

Komparativní analýza shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu

Markéta Koběřská

Úvodní část dizertační práce se zabývá izolací, sekvenční analýzou a heterologní expresí shluku pro biosyntézu linkomycinu izolovaného z typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Komparativní analýza se shlukem genů z nadprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 ukázala dvě rozsáhlé změny sekvence a několik stovek bodových mutací. Analýza sekvence okolí shluku upřesnila umístění shluku v genomu producenta. Kosmid nesoucí celý shluk pro biosyntézu linkomycinu byl následně vložen do genomu dvou modelových streptomycet: *Streptomyces coelicolor* CH 999 a *Streptomyces coelicolor* M 145. Takto modifikované kmeny heterologně produkovaly linkomycin, i když produkce klesla na 1-3% produkce naměřené u *S. lincolnensis* ATCC 25466.

Na základě přesné sekvence linkomycinového genového shluku z typového kmene byl identifikován a analyzován shluk genů pro biosyntézu strukturně příbuzného antibiotika celesticetinu. Analýza ukázala 24 otevřených čtecích rámců, 18 z nich je homologních s geny z linkomycinového shluku genů, 4 geny kódují tvorbu a připojení salicylátové podjednotky celesticetinu, dále shluk obsahuje jeden gen pro rezistenci a jeden gen kódující specifickou ornamentaci antibiotika. Geny nesoucí informaci pro biosyntézu jednotlivých částí antibiotik mají stavenicové uspořádání. Dvanáct genů, které pravděpodobně kódují biosyntézu aminocukerné podjednotky linkosamidových antibiotik, je konzervováno v obou shlucích a rozděleno do dvou kompaktně se pohybujících modulů. Mezi tyto dva moduly je v genovém shluku celesticetinu vložena čtveřice genů, *ccbD/lmbD*, *ccbE/lmbE* a *ccbF/lmbF*, kódujících pravděpodobně podjednotky klíčového kondenzačního enzymu N-demethyllinkomycinsynthetasy (NDLS). Výsledky inaktivačních pokusů a proteinových interakcí potvrdily, že proteiny kódované těmito geny tvoří jádro NDLS. K unikátnímu pohybu na podgenové úrovni došlo během vývoje linkosamidů v případě sekvence kódující peptidylový přenašeč, další nezbytné komponentě NDLS. V celesticetinovém genovém shluku tato sekvence tvoří 3' konec genu *ccbZ*, zatímco ve shluku pro biosyntézu linkomycinu je připojena na 5' konci genu *lmbN*, který sousedí s *lmbZ*, protějškem genu *ccbZ*. Během evoluce tedy došlo k „přeskoku“ sekvence kódující PCP z konce jednoho genu na začátek sousedního. Sekvenční analýza biochemicky příbuzných pyrrolobenzodiazepinových (PBD) antibiotik ukázala, že linkomycinový shluk pravděpodobně vznikl fúzí shluku genů linkosamidového antibiotika začleňujícího původně prolin se shlukem PBD antibiotika syntetizujícího a integrujícího do své struktury derivát 4-propyl-L-prolinu. Adaptace substrátové specifity enzymu NDLS spojujícího obě podjednotky antibiotika proběhla jen díky několika bodovým mutacím jeho podjednotek.