽÁK, osobní sdělení).

Preparation of (2*S*,4*R*)-4-alkyl prolines

Chemistry

The synthesis of optically pure (2*S*,4*R*)-4-alkyl prolines **9** started from protected intermediate **2**, which was prepared from commercially available L-pyrroglutamic acid (**1**) by benzylation of its carboxylic group [1] followed by Boc-group introduction into amidic nitrogen using Boc₂O with DMAP as a catalyst (Scheme 1) [2]. Protecting group manipulation of **2** leading to pyrroglutamate **3** and subsequent aldol condensation of **3** with corresponding aldehydes [3] resulted to diastereomeric mixtures of the alcohols **4** (Scheme 1). Their dehydration gave predominately the *E* isomers of the 4-alkylidenepyroglutamates **5** [3]. The mixture of both *E* and *Z* 4-alkylidenepyroglutamates **5** was hydrogenated using Pd on carbon as a catalyst, affording exclusively the *cis* 4-substituted pyrroglutamate **6**. The inversion of the configuration at C-4 of **6** was achieved by the procedure developed recently using DBU in CH₂Cl₂ [4], which gave the key intermediate of the target compound – the *trans* 4-substituted pyrroglutamate **7**. The chemoselective two-steps reduction of **7** [5] and subsequent acidic hydrolysis led to hydrochloride of **9**, which afforded after neutralization with methanolic NH₃ the final **9a** and **9b**, respectively.

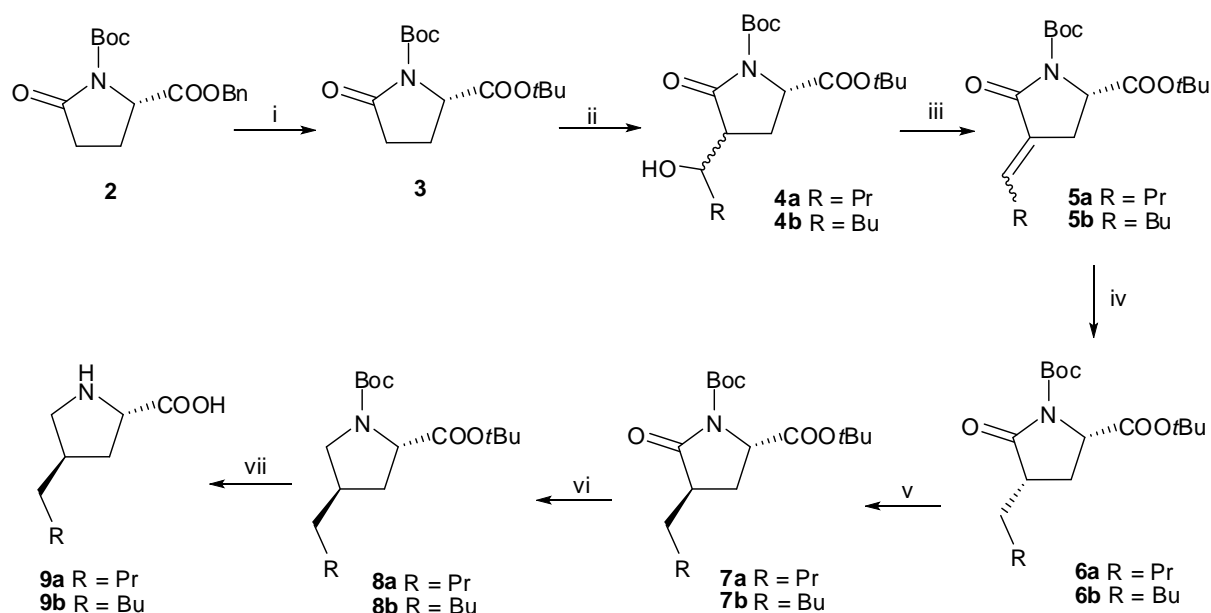


FIG. S1. Reagents and conditions. (i) a) H₂, Pd/C, EtOAc, 12 h, r.t.; b) *tert*-BuOH, DCC/DMAP, CH₂Cl₂, 12 h, r.t.; (ii) a) LiHMDS, THF, -78 °C, 1 h; b) RCHO (1.2 equiv.), BF₃·Et₂O, -78 °C, 75 min.; (iii) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0.5 h at 0 °C, then 2 days at r.t.; (iv) H₂, Pd/C, EtOAc, 48 h, r.t.; (v)

DBU, CH₂Cl₂, 2 days, r.t.; (vi) a) LiEt₃BH, THF, -78 °C, 0.5 h; b) H₂O₂, NaHCO₃, 0 °C, 20 min.; c) Et₃SiH, BF₃·Et₂O, CH₂Cl₂, -78 °C, 2 h; (vii) a) HCl, 80 °C, 2 h; b) NH₃, MeOH, 10 min.

Experimental

1. General methods

NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 (300.07 MHz for ¹H, 75.46 MHz for ¹³C, DMSO, room temp.). Chemical shifts were referenced to the residual solvent signal (δ_H 2.50, δ_C 39.60). Digital resolution used justified reporting the proton and carbon chemical shifts to three and two decimal places, respectively. 2D NMR experiments (gCOSY, ROESY, HOM2DJ, gHSQC; APT, gCOSY, ROESY, gHSQC.) were performed using standard manufacturer's software.

2. Chemicals

Solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Compounds **2** and **3** were prepared as reported previously [2, 6].

tert-Butyl (2S)-1-(tert-Butoxycarbonyl)-4-butylidenepyroglutamate (5a). To a solution of *tert*-butyl *N*-BOC-pyroglutamate (**3**) (6 g, 21.023 mmol) in THF (50 mL) stirred at -78 °C was added a 1 M solution of lithium hexamethyldisilazide in THF (25 mL, 25 mmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at -78 °C prior to the addition of a solution of the butyraldehyde (2.16 mL, 24.059 mmol) and Et₂O BF₃ (3 mL, 24.068 mmol) in THF (20 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at -78 °C, quenched with saturated NH₄Cl solution (150 mL), and extracted with ethyl ether (3 × 75 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness. The crude mixture of aldols **4a** was used without further purification in next reaction step.

The aldol mixture **4a** was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL) and treated with methanesulfonyl chloride (2.68 mL, 34.4 mmol) and triethylamine (36 mL, 344 mmol). The resulting solution was stirred for 2 days at room temperature, then it was evaporated to dryness, re-dissolved in hexane/ethyl acetate mixture (100 mL, 1:1, v/v) and the precipitate formed was filtered off. The filtrate was evaporated and the reaction mixture was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) affording alkylidenepyroglutamate **5a** (2.28 g, 32 %) as a slightly yellow oil.

tert-Butyl (2S,4S)-1-(tert-butoxycarbonyl)-4-butyl-pyroglutamate (6a). To a solution of alkene **5a** (3.8 g, 11.196 mmol) in 40 mL of ethyl acetate was added Pd/C (800 mg, 1.222 mmol, 10 % w/w). The reaction was allowed to proceed under hydrogen atmosphere at room temperature for 12 h. Filtration of the catalyst through Celite gave compound **6a** which was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 3:1) affording 3.28 g (86 %) of pure **6a** as a colorless oil.

tert-Butyl (2S,4R)-1-(tert-butoxycarbonyl)-4-butyl-pyrroglutamate (7a). The solution of pyrroglutamate **6a** (3.28 g, 9.607 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) was cooled to 0 °C, DBU (5.13 mL, 34.319 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 1 h at 0 °C and then for 48 h at room temperature. Reaction mixture was then washed with 0.1 M solution of HCl (2 × 50 mL), then with saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) and finally with water (50 mL). Organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, evaporated and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 5:1) yielding **7a** (1.67 g, 51 %) as a colorless oil.

(2S,4R)-4-Butyl proline (9a). 1.0 M solution of lithium triethylborohydride in THF (2.22 mL, 2.22 mmol) was added to a solution of **7a** (1.67 g, 4.892 mmol) in THF (8 mL) at -78 °C under argon atmosphere. After 30 min the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (2.5 mL) and warmed to 0 °C. H₂O₂ (7 drops, 30 % w/w) was added, and the mixture was stirred at 0 °C. After 20 min the organic solvent was removed *in vacuo*, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The crude reaction mixture was used without further purification and dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). After the addition of triethylsilane (0.29 mL, 1.864 mmol) the mixture was cooled to -78 °C. Boron trifluoride etherate (0.248 mL, 2.039 mmol) was added, dropwise under argon atmosphere. After 30 min triethylsilane (0.29 mL) and boron trifluoride etherate (0.248 mL) were added, allowing the reaction to reach room temperature. After being stirred for 30 min at room temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (5 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), and dried over Na₂SO₄. Evaporation of the solvent and purification by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 4:1) yielded proline *tert*-butyl ester which was hydrolyzed for 2 h at 85 °C with 6 N HCl solution (20 mL). The resulting solution was evaporated to dryness, and the oily residue was crystallized from CH₂Cl₂/diethyl ether affording pure **9a** (580 mg, 57 %) as a white hydrochloride salt. Hydrochloride **9a** (580 mg, 2.792 mmol) was dissolved in MeOH (5 mL), treated with NH₃ (2 mL, 2 M solution in MeOH) and stirred for 10 min. The solvents were removed under reduced pressure and the evaporated residue was purified by chromatography on Avicel[®] PH-101 (CH₃CN/H₂O/NH₄OH 100:15:1). Fractions containing pure **9a** were collected, evaporated, and the oily residue was precipitated by the addition of diethyl ether to give **9a** (452 mg, 95 %) as a white amorphous solid.

9a (as a hydrochloride salt): ¹H NMR (DMSO, 25 °C): 0.850 (3 H, t, *J* = 6.6 Hz, 3 × H-5'), 1.195 – 1.300 (6 H, m, 2 × H-2', 2 × H-3', 2 × H-4'), 1.358 (2 H, m, 2 × H-1'), 1.879 (1 H, m, H-3u), 2.153 (1 H, m, H-4), 2.164 (1 H, m, H-3d), 2.740 (1 H, dd, *J* = 11.0, 8.0 Hz, H-5u), 3.374 (1 H, dd, *J* = 11.0, 7.2 Hz, H-5d), 4.319 (1 H, dd, *J* = 9.5, 4.8 Hz, H-2), 8.783 (1 H, s, N⁺-H), 10.473 (1 H, s, N⁺-H). ¹³C NMR (DMSO, 25 °C): 13.98 (C-5'), 22.04 (C-3'), 27.17 (C-4'), 31.30 (C-2'), 31.95 (C-1'), 33.79 (C-3), 36.56 (C-4), 49.92 (C-5), 58.24 (C-2), 170.61 (C=O).

d = downfield, u = upfield

(2S,4R)-4-Pentyl proline (9b). This compound was prepared analogously as described for **9a** with similar yields of intermediates **5b**, **6b** and **7b**.

9b (as a hydrochloride salt): ^1H NMR (DMSO, 25 °C): 0.851 (3 H, t, $J = 6.6$ Hz, 3 \times H-5'), 1.160 – 1.300 (4 H, m, 2 \times H-2', 2 \times H-3'), 1.366 (2 H, m, 2 \times H-1'), 1.864 (1 H, m, H-3u), 2.050 (1 H, m, H-4), 2.167 (1 H, m, H-3d), 2.735 (1 H, dd, $J = 10.5, 7.6$ Hz, H-5u), 3.374 (1 H, dd, $J = 10.5, 7.3$ Hz, H-5d), 4.284 (1 H, dd, $J = 9.5, 4.3$ Hz, H-2), 8.900 (1 H, s, N⁺-H), 10.380 (1 H, s, N⁺-H). ^{13}C NMR (DMSO, 25 °C): 13.91 (C-4'), 22.17 (C-3'), 29.70 (C-2'), 31.64 (C-1'), 33.92 (C-3), 36.54 (C-4), 49.88 (C-5), 58.37 (C-2), 170.68 (C=O).

References:

1. Gosselin, F.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.*; 65; 7; 2000; 2163 – 2171.
2. Gloanec, P.; Herve, Y.; Bremand, N.; Lecouve, J.-P.; Breard, F.; Nanteuil, G. *Tetrahedron Lett.*; 43; 19; 2002; 3499 – 3502.
3. Ezquerra, J.; Pedregal, C.; Rubio, A.; Yruretagoyena, B.; Carreño, M. C.; Escribano, A.; Ruano, J. L. G. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 2925.
4. Tarver J. E., Terranova K. M., Joullie M. M. Hetero-Diels–Alder and pyroglutamate approaches to (2S,4R)-2-methylamino-5-hydroxy-4-methylpentanoic acid. *Tetrahedron* 60 (2004) 10277–10284.
5. Pedregal, C.; Ezquerra, J.; Escribano, A.; Carreño, M. C.; Garcia Ruano, J. L. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2053.
6. Baldwin, J. E.; Miranda, T.; Moloney, M.; Hokelek, T. *Tetrahedron*; 45; 23; 1989; 7459 – 7468.