

# Analýza genů biosyntetického shluku linkomycinu využitelných pro přípravu hybridních látek

Oponentský posudek  
na dizertační práci Mgr. Dany Ulanové

V současnosti představují infekční onemocnění příčinu poloviny všech úmrtí v rozvojových zemích, zatímco ve zbytku světa je vážným problémem rychle vzrůstající výskyt patogenů odolných k antibiotikům. Společným řešením obou problémů je výroba antibiotik nových struktur; ekonomicky přijatelná, ale zejména dostatečně rychlá, aby udržela krok s explozivní dynamikou produkce nových typů a kombinací rezistence. Asi nejspolehlivější cestou vedoucí k tomuto cíli je dokonalá znalost genetického zázemí biosyntetických drah přirozených antibiotik a následná cílená modifikace jeho molekuly/struktury antibiotika výběrem vhodných genů a/nebo prekurzorů z různých produkčních kmenů.

Právě tímto směrem se vydala Mgr. D. Ulanová ve své dizertaci, podporovaná zázemím své školící laboratoře. Laboratoře, která se soustavným studiem fyziologie a genetiky streptomycet postupně vypracovala k vysokému metodickému a invenčnímu standardu v oblasti výzkumu sekundárního metabolismu, konkrétně biosyntézy celesticetinu a linkomycinu (LM). Práce si kladla za cíl přispět k upřesnění neúplného obrazu biosyntetické dráhy LM, jako nutné podmínky pro kontrolované obměny struktury přirozeného linkomycinu. Lze konstatovat, že vytčeného cíle bylo dosaženo, jak dokazují i publikace výsledků v dizertaci uvedené.

Předkládaná dizertace v rozsahu 165 stran má klasické členění. Literární přehled zabírá plných 61 stran, je výborně psaný, aktuální (řada publikací z r.2009) a dokumentuje vzdělanost autorky v široké oblasti dizertace. Je zaměřen na dva tematické okruhy: první se zabývá rodem *Streptomyces* a jeho sekundárním metabolismem, druhý antibiotiky – přehledem jejich struktur, vyhledáváním nových typů, cílenou modifikací biosyntézy a syntézu linkosamidů. Dobře volených 22 obrázků přispívá k didaktické úrovni celé kapitoly. Rozsah literárního přehledu není samoučelný – je teoretickou přípravou k části experimentální, jejíž strukturu předznamenává. Za zvážení by podle mého názoru stálo uvažovat o publikování tohoto textu formou přehledných článků.

Materiál a metoda na 27 stranách přesně a pečlivě popisuje metodické postupy kultivační, obšírný soubor technik genových manipulací s *E. coli* a bakteriemi rodu *Streptomyces*, zastoupeny jsou metody separační a analytické. Zejména zavedení a zvládnutí recentní metody Redirect targeting system zvyšuje exaktnost a šetrnost mutačních zásahů do zkoumaných genů shluku *lmb*. V kombinaci s fermentačními a obohacovacími pokusy pak byly získány jasné výsledky.

Experimentální část je rozsahem i obsahem úzce propojena s literárním přehledem. Struktura výsledků odpovídá třem hlavním cílům práce: 1. mutační analýza *lmb* genů s předpokládanou funkcí, 2. cílená manipulace s biosyntetickou dráhou linkomycinu a 3. testování sbírky půdních aktinomycet. Text je veden jako řada jednotlivých pokusů - kroků, z nichž každý je vysvětlen, graficky doložen a vyhodnocen jako výchozí bod pro následující postup.

Výsledky 1. části - inaktivace sedmi vybraných *lmb* genů s následnou charakterizací mutantních kmenů rozšiřují dosavadní poznatky o biosyntéze LM. Zvláště úspěšná je mutační analýza N- a C- konců genu *lmbN* ověřená následnými obohacovacími pokusy, které dokazují podvojnou funkci proteinu *LmbN* v biosyntéze PPL i MTL. Pozorování kumulace PPL, ale nikoliv MTL v  $\Delta N\_PP$  naznačuje vícestupňovou kontrolu produkce antibiotika.

Pozitivní výsledky přinesla i 2. část – mutasyntéza, v podobě očekávaných derivátů linkomycinu, produkovaných kmenem *S.lincolnensis* inaktivovaným v genu *lmbΔX*. Přidané prekurzory 4-L-butylprolin a 4-L pentylprolin kondenzovaly s cukernou komponentou MTL a produkt PELIN inhibuje růst vybraných klinických izolátů *S. aureus* více než původní LM a srovnatelně s CLI.

Ve 3. části práce byl soubor půdních izolátů aktinomycet postupně testován na přítomnost genů rezistence *lmbB* a *lmbC*, na jejich fylogenetickou příbuznost bylo usuzováno podle podobnosti sekvencí 16S rRNA a konečně v několika kmenech byla ověřována i produkce linkomycinu inhibicí růstu indikátorové *K. rhizophila* a tenkovrstevnou chromatografií. Tato kapitola svědčí o pracnosti hledání, při současných metodických možnostech, nicméně v závěru bylo jedno ze čtyř míst sběru označeno jako potenciální naleziště nových producentů LM.

Diskuse na desíti stranách je důsledná a dokazuje schopnost Mgr. D. Ulanové interpretovat své výsledky v kontextu publikovaných faktů, které pocházejí z 35 citovaných prací. Dalším důkazem téhož je i předložení hypotézy, která zjištěná, byť neúplná data shrnuje a vysvětluje a na položené otázky navrhuje autorka i věrohodná řešení.

Závěry práce jsou věcné a odpovídají dosaženým výsledkům. Literární prameny, kterých je přes 200, jsou správně citovány.

Formální úroveň díla svědčí o pečlivém zpracování; práce je psaná čistou češtinou, překlepy se v podstatě nevyskytují (výjimka např. na str. 146 „za použitím“); práce obsahuje 52 kvalitních obrázků a 10 tabulek, které přispívají k pochopení textu

Nyní bych ráda požádala paní Mgr. Ulanovou o odpovědi, případně komentáře k následujícím otázkám:

V části Metodické

\* Které ze širokého spektra metod použitých v práci jste zaváděla, případně optimalizovala a sama prováděla? (Asi zavádění živého místo inaktivační kazety...)

\* v Metodách je zajímavě nakládáno s vodou. Tak na str. 65 se objevuje v předpisech kultivačních medií jako složka dH<sub>2</sub>O; v seznamu zkratk není zkratka vysvětlena. Na téže straně není na přípravu media MS, jako jediného, uvedena dH<sub>2</sub>O, ale vodovodní voda. Proč? Oproti tomu na str. 75 byla do reakčních systémů pro PCR přidávána voda, ne H<sub>2</sub>O, bez bližšího určení. Je možno tyto drobnosti upřesnit?

\* Na str. 81 se uvádí, že sekvenační analýza byla provedena na servisním pracovišti MBÚ v.v.i. a dále firmou Macrogen (Korea). Jedná se opravdu o korejské pracoviště?

V části Výsledky:

\* Str. 112: Mutace genů *lmb U* a *V* nebyly kompenzovány přídatkem PPL ani MTL. Lze usuzovat na roli jejich produktů v biosyntéze LM alespoň např. podle sekvenčních dat ?

\* V práci dokazujete účast produktu genu *lmbN*, resp. jeho N-koncové domény v syntéze PPL. Podle sekvenčních dat analogické oblasti *ccb* (genů syntézy celesticetinu) se patrně jedná o doménu pro vazbu 4-fosfopanteteinyly, která přenáší aktivovaný PPL k MTL před jejich kondenzací. V Diskusi zmiňujete možnost štěpení proteinu *LmbN* na dvě odděleně fungující části. Jaký by byl naopak Váš názor, na možnou existenci velkého enzymového komplexu, který by kontroloval závěrečné stupně biosyntézy N-DLM? Analogické struktury (ATPdependentní adenylace, ppan nosič, kondenzační doména) podobné syntetázám mastných kyselin byly prokázány např. při neribozomální biosyntéze gramicidinu *S*, tyrocidinu či surfaktinu v *B.subtilis* (publikované v r. 2008).

\* Z jakého důvodu byla pro testování účinku derivátů právě LM *K.rhizophila*?

Závěrem lze konstatovat, že dizertační práce Mrg. Dany Ulanové prokazuje její schopnost samostatně vědecky pracovat. Výsledky, které získala v průběhu svého 4letého působení v laboratoři sekundárního metabolismu v MBÚ byly publikovány v prestižních, recenzovaných časopisech. Doktorská práce splňuje beze zbytku požadavky dané zákonem č. 111/1998 Sb. Navrhuji proto, aby byla přijata k obhajobě.

Doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.

V Praze, 3.10.2009