

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



DISERTAČNÍ PRÁCE

Komparativní analýza shluků genů pro biosyntézu
linkomycinu a celesticetinu

Mgr. Markéta Koběřská

Praha 2010

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 listopad 2002 – srpen 2010.

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 2010

Mgr. Markéta Koběřská

Na prvním místě děkuji svému školiteli Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. za vedení práce, odborné rady, podnětné konzultace a trpělivost. Velké poděkování patří všem kolegům z Laboratoře sekundárního metabolismu za časté rady, pomoc a hlavně velmi příjemné pracovní prostředí. Děkuji také RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. a Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi za provedení chromatografických analýz.

Chtěla bych také vyjádřit velký dík svojí mámě za obětavé hlídání dětí, které mi umožnilo tuto práci dopsat, Šimonovi s Tobiášem, že se ochotně nechali hlídat a Pavlovi, že si nad tím vším udržel nadhled.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1. Streptomycety	9
2.2. Sekundární metabolismus	12
2.2.1. Biosyntéza sekundárních metabolitů	13
2.2.1.1. Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů	13
2.2.1.1.1. Reakce na signál z prostředí, dvousložkový fosforylační systém	14
2.2.1.1.2. Extracelulární signální molekuly	15
2.2.1.1.3. Dráhově specifické regulátory	17
2.2.1.2. Biosyntetické geny sekundárního metabolismu	18
2.2.1.2.1. Polyketidsynthetasy	18
2.2.1.2.2. Neribozomální peptidové synthasy	21
2.3. Linkosamidy	22
2.3.1. Struktura linkosamidových antibiotik	22
2.3.2. Mechanismus účinku a rezistence	24
2.3.3. Biosyntetická dráha linkosamidů	25
2.3.3.1. Biosyntéza aminokyselinové části linkomycinu, 4-propyl-L-prolinu	27
2.3.3.2. Biosyntéza aminocukerné části linkomycinu, methylthiolinkosamidu	28
2.3.3.3. Kondenzace a závěrečná methylace	29
2.3.3.4. Biosyntéza salicylátu	29
2.3.4. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu	31
2.4. Antibiotika biosynteticky podobná linkosamidům, PBD antibiotika	32
2.4.1. Anthramycin	36
2.4.2. Sibiromycin	36
2.4.3. Tomaymycin	36
2.5. Evoluce genových shluků	38
2.5.1. Změny jednotlivých biosyntetických genů	38
2.5.2. Změny na úrovni genových shluků	39
2.5.3. Slučováním genových „podshluků“ vznikají nové shluky	41
2.5.4. Slučováním genových shluků vznikají „supershluky“	42
2.5.5. Fenotypová konvergence	43
3. MATERIÁL A METODY	44
3.1. Materiál	44
3.1.1. Bakteriální kmeny	44
3.1.2. Plazmidy	45
3.1.3. Enzymy a chemikálie	46
3.1.4. Média	46
3.1.5. Roztoky a pufry	48
3.1.6. Komerční soupravy	51
	52

3.2. Metody	
3.2.1. Kultivace <i>E.coli</i>	52
3.2.2. Příprava kompetentních buněk	52
3.2.3. Transformace <i>E. coli</i> plazmidovou DNA elektroporací	52
3.2.4. Transformace <i>E. coli</i> plazmidovou DNA teplotním šokem	52
3.2.5. Kultivace <i>Streptomyces</i>	53
3.2.6. Příprava spor <i>Streptomyces</i>	53
3.2.7. Kultivace <i>Streptomyces</i> pro sledování produkce linkomycinu	53
3.2.8. Transformace <i>S. lincolnensis</i> plazmidovou DNA mezidruhovou konjugací s <i>E. coli</i>	53
3.2.9. Kultivace <i>Kocuria rhizophila</i>	54
3.2.10. Obohacovací pokusy s mutantními kmeny <i>S. lincolnensis</i>	54
3.2.11. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou lyzí	54
3.2.12. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> komerční soupravou	55
3.2.13. Izolace kosmidové z <i>E. coli</i> DNA komerční soupravou	55
3.2.14. Štěpení DNA pomocí restričních endonukleas	55
3.2.15. Ligace	55
3.2.16. Izolace genomové DNA ze streptomycet fenolovou extrakcí	56
3.2.17. DNA elektroforéza	56
3.2.18. Izolace DNA fragmentu z agarosového gelu	56
3.2.19. Polymerasová řetězová reakce	57
3.2.20. Příprava kosmidové knihovny (SuperCosI cosmid vector kit)	58
3.2.20.1. Příprava ligační směsi	58
3.2.20.2. Pakážování a transfekce ligační směsi	58
3.2.21. Koloniová hybridizace	59
3.2.21.1. Příprava membrány	59
3.2.21.2. Značení sondy, inkorporace digoxigenin – 11 – dUTP	59
3.2.21.3. Hybridizace se značenou sondou digoxigeninem	60
3.2.21.4. Chemiluminiscentní detekce	60
3.2.22. Sekvenační analýza	60
3.2.23. Metoda inaktivace genů na chromozómu streptomycet	60
3.2.24. Heterologní exprese biosyntetického shluku genů	64
3.2.25. Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii	65
3.2.26. Stanovení linkomycinu metodou UPLC	65
3.2.27. Hmotnostní spektrometrie	66
4. VÝSLEDKY	67
4.1. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene	67
4.1.1. Kosmidová knihovna <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	67
4.1.2. Sekvenování shluku pro biosyntézu linkomycinu ze <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	69
4.1.3. Sekvenční analýza	69
4.1.3.1. Srovnání genomového shluku <i>S. lincolnensis</i> 78-11 a <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	69
4.1.3.2. Proteiny kódované shlukem <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	71
4.1.3.3. Umístění linkomycinového shluku v genomu <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	73
4.1.4. Heterologní exprese shluku pro biosyntézu linkomycinu	73
4.2. Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu	79
4.2.1. Identifikace a izolace shluku genů pro biosyntézu celesticetinu ze <i>S. caelestis</i> ATCC 15084	79

4.2.2. Sekvenování metodou “shotgun”	82
4.2.3. Sekvenování inzertů kosmidů CK1 a CK2 metodou “primer walking”	82
4.2.4. Sekvenční analýza	83
4.2.4.1. Hranice shluku pro biosyntézu celesticetinu	83
4.3. Komparativní analýza linkosamidových shluků genů	85
4.3.1. Geny kódující biosyntézu aminocukerné části linkosamidových antibiotik	86
4.3.2. Geny kódující biosyntézu specifické aminokyselinové části linkomycinu, PPL	86
4.3.3. Geny kódující podjednotky NDLS	86
4.3.4. Biosyntéza salicylátové podjednotky celesticetinu	89
4.3.4 Geny kódující methyltransferasy v biosyntéze linkosamidových antibiotik	89
4.3.5. Rezistenční geny ve shlucích pro biosyntézu linkosamidů	90
4.3.6. Geny s neznámou funkcí ve shlucích pro biosyntézu linkosamidů	90
4.4. Inaktivace genů	95
4.4.1. Inaktivace genů <i>lmbIH</i> , <i>lmbQ</i> a <i>lmbU</i>	95
4.4.1.1. Příprava inaktivačních kazet	95
4.4.1.2. Integrace inaktivačních kazet do kosmidu nesoucího <i>lmb</i> shluk	96
4.4.1.3 Vnesení inaktivačních kazet do chromozómu <i>S. lincolnensis</i> a měření produkce linkomycinu	98
4.4.2. Inaktivace genů pravděpodobně kódujících podjednotky NDLS: <i>lmbC</i> , <i>lmbD</i> , <i>lmbE</i> a <i>lmbF</i>	100
4.4.2.1. Testování obnovení produkce linkomycinu	101
4.5. Navazující výsledky	106
4.5.1. Biochemická charakterizace proteinů LmbC a CcbC; posun substrátové specifity adenylační domény aktivující aminokyselinu (výsledky Mgr. S. Kadlčíka)	106
4.5.2. Testování proteinových interakcí podjednotek NDLS (výsledky RNDr. J. Novotné Ph.D.)	108
5. DISKUSE	109
6. ZÁVĚRY	119
7. REFERENCE	120

SEZNAM ZKRATEK

ACP	protein nesoucí acyl (acyl carrier protein)
A-doména	adenylační doména
bp	pár bází (base pair)
BuPL	4-L-butylprolin
ccb	biosyntéza celesticetinu (celesticetin biosynthesis/biosynthetic)
CSPD	Disodid 3-(4-methoxyspiro { 1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyklo [3.3.1.1 ^{3,7}]dekan }-4-yl)fenylfosfát
EPL	ethylprolin
DIG	digoxigenin
FLP	rekombinasa (flippase recombination enzyme)
FRT	místa rozpoznávaná rekombinasou (flippase recognition target sites)
HGT	horizontální transfer genů
lmb	biosyntéza linkomycinu (lincomycin biosynthesis/biosynthetic)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
MLS	makrolid, linkosamid a streptogramin B
MTL	methylthiolinkosamid
NDC	N-demethylcelesticetin
NDL	N-demethyllinkomycin
NDLS	N-demethyllinkosamid synthetasa
NRPS	neribozomální peptidová syntetasa
PBD	pyrrolobenzodiazepinová antibiotika
PCP	protein nesoucí peptidyl (peptidyl carrier protein)
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PePL	4-L-pentylprolin
PKS	polyketidsynthetasy
PP	fosfopantethein
PPL	4-L-propylprolin
SPE	extrakce pevné fáze (solid-phase extraction)
TCA	thiocelestosamidin
UPLC	kapalinová chromatografie (ultra-performance liquid chromatography)

1. ÚVOD

Více než dvě třetiny antibiotik používaných v humánním lékařství jsou přirozenými produkty mikroorganismů nebo jejich semisyntetické deriváty (WALSH 2003, CLARDY *et al.* 2006). Vzhledem k rostoucímu počtu rezistentních patogenních kmenů a novým druhům infekce vzniká potřeba i nadále hledat a vyvíjet nové antimikrobiální látky. V devadesátých letech minulého století byla při hledání nových antibiotik upřednostňována kombinatoriální chemie. V současné době je zřejmé, že tento přístup nedokáže zastoupit jako primární zdroj chemické diverzity přírodní produkty, jejichž hlavní výhodou je často velmi složitá struktura a chirální povaha (LARSEN *et al.* 2005). Za jednu z nadějných cest k rozšíření spektra antimikrobních látek jsou dnes považovány cílené zásahy do biosyntetických drah antibiotik pomocí metod molekulární biologie – kombinatoriální genetika (COATES a HU 2007). Tato strategie je však podmíněna znalostí biosyntetických drah antibiotik a enzymů, které katalyzují jejich jednotlivé reakce (WEBER *et al.* 2003).

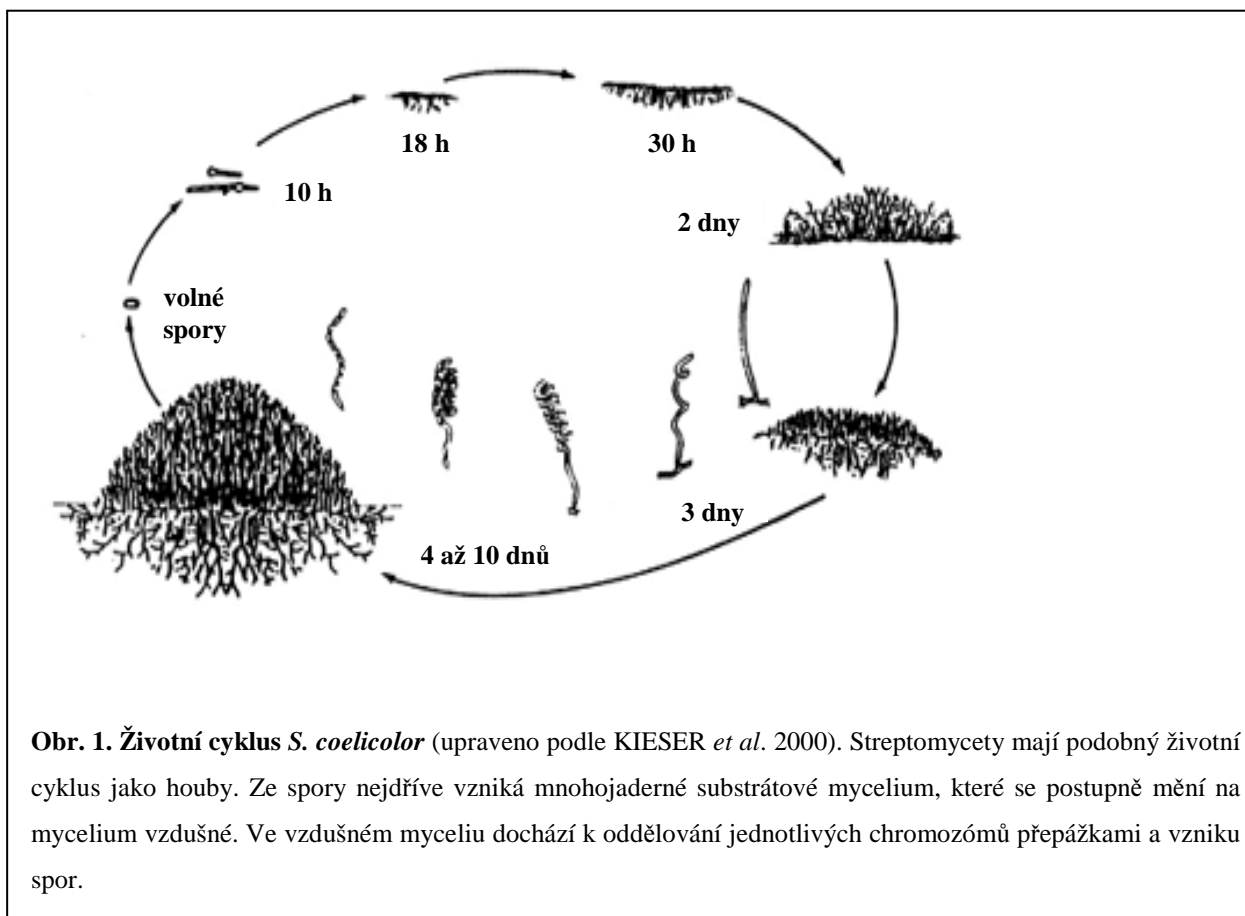
Inspiraci pro kombinatoriální biosyntézu lze hledat v evoluci sekundárních metabolitů. Antibiotika se vyvíjela déle než miliardu let (BALTZ 2008) a jejich schopnost inhibovat cílové enzymy, makromolekuly nebo makromolekulární struktury je prověřena tím, že se shuky genů pro jejich biosyntézu v producentech udržely. Pokroky v oborech jako je genetika, biochemie a bioinformatika umožňují studium antibiotik a dalších přírodních produktů z evolučního pohledu jakožto fenotypového projevu shluků genů. Evoluce genových shluků kódujících biosyntézu antibiotik poskytuje nejen návod, jak příroda objevuje a diverzifikuje malé molekuly, ale je také zdrojem informací, jak antibiotika fungují. Dává například informace o tom, která zásahová místa antibiotik se udržela v průběhu evoluce, nebo jak kombinace antibiotik mohou překonat rezistenci (FISCHBACH *et al.* 2009).

Tato disertační práce byla vypracována v rámci projektu studia biosyntézy linkosamidových a pyrrolobenzodiazepinových antibiotik, které jsou potenciálním zdrojem hybridních látek s antibakteriálními, antimalarickými nebo antikarcinogenními účinky. Konkrétně vychází z určení sekvence shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu, která umožňuje jejich komparativní analýzu s cílem přiřadit funkce většině jejich genů. Navržené hypotézy byly potvrzeny pomocí inaktivace vybraných genů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Streptomycety

Rod *Streptomyces* je nejlépe popsáným rodem třídy *Actinomyces* a zahrnuje půdní bakterie s unikátní morfologickou diferenciací (obr. 1).



Obr. 1. Životní cyklus *S. coelicolor* (upraveno podle KIESER *et al.* 2000). Streptomycety mají podobný životní cyklus jako houby. 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.

Streptomycety jsou nejvýznamnějšími producenty sekundárních metabolitů, produkuje nejen více než dvě třetiny antibiotik používaných v lékařské praxi, ale i látky s antikarcinogenními a imunosupresivními účinky. Tyto půdní organismy jsou důležitým zdrojem farmaceuticky významných sloučenin, v jejichž biosyntetických drahách jsou kombinovány běžné buněčné intermediáty jako aminokyseliny, cukry, mastné kyseliny nebo terpeny. Rozvinutý sekundární metabolismus a tedy i extrémně velký genom streptomycet (přes 8 Mbp) je výsledkem adaptace na složité půdní prostředí, ve kterém žijí. Dosud bylo

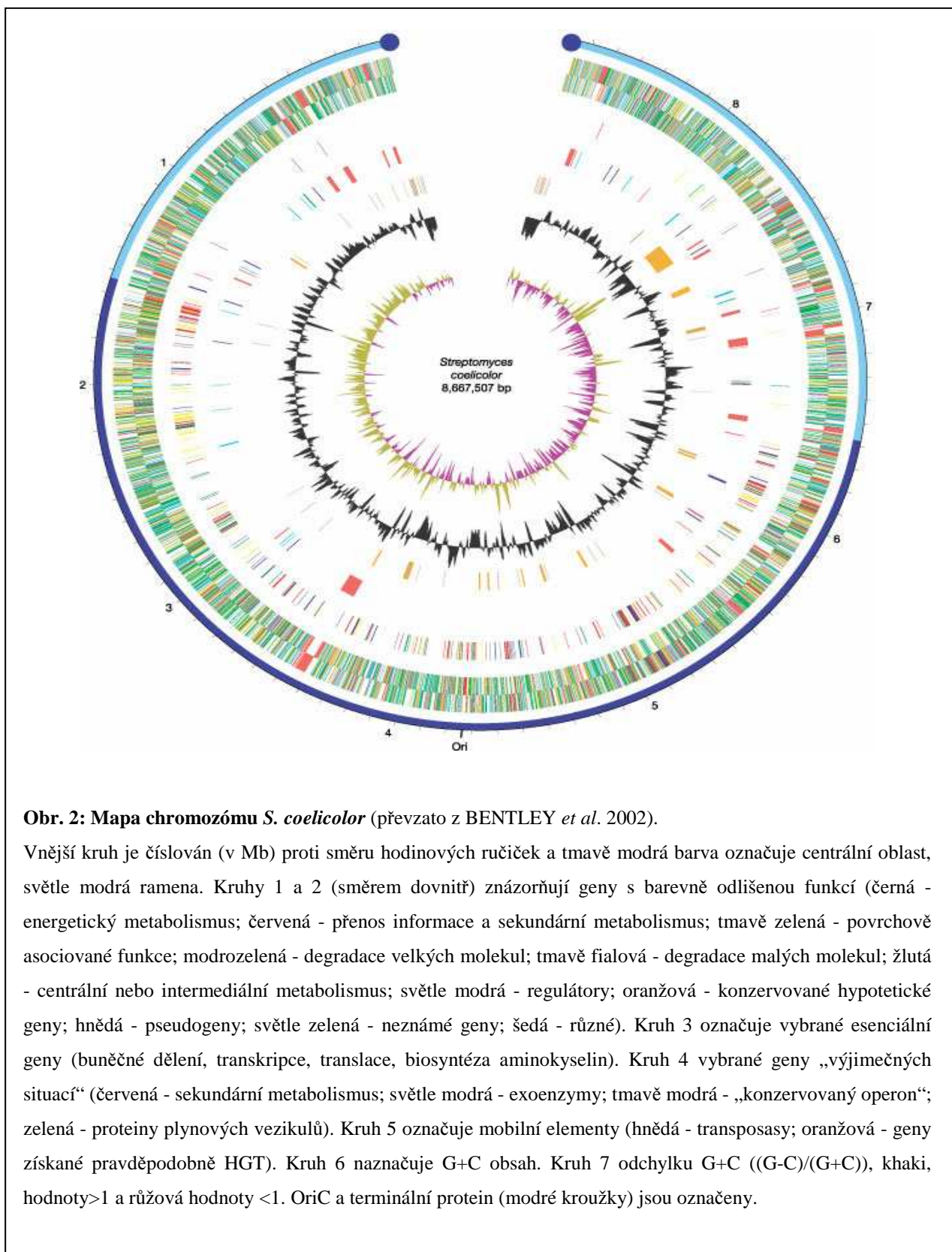
osekvenováno přes čtyřicet kompletních genomů aktinomycet, z nichž čtyři patří streptomycetám (ALAM *et al.* 2009).

Rozsáhlý GC bohatý chromozóm streptomycet je vzácným příkladem lineárního bakteriálního chromozómu. Je zakončen invertovanými repeticemi, na které jsou kovalentně vázané proteiny podílející se na terminaci replikace. Sekvence genomu první modelové streptomycety *Streptomyces coelicolor* A3(2) byla kompletně publikována v roce 2002 (BENTLEY *et al.* 2002). Kromě lineárního chromozómu obsahuje dva plazmidy. Chromozóm je dlouhý 8 667 507 bp, lineární plazmid SPC1 kódující mj. regulační proteiny včetně tří sigma faktorů je velký 365 023 bp (BENTLEY *et al.* 2004) a cirkulární plazmid SPC2, který se vyskytuje v malém počtu kopií, je velký 31 317 bp (HAUG *et al.* 2003). Na chromozómu lze rozlišit tři části: centrální oblast a dvě ramena. Centrální oblast zahrnuje přibližně polovinu chromozómu a obsahuje esenciální geny, ramena jsou 1,5 Mbp a 2,3 Mbp dlouhá a kódují neesenciální funkce, jako je produkce sekundárních metabolitů, hydrolytických exoenzymů, tzv. konzervované operony a proteiny plynových vezikulů (BENTLEY *et al.* 2002).

Následně byla publikována i sekvence genomu *Streptomyces avermitilis*. Obsahuje 9 025 608 bp (průměrný GC obsah 70,7%) a kóduje minimálně 7 574 otevřených čtecích rámců (IKEDA *et al.* 2003). Srovnání genomů *S. avermitilis* and *S. coelicolor* A3(2) ukázalo vysoce konzervovaný 6,5 Mbp dlouhý úsek obsahující všechny esenciální geny (v *S. avermitilis* jsou to geny *sav 1625–7142*), jejichž pořadí i orientace jsou vysoce konzervované u obou modelových streptomycet. Tato oblast je strukturně podobná i cirkulárním bakteriálním genomům, což naznačuje společný evoluční původ. Naproti tomu terminální ramena nesoucí neesenciální geny konzervovaná nejsou. Více než polovina genů sekundárního metabolismu se nachází v subtelomerických oblastech, kde naopak nebyly identifikovány žádné esenciální geny. Výskyt nových genů v těchto oblastech a jejich celková strukturální variabilita je pravděpodobně unikátní pro lineární chromozómy (IKEDA *et al.* 2003).

Geny sekundárního metabolismu zabírají přibližně 6,6 % genomu *S. avermitilis*, což je mnohem vyšší poměr než u jiných dosud sekvenovaných genomů. Skoro žádný z těchto shluků genů není lokalizován blízko středu chromozómu, více než polovina se nachází vlevo od *oriC* a blízko obou konců. Tyto výsledky svědčí o horizontálním přenosu (HGT) z donorového organismu. Koncové oblasti navíc obsahují mnoho genů kódujících trasposasy, které pravděpodobně hrají důležitou roli při HGT v průběhu evoluce streptomycet a také při

interním přeskupování genů v genomu. Některé z transposasových genů navíc přímo přiléhají ke shlukům genů sekundárního metabolismu (OMURA *et al.* 2001, IKEDA *et al.* 2003).



Obr. 2: Mapa chromozómu *S. coelicolor* (převzato z BENTLEY *et al.* 2002).

Vnější kruh je číslován (v Mb) proti směru hodinových ručiček a tmavě modrá barva označuje centrální oblast, světle modrá ramena. Kruhy 1 a 2 (směrem dovnitř) znázorňují geny s barevně odlišenou 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). Kruh 4 vybrané geny „výjimečných situací“ (červená - sekundární metabolismus; světle modrá - exoenzymy; tmavě modrá - „konzervovaný operon“; zelená - proteiny plynových vezikulů). Kruh 5 označuje mobilní elementy (hnědá - transposasy; oranžová - geny získané pravděpodobně HGT). Kruh 6 naznačuje G+C obsah. Kruh 7 odchylku G+C $((G-C)/(G+C))$, khaki, hodnoty >1 a růžová hodnoty <1. OriC a terminální protein (modré kroužky) jsou označeny.

2.2. Sekundární metabolismus

Sekundární metabolity jsou látky charakteristické pro úzké taxonomické skupiny organismů a mají různorodou, neobvyklou a často složitou chemickou strukturu. Tyto látky nejsou nezbytné pro růst produkčních organismů, ale mají široký rozsah „sekundárních“ funkcí; patří sem antibiotika, pigmenty, toxiny, feromony, autoregulační faktory, siderofory a další. Existuje i řada sekundárních metabolitů, kterým nebyla přiřazena biologická funkce, nebo nebylo prokázáno, že jejich funkce poskytuje producentovi konkurenční výhodu (CHALLIS a HOPWOOD 2003). Právě to dříve vedlo k teorii, že sekundární metabolity nemají v evoluci žádnou úlohu a jedná se o odpadní produkty primárního metabolismu. Tato teorie byla vyvrácena z důvodu složitosti genetických determinant biosyntézy sekundárních metabolitů a jejich dokonalé adaptace pro interakce s cílovými molekulami (WILLIAMS *et al.* 1989). Soubor proteinů řídících biosyntézu jednoho sekundárního metabolitu může až dvakrát převyšovat velikost ribozómu (MCALPINE *et al.* 2005), přestože na ribozómu jsou translatovány tisíce různých proteinů. Selektivní tlak na zachování takto složitého mechanismu i náklady na jeho údržbu musí být tedy značné (FISCHBACH *et al.* 2008). Sekundárním metabolitům nelze přiřadit jednu společnou funkci. S postupujícím poznáním biochemických drah a jejich evoluce lze sekundární metabolismus definovat jako proces udílející produkčnímu organismu určitou výhodu. Buď ovlivňuje fyziologii růstu a reprodukci produkčního organismu nebo má různé role v interakcích mezi produkčním organismem a jeho okolím. Rozdíl sekundárního metabolismu od primárního nespočívá v jeho konkrétní funkci, ale v postradatelnosti pro produkční organismus a jeho omezeném rozšíření (VINING 1992).

Studium shluků genů sekundárních metabolitů z hlediska jejich evoluce je důležité zejména ze dvou důvodů. Jednak je zřejmé, že se jedná o nejrozmanitější skupinu látek, které se díky krátkému reprodukčnímu času mikroorganismů a častému HGT rychle vyvíjejí. Zadruhé, fenotypem biosyntetického shluku genů je konkrétní molekula, kterou lze izolovat, strukturně charakterizovat a tedy i přiřadit funkce jednotlivým genům. Navíc genové shluky produkují mnoho lékařsky významných látek jako například antibiotika, tj. molekuly interferující s metabolickými procesy bakterií, nebo látky s antifungálními, antikarcinogeními a imunosupresivními účinky. Stejně jako se vyvíjejí tyto vyšší systémy, i genové shluky mají svůj mechanismus evoluce. Porozumění tomuto mechanismu usnadňuje vývoj metod pro produkci nových účinných látek metodami kombinatoriální biosyntézy (BALTZ *et al.* 2008).

Analogickým evolučním procesem je vývoj rezistencí v reakci na přítomnost nových antimikrobiálních látek v prostředí.

2.2.1. Biosyntéza sekundárních metabolitů

Geny kódující biosyntetickou dráhu malých molekul jsou většinou v genomu mikrobiálního producenta organizovány ve shlucích, což je nepochybně odrazem HGT v jejich evoluční historii (LAWRENCE 1999). Struktura genových shluků je modulární, tj. geny kódující jednotlivé funkční podjednotky sekundárního metabolitu jsou uspořádány do společně regulovaných ucelených bloků. Toto uspořádání umožňuje HGT jak celých shluků mezi organismy, tak i jednotlivých podshluků (modulů). Nové biosyntetické dráhy tak vznikají kombinací již prověřených funkčních genových modulů (podrobněji viz. kapitola 2.5.). Charakteristickým rysem sekundárního metabolismu je také přítomnost extrémně velkých modulárních a vícepodjednotkových enzymů (viz. kapitola 2.2.1.2.) sestavených z jednotlivých funkčních bloků. Stavebnicové uspořádání genetické informace usnadňuje HGT úseků kódujících jednotlivé funkční moduly. Tato rekombinovatelnost modulů umožňuje vysokou adaptabilitu enzymů sekundárního metabolismu k novým substrátům a intermediátům.

Velikost genových biosyntetických shluků se pohybuje od několika do 100 kb (BENTLEY *et al.* 2002). Obsahují kromě genů biosyntetických i geny kódující rezistenci ke kódovanému metabolitu a dráhově specifické regulační geny.

2.2.1.1. Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů

K biosyntéze sekundárních metabolitů dochází po skončení fáze vegetativního růstu, kdy se organismus dostává do stacionární fáze v tekutém mediu nebo do fáze morfologické diference kultury pěstované na agaru. Exprese biosyntetických genů sekundárního metabolismu je regulována v reakci na signál z okolního prostředí a to především na úrovni transkripce pomocí specifických i centrálních kontrolních okruhů, které mají často pleiotropní efekt. Například vysoké koncentrace anorganického fosfátu v prostředí produkci sekundárních metabolitů inhibují (MARTIN 2004).

V mikroorganismech jsou známy i různé typy autoregulačních efektorů (kap. 2.2.1.1.2.), které jsou syntetizovány a sekretovány produkčním kmenem a internalizovány další buňkou v populaci (ROBSON *et al.* 1997, KLOSE 2006).

2.2.1.1.1. Reakce na signál z prostředí, dvousložkový fosforylační systém

Dvousložkový fosforylační systém je důležitým regulačním principem zahrnutým v aktivaci sekundárních metabolitů a je velice rozšířený.

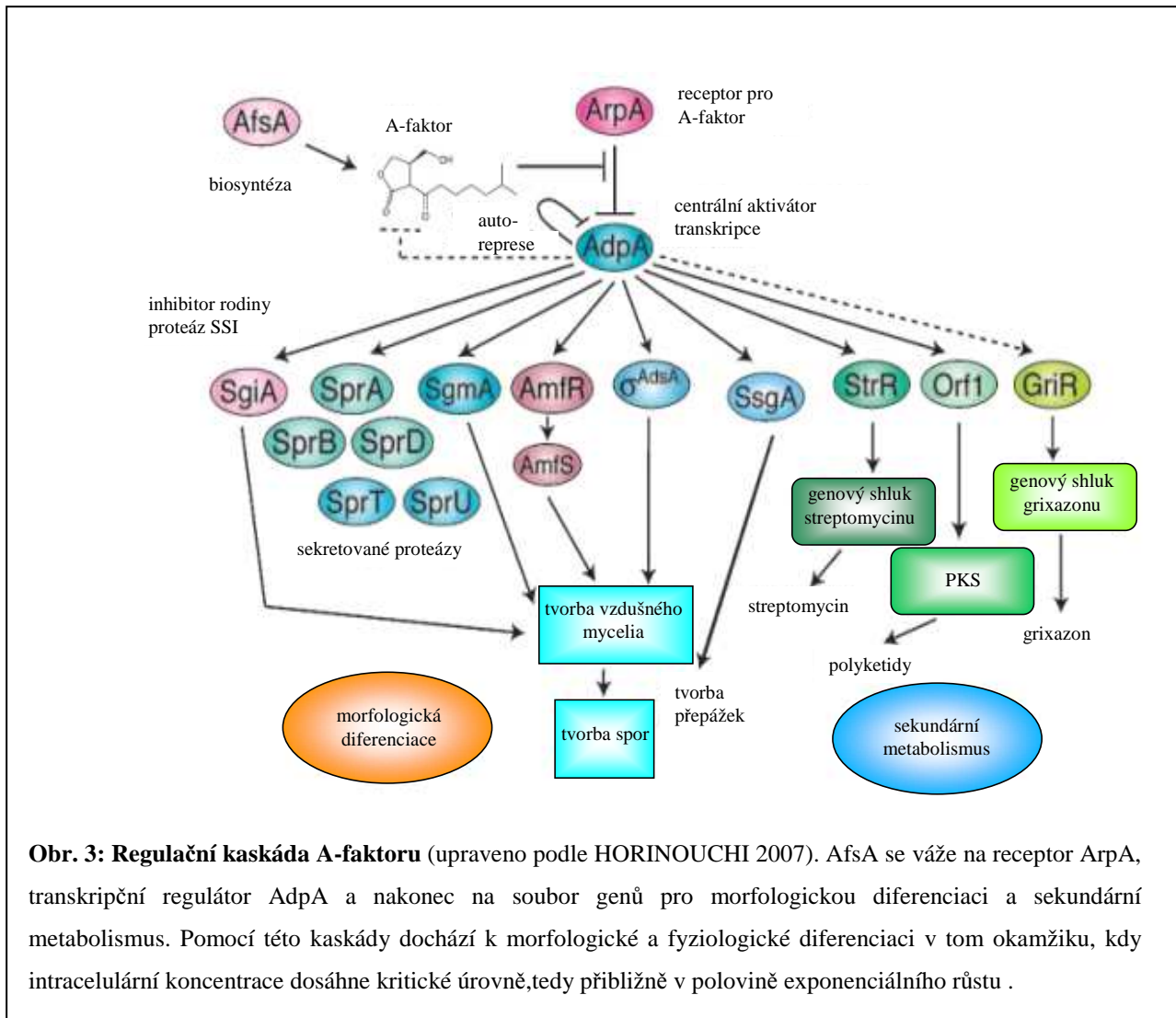
V klasickém modelu sensorová histidinová kinasa zachycuje signál z okolí a fosforyluje aspartátový zbytek regulačního proteinu, který ovlivňuje transkripci příslušných genů. Např. AfsQ1/AfsQ2 pozitivně ovlivňují transkripci genů, kódujících regulační proteiny specifické pro biosyntézu antibiotik aktinorhodinu, undecylprodigiosinu a antibiotika závislého na vápníku u *S. coelicolor* (SHU *et al.* 2009), zatímco AbsA1/AbsA2 působí na produkci těchto antibiotik negativně (ANDERSON *et al.* 2001, RYDING *et al.* 2002).

Dvousložkový systém AfsK/AfsR u *S. coelicolor* reguluje pouze tvorbu sekundárních metabolitů, zatímco u *S. griseus* se navíc účastní regulace morfologické diference (MATSUMOTO *et al.* 1994, UMEYAMA *et al.* 1999). Signály, na které reaguje nejsou zatím známy (ROKEM *et al.* 2007). Kinasa na vnitřní straně cytoplazmatické membrány se autofosforyluje na serinovém a threoninovém zbytku a následně je fosforylován protein AfsR, regulátor transkripce genu *afsS* (LEE *et al.* 2002). Enzym AfsS reguluje transkripci *actII-orf4* a *redD*, genů účastnících se regulace biosyntézy aktinorhodinu a undecylprodigiosinu (FLORIANO a BIBB 1996). AfsK se aktivuje autofosforylací s pomocí KbpA a poté fosforyluje protein AfsR, volně přítomný v cytoplasmě, čímž podstatně zvýší jeho afinitu k DNA (MATSUMOTO *et al.* 1994). Fosforylovaný AfsR pak vytváří komplex s RNA-polymerasou a aktivuje transkripci transkripčního faktoru AfsS, který dále aktivuje transkripci genů kódujících dráhově specifické regulátory, např. *ActII-orf4* a *RedD*. AfsR je fosforylován i jinými kinasami, což naznačuje jeho důležitou roli v dalších aktivitách buňky (UMEYAMA *et al.* 2002).

Modelová aktinomyceta *S. coelicolor* obsahuje 164 genů kódujících kinasy a regulátory dvousložkového systému, tedy daleko více než jakákoli jiná známá bakterie (HUTCHINGS *et al.* 2004), což svědčí o dobré adaptaci na složité půdní prostředí. Pro srovnání *Mycobacterium tuberculosis* obsahuje pouze 14 sensorových kinas a 16 regulátorů (TYAGI a SAINI 2004) a *Corynebacterium glutamicum* 13 sensorových kinas a 13 regulátorů (KOCAN *et al.* 2006). Aktinobakterie mají i další neobvyklé regulační systémy, jako např. bifunkční sensorové kinasy, které fungují jako kinasy i fosfatasy zároveň; větvené dráhy, kde jedna sensorová kinasa aktivuje více regulátorů; případně tzv. „trojsložkový“ systém, kde je aktivita sensorové kinasy nebo regulátoru ovlivněna ještě dalším proteinem (HUTCHINGS *et al.* 2007).

2.2.1.1.2. Extracelulární signální molekuly

Malé signální molekuly, jako např. γ -butyrolaktony nebo homoserinové laktony, byly popsány u různých druhů bakterií a hrají roli v mnoha fyziologických procesech, jako je morfologická diferenciace, produkce antibiotik, tvorba biofilmu, virulence, apod. Patří sem například A-faktor regulující biosyntézu streptomycinu ve *S. griseus*, virginia butanolid faktor *S. virginiae* (YAMADA *et al.* 1987) a podobné molekuly ze *S. coelicolor* (KAWAGUCHI *et al.* 1997, TAKANO 2006) a ostatních aktinomycet (CHATER a BIBB 1997). Ty však většinou regulují jen produkci sekundárních metabolitů, nikoli morfologickou diferenciaci (BIBB 2005). A-faktor je syntetizován enzymem AfsA, jeho receptorem je cytoplasmový protein ArpA. Vazba A-faktoru na ArpA ho uvolní z *adpA* promotoru a umožní tak transkripci *adpA*. Protein AdpA je nezbytný pro aktivaci transkripce dráhově specifického regulátoru streptomycinu StrR a pro expresi dalších genů *adpA* regulonu, z nichž některé řídí i morfologickou diferenciaci (OHNISHI *et al.* 2005).



Vedle γ -butyrolaktonů existují i jiné extracelulární signální molekuly, které ovlivňují syntézu sekundárních metabolitů jako například:

PI factor, autoinduktor (2,3-diamino-2,3-bis(hydroxymethyl)-1,4-butanediol) z producenta pimaricinu *S. natalensis* (RECIO *et al.* 2004).

B-faktor z *Amycolatopsis (Nocardia) mediterranei* produkující rifamycin (KAWAGUCHI *et al.* 1988)

modifikované peptidové feromony gram-negativních i gram-pozitivních bakterií (KLEEREBEZEM *et al.* 1997)

homoserinové laktony u gram-negativních bakterií (ROBSON *et al.* 1997, BAINTON *et al.* 1992)

furanosylborát diester, quorum-sensing induktor u gram-negativních bakterií (CHEN *et al.* 2002).

Molekula ppGpp je potřebná pro produkci antibiotik při limitaci dusíkem u *S. coelicolor* (CHAKRABURTTY a BIBB 1997). 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).

U *S. coelicolor* bylo pozorováno pozitivní působení molekuly cAMP na morfologickou diferenciaci a produkci antibiotik (SÜSSTRUNK *et al.* 1998).

Další třídu malých signálních molekul představují oligopeptidy. SAM, hlavní donor methylové skupiny v různých biologických procesech se účastní regulace diferenciaci u streptomycet. U *S. coelicolor* M145 exogenní SAM už v 2 μ M koncentraci zvyšuje produkci antibiotik a inhibuje morfologickou diferenciaci (PARK *et al.* 2005).

2.2.1.1.3. Dráhově specifické regulátory

Geny kódující regulační proteiny specifické pro určitý biosyntetický shluk genů se nacházejí uvnitř shluku nebo v jeho blízkém okolí (jako například výše zmíněné proteiny AfsR, StrR apod.). Většina dráhově specifických regulátorů u streptomycet patří do rodiny SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins; WIETZORREK a BIBB 1997). SARP proteiny byly nalezeny i u mykobakterií, nokardií, thermobifíů a lechevalierií. Tyto transkripční aktivátory jsou charakteristické specifickou strukturou DNA vazebné domény na N-konci, která se také nachází u proteinové rodiny OmpR z enterobakterií. U některých SARP proteinů bylo prokázáno, že rozeznávají heptamerová opakování v promotorových oblastech genů, které regulují (WIETZORREK a BIBB 1997, WIDDICK *et al.* 2003). Transkripční aktivátor StrR se váže na GTTCGActG(N)₁₁CagTcGAAC v promotoru 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.* 2005). Podobně jako u *strR* bylo prokázáno, že inaktivace *novG* způsobuje výraznou redukci tvorby novobiocinu, zatímco nadprodukce *novG* je účinným nástrojem k jejímu zvýšení (SHAWKY *et al.* 2007). Příklady zvýšené produkce antibiotika zvýšením počtu kopií regulačního proteinu ze skupiny SARP byly popsány i u producentů aktinorhodinu, undecylprodigiosinu, nikkomycinu, tylosinu a dalších antibiotik (NARVA a FEITELSON 1990, FERNÁNDEZ-MORENO *et al.* 1991, LIU *et al.* 2005, STRATIGOPOULOS *et al.* 2004).

Další skupina proteinů s regulační funkcí je kódovaná geny, které obsahují u streptomycet vzácný TTA kodón. Na rozdíl od jiných aktinomycet je u streptomycet tento kodón většinou lokalizován na začátku kódující sekvence (LESKIW *et al.* 1991, FUGLSANG 2005). Patří sem i *novE* z novobiocinového shluku (EUSTAQUIO *et al.* 2003, DANGEL *et al.* 2008), jehož orthology jsou i *lmbU*, *cloE* a *couE* ze shluků pro biosyntézu linkomycinu, chlorobiocinu a koumermycinu. Přesná funkce regulačních proteinů kódovaných zmíněnými geny zatím nebyla objasněna.

2.2.1.2. Biosyntetické geny sekundárního metabolismu

Ve shlucích sekundárního metabolismu jsou vedle genů kódujících enzymy, které katalyzují jednu reakci i velké geny kódující modulární a vícepodjednotkové enzymy. Patří sem dvě skupiny enzymů pracujících na analogickém principu: polyketidsynthetasy (PKS) katalyzující syntézu polyketidových antibiotik a neribozomální peptidové synthasy (NRPS) katalyzující syntézu peptidových antibiotik.

Polyketidová antibiotika se podle struktury a biosyntézy dělí na aromatická (tetracyklin) a makrolaktonová (erythromycin) (WALSH 2003). Mezi neribozomálně syntetizovaná antibiotika patří například cyklosporin, gramicidin S, vankomycin, bacitracin, β -laktamy a další (CANE a WALSH 1999, MOOTZ *et al.* 2002).

2.2.1.2.1. Polyketidsynthetasy

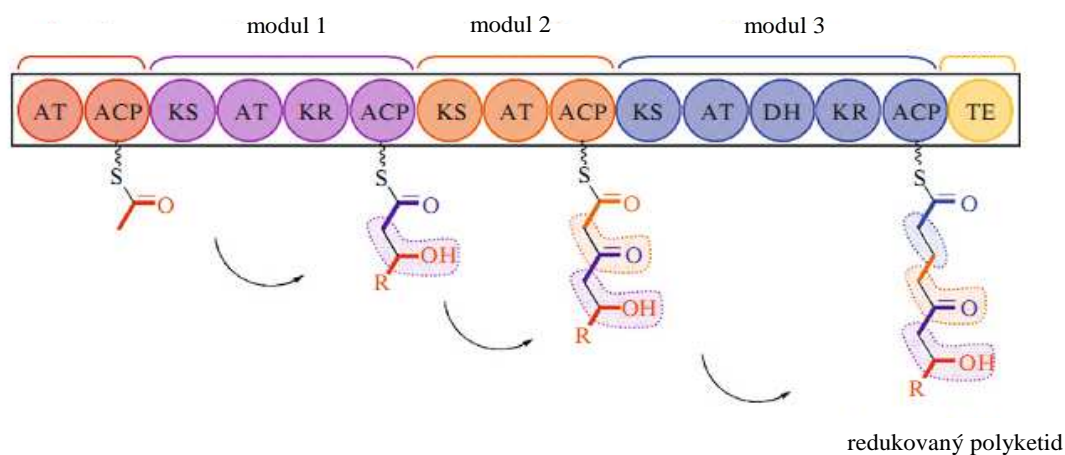
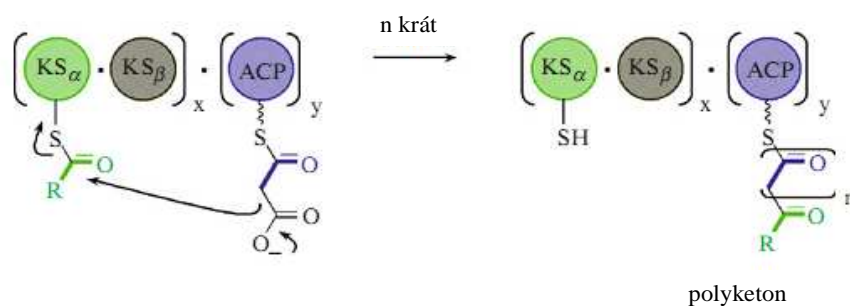
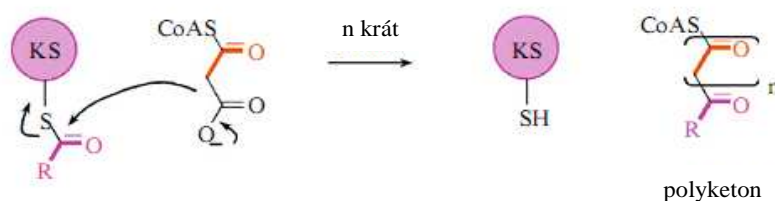
PKS typu I jsou velké proteinové komplexy organizované v opakující se moduly. Každý modul obsahuje minimálně tři funkční domény, dvě s katalytickou funkcí a jednu vazebnou doménu, které se podílejí na vzniku základního řetězce a účastní se biosyntézy vždy jednou (jsou to neiterativní enzymy). Moduly mohou obsahovat i další domény katalyzující různé specifické modifikace (redukce, dehydratace, methylace, cyklizace), zvyšující strukturní variabilitu produktu, ale i ukončení syntézy.

Rostoucí řetězec antibiotika je předáván z jedné SH skupiny na druhou sérií transacylačních reakcí a nakonec je uvolněn hydrolýzou. Ve startovací fázi je acetyl-CoA (případně propionyl-CoA, malonyl-CoA nebo methylmalonyl-CoA) rozpoznán a aktivován pomocí adenylace acyltransferasovou (AT) doménou. Aktivovaný prekurzor je přenesen na fosfopantetheinový zbytek navázaný na přenašeč acylových zbytků (acyl carrier protein ACP). Při tomto přenosu dochází k odštěpení molekuly AMP a tvorbě thioesterové vazby mezi acylovou skupinou a fosfopantetheinovým zbytkem. V elongační fázi je polyketidový řetězec předán z ACP domény prvního modulu na ketosynthetasovou (KS) doménu dalšího.

KS doména katalyzuje dekarboxylační kondenzaci dvou sousedících acylových skupin na rostoucí řetězec. Polyketidový řetězec může být modifikován dalšími doménami modulu jako např. ketoreduktasovou doménou (KR) katalyzující redukci β -ketoskupiny na β -hydroxyskupinu; dehydratasovou doménou (DH) odštěpující molekulu H_2O nebo enoyl-reduktasovou (ER) doménou redukující dvojnou vazbu. Důležité je, že tyto domény modifikují prekurzor přidaný předcházejícím modulem, ne prekurzor navázaný na ACP doméně modulu s modifikační doménou. V terminační fázi thioesterasová doména (TE) hydrolyzuje kompletní polyketidový řetězec z ACP domény předchozího modulu (WEISSMAN 2009; obr. 4).

PKS typu II jsou vícepodjednotkové iterativní enzymy, kde zařazení každé základní jednotky vznikajícího polyketidu je opakovaně katalyzováno vždy stejnou sadou podjednotek enzymu (HERTWECK 2007; obr. 4).

PKS typu III jsou iterativní enzymy, které nevyužívají ACP doménu (WEISSMAN 2009; obr. 4).

PKS I**PKS II****PKS III**

Obr. 4: Schematické znázornění tří typů PKS (převzato z WEISSMAN 2009).

PKS I – neiterativní, každý modul se účastní biosyntézy jednou

PKS II – iterativní, jednotlivé katalytické funkce jsou realizovány oddělenými podjednotkami tvořícími funkční komplex

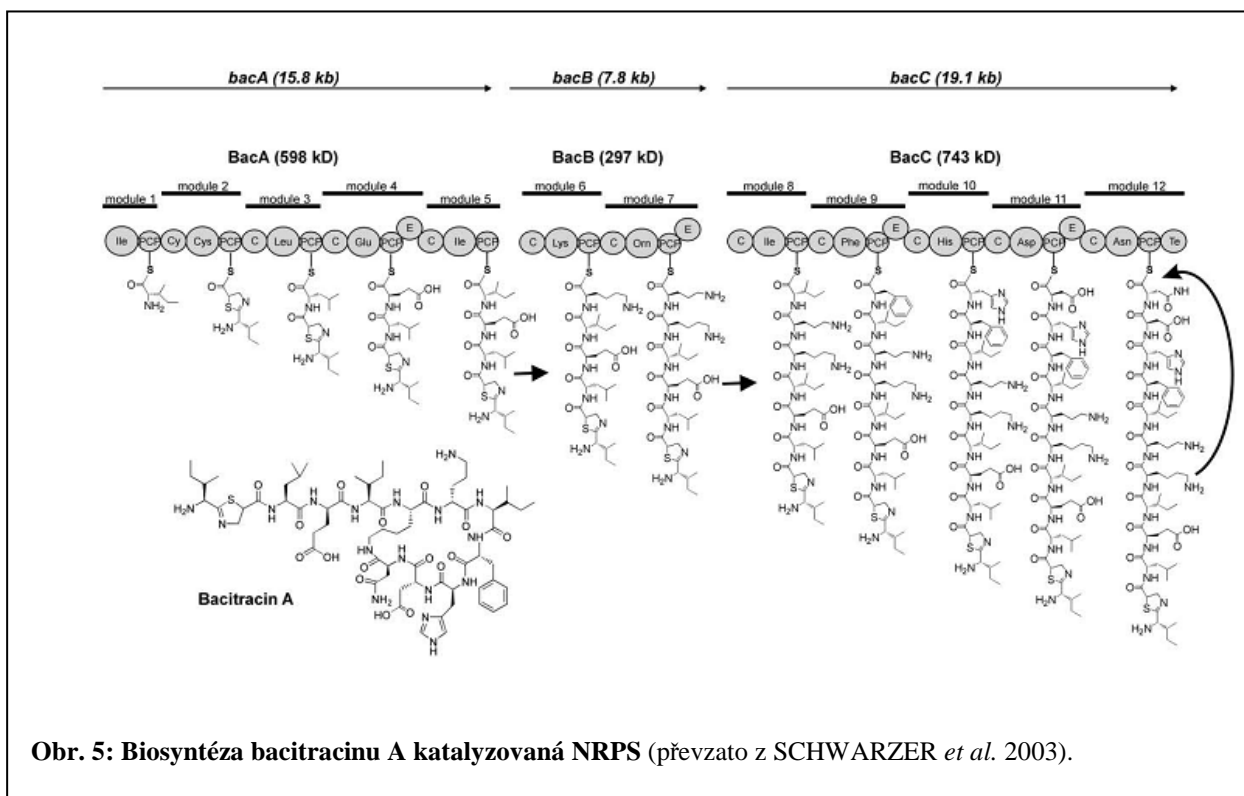
PKS III – iterativní, nezávislé na ACP, všechny biosyntetické kroky vedoucí k polyketonu se odehrávají v jednom multifunkčním aktivním místě.

2.2.1.2.2. Neribozomální peptidové synthasy

Uspořádání modulárních NRPS je podobné jako u PKS I. V obou systémech jsou jednotlivé intermediáty ve formě thioesterů kovalentně vázány na fosfopantetheinovou prostetickou skupinu. Většinou 4'fosfopantetheinyltransferasa specifická pro modulární enzymy modifikuje serinový zbytek v aktivním místě thiolační domény NRPS (peptidyl carrier protein - PCP nebo acyl carrier protein - ACP), čímž vzniká daný holoenzym (obr. 5).

Jádro každého NRPS modulu obsahuje tři domény: 1. adenylační (A), která vybírá aminokyselinu, aktivuje ji ve formě acyladenylátu a přesune na PCP, kde se tvoří thioesterová vazba, 2. kondenzační (C) doména, kde se tvoří peptidová vazba mezi aminokyselinou navázanou na PCP modulu a peptidylovým intermediátem navázaným na PCP modulu předcházejícího a 3. samotnou PCP doménu. Moduly mohou obsahovat další domény, například epimerasovou a methyltransferasovou (obr. 5). V posledním kroku TE doména hydrolyzuje a cyklizuje kompletní polypeptidový řetězec z ACP domény předchozího modulu (SCHWARZER *et al.* 2003).

Stejně jako u PKS dochází po syntéze základního makrolaktonového nebo peptidového kruhu k dalším ornamentujícím úpravám např. oxygenasami a glykosyltransferasami (WALSH 2002, 2003).

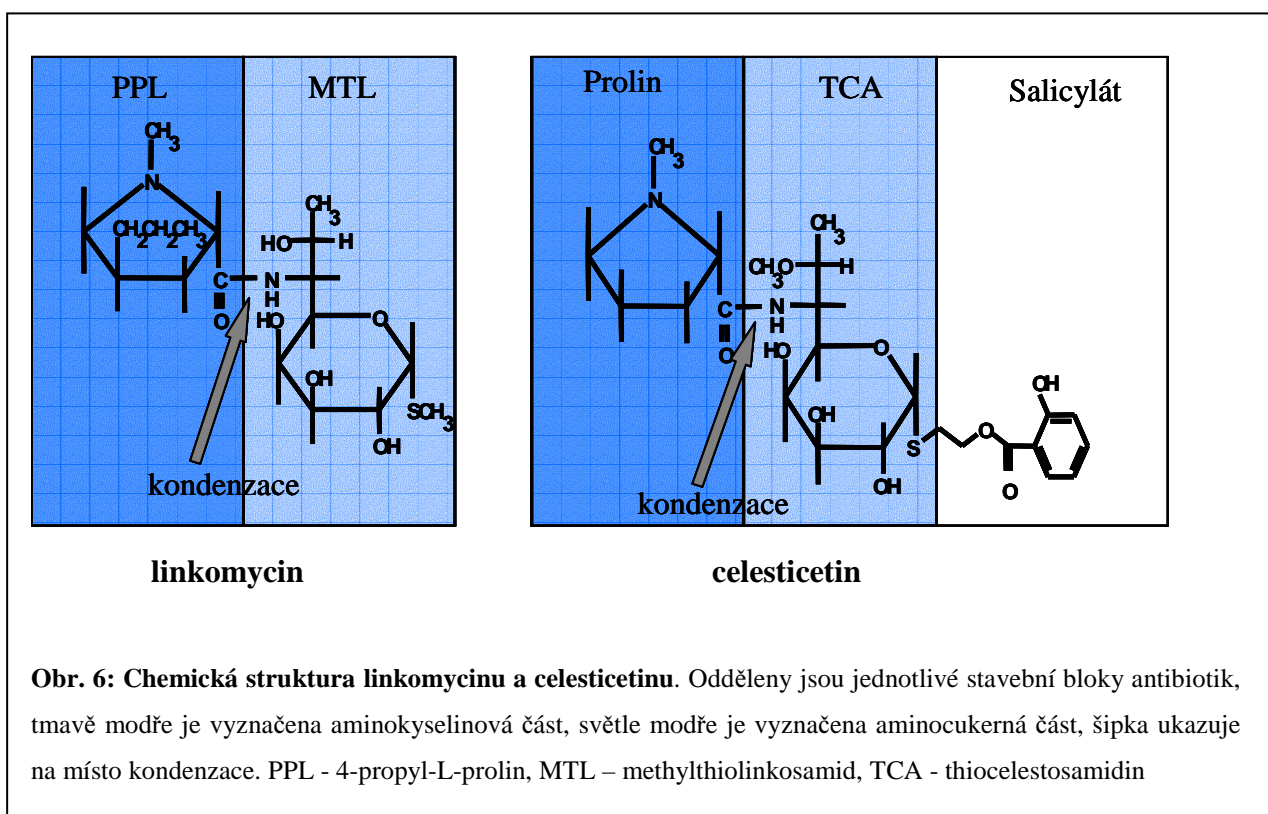


Obr. 5: Biosyntéza bacitracinu A katalyzovaná NRPS (převzato z SCHWARZER *et al.* 2003).

2.3. Linkosamidy

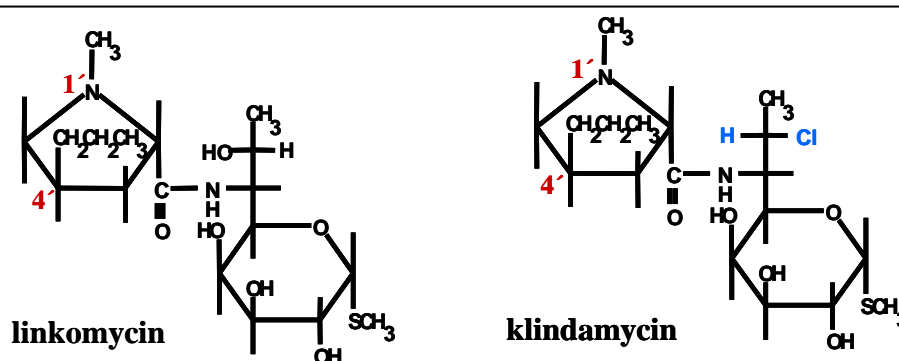
2.3.1. Struktura linkosamidových antibiotik

Z linkosamidových antibiotik byl dosud podrobněji charakterizován linkomycin a celesticetin. Klinicky významnější je linkomycin produkovaný *Streptomyces lincolnensis*, který se používá proti gram-pozitivním kokům, např. stafylokokům a streptokokům. Celesticetin produkovaný *S. caelestis* vykazuje asi jen 5% antibakteriální aktivitu linkomycinu a klinicky využívaný není. U linkosamidových antibiotik lze rozlišit aminocukernou a aminokyselinovou stavební jednotku spojené amidovou vazbou (obr. 6), u celesticetinu je ještě připojena salicylátová jednotka. V biosyntetické dráze linkosamidů jsou patrné prvky aminoglykosidových a peptidových antibiotik.



Chemickou modifikací linkomycinu se připravuje klinicky používaný derivát klindamycin (7-chloro-7-deoxylinkomycin; obr. 7). Kromě hlavního využití jako antibakteriálního agens, jsou popsány v literatuře i aplikace klindamycinu v kombinaci s chlorochinem a chininem v léčbě malárie způsobené *Plasmodium falciparum*. Kombinace s chininem je zvláště vhodná pro děti a v oblastech, kde je rozšířená rezistence ke chlorochinu (GRIFFITH *et al.* 2007, LELL a KREMSNER 2002). Účinnější skupinou látek jsou deriváty klindamycinu, které mají místo propylu v pozici C4' delší alkylový řetězec a z nich jsou nejúčinnějšími deriváty s pětičlenným nebo delším alkylem. Pokud navíc neobsahují methyl na dusíkovém atomu v pozici 1', je jejich antimikrobiální i antimalarická aktivita několikanásobně vyšší, než u derivátů methylovaných (MAGERLEIN a KAGAN 1969; obr. 7, tab. 1). Z testovaných derivátů linkomycinu se také ukázaly nejúčinnější 4'-alkyl-4'-depropyl-linkomyciny, které mají vyšší aktivitu a širší antimikrobiální spektrum než linkomycin.

Příprava těchto derivátů vyžaduje několikastupňovou chemickou syntézu, která je finančně náročná. Byla testována produkce derivátů prekurzorem řízenou biosyntézou, tj. obohacením kultivačního média o deriváty prolinu (VISSER 1972). Tento přístup však vede ke směsi přirozeného a nepřirozeného produktu, což komplikuje purifikaci žádoucí látky. Pro přípravu 4'-butyl-4'-depropyl-linkomycinu a 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycinu byl účinně využit mutasyntetický přístup. Inaktivací genu *lmbX* byl připraven kmen defektní v biosyntéze aminokyselinové části linkomycinu PPL, a tím i linkomycinu (SMUTNÁ 2007), do jehož kultivačního média byly přidávány deriváty prolinu 4-L-butylprolin nebo 4-L-pentylprolin. To vedlo k produkci derivátů linkomycinu s delším alkylovým řetězcem v pozici 4' bez kontaminace linkomycinem (ULANOVA *et al.* 2010).



Obr. 7: Vzorce linkomycinu a klindamycinu. Červeně jsou vyznačené pozice, ve kterých byla antibiotika modifikována, modře jsou vyznačené skupiny, ve kterých se linkomycin a klindamycin liší.

Tab. 1. Antimalarická aktivita linkomycinu a analogů klindamycinu u myši infikovaných *Plasmodium berghei* (upraveno podle MAGERLEIN 1971).

MED = dávka, při které byl v porovnání s neléčenými kontrolami statisticky významně prodloužen medián doby přežití (ST₅₀); CD₅₀ = medián protektivní dávky; CD₁₀₀ = dávka, která ochránila 100 % zvířat.

	MED (mg/kg)		CD ₅₀ (mg/kg)		CD ₁₀₀ (mg/kg)	
	podkožně	orálně	podkožně	orálně	podkožně	orálně
Chlorochin	10	12,5	8,1	14	20	25
Diaminodifenylsulfon	3,12	6,5	25	38	50	100
Linkomycin	> 160	> 400	> 100	> 400	> 160	> 400
Klindamycin	5,0	12	113	141	160	250
1'-demethyl-1'-ethylklindamycin	> 100	250	> 100	> 250	> 160	> 250
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-butyl-1'-ethylklindamycin	8,0	15	57	62	100	150
1'-demethylklindamycin	1,2	3,1	19,0	37	40	50
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-pentylklindamycin	0,31	1,6	4,7	12	10	25
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-hexylklindamycin	0,6	1,6	6,6	14	20	50

2.3.2. Mechanismus účinku a rezistence

Linkosamidy se váží na několik nukleotidů (včetně klíčového A2058) 23S rRNA 50S podjednotky bakteriálního ribozómu a způsobují tak disociaci peptidyl-tRNA (TENSON *et al.* 2003).

Rezistenci linkosamidů zajišťují tři základní mechanismy: modifikace zásahového místa, inaktivace antibiotika a aktivní eflux.

Modifikace zásahového místa je příčinou zkřížené rezistence linkosamidů, makrolidů a streptograminů B (MLS_B rezistence). Tzv. *erm* geny kódují proteiny methylující N⁶ adeninového zbytku A2058 v peptidyltransferasovém místě 23S rRNA, čímž brání vazbě antibiotika (WEISBLUM 1995). Jedná se buď o monomethylasy, mezi které patří LmrB kódovaná linkomycinovým shlukem genů, a které zajišťují rezistenci k vysokým (>1000 µg/ml) koncentracím linkosamidů a nižším (>50–200 µg/ml) koncentracím erythromycinu, tylosinu a karbomycinu. Naproti tomu dimethylasy udělují rezistenci k vysokým

(>1000 µg/ml) koncentracím všech pěti antibiotik (CALCUTT a CUNDLIFFE 1990, BURIANKOVA *et al.* 2004) a patří mezi ně například Erm(C) stafylokoků (SHIVAKUMAR a DUBNAU 1981).

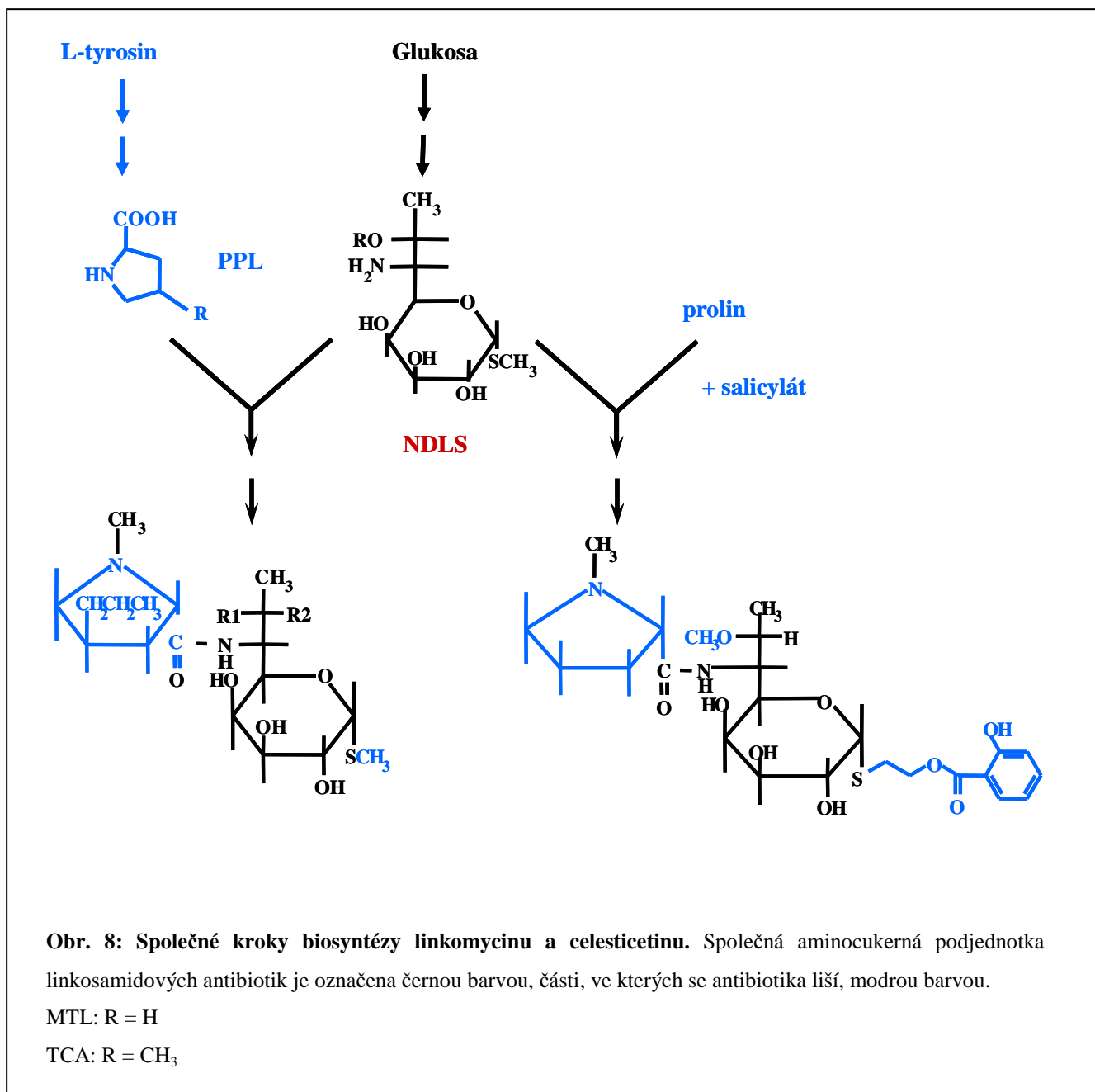
Specifická rezistence pouze k linkosamidům je dána enzymatickou inaktivací antibiotika. U *Staphylococcus haemolyticus* a *Staphylococcus aureus* byla popsána specifická O-nukleotidyltransferasa kódovaná geny *lnu(A)* a *lnu(A')* (BRISSON-NOEL *et al.* 1988). Dalších pět variant nukleotidyltransferas inaktivujících linkosamidy bylo popsáno u gram-positivních (BOZDOGAN *et al.* 1999, ACHARD *et al.* 2005) i gram-negativních (HEIR *et al.* 2004, WANG *et al.* 2000) mikroorganismů.

Aktivní eflux linkosamidových antibiotik zajišťují proteiny rodin transportérů MFS (major facilitator superfamily), které pro export látek využívají protonový gradient a patří mezi ně proteinový produkt genu z linkomycinového shluku *lmrA* (ZHANG *et al.* 1992). Druhou rodinou jsou ABC (ATP-binding cassette) transportéry získávající energii pro transport hydrolýzou ATP, mezi které patří *LmrC* kódovaný linkomycinovým biosyntetickým shlukem (PESCHKE *et al.* 1995). U klinických izolátů byly popsány i další ABC transportéry jako například protein *VgaA_{LC}* ze *Staphylococcus haemolyticus* způsobující aktivní eflux streptograminu A a linkosamidů (NOVOTNÁ a JANATA 2006).

2.3.3. Biosyntetická dráha linkosamidů

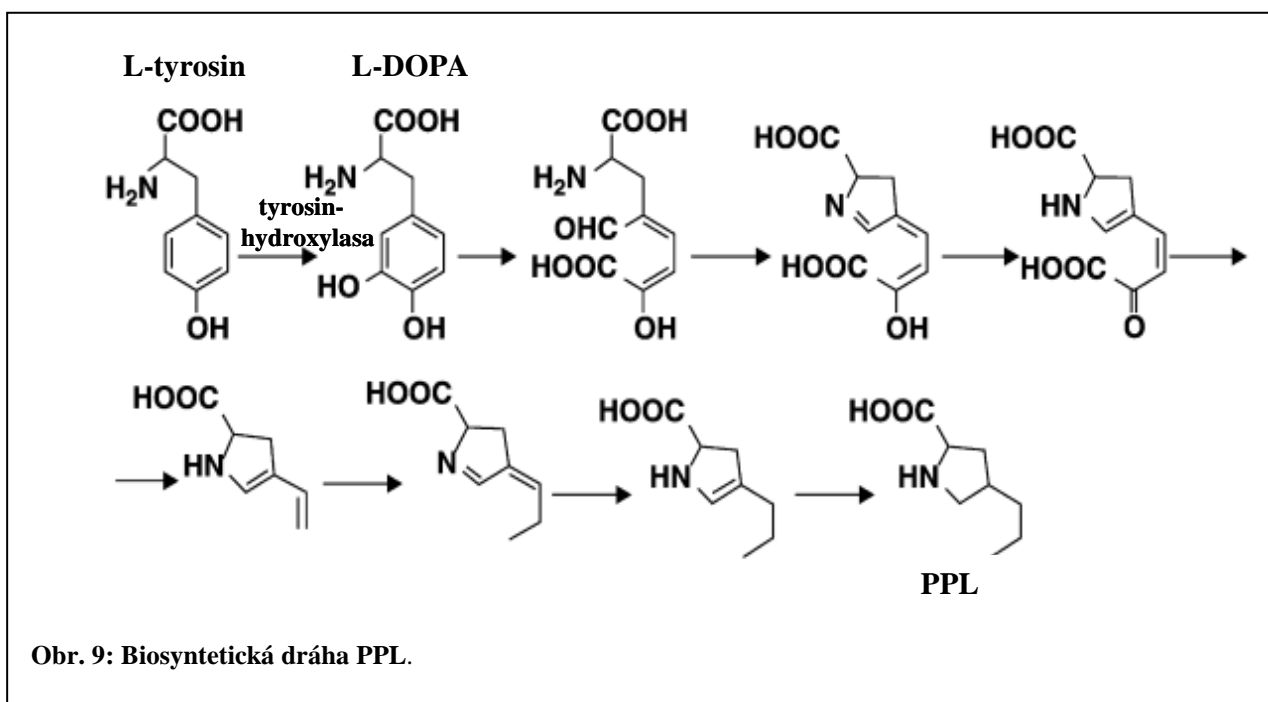
V biosyntéze linkomycinu dochází k oddělené syntéze dvou prekurzorů 4-propyl-L-prolinu (PPL) a methylthiolinkosamidu (MTL). Ty jsou následně kondenzací spojeny a vzniká N-demethyllinkomycin (NDL). Reakci katalyzuje klíčový enzym biosyntézy N-demethyllinkosamidsynthetasa (NDLS). V závěrečném kroku biosyntézy je NDL methylován na výsledný linkomycin (BRAHME *et al.* 1984a, BRAHME *et al.* 1984b, CHUNG *et al.* 1997).

Společnou částí biosyntézy linkomycinu a celesticetinu je biosyntéza cukerné části (obr. 8), MTL u linkomycinu a TCA (thiocelestosamidin) u celesticetinu, které se liší pouze v ornamentaci. Aminokyselinovou částí celesticetinu je proteinogenní prolin přítomný v buňce. V biosyntéze dochází navíc k připojení salicylátové podjednotky přes dvouuhlíkatý řetězec.



2.3.3.1. Biosyntéza aminokyselinové části linkomycinu, 4-propyl-L-prolinu

PPL vzniká z aminokyseliny L-tyrosinu, který je nejdříve enzymem L-tyrosin 3-hydroxylasou přeměněn na 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Dalším krokem je 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu L-DOPA katalyzované dioxygenasou a následná cyklizace produktu za vzniku pyrrolového kruhu (obr. 9), kdy vzniká kyselina 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová (NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNÁ *et al.* 2004). Zbývající kroky biosyntézy PPL nebyly zatím přesně popsány. 2,3-extradiolové štěpení a následná cyklizace do pyrrolového kruhu je společná s biosyntézou pyrrolobenzodiazepinových antibiotik (PBD).

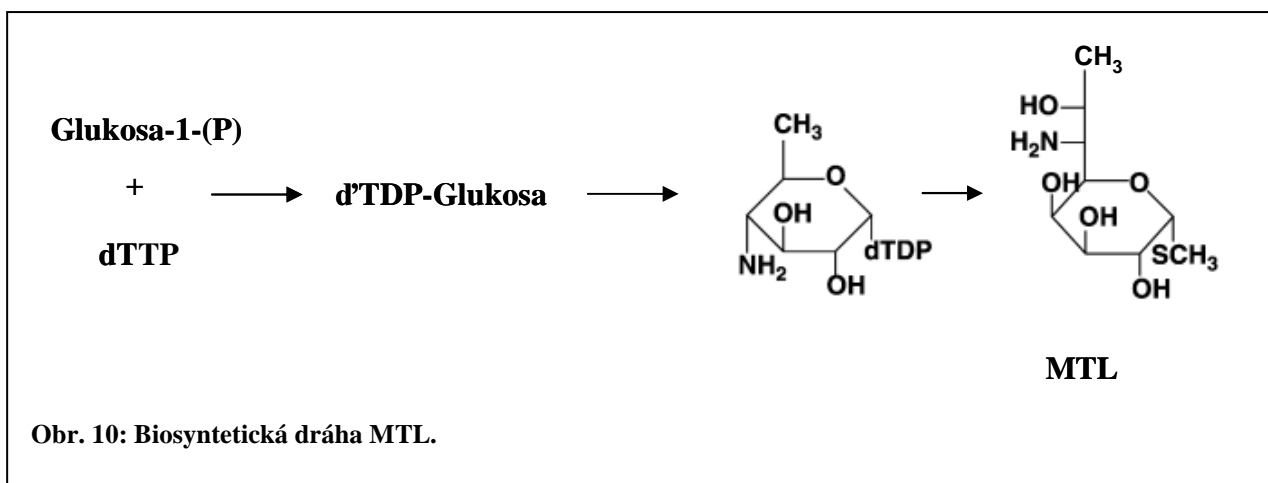


Obr. 9: Biosyntetická dráha PPL.

2.3.3.2. Biosyntéza aminocukerné části linkomycinu, methylthiolinkosamidu

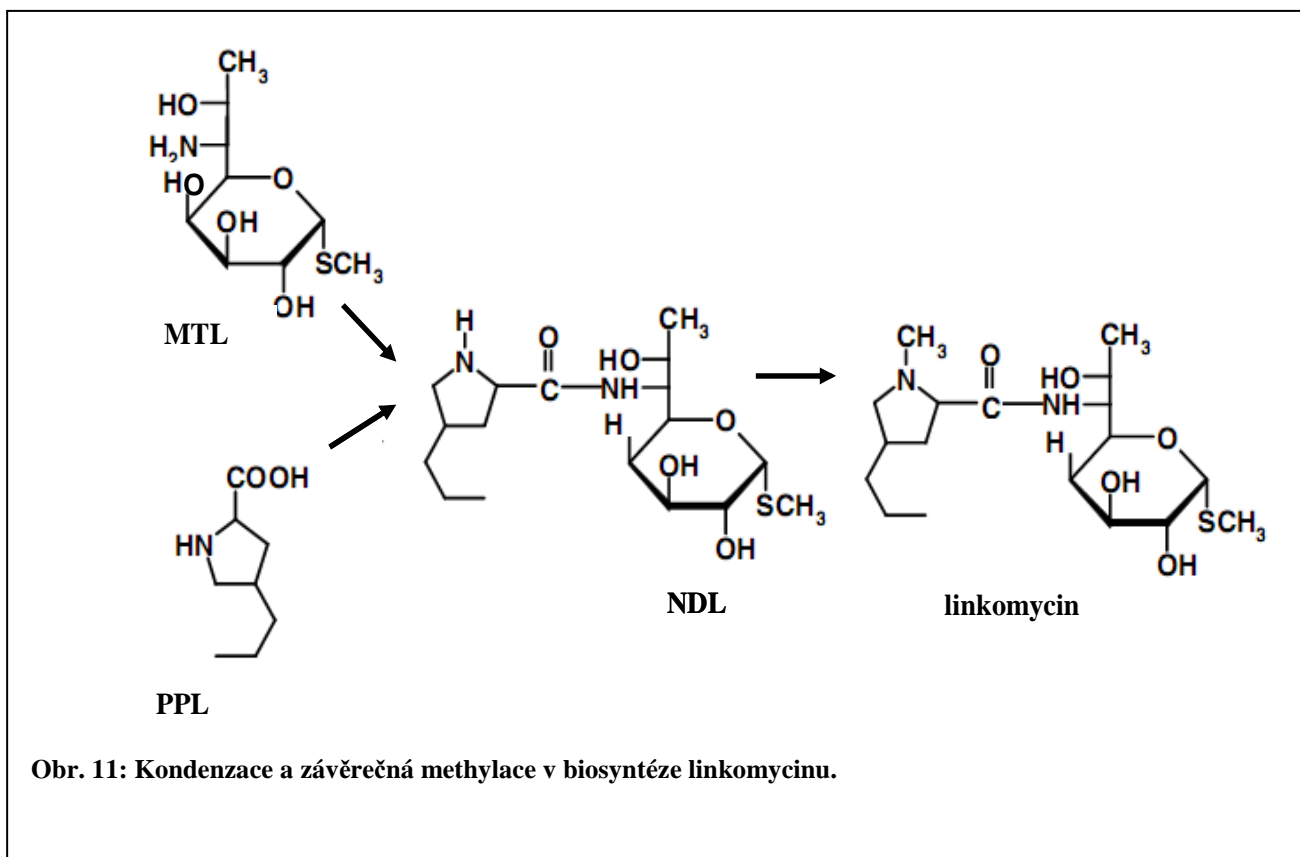
Žádný intermediát biosyntézy MTL nebyl dosud identifikován. Dřívější předpoklad, že C8 uhlíkový skelet MTL vzniká kondenzací C5 a C3 jednotek (BRAHME *et al.* 1984a) byl vyvrácen osekvenováním shluku genů pro biosyntézu linkomycinu. Analýza genů a jejich porovnání s databázemi ukázaly, že geny pro biosyntézu MTL se nacházejí v tzv. cukerném shluku (PESCHKE *et al.* 1995). Na základě homologie se předpokládá, že na začátku dráhy je nukleotidylační aktivační krok, po kterém následují modifikační kroky probíhající na nukleotidem (nejspíše dTDP) aktivovaném cukerném intermediátu. Vzniká tedy dTDP-aktivovaná glukosa, která je přeměněna na dTDP-deoxyaminointermediát, z něhož vzniká C8-cukerná složka (PESCHKE *et al.* 1995; obr. 10).

S-methylová skupina na pravděpodobně pochází z S-adenosylmethioninu (CHUNG *et al.* 1997).



2.3.3.3. Kondenzace a závěrečná methylace

Aminocukerná část linkomycinu (MTL) je spojena s aminokyselinovou částí (PPL) amidovou vazbou činností vícepodjednotkového enzymu NDLS. Tento multimerní komplex má některé společné rysy s NRPS. Kondenzací aminoskupiny MTL s karboxyskupinou PPL tak vzniká N-demethyllinkomycin (NDL), který je v závěrečném kroku biosyntézy methylován na linkomycin (CHUNG *et al.* 1997; obr. 11).

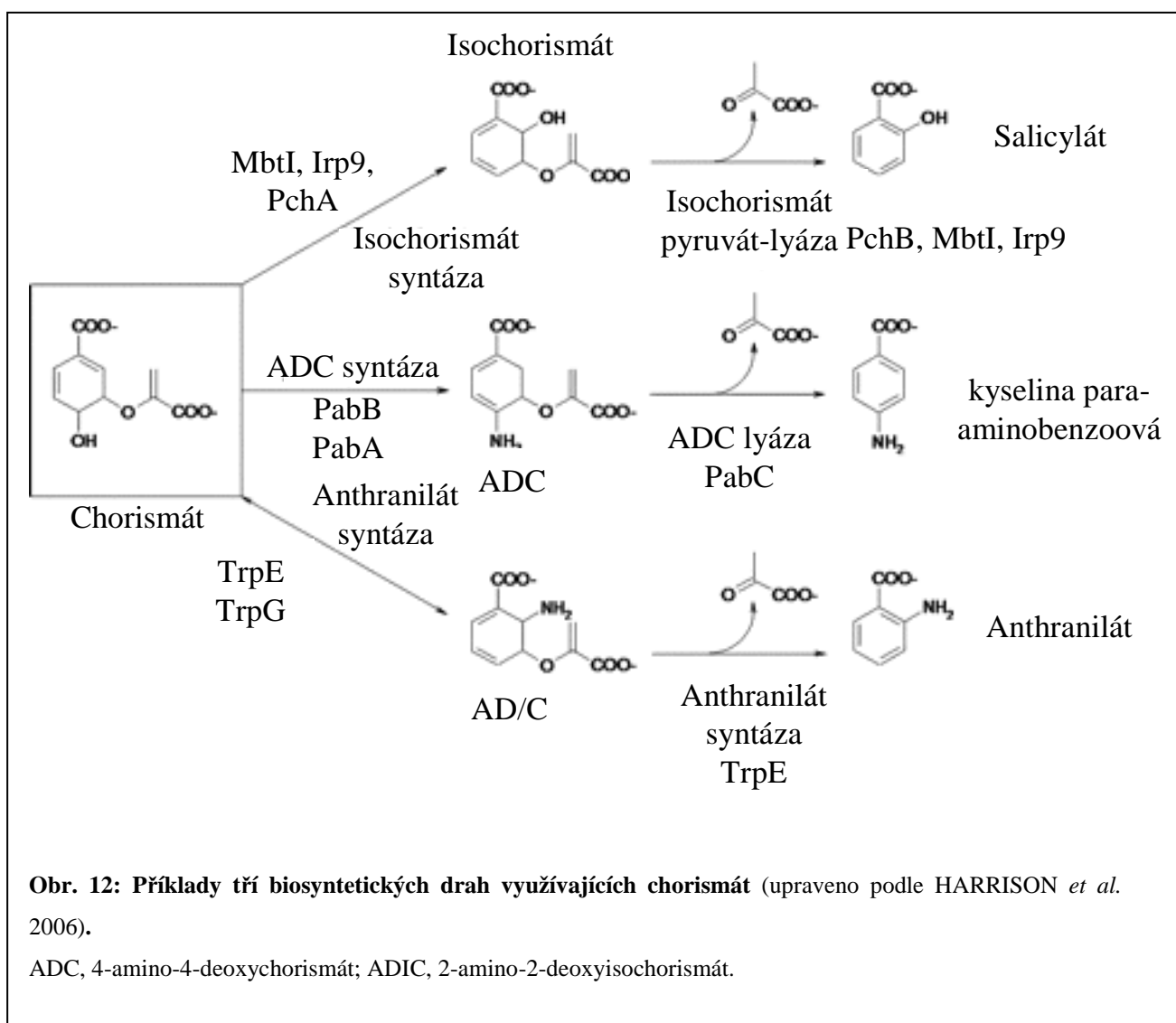


Obr. 11: Kondenzace a závěrečná methylace v biosyntéze linkomycinu.

2.3.3.4. Biosyntéza salicylátové jednotky v biosyntéze celesticetinu

Antibiotikum celesticetin se skládá z aminocukru TCA, aminokyseliny prolinu a salicylátu (obr. 6). Způsob, jakým dochází k biosyntéze salicylátu u celesticetinu nebyl zatím popsán. Salicylát je důležitou součástí mnoha sideroforů a dosud jsou známy různé způsoby jeho biosyntézy. U *Pseudomonas aeruginosa* dochází k přeměně chorismátu na salicylát ve dvou krocích. První krok katalyzuje isochorismátsynthasa PchA, druhý isochorismát-pyruvátlyasa PchB odštěpující pyruvát (GAILLE *et al.* 2002). Podobná situace je například v biosyntéze kyseliny para-aminobenzoové, kde enzym PabB katalyzuje chemickou modifikaci chorismátu (připojení aminoskupiny), zatímco PabC funguje jako lyasa (GREEN

et al. 1992). Naproti tomu v biosyntéze tryptofanu, enzym TrpE katalyzuje jak chemickou modifikaci, tak i oddělení pyruvátu (ZALKIN *et al.* 1985; obr. 12). Později byla salicylátsyntetasa Irp9 katalyzující jak izomerizaci, tak lyasovou reakci, popsána u *Yersinia enterocolitica* (PELLUDAT *et al.* 2003, KERBARH *et al.* 2005). Ke stejné konverzi chorismátu přímo na salicylát katalyzované jedním enzymem MbtI dochází i u *Mycobacterium tuberculosis* (HARRISON *et al.* 2006).



2.3.4. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu

Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu byl poprvé izolován a sekvenován z vysokoprodukčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995). Obsahuje 29 otevřených čtecích rámců, včetně tří genů kódujících rezistenci (*lmr* geny): *lmrA* kóduje protein MFS transportéru. Gen *lmrB* kóduje protein patřící mezi 23S rRNA methyltransferasy (ZHANG *et al.* 1992) a *lmrC* kóduje protein z rodiny ABC transportéru (PESCHKE *et al.* 1995). Další informace viz. též kapitola 2.3.2.

Zbývajících 26 genů (*lmb* geny) kóduje biosyntetické a regulační funkce. Biosyntetické geny jsou zřetelně uspořádané do modulů kódujících jednotlivé části antibiotika.

Experimentálně byla dosud prokázána funkce pouze několika proteinů kódovaných shlukem. Enzym kódovaný genem *lmbB2* řídí první krok v biosyntéze PPL. *LmbB2* je neobvyklá monooxygenasa katalyzující hydroxylaci L-tyrosinu na DOPA, která má jako prostetickou skupinu Fe-protoporfyrin IX (hem b) a jako donor redoxních ekvivalentů používá tetrahydrobiopterin (NOVOTNÁ *et al.* 2008).

Enzym *LmbB1* je dioxygenasa katalyzující 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu L-DOPA. Z bezprostředního produktu štěpení, 2,3-secoDOPA, vzniká kyselina 4-(karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrolo-2-karboxylová intramolekulární cyklizací a to nejpravděpodobněji za přispění *LmbB1* (NOVOTNÁ *et al.* 2004). *LmbJ* katalyzuje závěrečný krok biosyntézy, methylaci NDL (KADLEC 2000).

Byla potvrzena účast produktu genu *lmbX* v biosyntéze PPL, protože inaktivací tohoto genu byl získán kmen defektní v tvorbě PPL (SMUTNÁ 2007, ULANOVA *et al.* 2010).

Funkce ostatních genů nebyla zatím potvrzena experimentálně, nicméně na základě porovnání s ostatními geny sekundárního metabolismu v databázích lze odvodit několik informací:

1. Homology genů *lmbA*, *B1*, *B2*, *X*, *Y* a *W*, které pravděpodobně kódují aminokyselinovou stavební jednotku antibiotika PPL, byly nalezeny u producenta anthramycinu (HU *et al.* 2007), sibiromycinu (LI *et al.* 2009a) a kromě homologu *lmbW* i u tomaymycinu (LI *et al.* 2009b; tab.2), tedy PBD antibiotik, v jejichž biosyntéze se vyskytuje podobná aminokyselinová podjednotka jako v biosyntéze linkosamidů (HU *et al.* 2007).

2. Geny *lmbK*, *L*, *M*, *N*, *O*, *P*, *R*, *S*, *T* jsou všechny souhlasně orientovány a vykazují vysokou míru podobnosti s geny kódujícími enzymy metabolismu deoxyaminocukrů popsaných u jiných aktinomycet (PESCHKE *et al.* 1995, PISSOWOTZKI *et al.* 1991). Jejich homology spolu s geny *lmbQ*, *T* a *V* byly navíc detekovány DNA sondami v produkčním organismu

druhého linkosamidového antibiotika celesticetinu, *S. caelestis* (ČERMÁK *et al.* 2007), které s linkomycinem sdílí aminocukernou část.

3. Geny *lmbIH* a *lmbQ* jsou vzájemně homologní (s nízkou mírou homologie) a jejich produkty patří do rodiny TldD/TldE proteinů - modulátorů DNA gyrazy (MURAYAMA *et al.* 1996). Geny této skupiny se často vyskytují jako překrývající se jako například *calR6/calR5* u *Micromonospora echinospora* (ALHERT *et al.* 2002) nebo jsou tyto páry genů blízko sebe. Protein LmbIH, ve srovnání s proteinem LmbJ s prokázanou biosyntetickou funkcí, je v buňce přítomen v nízké koncentraci a technikou Western-blotu je detekovatelný pouze v krátkém úseku růstové křivky. Tento fakt také naznačuje, že LmbIH má regulační roli (HOLÁ *et al.* 2003).

4. Homology genu *lmbU* byly nalezeny u řady jiných biosyntetických shluků: *novE* z novobiocinového, *cloE* z chlorbiocinového a *couE* z koumermycinového shluku (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 působí jako pozitivní regulátory biosyntézy (DANGEL *et al.* 2008).

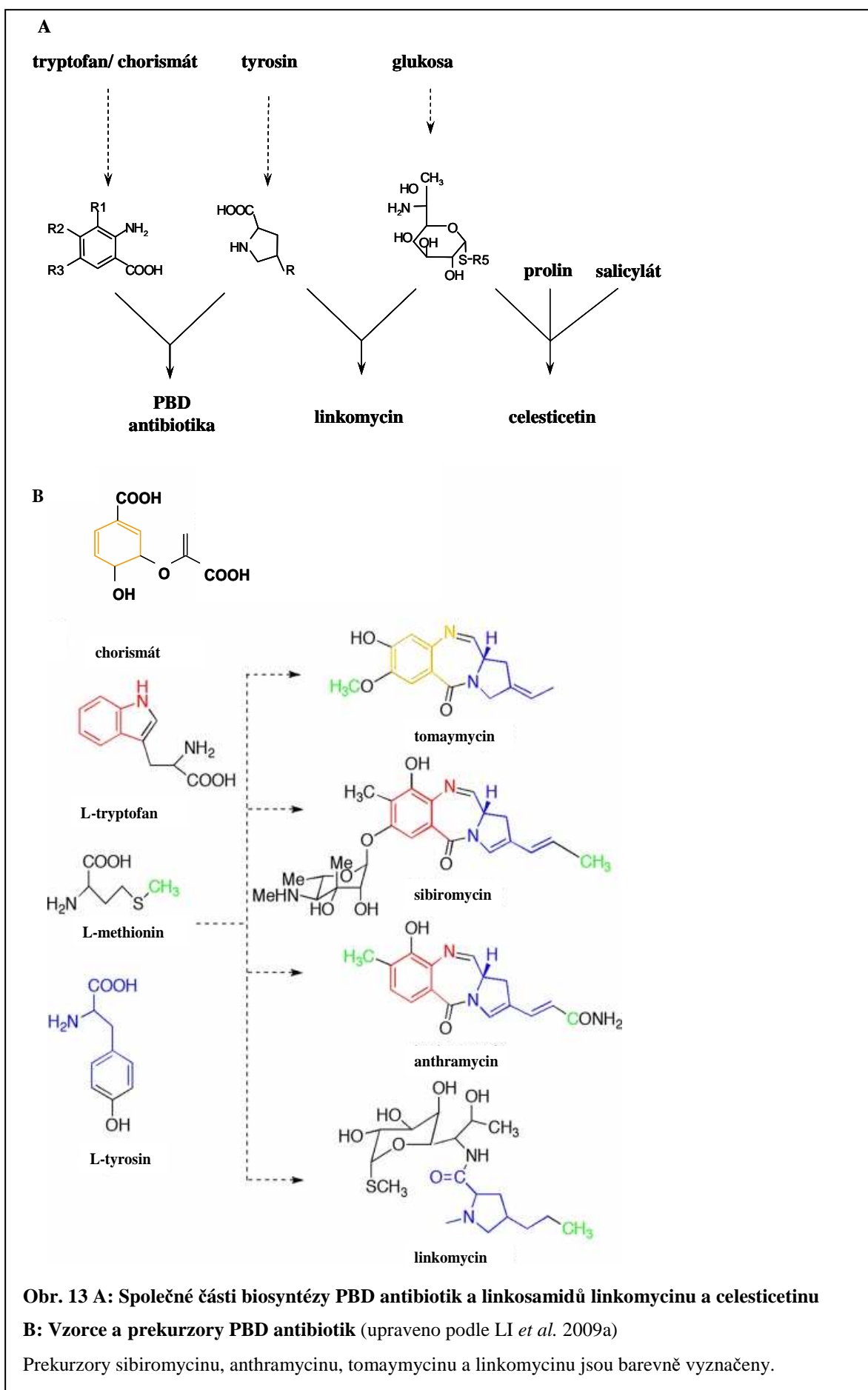
2.4. Antibiotika biosynteticky podobná linkosamidům, pyrrolo-benzodiazepinová antibiotika

Pyrrolo-benzodiazepinová antibiotika (PBD) se strukturně a funkčně od linkosamidů velmi liší, nicméně obě skupiny antibiotik mají společnou část biosyntézy (obr. 13).

PBD antibiotika se skládají ze dvou částí: anthranilátu a prolinové podjednotky spojených peptidovou vazbou a následným spontánním uzavřením kruhu (HURLEY a ROKEM 1983). Derivát prolinu s postranním řetězcem v poloze 4 je, stejně jako u linkomycinu, syntetizován z L-tyrosinu přes intermediáty L-DOPA a kyselinu 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylovou. Tato analogie reflektuje částečnou fúzi linkosamidové a PBD biosyntetické dráhy v průběhu evoluční historie linkomycinu. Tři dosud nejstudovanější PBD antibiotika, sekvence jejichž shluků byla publikována, jsou anthramycin (HU *et al.* 2007), sibiromycin (LI *et al.* 2009a) a tomaymycin (LI *et al.* 2009b). Podle očekávání se ve všech třech genových shlucích vyskytují homology genů *lmbA*, *B1*, *B2*, *X*, *Y* a kromě tomaymycinu i *lmbW*, které pravděpodobně kódují biosyntézu PPL (tab. 2).

Přírozně produkované PBD jsou monomerní sloučeniny, které specificky alkylují sekvenci a 5'-Pu-G-Pu 3' v malém žlábků DNA (PUVVADA *et al.* 1997). Vazba na DNA vede k protinádorové aktivitě těchto látek. Chemická diverzita mezi PBD je dána různými substituenty A a C kruhů (obr. 13). Kruh C může být plně nasycený, obsahovat nenasycenou vazbu mezi C2 a C3, případně může být exocylicky nenasycený v C2, jako je tomu u neothramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu. Synteticky bylo připraveno jen omezené množství derivátů PBD antibiotik, protože přítomnost iminové vazby omezuje jejich syntézu na dostupné prekurzory (ANTONOW *et al.* 2007, KAMAL *et al.* 2002, KUMAR *et al.* 2003, TIBERGHIE *et al.* 2004).

Dvě hlavní skupiny PBD antibiotik se odlišují přítomností OH skupiny v pozici C9 anthranilátové podjednotky (obr. 14, 13B). Bylo prokázáno, že původ anthranilátové podjednotky je u těchto dvou skupin různý (LI *et al.* 2009b). U substituovaných antibiotik (jako je anthramycin nebo sibiromycin) byla v biosyntéze adaptována degrační dráha primárního metabolismu, kde z tryptofanu vzniká 3-hydroxyanthranilát. V biosyntetické dráze druhé skupiny (nesubstituovaná antibiotika v C9 jako např. tomaymycin) je anthranilátová podjednotka odvozena z chorismátu (obr. 12, 13B), produktu šikimátové biosyntetické dráhy, který je následně pomocí anthranilátsynthetasy přeměněn na kyselinu anthranilovou (LI *et al.* 2009b).



Tab. 2. Proteiny, jejichž homology se vyskytují jak v biosyntéze linkomycinu, tak vybraných PBD antibiotik.

Biosyntéza linkomycinu	Biosyntéza anthramycinu	Biosyntéza sibiromycinu	Biosyntéza tomaymycinu	Pravděpodobná funkce
Lmb A	ORF 6 (75%)	Sib Y (58%)	Tom L (60%)	γ -glutamyltransferasa, katalyzuje redukci 4-propylidene-tetrahydropyrrol-2-karboxylové kyseliny (LI <i>et al.</i> 2009a)
Lmb B1	ORF 12 (49%)	Sib V (55%)	Tom H (57%)	L-DOPA 2,3-dioxygenasa (NEUSSER <i>et al.</i> 1998, NOVOTNÁ <i>et al.</i> 2004)
Lmb B2	ORF 13 (39%)	Sib U (43%)	Tom I (42%)	tyrosinhydroxylasa (NOVOTNÁ <i>et al.</i> 2004)
Lmb W	ORF 5 (78%)	Sib Z (61%)		methyltransferasa, methylace propylového nebo propylidenového řetězce (HURLEY <i>et al.</i> 1980, BRAHME <i>et al.</i> 1984a)
Lmb X	ORF 15 (34%)	Sib S (43%)	Tom K (48%)	hydrolýza C-C vazby 4-(3-karboxy-3-oxopropenyl)-2,3-dihydro-1-H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (LI <i>et al.</i> 2009a)
Lmb Y	ORF 14 (51%)	Sib T (55%)	Tom J (54%)	F-420-dependentní reduktasa, katalyzuje redukci of 4-propyliden tetrahydropyrrol-2-karboxylové kyseliny (LI <i>et al.</i> 2009a)

2.4.1. Anthramycin

Anthramycin (obr. 14) produkovaný *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* je zajímavá látka hlavně pro své protinádorové účinky. Vykazuje i relativně malou antibiotickou aktivitu, má slabé účinky proti *Trichomonas* a *Entamoeba*, kde inhibuje syntézu RNA a DNA. Anthramycin se váže na 10 bp dlouhou sekvenci C-C-A-A-C-G-T-T-G-G. Molekula antibiotika se váže přes C11 na N2 předposledního guaninu řetězce. Přirozený ohyb molekuly kopíruje vinutí malého žlábků DNA (KOPKA *et al.* 1994). Kvůli vysoké kardiotoxicitě anthramycinu byly na jeho bázi připraveny nové PBD látky, které tuto nevýhodu nemají (BACHMANN *et al.* 2006, CHARAN *et al.* 2004, FARNET *et al.* 2007).

Anthramycin patří do skupiny C9 substituovaných antibiotik, jeho molekula se skládá ze dvou částí, obě vznikají oxidativním otevřením aromatické aminokyseliny následovaným ornamentačními kroky. Část molekuly odvozená od kyseliny 4-methyl-3-hydroxyanthranilové pochází z tryptofanu, druhá část (derivát prolinu) společná s PPL prekurzorem linkomycinu (obr. 13A, B) vzniká z L-tyrosinu přes oxidativní otevření DOPA (HURLEY *et al.* 1980, NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNÁ *et al.* 2004). Společný původ prolinové části linkomycinu a anthramycinu byl testován pokusy se začleňováním značeného methioninu do C-koncového karboxyamidu anthramycinu a koncové methyl skupiny propylového postranního řetězce linkomycinu (HU *et al.* 2007). Oba aminokyselinové prekurzory anthramycinu jsou pravděpodobně aktivovány adenylací a thioesterifikací na bimodulární megasyntetase. První modul pravděpodobně aktivuje kyselinu 4-methyl-3-hydroxyanthranilovou, která je thioesterifikována na první T-doméně a druhý modul aktivuje prolinový prekurzor dehydroprolinakrylamid.

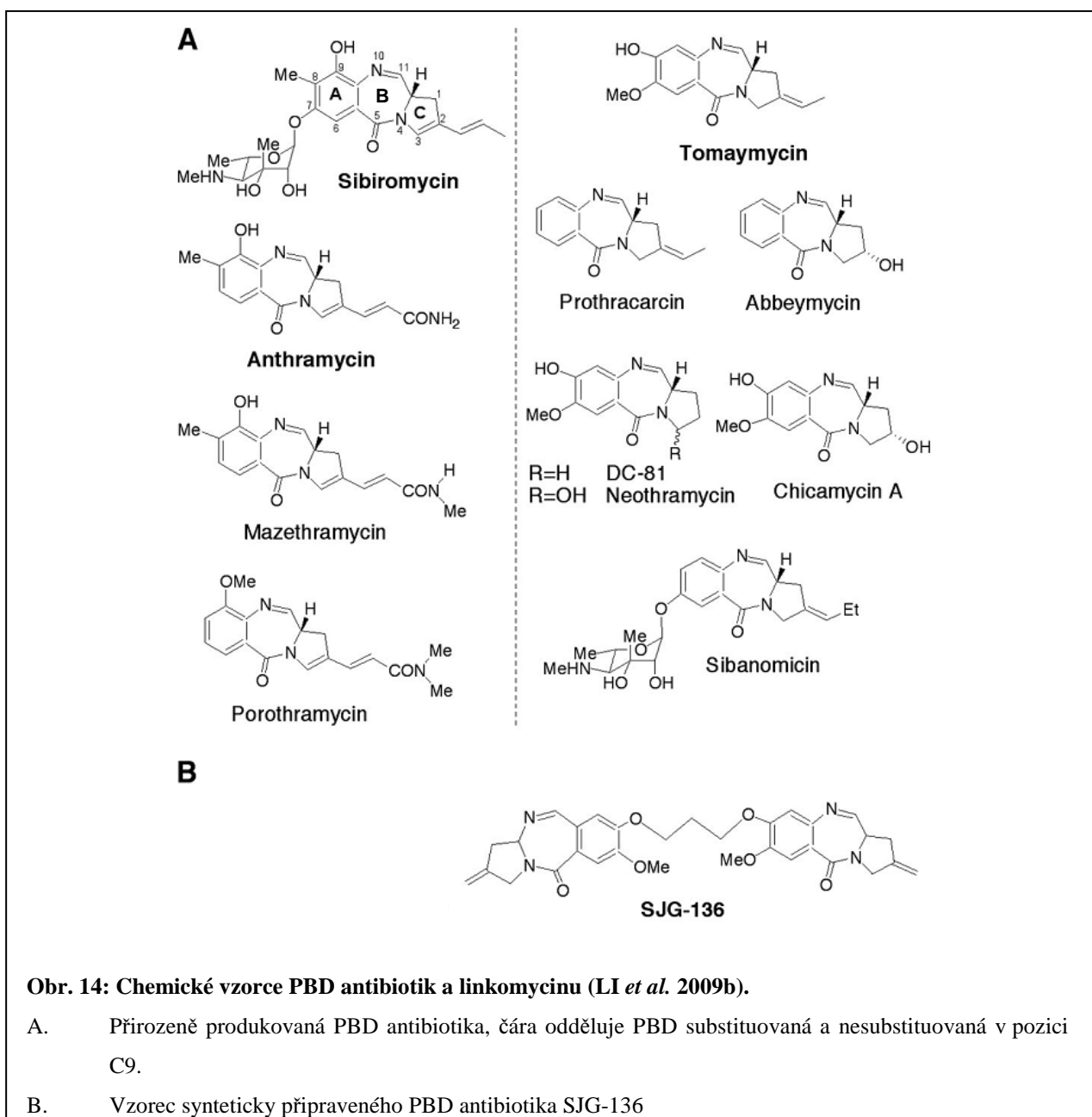
2.4.2. Sibiromycin

Sibiromycin (obr. 14) produkovaný *Streptosporangium sibiricum* patří stejně jako anthramycin do skupiny C9 substituovaných PBD antibiotik. Vykazuje nejvyšší afinitu k DNA a tedy i nejsilnější protinádorové účinky, nicméně klinické testy byly znemožněny jeho příliš velkou kardiotoxicitou u zvířat, která je připisována právě přítomnosti hydroxylové skupiny v pozici C9.

2.4.3. Tomaymycin

Tomaymycin produkovaný *Streptomyces achromogenes* je velmi podobný monomerní jednotce SJG-136 (obr. 14). První fáze klinických testů SJG-136 má pozitivní výsledky v léčbě rakoviny vaječníků (ALLEY *et al.* 2004). I tomaymycin je výrazně cytotoxický proti

buněčným liniím leukémie, plasmocystomu a rakoviny vaječníků (THURSTON *et al.* 1999). Tomaymycin i SJG-136 mají methoxidový substituent v poloze C7, O-alkylový zbytek v poloze C8 a obě antibiotika obsahují C2-exo nenasycenou tetrahydropyrrolovou část a patří do skupiny PBD antibiotik nesubstituovaných v poloze C9.



2.5. Evoluce genových shluků

Shluky biosyntetických genů jsou ideálními modely pro studium evoluce genových společenství. Jsou to sobecké genetické jednotky, které se rychle vyvíjejí a obvykle obsahují kompletní biosyntetickou dráhu. Mají tedy fenotypový projev - molekulu antibiotika, který je relativně snadné identifikovat a analyzovat (FISCHBACH *et al.* 2008). Všechny geny podléhají evoluci díky vertikálnímu přenosu, kdy dochází k bodovým mutacím, genovým duplikacím a delecím, rekombinaci nebo k výměnám genů. U shluků genů pro biosyntézu antibiotik dochází navíc i k intra- i inter-generickému HGT. Biosyntetické shluky se šíří laterálně protože malé molekuly, které kódují, poskytují selektivní konkurenční výhodu hostitelskému organismu. Podobně jako geny rezistence k antibiotikům (HOLDEN *et al.* 2004), biosyntetické shluky jsou transportovány sobeckými genetickými prvky jako jsou ostrovy patogenicity (HACKER *et al.* 1997) a plazmidy (SZCZEPANOWSKI *et al.* 2005). Omezení transportu celých shluků plyne z „transportní kapacity“ genetických prvků, jako jsou např. konjugativní plazmidy (COURVALIN 1994), nebo z rozdílů metabolické infrastruktury donorového a recipientního organismu jako je např. dostupnost tříuhlíkaté stavební jednotky propionátu (DAYEM *et al.* 2002) pro biosyntézu polyketidů.

Nicméně ne všechny shluky nesou známky přenosu pomocí HGT. V roce 2009 Matter *et al.* publikoval charakteristiku shluků pro biosyntézu valinomycinu z osmi různých streptomycet. Způsob geografického rozšíření těchto kmenů a podobnost evolučních stromů genů pro biosyntézu valinomycinu se stromy 16S rDNA a *trpB* genů ukazuje pouze na vertikální přenos bez jakýchkoli známek HGT (MATTER *et al.* 2009).

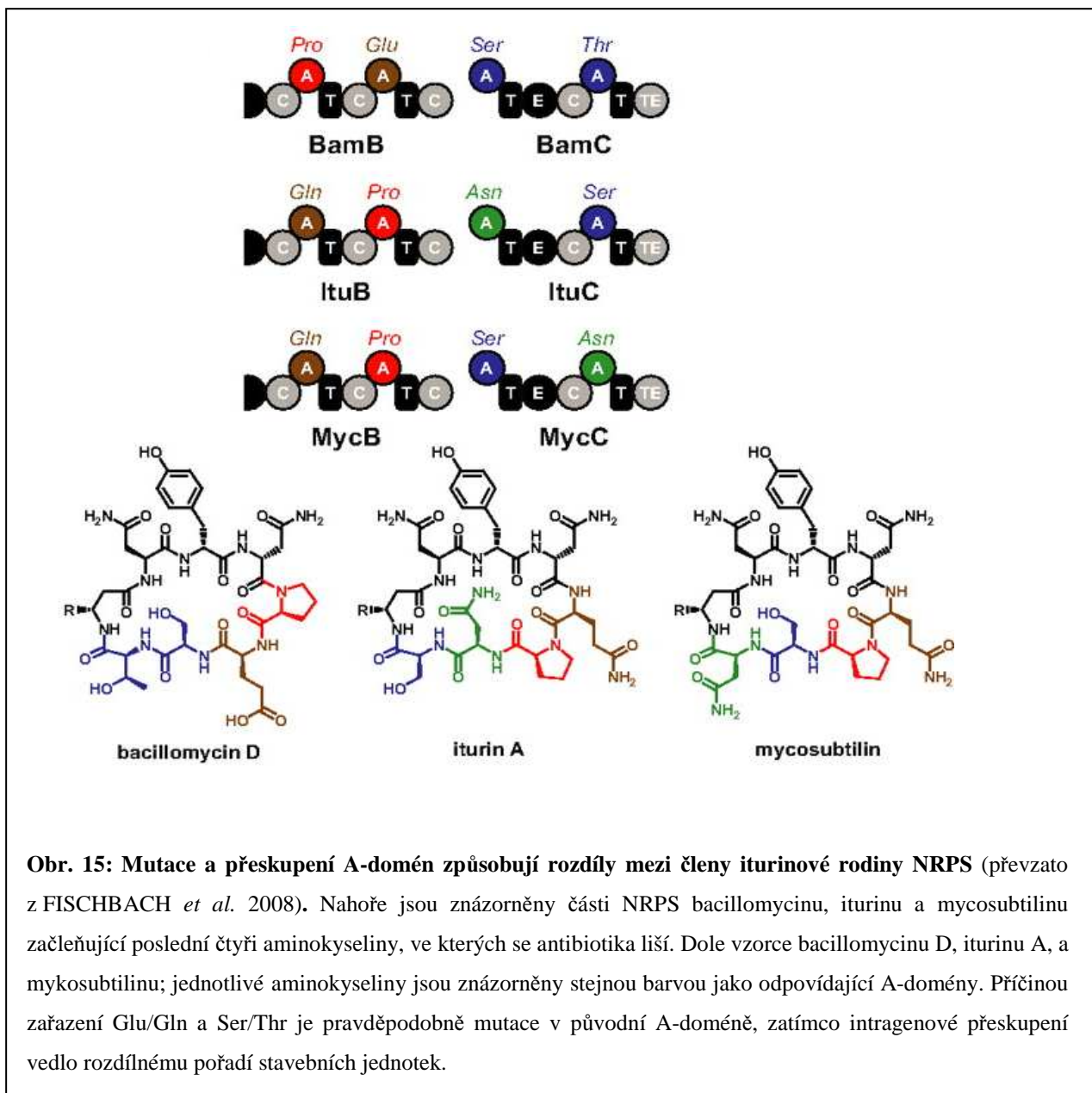
2.5.1. Změny uvnitř jednotlivých biosyntetických genů

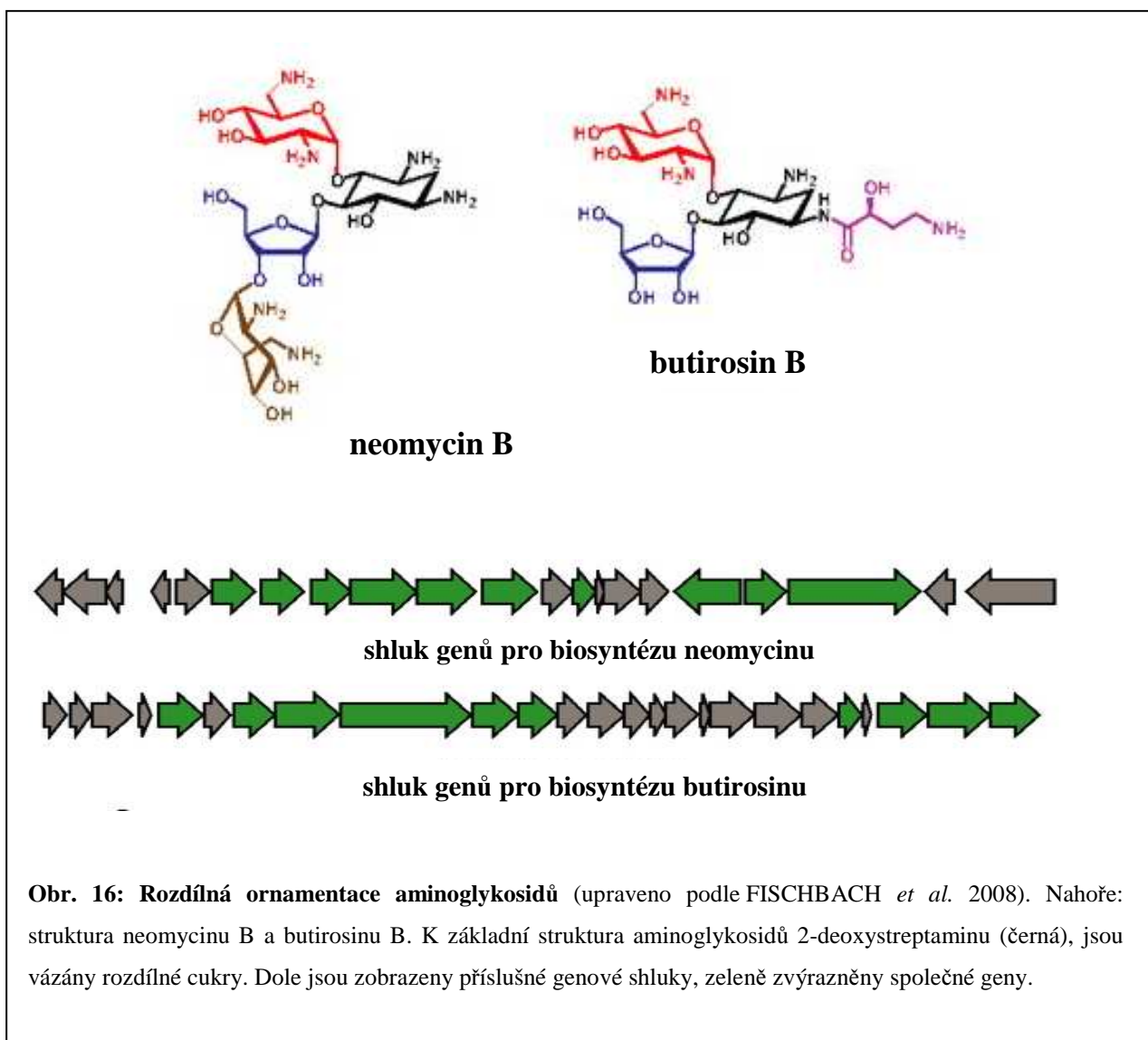
Nejzřetelnější způsob, jakým dochází ke změnám v biosyntetických shlucích, jsou mutace jednotlivých genů (FISCHBACH *et al.* 2008). Důležitým příkladem diverzity způsobené mutacemi jsou PKS. Každý modul těchto enzymů obsahuje jednu až tři „zpracovávající“ domény - ketoreduktasovou (KR), dehydratasovou (DH) a enoylreduktasovou (ER) – které modifikují stavební jednotku zařazenou pomocí acetyltransferasové (AT) domény. Složení jednotlivých modulů z těchto domén a jejich pořadí předurčuje složení a pořadí jednotlivých stavebních jednotek výsledné molekuly antibiotika. Rozdíly ve strukturách polyketidů jsou tedy dány rozdíly jednotlivých domén v každém modulu. Ty obvykle vznikají díky bodovým mutacím katalytických zbytků, které udržují jednotlivé domény neaktivní (FISCHBACH *et al.* 2008).

Jiným příkladem jsou podobné modulární enzymy, NRPS. Hlavním zdrojem diverzity stavebních jednotek však v tomto případě nejsou mutace jednotlivých domén, ale rozdíly v adenylačních (A) doménách každého modulu. Příkladem jsou NRPS z kmene *Bacillus*, které syntetizují příbuzné molekuly bacillomycinu, iturinu a mykosubtilinu. Jak je zobrazeno na obr. 15, mají tyto NRPS podobné A-domény syntetizující „horní část“, antibiotik, což vede k zařazení stejného stavebního bloku do molekul bacillomycinu, iturinu a mykosubtilinu (ve vzorcích zobrazeno černě), zatímco odlišnosti molekul zmíněných antibiotik způsobují rozdíly v A-doménách modulů NRPS zařazující poslední čtyři aminokyseliny (FISCHBACH *et al.* 2008).

2.5.2. Změny na úrovni genových shluků

Některé rodiny antibiotik (jako například teikoplanin a příbuzná antibiotika) se liší jen v ornamentaci molekuly, čemuž odpovídá přítomnost/absence genů kódujících jednotlivé modifikační enzymy v příslušných biosyntetických shlucích. U aminoglykosidů jednotlivé genové shluky obsahují společné geny pro biosyntézu základní struktury 2-deoxystreptaminu z glukoso-6-fosfátu, liší se však v přítomnosti enzymů připojujících jednotlivé cukry k základní struktuře. Tyto ornamentační geny mohou tvořit podshluky, které se během evoluce mezi shluky nezávisle „pohybují“ (obr. 16).





2.5.3. Slučováním genových „podshluků“ vznikají nové shluky

Z rozložení genů v některých shlucích pro biosyntézu antibiotik je patrné, že geny kódující enzymy pro biosyntézu jednotlivých funkčních částí antibiotika tvoří podshluky. Při HGT dochází k přenosu celých podshluků, jejichž spojováním vznikají nové genové shluky. Tato modulární struktura je patrná i u linkomycinu, kde jsou do podshluků uspořádány geny kódující enzymy biosyntézy aminocukru MTL, aminokyselinové části antibiotika PPL i obě stavební jednotky propojujícího enzymu NDLS.

Při vzniku nových genových shluků jsou klíčové enzymy, které umožňují fúzi jednotlivých podshluků společně s konjugačními enzymy, které spojují produkty podshluků dohromady. Tyto enzymy musí být logicky unikátní a jejich evoluční původ je nejasný (FISCHBACH *et al.* 2008).

2.5.4. Slučováním genových shluků vznikají „supershluky“

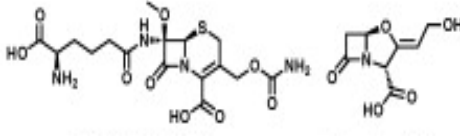
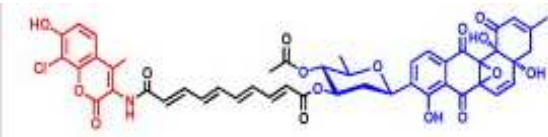
Díky HGT se mohou odlišné genové shluky ocitnout ve stejném mikrobiálním genomu a sloučit se v tzv. „supershluk“ (FISCHBACH *et al.* 2009). Nabízejí se zde dvě možnosti sloučení (obr. 17):

1. Odlišné genové shluky kódující biosyntézu synergistických antibiotik jsou sfúzovány do jedné kazety, jsou pak společně regulovány a při HGT je přenášena celá kazeta.

Příkladem je *Streptomyces clavuligerus* produkující β -laktamové antibiotikum cefamycin, která syntetizuje zároveň i kyselinu klavulanovou, inhibitor β -laktamas. Oba biosyntetické shluky jsou sfúzovány do 90 kb dlouhého supershluku (WARD *et al.* 1993), kde jsou společně koregulovány.

2. Dojde k funkčnímu spojení genových shluků a vytvoří se jedna nová biosyntetická dráha produkující hybridní molekulu.

Příklad: Simocyclinon je hybridní antibiotikum mezi aminokumariny a PBD antibiotiky. Jeho genový shluk se skládá ze dvou shluků odpovídajících genovým shlukům aminokumarinů a anthramycinu (TREFZER *et al.* 2002).

molekuly	produkční organismus funkce
 <p>cefamycin C klavulanát</p>	<i>Streptomyces clavuligerus</i> β -laktamové antibiotikum inhibitor β -laktamas
 <p>simocyclinon</p>	<i>Streptomyces antibioticus</i> Aminokumarin (červená) konjugovaný s anthracyklinem (modrá)

Obr. 17. Spojování shluků v „supershluky“ (upraveno podle FISCHBACH *et al.* 2009)

2.5.5. Fenotypová konvergence

Selektivní evoluční tlak může vést k tomu, že nepříbuzné enzymy katalyzují stejnou reakci. Například β -laktamasy, které štěpí tytéž vazby v β -laktamových antibiotikách pocházejí z nepříbuzných skupin: Serinové hydrolasy třídy A, C, a D, které se pravděpodobně vyvinuly z penicilin vazebných proteinů nejsou příbuzné se Zn-dependentními hydrolasami typu B (JACOBY *et al.* 2005, GARAU *et al.* 2004, JORIS *et al.* 1988).

Podobně mohou ke stejnému fenotypu konvergovat i genovými shluky kódovaná společenství enzymů, která produkují antibiotika. Je známo aspoň pět antibiotik (včetně linkosamidů) kódovaných nepříbuznými biosyntetickými drahami, která se vážou do peptidyltransferasového centra 50S podjednotky ribozómu (HANSEN *et al.* 2003, MOORE *et al.* 2005). Vazebné konfigurace těchto enzymů se sice liší, nicméně jejich vazebná místa se překrývají. Nepříbuzné biosyntetické dráhy tedy produkují molekuly schopné vazby do stejného místa.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriální kmeny

Streptomyces lincolnensis ATCC 25466 (DSM 40355): typový kmen produkující linkomycin.

Streptomyces caelestis ATCC 15084: typový kmen produkující celesticetin.

Streptomyces coelicolor M145 (synonymum A3): typový kmen jehož kompletní sekvence byla publikována v roce 2002 (BENTLEY *et al.* 2002). Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

Streptomyces coelicolor CH999: kmen *Streptomyces coelicolor* s deletovaným shlukem pro biosyntézu aktinorhodinu, kmen nemá endogenní plasmidy a má stabilní mutaci blokující biosyntézu undecylprodigosinu. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

Streptomyces lividans 1365: kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

Escherichia coli DH5 α : kmen s genotypem F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1 (Takara, Japonsko).

Escherichia coli DH5 α /pIJ773: kmen s genotypem F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, 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 DH5 α /pIJ787: kmen s genotypem F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1, nesoucí plazmid pIJ787. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

Escherichia coli BW25113/pIJ790: kmen s genotypem (Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-4), lacI^p-4000(lacI^Q), λ ⁻, rpoS369(Am), rph-1, Δ (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 *dam13:Tn9(Cam) dcm-6 mcrB1 hsdR2(rk-mk+) mcrA recF143* – nemethylující kmen (zachována jen protektivní methylace) (New England Biolabs).

Kocuria rhizophila CCM 552: indikátorový kmen citlivý k linkomycinu.

3.1.2. Plazmidy

pIJ787 – konstrukt je odvozen od vektoru pBluescriptKS(+) (Stratagene) a nese integrační kazetu (GUST *et al.* 2004) *bla-oriT-tet-attP-int-bla*. Integrační kazeta (obr. 20) je do kosmidu vložena pomocí homologní rekombinace s genem kódujícím rezistenci k ampicilinu (*bla*), kazeta obsahuje selekční marker (tetracyklinová rezistence), *oriT* pro kojugační transfer, *attP* místo a gen pro integrázu z fága phiC31, která umožní integraci do chromozómu pomocí *attP/attB* integrace (THROPE *et al.* 2000).

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 rekombinasou .

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.

3.1.3. Enzymy a chemikálie

Enzym	Výrobce
Restriční endonukleasy	New England Biolabs
DyNAzyme II DNA polymerase	Finnzymes
LA DNA Polymerases Mix	Top Bio
T4 DNA ligasa	Promega
Lysozym	Sigma
Klenow fragment	TaKaRa

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

3.1.4. 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	

po sterilizaci přidat

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	

po sterilizaci přidat:

2,5 M MgCl ₂	2 ml
-------------------------	------

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
-------------	--------

YEME produkční:

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

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

2 x YT médium:

krypton	16 g
kvasniční extrakt	10 g
NaCl	5 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	

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

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

3.1.5. Roztoky a pufry

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

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

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

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

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

TES puf: 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	0,5 ml
(pH 8,0)	

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

SM pufr

NaCl	5,8g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0g
1 M Tris/HCl	50 ml
(pH 7,5)	
2% želatina	5 ml
dH ₂ O	do 1000 ml

Roztoky pro izolaci 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 dH ₂ O)
Apramycin	50 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
Kanamycin	50 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
Hygromycin	50 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
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 jednoho litru rozehřátého 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 µg/ml) a 0,4 ml zásobního roztoku IPTG (isopropyl-β-thiogalakto-pyranosid) (1M) do finální koncentrace 0,4 mM.

Roztoky pro přípravu membrány a hybridizaci:

denaturační roztok: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

neutralizační roztok: 1M Tris/HCl, pH 5, 2M NaCl)

prehybridizační roztok: 5x SSC, 0,1% N-lauroylsarkosin, 0,02% SDS, 1% blokovací agens

hybridizační roztok: 5x SSC, 0,1% N-lauroylsarkosin, 0,02% SDS, 1% blokovací agens,
značená sonda

2x SSC promývací roztok: 2x SSC, 0,1% SDS

0,5x SSC promývací roztok: 0,5x SSC, 0,1% SDS

blokovací roztok: 1% blokovací agens

detekční pufr: 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mN NaCl

odmývací roztok: 200 mM NaOH, 0,1% SDS

3.1.6. Komerční soupravy

Příprava kosmidové knihovny - SuperCos I Cosmid Vector Kit (Stratagene)

Gigapack III XL Packaging Extract (Stratagene)

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

Izolace kosmidové DNA z *E.coli* - NucleoBond BAC 100 columns (Macherey-Nagel)

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).

Standardy molekulových velikostí pro DNA elektroforézu v agarosovém gelu

1kb PLUS DNA ladder (Gibco)

HyperLadder I (Bioline)

Příprava kosmidové knihovny - SuperCosI cosmid vector kit (Stratagene)

Pakázování kosmidů – Gigapack III XL packaging extrakt (Stratagene)

Značení sond – Dig DNA labeling kit (Roche)

Při použití všech komerčních souprav byl dodržen postup výrobce.

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace *E.coli*

Buňky *E. coli* byly kultivovány v tekutých médiích 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.

3.2.2. Příprava kompetentních buněk

SOC médium (250 ml) bylo zaočkováno přes noc narostlou kulturou na $OD_{550} = 0,01$. Kultivace probíhala na rotační třepačce do dosažení $OD_{550} = 0,4 - 0,6$. 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.

3.2.3. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA elektroporací

K 50 μ l čerstvě připravené suspenze kompetentních buněk bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA v objemu 2 μ l. 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 μ F. Poté byly ihned resuspendovány v 1 ml LB média, 10 min chlazeny na ledu a 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.

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

K 50 μ l suspenze kompetentních buněk JM109 (Promega) bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA v objemu 2 μ l. Suspenze byla promíchána a inkubována 20 min v ledu. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 50 s. Následně byly buňky inkubovány 2 min v ledu, pak bylo přidáno 950 ml SOC média předehřátého 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.

3.2.5. Kultivace *Streptomyces*

Buňky *Streptomyces* byly kultivovány v tekutých médiích (YEME, AVM) nebo na pevných půdách (R2YE, MS, DNA, GYM) při 28 – 30°C. Tekuté kultury byly inkubovány v 0,5l Erlenmayerových baňkách opatřených vlisy pro zabránění tvorby shluků mycelia na rotační třepače při 230 RPM. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

3.2.6. Příprava spor *Streptomyces*

Jeden mililitr přes noc narostlé kultury *Streptomyces* 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.

3.2.7. Kultivace *Streptomyces* pro sledování produkce linkomycinu

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média spory ze šikmého GYM agaru a kultivací na třepače po dobu 30 h. AVM médium (25 ml) bylo zaočkováno 1,25 ml inokula. Kultivace probíhala na rotační třepače 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.

3.2.8. Transformace *S. lincolnensis* plazmidovou DNA mezidruhovou konjugací s *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 byly elektroporací transformovány kosmidem 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 třepače 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 pokojovou teplotu. Poté 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.

3.2.9. Kultivace *Kocuria rhizophila*

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

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

Obnovení produkce linkomycinu přidávkem 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 organismus (*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. 3.2.7.).

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

Kolonie *E. coli* byla zaočkována do 5 ml LB média a inkubována na třepačce 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 mikrozkuvky 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.

3.2.12. Izolace plazmidové DNA z *E. 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, ale přečištěna vazbou na aktivované sklo v kolonce. Při používání soupravy bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

3.2.13. Izolace kosmidové z *E. coli* 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.

3.2.14. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

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

3.2.15. Ligace

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

3.2.16. 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 pufrům za týchž podmínek. Sediment byl zvážen, 0,3 g buněk byly resuspendovány v 0,5 ml TES pufru a k suspenzi bylo přidáno 25 µl 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 µl zásobního roztoku proteinasy K o koncentraci 0,5 mg/ml a 60 µl 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.

3.2.17. 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.

3.2.18. 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.

3.2.19. Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (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
dH_2O	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	

3.2.20. Příprava kosmidové knihovny (SuperCosI cosmid vector kit)

Kosmidové vektory jsou vhodnými nástroji pro mapování velkých úseků DNA, mohou nést fragment DNA dlouhý 30 – 42 kbp. SuperCos I je 7,9 bp dlouhý kosmid, který obsahuje promotor z bakteriofága v těsném sousedství s unikátním klonovacím místem. Tím je umožněno sekvenování okrajových částí inzertu z univerzálních primerů vycházejících ze sekvence promotoru.

3.2.20.1. Příprava ligační směsi

Pro restrikci chromozomální DNA a její klonování do vektoru SuperCosI je důležité získat fragmenty chromozomální DNA větší než 150 kbp. Kultura *Streptomyces* byla pěstována v YEME médiu (50 ml v 250 ml baňce) a chromozomální DNA byla izolována fenolovou extrakcí (kap. 3.2.16.). Izolovaná chromozomální DNA byla parciálně neštěpena enzymem BamHI (přibližně 10 min) tak, aby velikost fragmentů byla 40 – 60 kbp. Velikost restričních fragmentů byla testována elektroforézou v 0,3% gelu. Konce neštěpené DNA byly defosforylovány CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase).

Vektor SuperCosI byl linearizován enzymem XbaI, opracován CIAP a následně neštěpen enzymem BamHI.

3.2.20.2. Pakážování a transfekce ligační směsi

Ligační směs fragmentů chromozomální DNA a linearizovaného vektoru byla pakážována pomocí Gigapack III Gold packaging extrakt (Stratagene), který preferenčně zabaluje velké fragmenty DNA (47 – 51 kbp) a následně transfektována do buněk *E. coli* XL1-Blue MR^b.

Kultura *E. coli* XL1-Blue MR^b byla zaočkována do LB média s 0,2% maltosou a 10 mM MgSO₄ a kultivována do max O.D. 1,0. Kultivace probíhala buď přes noc při 30 °C nebo 4–6 h při 37 °C. Suspenze byla centrifugována (10 min, 500x g) a pelet byl resuspendován v 10 mM MgSO₄ na O.D. 0,5.

Během kultivace hostitelských buněk *E. coli* XL1-Blue MR^b byla ligační směs promíchána s pakážovacími extrakty (Stratagene); 1–4 µl ligační směsi s obsahem 0,1-1 µg DNA na 1 extrakt. Směs byla inkubována 2 h při pokojové teplotě. Pakážovací reakce byla ukončena přidáním 500 µl SM pufru a 20 µl chloroformu. Směs byla krátce centrifugována a 150 µl supernatantu bylo promícháno s 15 ml připraveného roztoku buněk v 10 mM MgSO₄. Směs byla inkubována 30 min při pokojové teplotě. Dále byly do baněk přidány 4 objemy LB

média a následovala inkubace 1 h při 37 °C. Buňky byly centrifugovány (10 min, 4000x g, pokojová teplota), pelet byl resuspendován v 500 µl LB média a suspenze byla vyseta na 150ml plotny s obsahem kanamycinu (50 µg/ml) a ampicilinu (100 µg/ml). Plotny byly inkubovány přes noc v 37 °C. Kolonie ze všech ploten byly smyty (6 ml LB média pro smytí kolonií z jedné plotny) a smíchány v jedné baňce. K suspenzi byl přidán glycerol do finální koncentrace 20 % a ampicilin do finální koncentrace 100 µg/ml. Knihovna byla rozdělena na 1 ml alikvoty a zmrazena při -80 °C.

3.2.21. Koloniová hybridizace

3.2.21.1. Příprava membrány

Knihovna *Streptomyces* byla vyseta na plotny a kultivována přes noc při 37 °C. Plotny byly následně uloženy na 30 min do 4 °C. Na povrch ploten byla přiložena sterilní nylonová membrána (Roche). Po sejmutí z ploten byla membrána zespodu osušena a na 15 min položena na 2 ml kapku denaturačního roztoku. Membrána byla opět zespodu usušena a položena na 15 min na 2 ml neutralizačního roztoku. Následovalo přiložení membrány na 2 ml kapku 2x SSC, dvakrát po dobu 10 min. Poté byla membrána fixována 5 min pomocí UV. Pro odstranění zbytků kolonií byla membrána pokryta roztokem proteinkinázy K v SSC (naneseno 0,5 ml roztoku o koncentraci 14 ng/ml na každých 82 mm² membrány) a inkubována 1 h v 37 °C. Membrána byla následně překryta filtračním papírem namočeným v dH₂O, přitlačením filtračního papíru a stržením byly odstraněny zbytky kolonií.

3.2.21.2. Značení sondy, inkorporace digoxigenin – 11 – dUTP

Pro syntézu sondy značení digoxigeninem (DIG) byly použity dvojice primerů specifické pro dané sondy. Syntéza probíhala v objemu 100 µl. Optimální hybridizační teploty jednotlivých primerů byly o 5 °C nižší než u hybridizačních teplot klasických PCR reakcí. Místo směsi nukleotidů v reakci byl používán 200 µM PCR DIG labeling mix. Pro značící reakci byla využívána polymeráza DyNAzyme nebo Klenowův fragment. Po skončení PCR byla nesyntetizovaná sonda přesrážena ethanolem. Úspěšné značení sondy bylo ověřeno elektroforézou, DNA s inkorporovaným DIG-11-dUTP je větší a migruje gelem pomaleji než neznačená DNA stejné velikosti.

3.2.21.3. Hybridizace se značenou sondou digoxigeninem

Membrána s fixovanými koloniemi byla prehybridizována v 20 ml prehybridizačního roztoku po dobu 2 h při 68 °C. Po odstranění prehybridizačního roztoku byla membrána hybridizována přes noc v hybridizačním roztoku, který byl předem denaturován 10 min při 100 °C. Následující den byla membrána promyta nejdříve 2x 5 min ve 100 ml 2x SSC promývacího roztoku při pokojové teplotě a poté 2x 15 min ve 100 ml 0,5x SSC promývacího roztoku při teplotě 68 °C.

3.2.21.4. Chemiluminiscenční detekce

Princip této metody spočívá v detekci světelného signálu v místě se specificky navázanou DNA sondou s inkorporovaným DIG-11-dUTP. Chemiluminiscence vzniká štěpením substrátu (CSPD) alkalickou fosfatasou konjugovanou s Anti-DIG protilátkou. Nejprve byla membrána inkubována v blokovacím roztoku 30–60 min při pokojové teplotě. Tato inkubace zabrání nespecifické vazbě protilátky na membránu. Následovala 30 min inkubace membrány v 20 ml roztoku protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou. Poté byla membrána promyta 2x 15 min v promývacím pufru a krátce opláchnuta v detekčním pufru. Na membránu byl aplikován substrát CSPD rozpuštěný v detekčním pufru v poměru 1 : 100. Po 5 min inkubaci při pokojové teplotě byl odstraněn přebytečný substrát a membrána inkubována 15 – 20 min při 37 °C. Signál byl vizualizován expozicí membrány (5 – 20 min) při 37 °C na citlivém filmu a jeho následným vyvoláním.

3.2.22. Sekvenační analýza

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

Vzorek DNA byl dodáván ve formě vodného roztoku, v koncentraci požadované pracovištěm. Všechny další úpravy vzorků před sekvenční analýzou byly prováděny laborantkou sekvenačního pracoviště.

3.2.23. 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:

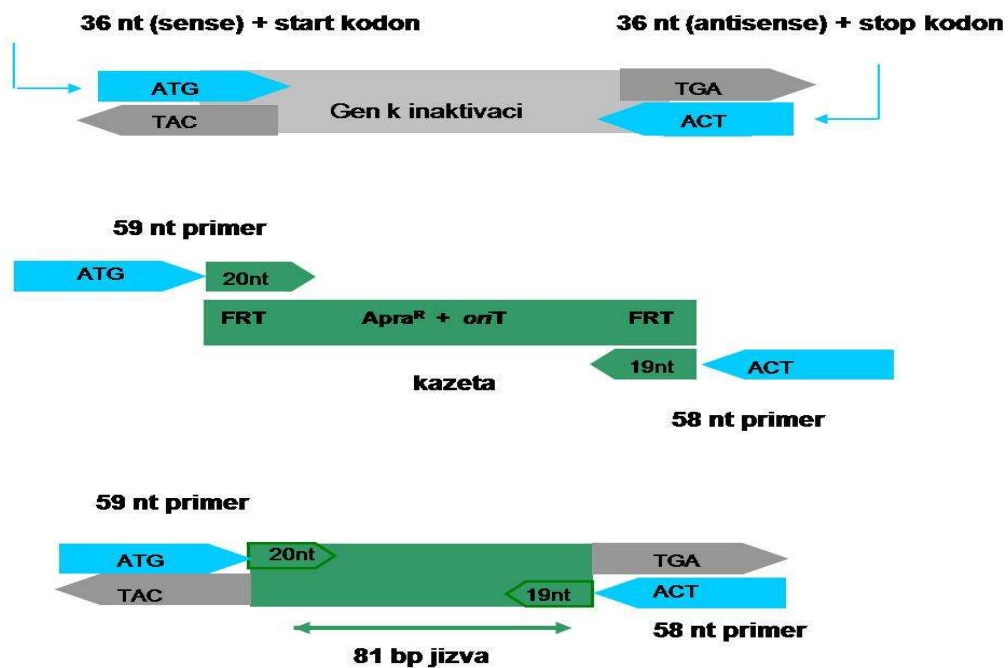
http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf

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

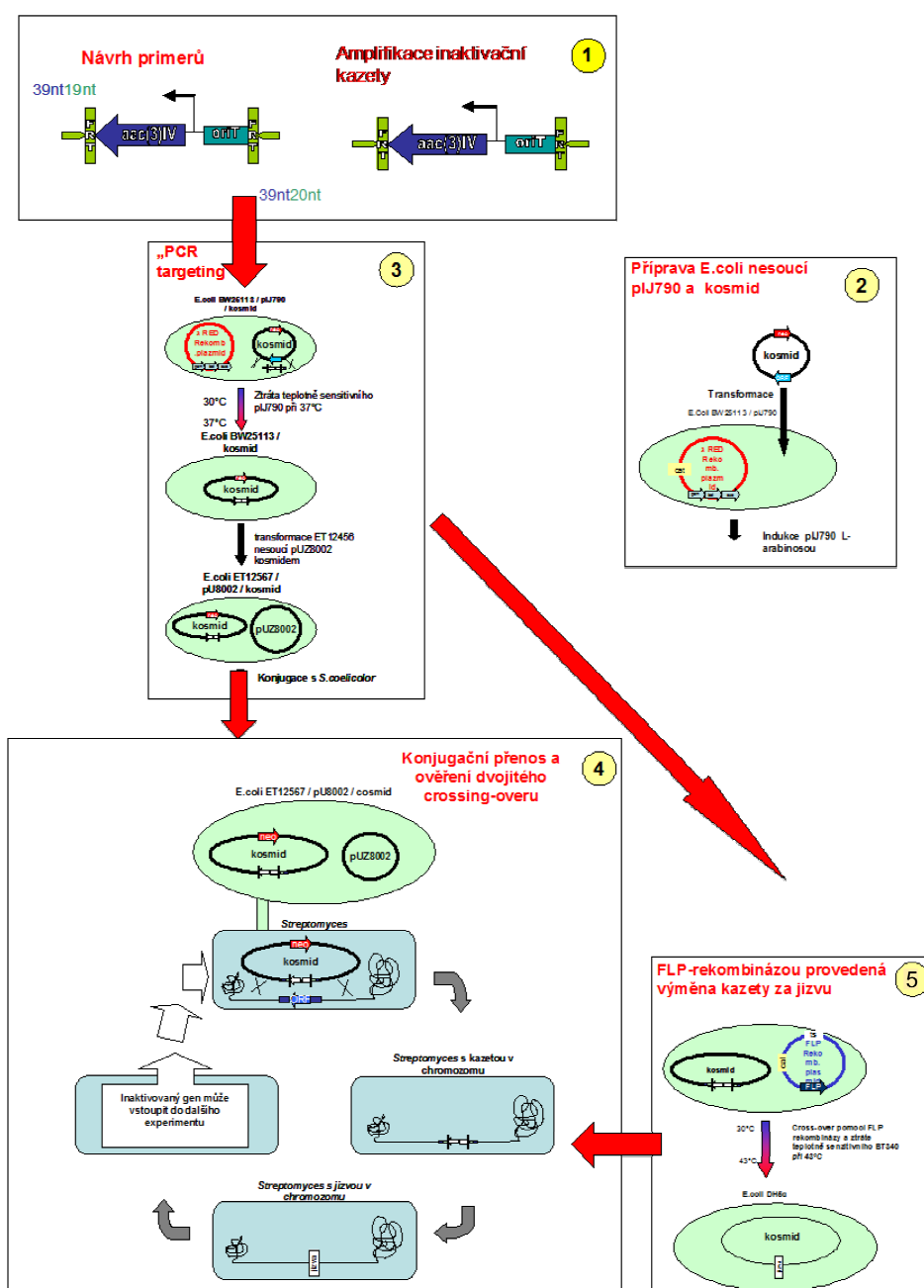
V systému REDIRECT je součástí inaktivační kazety gen kódující rezistenci k apramycinu; *oriT*, který umožňuje mobilizaci konstruktů; FRT sekvence, které jsou cílovým místem pro FLP rekombinasi a sekvence homologní k okolí inaktivovaného genu, které jsou vneseny do kazety v PCR reakci tak, že jsou součástí primerů (obr. 18). 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 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 sekvencí 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.

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“. 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. 18: 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).

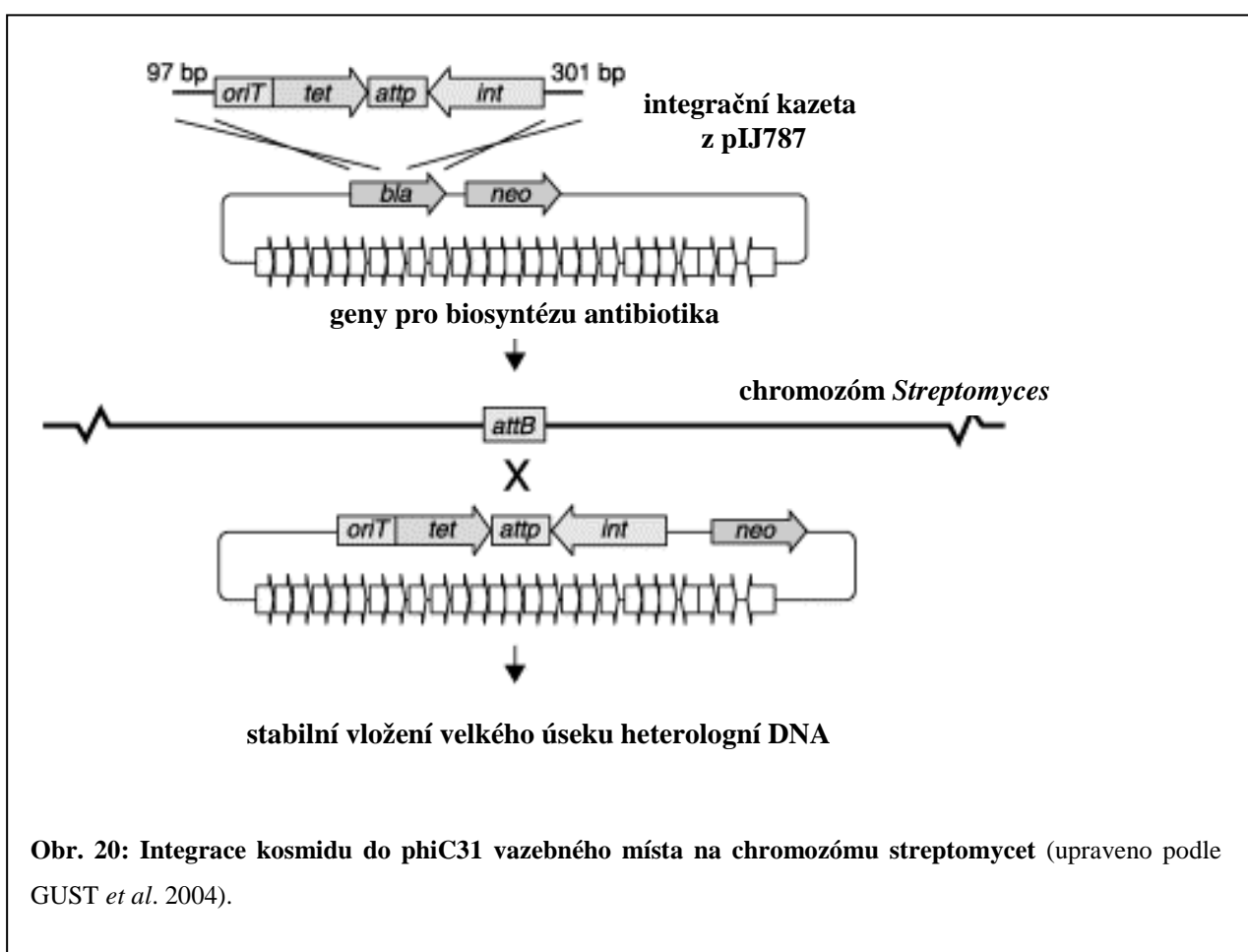


Obr. 19: Schéma postupu inaktivace genu podle protokolu REDIRECT.

1. Návrh primerů a amplifikace inaktivační kazety
2. Transformace kosmidu obsahujícího gen k inaktivaci do *E. coli* BW25113/pIJ790
3. Vložení kazety do kosmidu homologní 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).

3.2.24. Heterologní exprese biosyntetického shluku genů

Do vektoru SuperCosI nesoucího shluk pro biosyntézu linkomycinu byla vnesena integrační kazeta. Součástí kazety nesené vektorem pIJ787 (GUST *et al.* 2004) jsou sekvence homologní s genem *bla* (na jedné straně 97 bp a na druhé 301 bp), který kóduje rezistenci k ampicilinu v kosmidu SuperCosI. Homologní rekombinací s genem *bla* lze tedy vložit integrační kazetu do kosmidu. Integrační kazeta obsahuje selekční marker – gen pro tetracyklinovou rezistenci, *oriT* pro kojugační transfer, *attP* místo a gen pro integrasu *int* z fáze ϕ C31, která zajistí integraci do chromozómu hostitelského organismu pomocí *attP/attB* rekombinace (obr. 20).



Obr. 20: Integrace kosmidu do ϕ C31 vazebného místa na chromozómu streptomycet (upraveno podle GUST *et al.* 2004).

Kazeta byla z vektoru pIJ787 vyštěpena restrikcí endonukleasami DraI and BsaI. Gen *bla* v SuperCos I byl nahrazen integrační kazetou pomocí λ -Red rekombinace stejným postupem jako je nahrazován gen inaktivační kazetou v metodě REDIRECT (kap.3.2.22.). Kosmid s integrační kazetou byl do hostitelského organismu vnesen mezidruhovou konjugací za pomoci proteinových produktů genů kódovaných plazmidem pUZ8002.

3.2.25. Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii

Příprava vzorků pro účely UPLC a HPLC analýzy a samotná analýza byly provedeny RNDr. Janou Olšovskou, Ph.D. a Mgr. Zdeňkem Kameníkem z Laboratoře genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub (MBÚ) podle protokolu popsaneého 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 byly 3 ml média naneseny 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 nebo žádná produkce linkomycinu, byl vzorek 30x koncentrován. Deriváty linkomycinu byly z SPE kolony eluovány 100% methanolem a vzorek k analýze byl 10x 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.

3.2.26. 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 1,7 μm, 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.

3.2.27. 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 terčík a po uschnutí byl vzorek analyzován.

4. VÝSLEDKY

4.1. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene

První kapitola výsledků se zabývá izolací, sekvenční analýzou a heterologní expresí shluku pro biosyntézu linkomycinu.

V roce 1995 byla publikována sekvence shluku pro biosyntézu linkomycinu z kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995). Jedná se o šlechtěný vysokoprodukční kmen a již dřívější pokusy naší laboratoře naznačovaly, že sekvence jeho shluku se od sekvence typového kmene významně liší (JANATA *et al.* 2001). Pro komparativní analýzu linkomycinového a celesticetinového shluku genů bylo vhodnější použít sekvenci shluku nešlechtěného, tedy typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466.

Výsledky této kapitoly jsou součástí publikace “Koběrská, 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”.

Heterologní produkce linkomycinu byla příliš nízká pro měření dosud známými metodami, proto byla vyvinuta nová metoda využívající UPLC a detekci pomocí UV, která byla v roce 2007 publikována: Olšovská, J., Jelínková, M., Man, P., Koběrská, 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.

4.1.1. Kosmidová knihovna *S. lincolnensis* ATCC 25466

Kosmidová knihovna *S. lincolnensis* ATCC 25466 byla připravena podle protokolu Stratagene SuperCos I Cosmid Vector Kit (kap. 3.2.20.). Knihovna byla prohledávána koloniovou hybridizací se sondami připravenými na základě publikované sekvence *lmb* genů *lmbA*, *lmbE*, *lmbM*, *lmbU* a *lmcC* ze *S. lincolnensis* 78-11. Byly vybrány přibližně 300 bp dlouhé úseky uvedených genů pokrývající celou délku shluku. Pomocí koloniové hybridizace s těmito sondami byly identifikovány čtyři pozitivní klony LK2, LK3, LK4 a LK6 (tab. 4.).

Tab. 4. Pozitivní signály koloniové hybridizace vybraných kosmidů se sondami *lmbA*, *lmbE*, *lmbM*, *lmbU* a *lmrC* ze *S. lincolnensis* 78-11.

	<i>lmbA</i>	<i>lmbE</i>	<i>lmbM</i>	<i>lmbU</i>	<i>lmrC</i>
LK2	+	+	+	+	+
LK3	+		+		
LK4	+	+	+	+	
LK6	+	+	+	+	+

Všechny klony byly analyzovány mapováním restrikcí endonukleázami BamHI a EcoRI a sekvenováním obou konců vloženého inzertu z univerzálních primerů SuperCosI. Primery jsou navrženy podle sekvence T3 a T7 promotoru, které v kosmidu sousedí s vloženou sekvencí. Analýza krajních oblastí inzertu v programu BLAST ukázala, že kosmid LK6 pravděpodobně obsahuje celý shluk včetně jeho blízkého okolí (tab. 5.).

Tab. 5: Sekvenování okrajových oblastí vybraných kosmidů

kosmid	sekvenování z T3 promotoru	sekvenování z T7 promotoru
LK2	38% identita s dehydrogenasou z <i>Nostoc punctiforme</i>	91% identita s <i>LmrC</i> ze <i>S. lincolnensis</i> 78-11
LK3	41% identita s předpokládaným lipoproteidem <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	79% identita s předpokládaným membránovým proteinem <i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
LK4	47% identita s periplazmovou anhydrasou typu β <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	100% identita s <i>LmrC</i> ze <i>S. lincolnensis</i> 78-11
LK6	41% identita s hypotetickým proteinem Rv1999c z <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	41% identita s hypotetickým proteinem ze <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)

Na základě všech výše uvedených výsledků byl pro celkové sekvenování vybrán kosmid **LK6**. Kosmidy LK2 a LK4 pravděpodobně obsahují většinu shluku pro biosyntézu linkomycinu, nicméně gen *lmrC* v nich není obsažen celý, kosmid LK3 nehybridizoval se všemi sondami, kosmid nese pravděpodobně jen část shluku.

4.1.2. Sekvenování shluku pro biosyntézu linkomycinu ze *S. lincolnensis* ATCC 25466

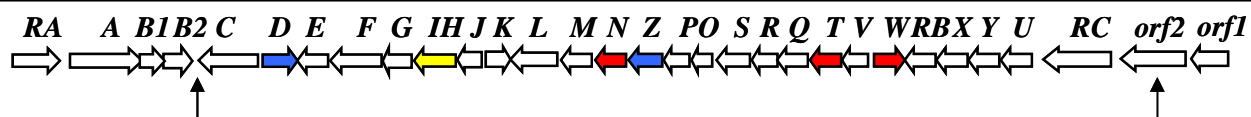
Primery pro sekvenování byly navrženy podle sekvence shluku *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995). Primery jsou dvacet nukleotidů dlouhé, rozmístěné v 550 bp vzdálenostech tak, aby byla pokryta celá sekvence shluku. Zbylé, tj. okrajové oblasti byly osekvenovány metodou „primer walking“. Celý inzert v kosmidu LK6 byl osekvenován minimálně dvakrát a z obou směrů. Sekvence je uložena v Genbank pod přístupovým číslem **EU124663**.

4.1.3. Sekvenční analýza

4.1.3.1. Srovnání genového shluku *S. lincolnensis* 78-11 a *S. lincolnensis* ATCC25466

Srovnání nukleotidové sekvence genového shluku z průmyslového a typového kmene ukázalo následující rozdíly (obr. 21):

- průmyslový kmen na rozdíl od typového obsahuje 29 bp dlouhou repetici v nekódující oblasti mezi geny *lmbB2* a *lmbC* a 145 bp dlouhou inzerci v sekvenci genu *orf2*.
- v sekvencích průmyslového a typového kmene bylo identifikováno 385 nukleotidových rozdílů, z nichž 245 představuje jedno- nebo vícenukleotidové inserce nebo delece a 140 představuje substituce nukleotidů. Inserce a delece v mnoha případech vedou k posunům čtecího rámce, a mají tedy významný dopad na sekvenci kódovaných proteinů (tab. 6). Největší dopad mají rozdíly vedoucí k prodloužení tří proteinů: proteinu LmbN na C-konci a proteinů LmbT a LmbW na N-koncích. Oblasti, které následují za genem *lmrC* vykazují vysoké procento rozdílů mezi typovým a průmyslovým kmenem, což ukazuje, že jde o vysoce variabilní úsek nekódující sekvence. Posun čtecího rámce také způsobil fúzi hypotetických genů *lmbI* a *lmbH* v jediný ORF *lmbIH* (JANATA *et al.* 2001).



Obr. 21: Uspořádání genů v linkomycinovém biosyntetickém shluku, rozdíly mezi shluky typového a vysokoprodukčního kmene. Označeny jsou významné rozdíly mezi průmyslovým a typovým kmenem: fúze genů *lmbI* a *lmbH* (žlutá) (JANATA *et al.* 2001), prodloužení genů *lmbN*, *lmbT* a *lmbW* (červená) a geny *lmbD* a *lmbZ* kódující protein s více než 11 % odlišných aminokyselin (modrá). Šipky označují místo 29 bp repeticce mezi geny *lmbB2* a *lmbC* 145 bp dlouhé inserce v genu *orf2* v průmyslovém kmeni.

4.1.3.2. Proteiny kódované shlukem *S. lincolnensis* ATCC 25466

V tabulce 6 jsou uvedeny předpokládané funkce proteinů kódovaných *lmb* shlukem, funkce proteinů pravděpodobně katalyzujících aminokyselinovou část antibiotika, PPL jsou předpokládány s ohledem na nedávno publikované sekvence PBD antibiotik anthramycinu (HU *et al.* 2007), sibiromycinu (LI *et al.* 2009a) a tomaymycinu (LI *et al.* 2009b).

Tab. 6: Předpokládané funkce proteinů kódovaných geny shluku pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 a jejich srovnání s homologními proteiny shluku z průmyslového kmene *S. lincolnensis* 78-11 (Peschke *et al.* 1995).

Gen	Identita proteinu ^a	Účast v	Předpokládaná funkce proteinu ^b
<i>lmrA</i>	454/484	rezistence	transmembránový efluxní protein
<i>lmbA</i>	588/601	syntéza PPL	neznámá funkce, homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf6</i> (HU <i>et al.</i> 2007)
<i>lmbB1</i>	158/158	syntéza PPL	enzym kovertující L-DOPA (NEUSSER <i>et al.</i> 1998, NOVOTNÁ <i>et al.</i> 2004), homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf12</i> (HU <i>et al.</i> 2007)
<i>lmbB2</i>	301/317	syntéza PPL	enzym kovertující L-DOPA (NEUSSER <i>et al.</i> 1998), homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf13</i> (HU <i>et al.</i> 2007)
<i>lmbC</i>	497/509	kondenzační reakce	adenylace PPL
<i>lmbD</i>	323/355		neznámá funkce
<i>lmbE</i>	269/270	kondenzační reakce?	GlcNAc acetylase
<i>lmbF</i>	423/427		aminotransferasa
<i>lmbG</i>	265/266	syntéza MTL	methyltransferasa
<i>lmbIH</i>	410/483		neznámá funkce
<i>lmbJ</i>	247/248	methylace NDL	NDL-methyltransferasa (JANATA <i>et al.</i> 2001)

<i>lmbK</i>	189/189		fosfatasa
<i>lmbL</i>	419/437	syntéza MTL	dehydrogenasa
<i>lmbM</i>	312/324	syntéza MTL	dehydrogenasa
<i>lmbN</i>	267/285 ^c	syntéza MTL	izomerasa
<i>lmbZ</i>	301/334	syntéza MTL	oxidoreduktasa
<i>lmbP</i>	314/327	syntéza MTL	kinasa
<i>lmbO</i>	219/224	syntéza MTL	nucleotidyltransferasa
<i>lmbS</i>	378/382	syntéza MTL	aminotransferasa
<i>lmbR</i>	215/220	syntéza MTL	transaldolasa
<i>lmbQ</i>	347/368		neznámá funkce
<i>lmbT</i>	394/436 ^d	syntéza MTL	glykosyltransferasa
<i>lmbV</i>	236/239		neznámá funkce
<i>lmbW</i>	318/350 ^e	syntéza PPL	methyltransferasa, homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf5</i> (Hu <i>et al.</i> 2007)
<i>lmrB</i>	278/279	rezistence	rRNA methyltransferasa
<i>lmbX</i>	296/296	syntéza PPL	homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf15</i> (Hu <i>et al.</i> 2007)
<i>lmbY</i>	291/295	syntéza PPL	oxidoreduktasa, homolog ve shluku pro biosyntézu anthramycinu: <i>orf14</i> (Hu <i>et al.</i> 2007)
<i>lmbU</i>	210/225		neznámá funkce
<i>lmrC</i>	548/550	rezistence	ABC transportér

^a Počet identických aminokyselin s homologním proteinem z *S. lincolnensis* 78-11/ počet aminokyselin proteinu *S. lincolnensis* ATCC 25466

^b Proteinové funkce byly předpovězeny na základě BLAST analýzy, není-li uvedeno jinak.

^c +10 aminokyselin na C-konci

^d +22 aminokyselin on N-konci

^e +32 aminokyselin on N-konci

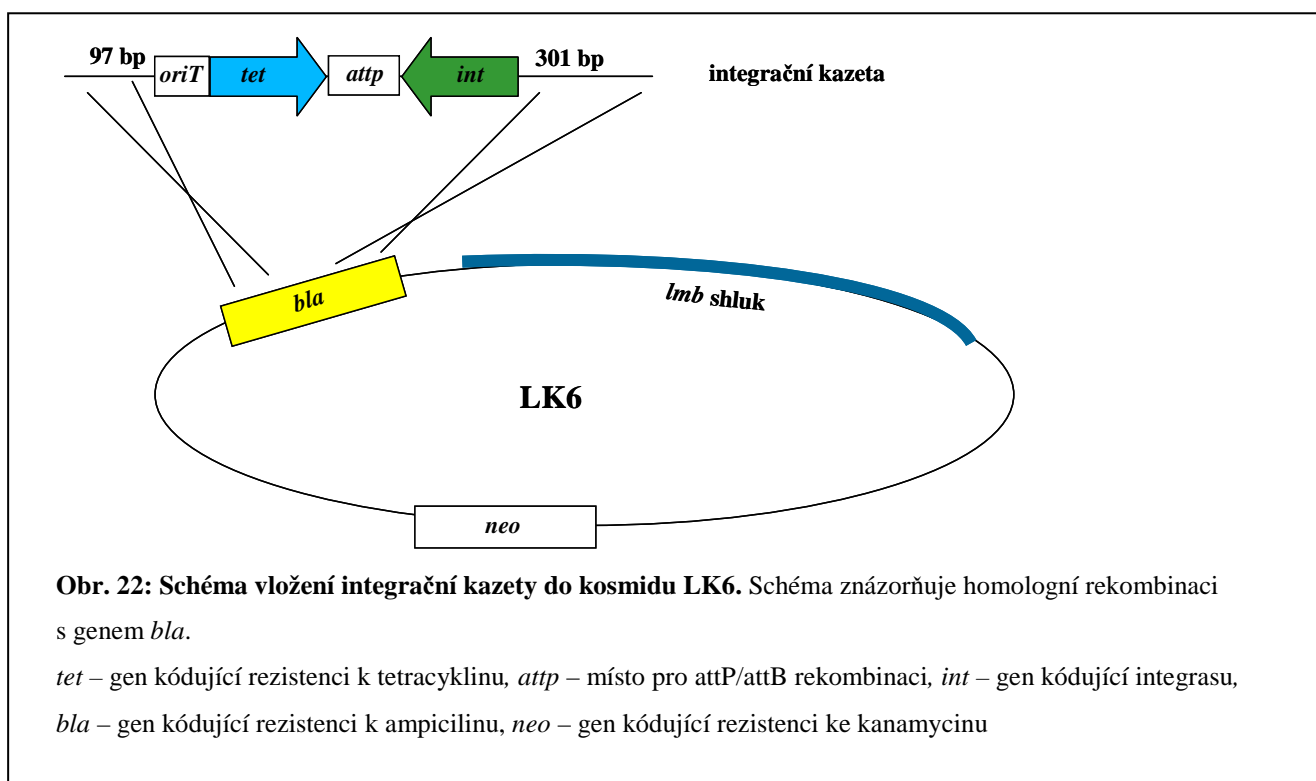
4.1.3.3. Umístění linkomycinového shluku v genomu *S. lincolnensis* ATCC 25466

Inzert v kosmidu LK6 je dlouhý 38217 bp, *lmrA-lmrC* (pozice v kosmidu LK6 2497-34348) tvoří úsek dlouhý 31852 bp. Analýza okrajových oblastí inzertu pomocí programu BLAST ukázala, že v typovém kmenu je linkomycinový shluk lokalizován mezi geny homologními s geny *S. coelicolor sco4638* (pozice v genomu *S. coelicolor* 5062845 - 5063669) a *sco4612* (pozice v genomu *S. coelicolor* 5036030 – 5037274). Vzdálenost těchto genů v *S. coelicolor* je 25571 bp, což přibližně odpovídá velikosti *lmb* shluku. V evoluci tedy pravděpodobně došlo k náhradě příslušného úseku genomu linkomycinovým biosyntetickým shlukem.

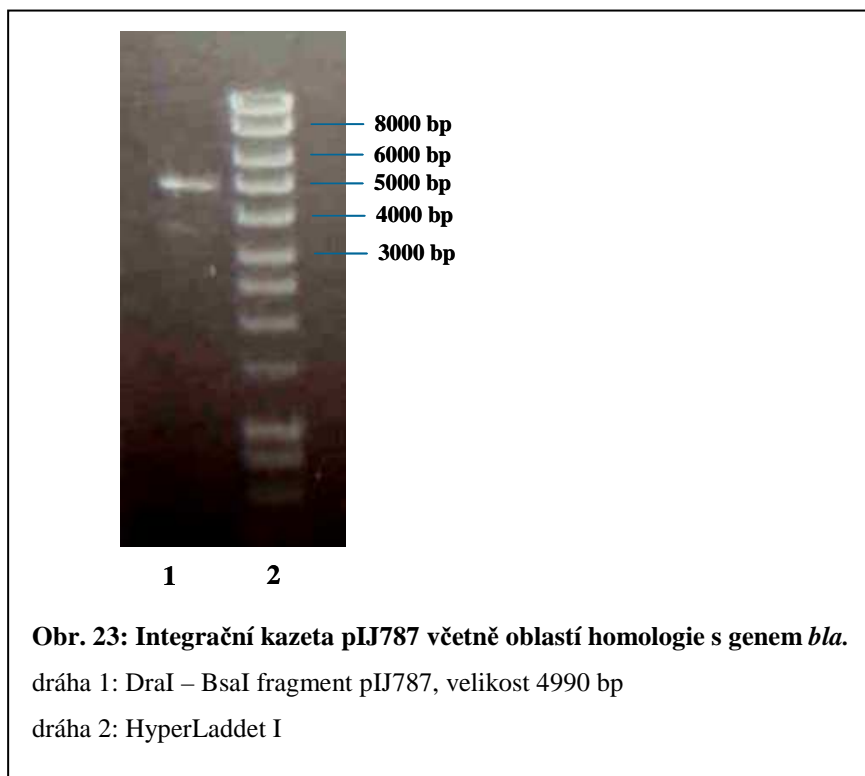
4.1.4. Heterologní exprese shluku pro biosyntézu linkomycinu

Kosmid LK6 byl vložen do chromozómů *S. coelicolor* CH 999, *S. coelicolor* M 145 a *S. lividans* 1365 pomocí integračního vektoru pIJ787 podle protokolu uvedeném v kap. 3.2.24.

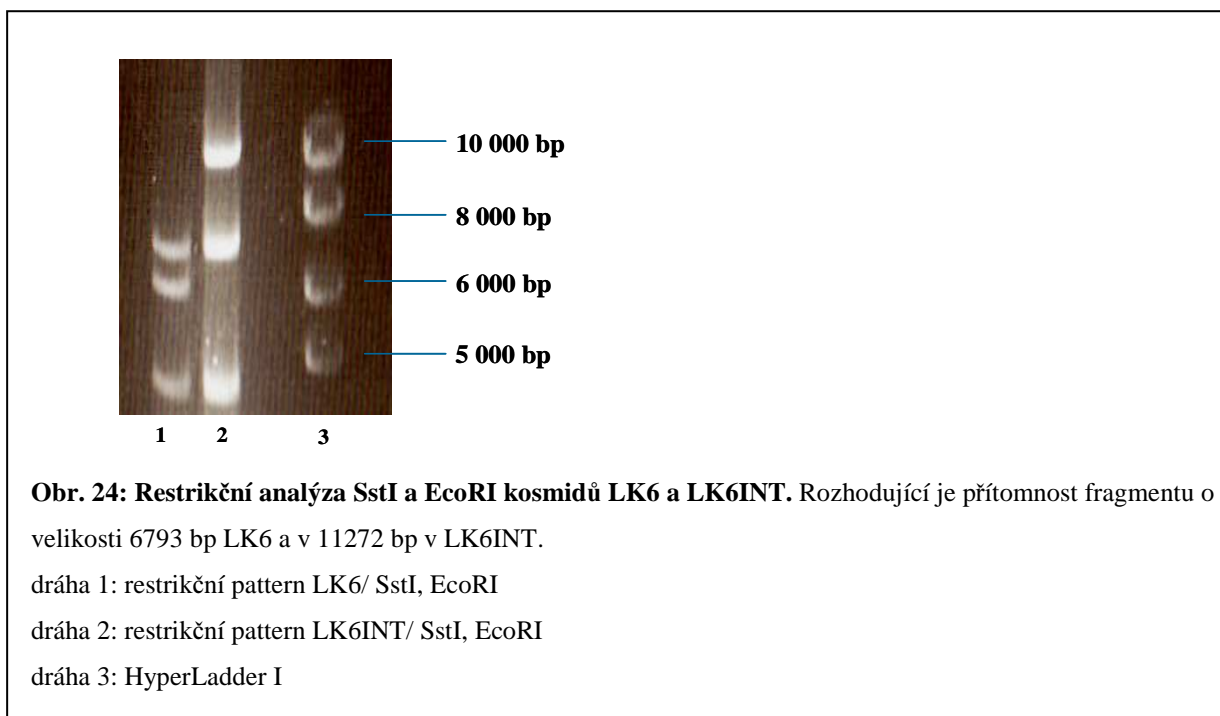
Integrační kazeta, obsažená ve vektoru pIJ787, je ohraničena sekvencemi homologními s genem *bla* (na jedné straně 97 bp a na druhé 301 bp), který kóduje rezistenci k ampicilinu v kosmidu SuperCosI. Homologní rekombinací s genem *bla* lze tedy vložit integrační kazetu do kosmidu LK6 (obr. 22).



Vektor nesoucí integrační kazetu pIJ787 byl rozštěpen restričními endonukleasami DraI a BsaI. Fragment o velikosti 4990 bp, který nese integrační kazetu včetně oblastí homologních s *bla* genem, byl izolován extrakcí z gelu (obr. 23).



Vložení kazety do kosmidu LK6 výměnou za gen *bla* probíhalo 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 elektroporací transformovány kosmidem LK6. Transformanty *E. coli* BW25113/pIJ790/LK6 byly selektovány na LB agar s chloramfenikolem (25 µg/ml), kanamycinem (50 µg/ml) a karbencilinem (100 µg/ml) při 30 °C. Pozitivní kolonie byly následně transformovány integrační kazetou (DraI/BsaI úsek vektoru pIJ787) a selektovány na LB agaru s tetracyklinem (5 µg/ml) při 37 °C. Po 16 h inkubace byla z několika kolonií izolována kosmidová DNA metodou alkalické lyze. Přítomnost kazety v LK6 byla testována restrikcí endonukleasami SstI a EcoRI. Kosmid nesoucí integrační kazetu byl označen LK6INT (obr. 24).



Kosmid LK6INT byl elektroporací vnesen do buněk *E. coli* ET12567 obsahujících plazmid pro mezidruhovou konjugaci pUZ8002 a transformanty *E. coli* ET12567/pUZ8002/LK6INT byly selektovány na LB agaru s tetracyklinem (5 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml). Poté byl kosmid LK6INT přenesen mezidruhovou konjugací do *S. coelicolor* CH 999, *S. coelicolor* M 145 a *S. lividans* 1365. Transkonjuganty byly selektovány přelitím MS agaru vodním roztokem kyseliny nalidixové (finální koncentrace 25 µg/ml) a kanamycinu (finální koncentrace 50 µg/ml). Kosmid LK6INT se do chromozómu streptomycet integruje celý, tedy včetně genu pro kanamycinovou rezistenci (obr. 24). Integrací do *S. coelicolor* CH 999 bylo získáno pět pozitivních, tedy ke kanamycinu rezistentních, klonů, integrací *S. coelicolor* M 145 byl získán jeden pozitivní klon a integrací do *S. lividans* 1365 více než 100 pozitivních klonů.

Produkce linkomycinu klony s integrovaným shlukem pro biosyntézu linkomycinu byla testována kultivací s citlivým organismem *Kocuria rhizophila* CCM 552. Z klonů kolem kterých se při kultivaci s citlivým organismem tvořila zóna byly vybrány dva: *S. coelicolor* CH 999 *int* a *S. coelicolor* M 145 *int* pro kultivaci v tekutém mediu. Analýza media pomocí UPLC (OLŠOVSKÁ *et al.* 2007) u obou potvrdila přítomnost produktu se stejnou pohyblivostí jako má linkomycin (obr. 25). Produkt byl izolován a analyzován hmotnostní spektrometrií, která ukázala stejnou molekulovou hmotnost iontu m/z 407.2 a stejný fragmentační patern jako linkomycin produkovaný *S. lincolnensis* ATCC 25466 (obr. 26).

Ve srovnání s typovým kmenem *S. lincolnensis* ATCC 25466, je produkce linkomycinu jen 2.9% u *S. coelicolor* CH 999 *int* a 1.3% u *S. coelicolor* M 145 *int* (tab. 7).

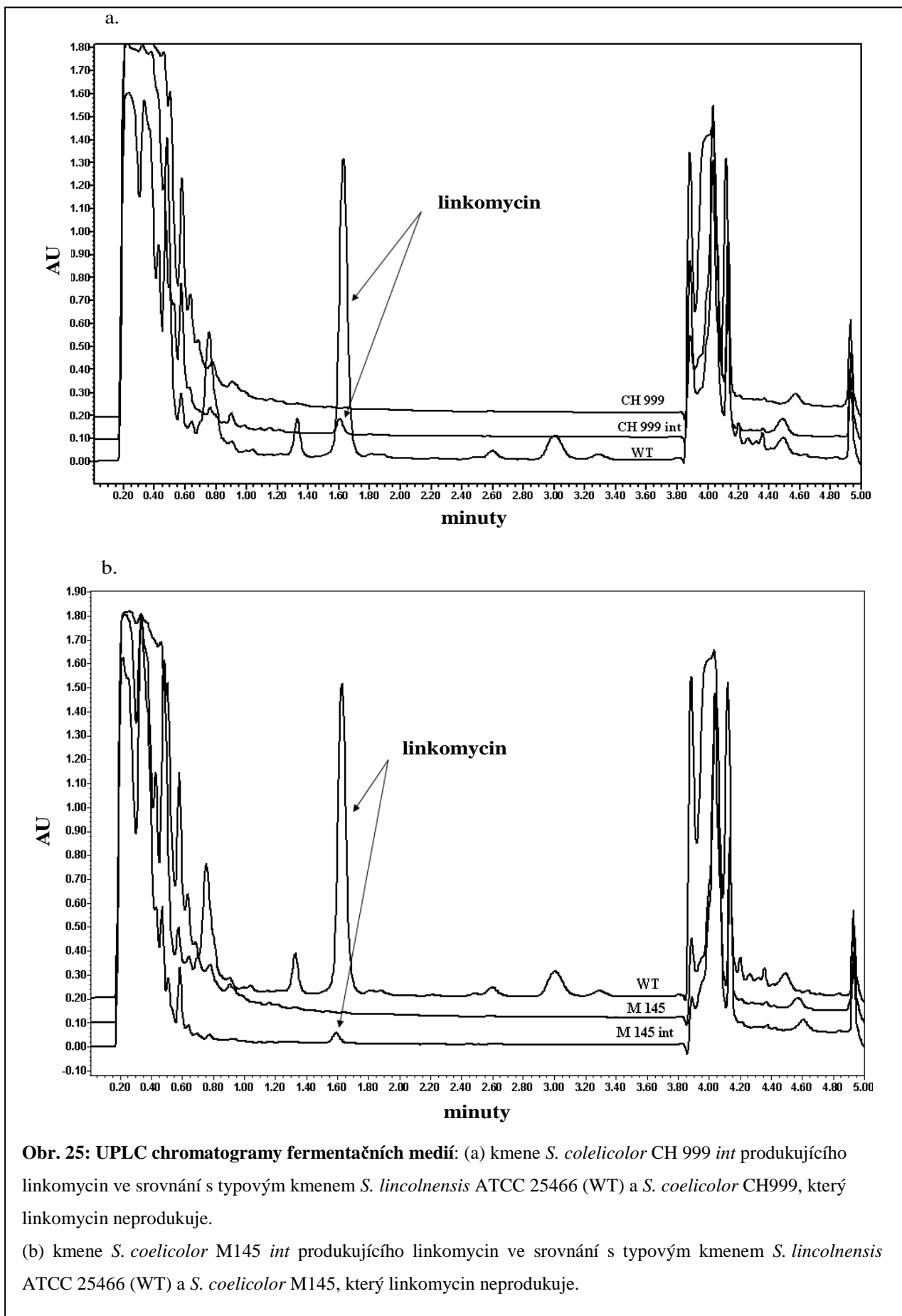
Integrací shluku do genomu *S. lividans* 1365 nebyly získány žádné klony produkující linkomycin.

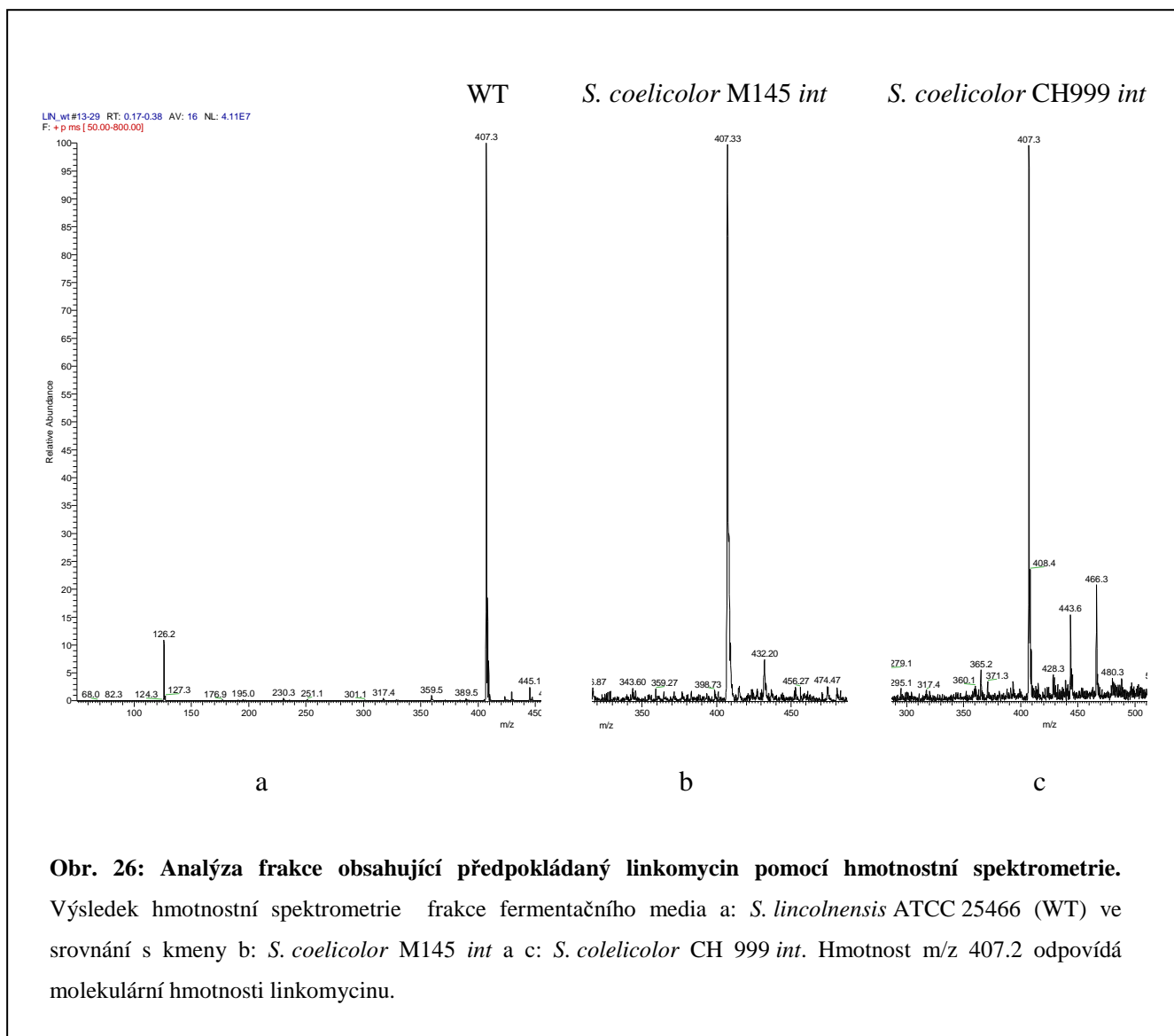
Tab. 7: Heterologní produkce linkomycinu hostitelskými kmeny streptomycet.

kmen	produkce linkomycinu (mg/l) ^b
<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	50.10 ± 1.40
<i>S. coelicolor</i> CH 999	nd ^a
<i>S. coelicolor</i> M 145	nd ^a
<i>S. coelicolor</i> CH 999 <i>int</i>	1.49 ± 0.05
<i>S. coelicolor</i> M 145 <i>int</i>	0.66 ± 0.02

^a pod detekční limit UPLC metody, který je (v kombinaci s prekoncentračním krokem) 0,1 mg/l.

^b Měření bylo provedeno UPLC metodou, výsledky reprezentují průměrnou hodnotu šesti měření.





4.2. Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu

Komparativní analýza příbuzných genových shluků je účinným nástrojem pro přiřazení funkcí jednotlivým genům. Linkomycin a celesticetin mají společnou aminocukernou část biosyntézy, komparativní analýza je tedy vhodným nástrojem pro analýzu genů linkosamidových antibiotik.

Tato kapitola se zabývá identifikací, izolací a určením sekvence shluku pro biosyntézu celesticetinu pro následnou komparativní analýzu se shlukem pro biosyntézu linkomycinu izolovaným z typového kmene (kap. 4.1.).

Výsledky komparativní analýzy linkosamidových antibiotik a následných pokusů jsou shrnuty v připravované publikaci Koběřská M., Ulanova D., Novotná J., Kopecký J., Kadlčík S., Jelínková M., Najmanová L., Gažák R., Olšovská J., Janata J. „Comparative analysis of celesticetin and lincomycin biosynthetic gene clusters: the evolutionary marriage of lincosamides and pyrrolobenzodiazepines“

4.2.1. Identifikace a izolace shluku genů pro biosyntézu celesticetinu ze *S. caelestis* ATCC 15084

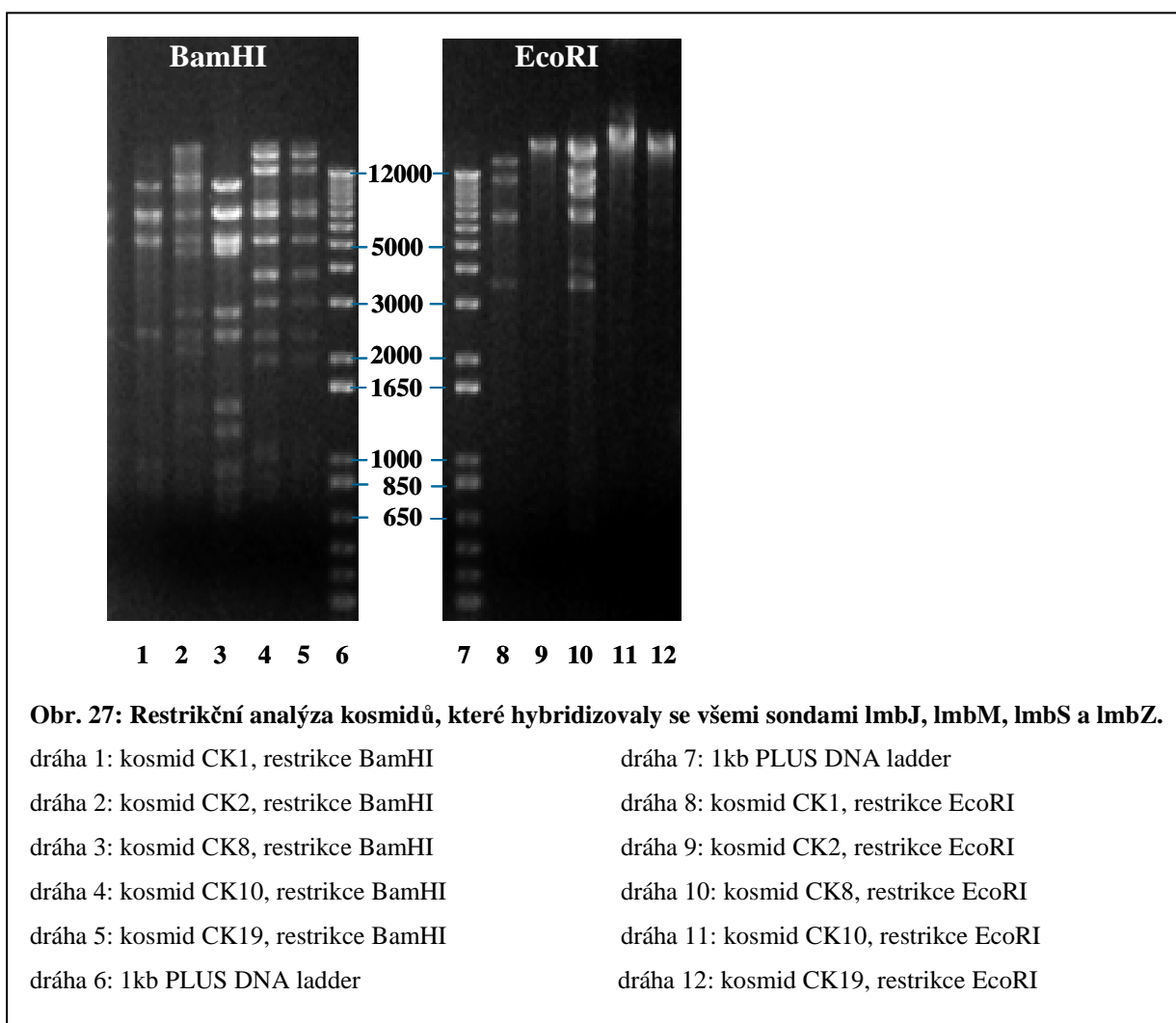
Kosmidová knihovna *S. caelestis* ATCC 15084 byla připravena podle protokolu Stratagene SuperCos I Cosmid Vector Kit (kap. 3.2.20.). Knihovna byla prohledávána koloniovou hybridizací se 300 bp dlouhými sondami připravenými podle konzervovaných úseků *lmb* genů *lmbJ*, *lmbM*, *lmbS*, *lmbZ* ze *S. lincolnensis* ATCC 25466. Gen *lmbJ* kóduje enzym katalyzující závěrečnou metylaci linkomycinu, analogická reakce se vyskytuje i v biosyntéze celesticetinu. Geny *lmbM*, *lmbS* a *lmbZ* podle porovnání s databázemi pravděpodobně kódují reakce v biosyntéze aminocukru společného pro obě linkosamidová antibiotika. Sondy byly připraveny PCR pomocí primerů uvedených v tab. 8.

Tab. 8: Primery pro PCR amplifikaci sond. Přidané sekvence s restričním místem jsou podtrženy.

primer	sekvence
lmbJs	5'- <u>CCGGAATTC</u> CCCTCCGTTTCGAGGCAGT-3'
lmbJa	5'- <u>AACCCAAGCTT</u> CGAACTCGGCGTGGGTA-3'
lmbMs	5'- <u>CCGGAATTC</u> TGAACCCGTCCAGGTGG-3'
lmbMa	5'- <u>AACCCAAGCTT</u> GTGTCGTCCACCTGGCCTC-3'
lmbSs	5'- <u>CCGGAATTC</u> ACCGCCTTGGTGCGTTC-3'
lmbSa	5'- <u>AACCCAAGCTT</u> GCCGAGGCGCAATCCTT-3'
lmbZs	5'- <u>CCGGAATTC</u> CGCGACCCGGCACATCT-3'
lmbZa	5'- <u>AACCCAAGCTT</u> GTGCGGGCCCTGATCGA-3'

Přibližně tisíc kolonií knihovny *S. caelestis* bylo koloniovou hybridizací testováno na přítomnost úseků homologních s uvedenými sondami. Z poměru přibližné velikosti genomu *S. caelestis* a shluku pro biosyntézu celesticetinu bylo možno odhadnout, že mezi tisíci kosmidy by mělo být identifikováno 3 - 5 pozitivních klonů nesoucích část nebo celý biosyntetický shluk celesticetinu.

V souladu s předpokladem, byla identifikována pětice kosmidových klonů CK1, CK2, CK8, CK10 a CK19 hybridizujících se všemi uvedenými sondami, nejsilnější signál měly klony CK1 a CK2. Odlišnosti klonů byly analyzovány mapováním restričními endonukleázami BamHI a EcoRI (obr. 27). Restriční patern jednotlivých kosmidů ukazuje, že klony CK8 a CK19 jsou pravděpodobně identické.



Okrajové oblasti inzertů v kosmidech CK1 a CK2 byly sekvenovány z univerzálních primerů SuperCosI. Sekvenční primery byly navrženy ze sekvencí T3 a T7 promotorů, které v kosmidu sousedí s inzertovanou sekvencí (tab. 9). Podle výsledků koloniové hybridizace a sekvenování se inzerty CK1 a CK2 překrývají a dohromady obsahují celý shluk pro biosyntézu celesticetinu.

Tab.9: Sekvenování okrajových oblastí vybraných kosmidů

kosmid	sekvenování z T3 promotoru	sekvenování z T7 promotoru
CK1	45% identita s LmbIH <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	60% identita s hypotetickým proteinem <i>S. coelicolor</i> Sco 2666
CK2	64% identita s LmbT <i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	88% identita s hypotetickým proteinem <i>S. coelicolor</i> Sco 5252

4.2.2. Sekvenování metodou “shotgun”

Byla připravena „miniknihovna“ z kosmidu CK1. Kosmid CK1 byl parciálně štěpen restriční endonukleázou Sau3A a fragmenty o velikosti 1 - 2 kbp byly extrahovány z gelu a ligovány do pBluescript linearizovaného enzymem BamHI. Inzerty dvaceti klonů byly sekvenovány z univerzálních primerů pBluescript. Získané sekvence byly analyzovány programem BLAST. Sekvence homologní s *lmb* geny nebo s jinými geny sekundárního metabolismu byly vybrány pro návrh primerů k dalšímu sekvenování inzertu v kosmidu CK1.

4.2.3. Sekvenování inzertů kosmidů CK1 a CK2 metodou “primer walking”

Z okrajových oblastí sekvencí získaných z miniknihovny z CK1 byly navrženy primery pro další sekvenování rozšiřující sekvenci na obě strany. Nové sekvence, které vykazovaly podobnost s geny sekundárního metabolismu nebo přímo s *lmb* geny byly znovu využity pro návrh primerů. Postupně bylo dosaženo propojení všech sekvencí v jediný kontig zahrnující celý shluk pro biosyntézu celesticetinu včetně jeho blízkého okolí.

Kosmidy CK1 a CK2 se překrývají 18383 bp dlouhým úsekem. Sekvenační reakce byly navrhovány tak, aby každý úsek celého shluku byl sekvenován minimálně dvakrát a to z obou směrů. Sekvence obsažená v obou kosmidech byla sekvenována v jednom směru z jednoho a v opačném směru z druhého kosmidu. V celé sekvenci obsažené v obou kosmidech nebyl nalezen žádný rozdíl.

Celá sekvence je uložena v Genbank pod přístupovým heslem **GQ844764**.

4.2.4. Sekvenční analýza

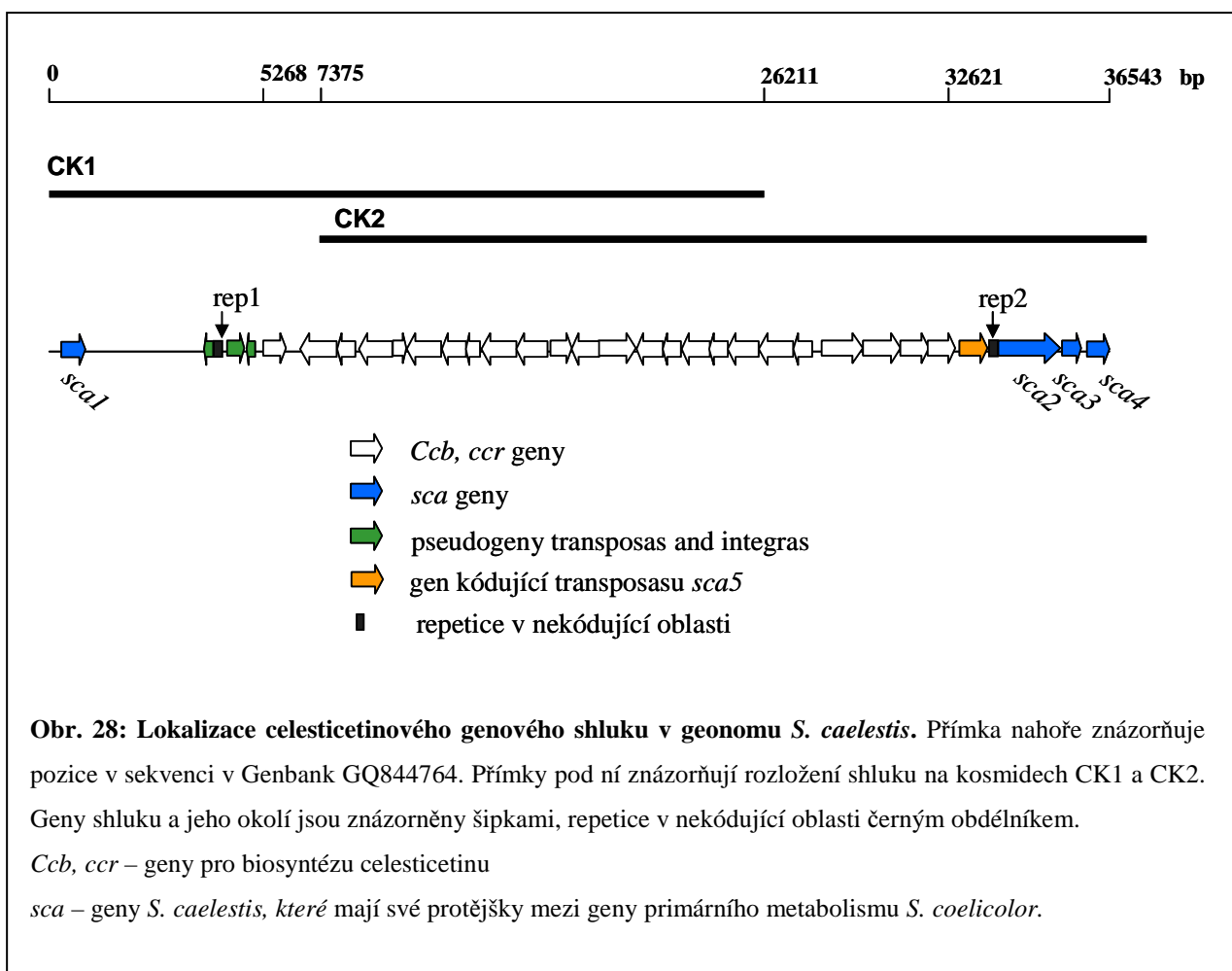
4.2.4.1. Hranice shluku pro biosyntézu celesticetinu

Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu, tedy úsek *ccr1* - *ccb5* je dlouhý 27350 bp a obsahuje 24 hypotetických genů (obr. 30).

Hranice shluku byly určeny komparativní analýzou. Geny *sca1* a *sca2* lemující shluk mají vysokou podobnost s geny primárního metabolismu *S. coelicolor* *sco4741* a *sco2677*. Za homologem genu *sco2677* následují geny *sca3* a *sca4* homologní s geny *sco2676* a *sco2675*.

Analýza nejbližšího okolí shluku objasnila místo a mechanismus včlenění celesticetinového shluku genů do hostitelského organismu. V nekódující oblasti mezi geny *sca1* (homologní se *sco4741*) a *ccr1* byla nalezena 112 bp dlouhá sekvence, která má 81% identitu se sekvencí nekódující oblasti mezi geny *S. coelicolor* *sco2678* a *sco2677* (pozice v genomu *S. coelicolor* je 194502-194615). Druhá 215 bp dlouhá sekvence homologní se stejnou oblastí (194444-194658) v *S. coelicolor* byla u *S. caelestis* nalezena v nekódující oblasti mezi geny *sca5* a *sca2*, tedy na druhé straně celesticetinového shluku (obr. 28). Vzájemná podobnost těchto dvou repetic je 94% (obr. 29). Obě repetice jsou navíc doprovázeny pseudogeny transposas nebo integras. Je tedy zřejmé, že shluk byl včleněn do genomu *S. caelestis* v místě nekódující oblasti mezi geny homologní se *sco2677* a *sco2678* a nedošlo zde k nahrazení příslušné sekvence shlukem jako v případě linkomycinového biosyntetického shluku (kap. 4.1.3.3.).

Gen kódující transposasu *sca5* sousedící s *ccb5* má 88% identitu s genem kódujícím transposasu *Sco5328* *S. coelicolor*. Gen *sca5* má ale v pozici 398 delecii způsobující posun čtecího rámce. Pravděpodobně se jedná o jeden z mechanismů regulace transpozice.



```

>lc1|46667
Length=215

Score = 174 bits (94), Expect = 6e-49
Identities = 107/113 (94%), Gaps = 1/113 (0%)
Strand=Plus/Plus

rep1  2  CGGCGACCGACAGTGACAGGCGAGCCTCAGCCGCCAACCACGAAA-CCCAGGTCAGAGCC  60
      |||
rep2  44  CGGCGACCGACAGTGACAGGCGAGTCTCGGCCGCCATCCACGAAAACCCAGGTCAGAGCC  103
      |||

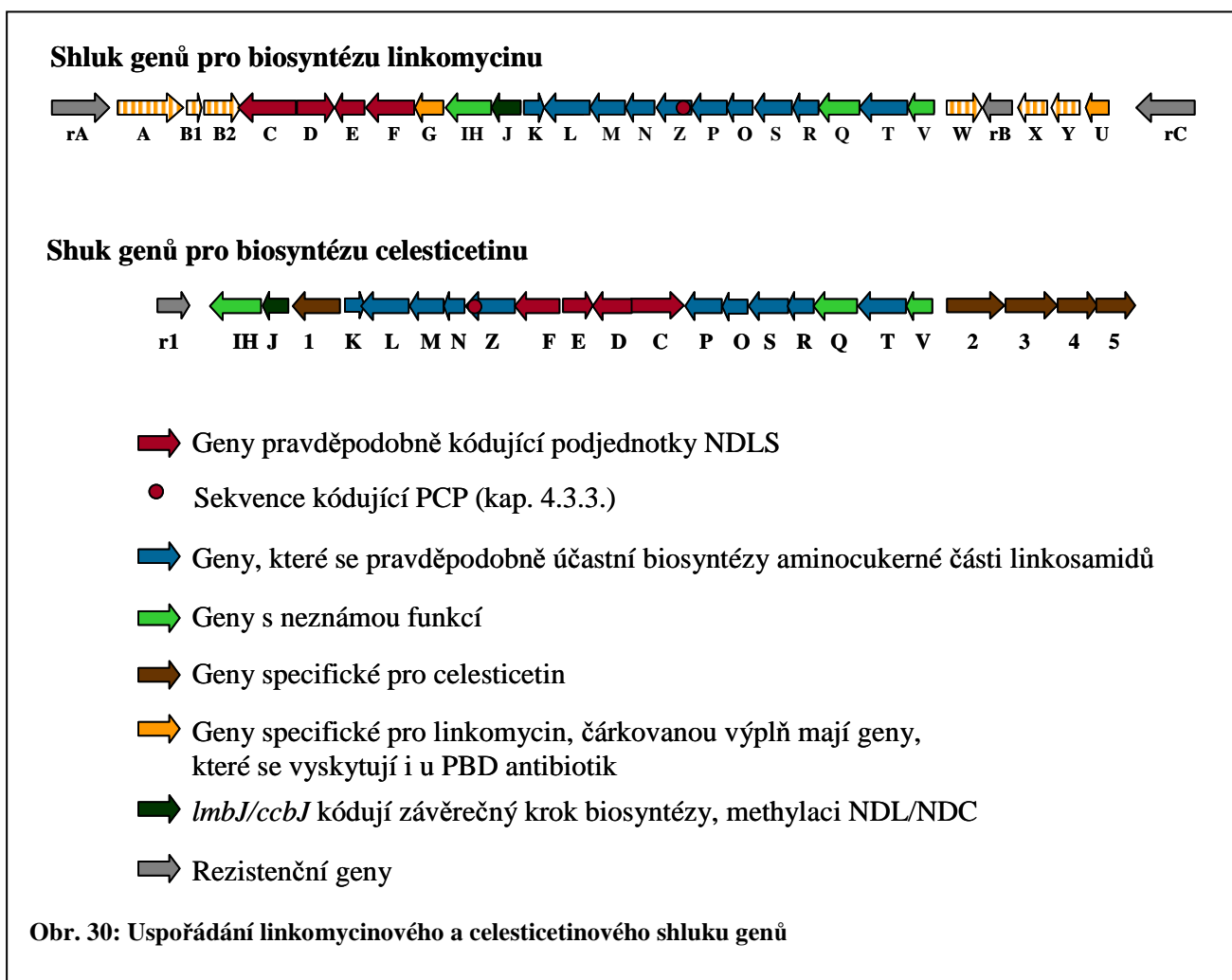
rep1  61  CCTGCGCCAGACGCGTTTTCCACCCAGGGGTGGCGGTACGGCAAGTTGGGGTGT  113
      ||
rep2  104 CCCGCGCCAGACGCGTTTTCCACCCAGGGGTGGCGGTACGGCAAGATGGGGTGT  156
      ||
  
```

Obr. 29: Vzájemná podobnost repetice rep1 a rep2, které se nacházejí v nekódující oblasti v těsné blízkosti obou stran shluku pro biosyntézu celesticetinu (viz Obr. 28). Alignment sekvencí je v programu BLAST.

4.3. Komparativní analýza linkosamidových shluků genů

Jednotlivé otevřené čtecí rámce shluku celesticetinu byly určeny pomocí BLAST analýzy a programu Artemis. Funkce pravděpodobných proteinů kódovaných shlukem jsou shrnuty v tab. 10.

Oba srovnávané linkosamidové shluky sdílí osmnáct homologních genů (obr. 30), které většinou kódují biosyntézu aminocukerné části antibiotik a podjednotky kondenzačního enzymu NDLS. Jejich vzájemná podobnost je 39-73 %. Linkomycinový shluk obsahuje osm specifických biosyntetických genů, homology šesti z nich se vyskytují v genových shlucích již publikovaných PBD antibiotik (kap. 2.4., tab. 2). Celesticetinový shluk naopak obsahuje pět specifických biosyntetických genů, z toho čtyři kódují proteiny pro syntézu salicylátové podjednotky a její připojení (*ccb1*, *ccb2*, *ccb3* a *ccb5*) a jeden specifickou metylaci (*ccb4*). Celesticetinový shluk obsahuje jediný rezistenční gen *ccr1*, zatímco linkomycinový tři. Komparativní analýza obou linkosamidových shluků a jejich porovnání s databázemi umožnila přiřadit funkce většině genů pro biosyntézu linkomycinu.



4.3.1. Geny kódující biosyntézu aminocukerné části linkosamidových antibiotik

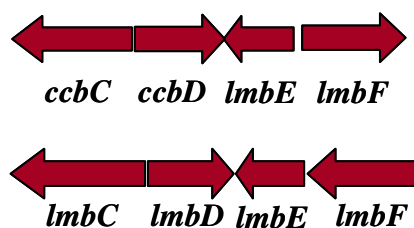
V linkomycinovém shluku genů jsou geny *lmbK–lmbV* seskupeny v jednom podshluku. Všechny jedenáct genů následujících za *lmbK* je ve stejné orientaci. Homology genů úseku *lmbK-lmbV* byly nalezeny i v celesticetinovém shluku, tam jsou ale rozděleny do dvou modulů *ccbK–ccbZ* a *ccbP–ccbV*, mezi které je vložen modul genů *ccbC, ccbD, ccbE* a *ccbF* (obr. 30). Kromě dvou proteinových párů CcbV/LmbV a CcbQ/LmbQ, vykazují všechny kódované proteiny podobnost s proteiny cukerného metabolismu a příslušné orthologní proteiny mají vysokou míru vzájemné homologie (59–74 %).

4.3.2. Geny kódující biosyntézu specifické aminokyselinové části linkomycinu, PPL

Geny *lmbA, lmbB1, lmbB2, lmbX, lmbY* a *lmbW* své homology v biosyntetickém shluku celesticetinu nemají, což potvrzuje jejich účast na biosyntéze PPL z L-tyrosinu. Homology těchto genů byly naopak nalezeny u producentů PBD antibiotik (kap. 2.4.). Podle sekvenční homologie kóduje konzervovaná čtveřice genů *lmbB1, lmbB2, lmbX, lmbY* enzymy katalyzující sled reakcí přeměňujících L-tyrosin na ethyl-prolin (NOVOTNÁ *et al.* 2004, HU *et al.* 2007), tedy jakousi páteř biosyntetické dráhy, zatímco u *lmbW* homologů předpokládáme, že kódují fakultativní methylaci a *lmbA* homology kódují enzymy s podpůrnou funkcí.

4.3.3. Geny kódující podjednotky NDLS

Nejdůležitějším výsledkem komparativní analýzy je predikce genů kódujících podjednotky NDLS. Podle dřívějších předpokladů (CHUNG *et al.* 1997) je NDLS multimerní komplex několika podjednotek. Kromě dvanácti genů cukerného metabolismu sdílí oba shluky šest dalších homologů. Čtyři z nich, *ccbC/lmbC–ccbF/lmbF*, se v průběhu evoluce biosyntézy linkosamidů zachovaly v kompaktním modulu, jediným rozdílem je vzájemná orientace genů *ccbF-ccbE* a *lmbF-lmbE* (obr. 31).



Obr. 31: Modul genů pravděpodobně kódujících podjednotky NDLS. Nahoře vzájemná orientace genů v celesticetinovém shluku, dole v linkomycinovém shluku.

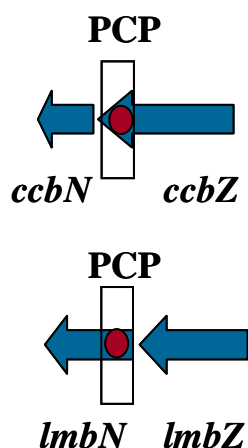
Ve shluku pro biosyntézu celesticetinu je tento modul vmezeřen mezi dva „ostrovky“ genů pravděpodobně kódující biosyntézu aminocukru TCA (obr. 30). Geny NDLS modulu mají nižší míru vzájemné homologie (39–60 %) než geny cukerného metabolismu (59–74 %), nicméně kompaktnost jejich pohybu mezi linkosamidovými shluky naznačuje, že jejich funkce souvisejí. Na základě porovnání s databázemi lze odvodit funkci dvou genů z této čtveřice: *ccbC* a *lmbC* kódují proteiny podobné samostatným adenylačním doménám NRPS, oba proteiny vykazují nejvyšší podobnost s rodinou enzymů aktivujících prolin. V biosyntéze linkosamidů tedy rozpoznávají a aktivují příslušný aminokyselinový prekurzor (*CcbC* aktivuje prolin, *LmbC* aktivuje PPL). Detailní charakterizace a funkční testování proteinů *CcbC* a *LmbC* je náplní doktorského studia Mgr. Stanislava Kadlčíka (kap. 4.5.1.).

CcbE/LmbE má 33% podobnost s amidasou mykothiol *S*-konjugátu *Mca* z *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, který štěpí amidovou vazbu konjugátu mykothiolu za vzniku konjugátu kyseliny (CAMUS *et al.* 2002). Předpokládáme proto, že *CcbE/LmbE* má katalytickou funkci, účastní se tvorby amidové vazby mezi aminokyselinovou a aminocukernou částí linkosamidů.

Funkce dalších dvou genů modulu ze sekvenční homologie není zřejmá. *CcbF* a *LmbF* mají ze všech ortologních párů nejnižší míru vzájemné homologie. Jejich podobnost několika aminotransferázám naznačuje, že tyto enzymy zřejmě interagují s aktivovanou aminokyselinou, které se u obou linkosamidů výrazně liší (prolin vs. PPL). Poslední pár proteinů ze čtveřice kódující potenciální podjednotky NDLS, *CcbD/LmbD* není podobný s žádným proteinem v databázích, jedná se o unikátní sekvenci. Z těchto důvodů bylo nutné účast zejména posledních dvou párů proteinů na kondenzační reakci prokázat inaktivací a následnými obohacovacími pokusy s oběma prekurzory kondenzační reakce, MTL a PPL. Tato část je popsána v kap. 4.4.2. a spolupodílely se se mnou na ní RNDr. Dana

Ulanova Ph.D., RNDr. Jitka Novotná Ph.D. a RNDr. Lucie Najmanová Ph.D., analýzu produktu prováděli RNDr. Jana Olšovská Ph.D. a Mgr. Zdeněk Kameník. Vzájemné interakce všech čtyř předpokládaných podjednotek byly navíc testovány dvouhybridovým systémem, tuto část vypracovala RNDr. Jitka Novotná Ph.D. (kap. 4.5.2.).

Ve čtveřici genů kódujících pravděpodobné podjednotky NDLS však chybí gen pro PCP, který je nezbytnou součástí vícepodjednotkových NRPS. Podrobná analýza genů *ccbN-ccbZ* a *lmbN-lmbZ* ukázala na přítomnost sekvence kódující domény o velikosti 80 aminokyselinových zbytků s vazebným místem pro 4'-fosfopantethein (PP vazebný protein) a vysokým stupněm homologie s ACP doménami proteinů z biosyntézy polyketidových antibiotik. Tento PP vazebný protein je v linkomycinovém shluku kódován sekvencí lokalizovanou na 5' konci genu *lmbN* zatímco v celesticetinovém shluku je tato sekvence na 3' konci genu *ccbZ*. Geny *lmbN* a *lmbZ* v linkomycinovém shluku a *ccbN* a *ccbZ* v celesticetinovém shluku spolu sousedí (obr. 32). Sekvence kódující PCP je tedy v obou shlucích součástí genu, jehož zbylá část kóduje jiný enzym, v obou případech enzym aminocukerného metabolismu (obr. 30, 32). Nezávislost PCP kódující domény na zbytku genu byla testována inaktivačními pokusy (Ulanova 2009).



Obr. 32: Umístění PCP kódující domény v *ccb* shluku (nahore) a *lmb* shluku (dole). V průběhu evoluce došlo k „přeskoku“ této sekvence z 5' konce *ccbZ* na 3' konec *lmbN*.

4.3.4. Biosyntéza salicylátové podjednotky celesticetinu

Geny *ccb1–ccb5* byly nalezeny pouze v genomu *S. caelestis* ATCC 15084, nemají homology v *S. lincolnensis* ATCC 25466. Kromě genu *ccb4* (kap. 4.3.4.) tyto geny pravděpodobně kódují biosyntézu a připojení salicylátové podjednotky.

Protein Ccb3 má 43% identitu se salicylátsynthasou MbtI *Mycobacterium tuberculosis*, která katalyzuje přímou konverzi chorismátu na salicylát (HARRISON *et al.* 2006).

Protein Ccb2 má 57% identitu s předpokládanou salicyl-AMP ligasou SdgA *Streptomyces sp.* WA46 (ISHIYAMA *et al.* 2004), pravděpodobně tedy katalyzuje aktivaci salicyl-SCoA.

Ccb5 patří mezi NADP-dependentní alkoholdehydrogenasy a pravděpodobně katalyzuje redukční krok při tvorbě dvouuhlíkatého řetězce, který propojuje TCA a salicylát.

Gen *ccb1* je lokalizován odděleně od všech ostatních genů specifických pro biosyntézu celesticetinu. Protein Ccb1 obsahuje kondenzační doménu, která se vyskytuje u několika vícepodjednotkových enzymů v biosyntéze peptidových antibiotik (STACHELHAUS *et al.* 1998). V biosyntéze celesticetinu Ccb1 pravděpodobně katalyzuje vznik vazby mezi dvouuhlíkatým řetězcem a TCA.

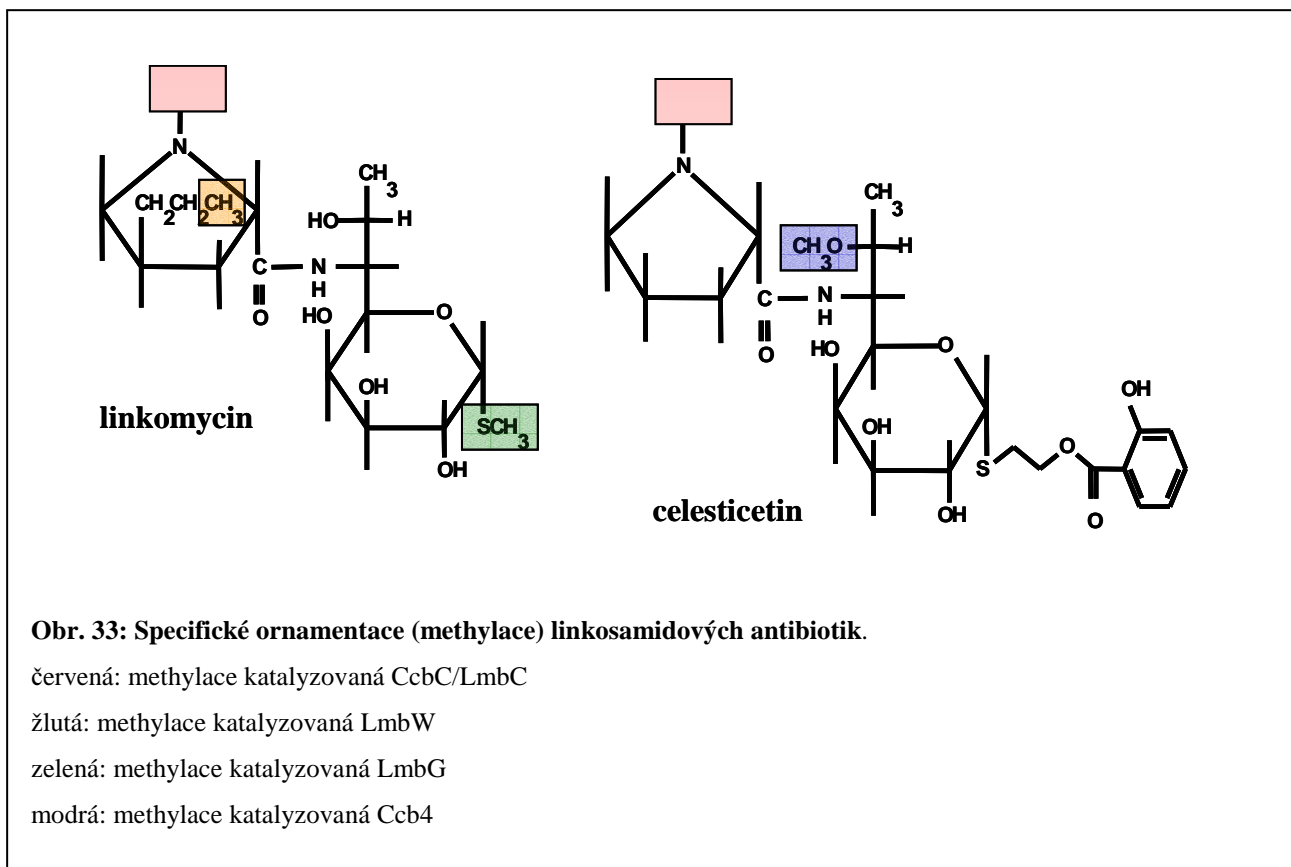
4.3.4 Geny kódující methyltransferasy v biosyntéze linkosamidových antibiotik

Linkosamidové shluky sdílejí jediný pár ortologních genů kódujících methyltransferasu *ccbJ/lmbJ*. LmbJ katalyzuje závěrečný krok v biosyntéze linkomycinu, metylaci NDL (KADLEC 2000), stejný biosyntetický krok se vyskytuje i u celesticetinu. Ostatní geny kódující methyltransferasy jsou specifické pro jednotlivá antibiotika a jejich přítomnost ve shlucích reflektuje rozdíly ve specifické ornamentaci linkomycinu a celesticetinu.

Geny *lmbW* a *lmbG* jsou specifické pro linkomycinový shluk genů. Protein LmbW má své protějšky v biosyntéze PBD látek a pravděpodobně katalyzuje C-methylaci propylového nebo propylidinového bočního řetězce linkomycinu, anthramycinu a sibiromycinu (obr. 33).

Protein LmbG je podobný mnoha methyltransferasám a pravděpodobně je zodpovědný za thiomethylaci MTL podjednotky linkomycinu v pozici 1 (obr. 33).

Naproti tomu celesticetinový shluk má navíc gen pro O-methyltransferasu *ccb4*, který pravděpodobně kóduje metylaci TCA v pozici 7 (obr. 33).



4.3.5. Rezistenční geny ve shlucích pro biosyntézu linkosamidů

Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu obsahuje jenom jeden rezistenční gen *ccl1*, který kóduje protein z rodiny 23S rRNA methyltransferas, zatímco shluk genů pro biosyntézu linkomycinu kóduje rezistenční geny tři: *lmrA* a *lmrC* kódují efluxní proteiny; *lmrB* také kóduje 23S rRNA methyltransferasu. Nicméně proteiny Ccl1 a LmrB nepatří do stejné fylogenetické skupiny. Skutečnost, že linkosamidové shluky nemají společné geny kódující rezistenci potvrzuje, že HGT rezistenčních genů probíhá s vyšší frekvencí než genů biosyntetických a celých biosyntetických shluků

4.3.6. Geny s neznámou funkcí ve shlucích pro biosyntézu linkosamidů

Jediný z *lmb* genů, jehož homolog se nevyskytuje ani ve shluku pro biosyntézu celesticetinu, ani žádného z PBD antibiotik, je *lmbU*. Mezi homology LmbU patří CloE (POJER *et al.* 2002) a NovE (STEFFENSKY *et al.* 2000), pravděpodobné regulační proteiny v biosyntéze aminokumarinových antibiotik. Dřívější výsledky naší laboratoře ukazují, že v biosyntéze linkomycinu je transkripce *lmbU* zahájena dříve než transkripce ostatních biosyntetických genů (JELÍNKOVÁ, nepublikovaná data), což naznačuje jeho pravděpodobnou roli v regulaci biosyntézy linkomycinu.

Dalšími proteiny s regulační nebo podpůrnou funkcí jsou CcbIH/LmbIH a CcbQ/LmbQ, které patří do rodiny proteinů modulátorů DNA gyrasy PmbA-TldD (JANATA *et al.* 2001, MURAYAMA *et al.* 1996).

Tab. 10: Analýza jednotlivých genů shluku pro biosyntézu celesticetinu. V tabulce jsou uvedeny předpokládané funkce kódovaných proteinů a jejich porovnání s proteiny biosyntézy linkomycinu a jiných producentů antibiotik.

Gen	počet amino-kyselin v proteinu	účast v	předpokládaná funkce	identita kódovaných proteinů	
				<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	ostatní producenti antibiotik ^a
<i>ccrI</i>	341	rezistence	23S rRNA methyltransferasa		TlrD <i>Streptomyces fradiae</i> (CAA66307) 141/266 (53%)
<i>ccbIH</i>	484	?	neznámá funkce	LmbIH (ABX00605) 296/464 (63%)	peptidasa U62 modulátor DNA gyrasy <i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724 (ACK41515) 177/476 (37%)
<i>ccbJ</i>	256	methylace celesticetinu v pozici 1	NDC methyltransferasa	LmbJ (ABX00606) 152/251 (60%)	methyltransferasa typu 11 <i>Frankia sp.</i> EUN1f (EFC81668) 101/243 (41%)
<i>ccbI</i>	437	biosyntéza salicylátové podjednotky	obsahuje kondenzační doménu (spojení salicylátu a TCA)		hypotetický protein MkanA1_21000 <i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478 (ZP_04750465) 67/194 (34%)

<i>ccbK</i>	185	biosyntéza aminocukru ? regulace?	histidinol fosfatasa	LmbK (ABX00607) 110/173 (63%)	Histidinolfosfát fosfatasa <i>Leptospirillum rubarum</i> (EAY56998) 77/173 (44%)
<i>ccbL</i>	436	biosyntéza aminocukru	dehydrogenasa	LmbL (ABX00608) 270/426 (63%)	předpokládaná UDP-glukoso 6-dehydrogenasa <i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246 (ZP_02733835) 159/390 (40%)
<i>ccbM</i>	325	biosyntéza aminocukru	dehydrogenasa	LmbM (ABX00609) 239/323 (73%)	UDP-glukosa 4-epimerasa <i>Methanosarcina mazei</i> Go1 (NP_633158) 145/318 (45%)
<i>ccbN^a</i>	202	biosyntéza aminocukru	isomerasa	LmbN (ABX00610) 143/201 (71%)	sedoheptuloso 7-fosfátisomerasa <i>Sorangium cellulosum</i> 'Soce 56' (YP_001614387) 76/197 (38%)
<i>ccbZ</i>	427	3' konec: biosyntéza aminocukru	3' konec: oxidoreduktasa	LmbZ (ABX00611) 213/332 (64%)	předpokládaný LmbZ <i>Acidobacteria bacterium</i> (AAP58526) 128/324 (39%)
		5' konec: kondenzační reakce	5' konec: PCP		
<i>ccbF</i>	416	kondenzační reakce	aminotransferasa	LmbF (ABX00603) 158/397 (39%)	aspartát/tyrosin/ aromatická aminotransferasa <i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728 (ZP_04484866) 94/316 (29%)
<i>ccbE</i>	274	kondenzační reakce	pravděpodobná N-acetylglukosaminylphosfatidylinositol - deacetylasa	LmbE (ABX00602) 164/273 (60%)	protein rodiny LmbE <i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSM 10331 (YP_0033110204) 102/277 (36%)

<i>ccbD</i>	355	kondenzační reakce	neznámá funkce	LmbD (ABX0060) 199/356 (55%)	žádná významná podobnost
<i>ccbC</i>	505	kondenzační reakce	aktivace prolinu	LmbC (ABX00600) 278/506 (54%)	acyl-CoA synthetasa <i>Streptomyces rishiriensis</i> (AAG29789) 202/507 (39%)
<i>ccbP</i>	323	biosyntéza aminocukru	kinasa	LmbP (ABX00612) 189/320 (59%)	Galactokinasa/ mevalonát kinasa <i>Leptospirillum rubarum</i> (EAY57001) 114/328 (34%)
<i>ccbO</i>	232	biosyntéza aminocukru	nukleotidyl-transferasa	LmbO (ABX00613) 144/222 (64%)	nukleotidyltransferasa a <i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC 51196 (YP_002753941) 86/229 (37%)
<i>ccbS</i>	386	biosyntéza aminocukru	aminotransferasa	LmbS (ABX00614) 273/367 (74%)	DegT/DnrJ/EryC1/St rS aminotransferasa <i>Dethiosulfovibrio peptidovorans</i> DSM 11002 (ZP_06391694) 174/381 (45%)
<i>ccbR</i>	222	biosyntéza aminocukru	transaldolasa	LmbR (ABX00615) 151/218 (69%)	transaldolasa <i>Cellulomonas flavigena</i> DSM 20109 (ZP_04365550) 100/211 (47%)
<i>ccbQ</i>	385	?	neznámá funkce	LmbQ (ABX00616) 164/377 (43%)	předpokládaný TldD protein, <i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12 (YP_002251723) 59/231 (25%)
<i>ccbT</i>	435	biosyntéza aminocukru	glycosyl-transferasa	LmbT (ABX00617) 283/435 (65%)	glykosyltransferasa <i>Yersinia aldovae</i> ATCC 35236 (ZP_04619711) 120/433 (27%)

<i>ccbV</i>	237	?	neznámá funkce	LmbV (ABX00618) 133/238 (55%)	hypotetický protein Tur 3446 <i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183 (YP_003301022) 79/205 (38%)
<i>ccb2</i>	548	biosyntéza salicylátové podjednotky	acyl-CoA synhtetasa, předpokládaná salicyl-AMP ligasa		předpokládaná salicyl-AMP ligasa <i>Streptomyces sp.</i> WA46 EntE (BAC78380) 311/544 (57%)
<i>ccb3</i>	455	biosyntéza salicylátové podjednotky	salicylát-synthasa		anthranilátsynthasa komponent I <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338 (YP_001104896) 244/431 (56%)
<i>ccb4</i>	369	methylace celesticetinu pozici 7'	O-methyl- transferasa		rodina 2 proteinů O-methyltransferas <i>Pirellula staleyi</i> DSM 6068 YP 003370082 133/347 (38%)
<i>ccb5</i>	351	biosyntéza salicylátové podjednotky	alkohol dehydrogenasa		NADP-dependentní alkohol dehydrogenasa <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338 (YP_001104080) 225/346 (65%)

4.4. Inaktivace genů

4.4.1. Inaktivace genů *lmbIH*, *lmbQ* a *lmbU*

Pro analýzu pomocí inaktivace byly nejdříve vybrány geny *lmbU*, *lmbIH*, *lmbQ* (kap. 4.3.6.), u kterých předpokládáme regulační nebo pomocnou funkci. Geny byly inaktivovány metodou REDIRECT (kap. 3.2.23.).

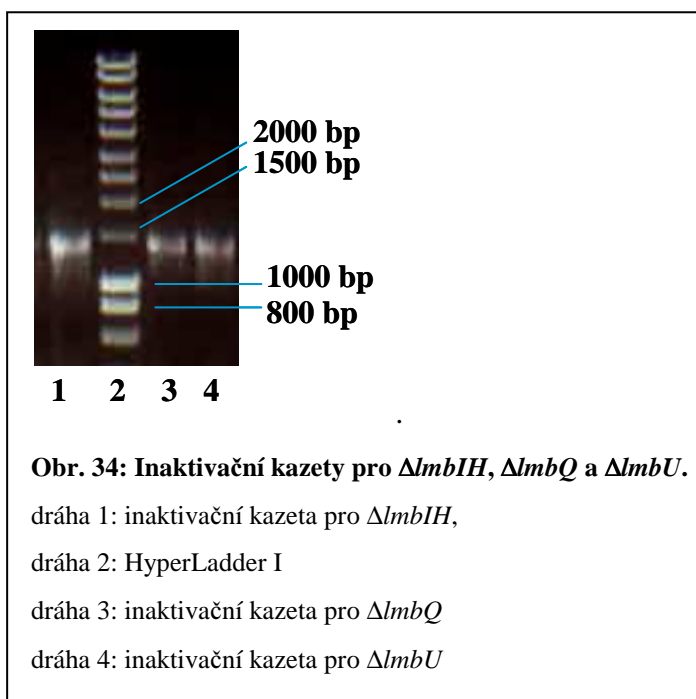
4.4.1.1. Příprava inaktivačních kazet

Inaktivační primery byly navrženy podle protokolu viz (kap. 3.2.23.) a jsou shrnuty v tab. 11.

Tab. 11: Primery pro inaktivace *lmb* genů

primer	sekvence
IHf	5'- <u>GCCGCTACCACGTGTCCGTCTACGCCCGGGCGCACGGTGATTCCGGG</u> GATCCGTCGACC-3'
IHr	5'- <u>GTGAAACGTCGTGTGCAACGGGCGGTTGTGGGGTGGTCATGTAGGCT</u> GGAGCTGCTTC-3'
Qf	5'- <u>GGCCGACGCCGCGGTCGACAGGCTGGCGGAGGTGTCATGATTCCGG</u> GGATCCGTCGACC-3'
Qr	5'- <u>GAGCGAGGAAGCTCGGAGGTGCTGAGCGGGGGCGGGCTATGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTC-3'
Uf	5'- <u>CCAAAGGCAAGAGCGTGAGAAAGGGATGGCAGCCGCGTGATTCCGG</u> GGATCCGTCGACC-3'
Ur	5'- <u>ACCGCCCGCGGGGCGGCAGGGCGGCGGGGCTCAGAGTTATGTAGGC</u> TGGAGCTGCTTC-3'

Aby nedošlo k možné kontaminaci budoucí transformační reakce kruhovou formou plazmidu pIJ773, používá se jako templát pro PCR reakci EcoRI–HindII fragment vyštěpený z plazmidu pIJ 773, který zahrnuje sekvenci samotné inaktivační kazety o velikosti 1382 bp a její krátké okolí (14 bp). Vložení inaktivační kazety do kosmidu LK6 bylo ověřeno PCR s testovacími primery.



4.4.1.2. Integrace inaktivačních kazet 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 elektroporací transformovány kosmidem LK6. 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. Pozitivní kolonie byly následně transformovány inaktivačními kazetami 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 (nesou více kopií mutovaného kosmidu). Z těchto kolonií byla izolována kosmidová DNA

metodou alkalické lyze. Přítomnost kazety byla testována PCR s testovacími primery a kontrolní restrikcí enzymem SstI. Testovací primery jsou navrženy vně cílových genů tak, aby byla amplifikována inaktivační kazeta nahrazující cílový gen spolu s okolím o souhrnné velikosti 300–400 bp.

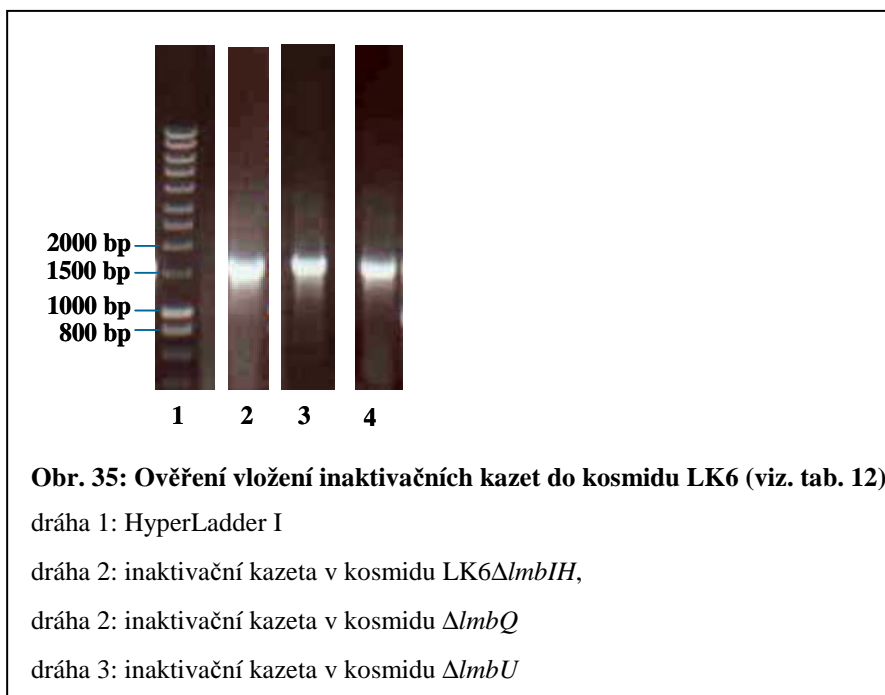
Tab. 12: Výpočet očekávaných velikostí ověřovacích PCR fragmentů při přípravě kosmidů s inaktivovanými geny *lmbIH*, *lmbQ* a *lmbU*.

	velikost (bp) wt ^a	velikost (bp) kazeta ^b
Δ <i>lmbIH</i> ^c	1694	1617
Δ <i>lmbQ</i>	920	1607
Δ <i>lmbU</i>	1340	1601

a. Stav v typovém kmenu *S. lincolnensis* ATCC 25466 - velikost fragmentu nesoucího příslušný gen a jeho okolí.

b. Stav po vložení kazety místo genu – velikost kazety (1382 bp) a okolí

c. Velikost mutované a nemutované formy se téměř neliší, proto byla přítomnost inaktivační kazety navíc ověřena restrikční analýzou enzymem SstI.



4.4.1.3 Vnesení inaktivačních kazet do chromozómu *S. lincolnensis* a měření produkce linkomycinu

Kosmidy LK6 Δ IH, LK6 Δ Q a LK6 Δ U byly elektroporací vneseny do *E. coli* ET12567/pUZ8002 a transformanty byly selektovány na LB agaru s apramycinem (50 μ g/ml) a karbenicilinem (100 μ g/ml). Poté byly kosmidy LK6 Δ IH, LK6 Δ Q a LK6 Δ U mezidruhovou konjugací přeneseny do *S. lincolnensis* ATCC 25466. Transkonjuganty 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 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 za inaktivační kazetu.

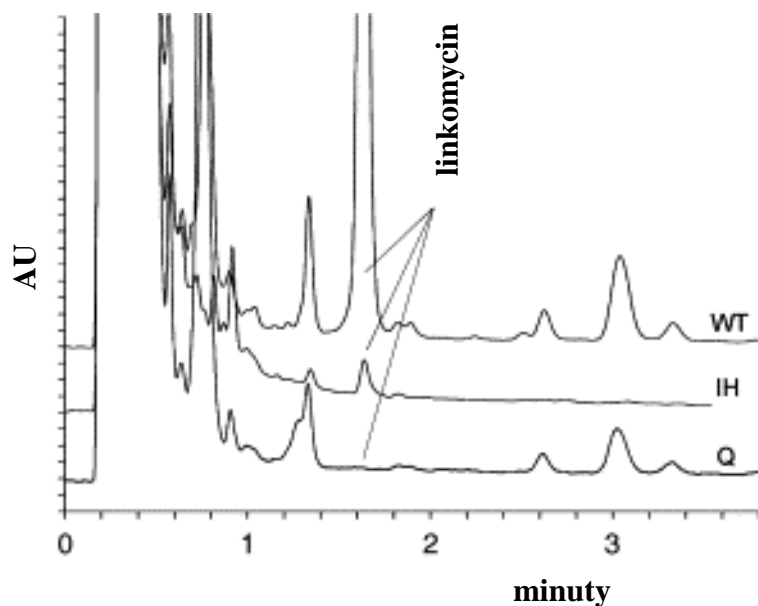
U klonů *S. lincolnensis* Δ IH a *S. lincolnensis* Δ Q, ve kterých je daný gen nahrazen inaktivační kazetou, byla metodou UPLC testována přítomnost linkomycinu ve fermentačním mediu (tab. 13, obr. 36). Výsledky byly součástí publikace Olšovská, J., Jelínková, M., Man, P., Koběrská, M., Janata, J., and 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.

Tab. 13: Produkce linkomycinu mutovanými kmeny *S. lincolnensis* Δ IH a *S. lincolnensis* Δ Q.

kmen	produkce linkomycinu (mg/l) ^b
<i>S. lincolnensis</i> ATCC 25466	50.10 \pm 1.40
<i>S. coelicolor</i> Δ IH	1.35 \pm 0.03
<i>S. coelicolor</i> Δ Q	nd ^a

^a pod detekční limit UPLC metody, který byl 2,2 mg/l, v kombinaci s SPE prekoncentračním krokem byl snížen na 0,1 mg/l (OLŠOVSKÁ *et al.* 2007)

^b Měření bylo provedeno UPLC metodou, výsledky reprezentují průměrnou hodnotu šesti měření.



Obr. 36: UPLC chromatogramy fermentačních médií: (a) kmene *S. lincolnensis* Δ IH a *S. lincolnensis* Δ Q ve srovnání s typovým kmenem *S. lincolnensis* ATCC 25466 (WT).

Další postup zahrnoval výměnu inaktivační kazety za jizvu, aby nedocházelo k ovlivnění přepisu „downstream“ genů. U mutovaných kmenů označených $j\Delta$ IH, $j\Delta$ Q a $j\Delta$ U byla znovu testována schopnost produkce linkomycinu metodou UPLC analýzy fermentačního média. Tato část pokusu byla součástí disertační práce RNDr. D. Ulanové Ph.D. (ULANOVA 2009). UPLC kultivačních médií prokázala produkci linkomycinu u kmenů *S. lincolnensis* $j\Delta$ IH a $j\Delta$ Q prokázána, avšak jen těsně nad limitem detekce (který byl v tomto případě 1 μ g/ml), u *S. lincolnensis* $j\Delta$ U produkce linkomycinu prokázána nebyla.

4.4.2. Inaktivace genů pravděpodobně kódujících podjednotky NDLS: *lmbC*, *lmbD*, *lmbE* a *lmbF*

Jak již bylo zmíněno v kap. 4.3.3. nejdůležitějším výstupem komparativní analýzy linkosamidových sluků je predikce genů kódujících podjednotky NDLS. Pro ověření předpokládané funkce byly geny modulu *lmbC–lmbF* inaktivovány. Na této práci jsem se podílela spolu s RNDr. Danou Ulanovou Ph.D., RNDr. Jitkou Novotnou Ph.D. a RNDr. Lucíí Najmanovou Ph.D.

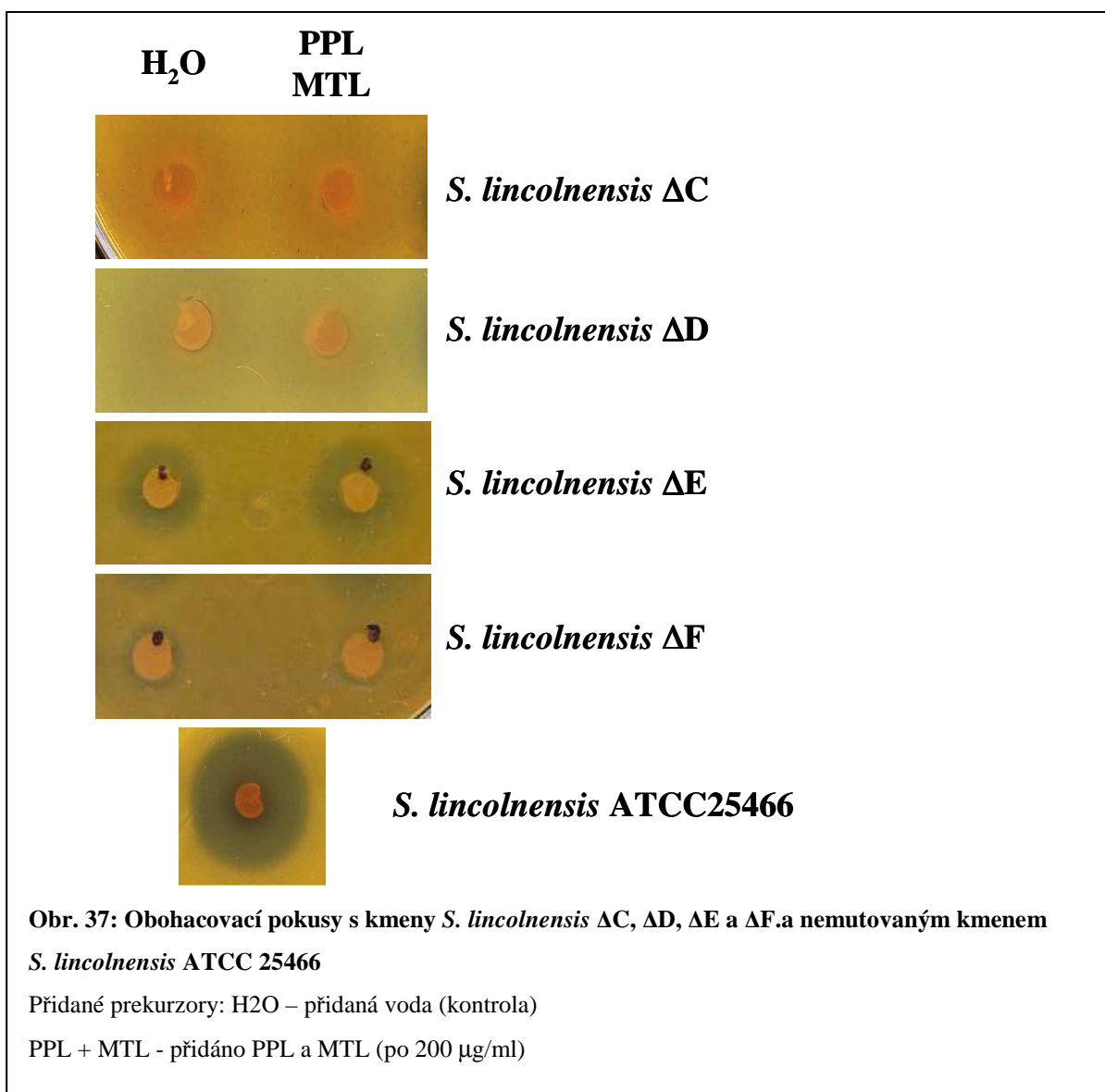
Geny *lmbC*, *lmbD*, *lmbE* a *lmbF* byly inaktivovány metodou REDIRECT stejným způsobem, jako je popsáno v kap. 4.4.1. Inaktivační primery jsou shrnuty v tab. 14.

Tab. 14: Primery pro inaktivace *lmb* genů.

primer	sekvence
lmbCFor	5'-TCCTTCATGTCGTCCTCCGTTTCGACTCTCCACACTCCTCATTCCG GGGATCCGT CGACC-3'
lmbCRev	5'-TCACTCCCCGCGTGTGACGAGTTCCTCCCTGAGCGCGCGT GTAGGCTGGAGCTG CTTC-3'
lmbDFor	5'-GACATGAAGGACGTCGAAGAGGTCACAGCGGGCGGACATGATT CCGGGGATCCGTCGACC-3'
lmbDRev	5'-GTTACCGCTCCCGCGTGAACCGCGCGCCACGGCCCTATGTA GGCTGGAGCTGCTTC-3'
lmbEFor	5'-CGAACAAGGGAAAGTAAGGAACGAGACATGACTCAGTGCAT TCCGGGGATCCGTCGACC-3'
lmbERev	5'-TCACGCGGGAGCGGTGAACAGGTCGTGCACCACGGCTTCTGT AGGCTGGAGCTGCTTC-3'
lmbFFor	5'-GCTCGGCACGGCGGGGGCGACCCGATGACCGC CACGGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'
lmbFRev	5'-TTTCCCTTGTTTCGATTCGCTGGGTGGGCGGCCG TCACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'

4.4.2.1. Testování obnovení produkce linkomycinu

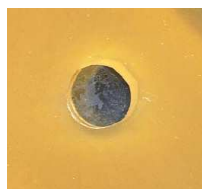
Schopnost obnovení produkce linkomycinu u kmenů *S. lincolnensis* ΔC, ΔD, ΔE a ΔF po obohacení média o prekurzory kondenzační reakce PPL a MTL byla testována pomocí kultivace s citlivým organismem *K. rhizophila* CCM 552. Typový kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 byl použit jako kontrolní produkující kmen. Spory kmenů byly zaočkovány na bločky agarů s přídavkem prekurzorů PPL a MTL. Po sedmi dnech kultivace v 28 °C byly bločky přemístěny na agarovou plotnu převrstvenou suspenzí *K. rhizophila*, a po 16 h byly odečteny zóny inhibice růstu (obr. 37).



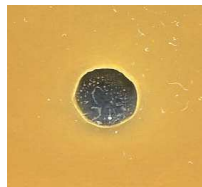
Inaktivace genů *lmbC*, *lmbD* a *lmbF* vedla ke zrušení produkce linkomycinu. Obohacením média o oba prekurzory závěrečné reakce katalyzované NDLS, PPL a MTL, nebyla produkce antibiotika obnovena, což potvrzuje účast těchto genů na předposledním kroku biosyntézy linkomycinu, tj. kondenzaci podjednotek PPL a MTL. Kolem *S. lincolnensis* ΔF je patrná minimální inhibiční zóna, která může indikovat zachování slabé produkce antibiotika. Produkce antibiotika s inaktivovaným genem *lmbE*, byla snížena oproti produkci divokého kmene, jak je patrné z porovnání velikostí příslušných zón (obr. 37), nicméně nebyla zcela zrušena. V přítomnosti obou prekurzorů kondenzační reakce nedošlo k výraznějšímu zvětšení inhibiční zóny. To opět svědčí o pravděpodobné účasti proteinu LmbE v kondenzační reakci.

Kmeny *S. lincolnensis* ΔE , kolem kterého se tvoří zřetelná inhibiční zóna a *S. lincolnensis* ΔF s minimální zónou byly kultivovány v tekutém médiu s cílem zjistit pomocí UPLC analýzy, zda je antibakteriální aktivita způsobena přítomností linkomycinu nebo jiné látky v produkčním médiu. Současně byl proveden mikrobiální test antibakteriální aktivity: 200 μ l supernatantu bylo nanášeno do jamek v plotnách, které byly po zaschnutí přelity suspenzí *K. rhizophila* (obr. 38). Tento test překvapivě ukázal, že v tekutém médiu obou inaktivovaných kmenů k produkci antibakteriální látky nedocházelo. Produkce antibiotika u *S. lincolnensis* ΔE je tedy zachována pouze při kultivaci na pevném agaru, ne však při kultivaci v tekutém médiu. Produkce linkomycinu a jeho množství mohlo být proto kvantifikováno metodou UPLC pouze po kultivaci na pevné půdě. Agarové bločky, na kterých byly pěstovány kmeny *S. lincolnensis* ΔE a *S. lincolnensis* ΔF byly extrahovány methanolem a extrakt byl analyzován metodou UPLC. Ta u *S. lincolnensis* ΔE potvrdila přítomnost látky s retenčním časem shodným s linkomycinem produkovaným typovým kmenem. U *S. lincolnensis* ΔF linkomycin identifikován nebyl (obr. 39).

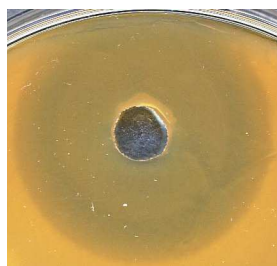
Předpokládáme proto, že gen *lmbE* je pro produkci linkomycinu nezbytný a že se účastní právě kondenzační reakce, nicméně za určitých podmínek (např. při pěstování na pevné půdě) je v *S. lincolnensis* exprimován i další neidentifikovaný gen, jehož enzymový produkt je schopen aktivitu LmbE částečně komplementovat.



S. lincolnensis ΔE

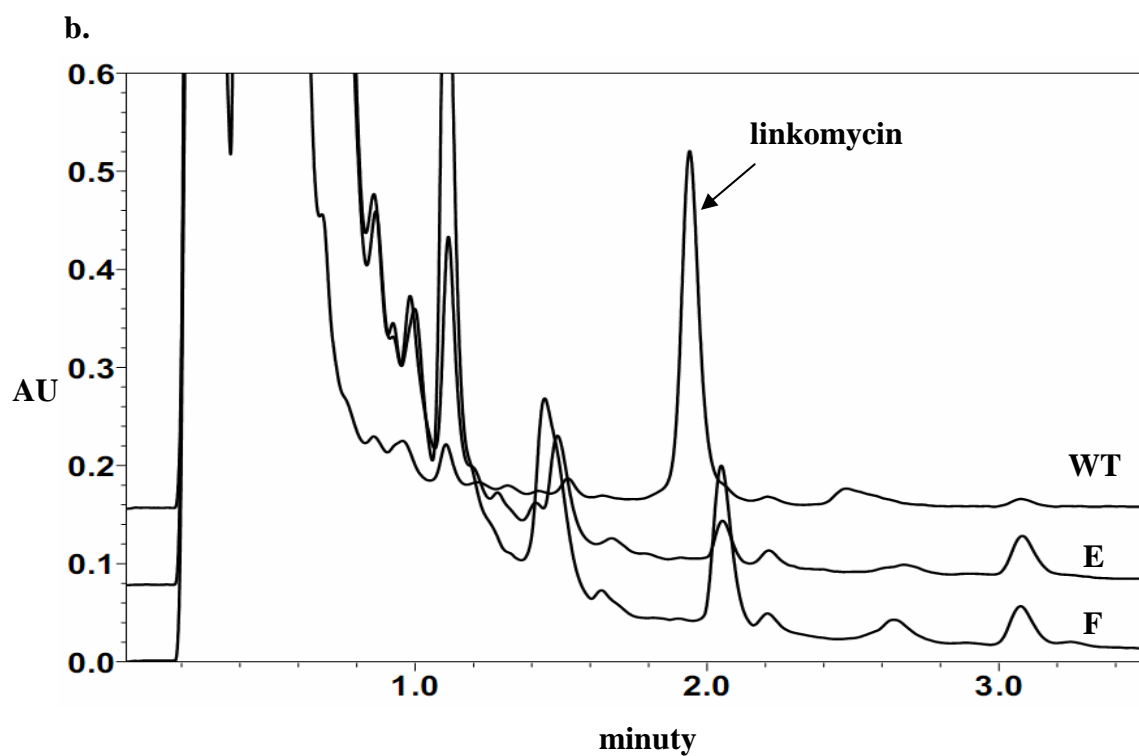
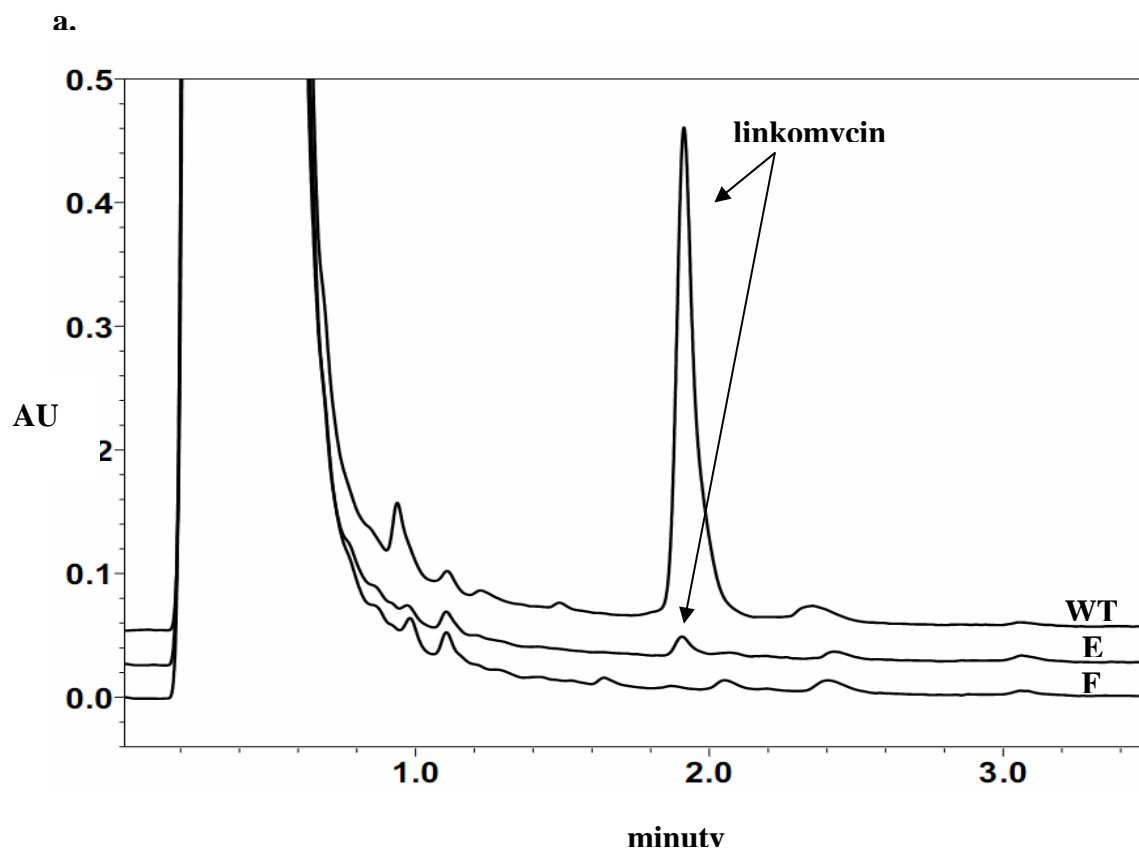


S. lincolnensis ΔF



S. lincolnensis ATCC25466

Obr. 38: Testování produkce linkomycinu v tekutém médiu mutantními kmeny *S. lincolnensis* ΔE a *S. lincolnensis* ΔF ve srovnání s nemutovaným kmenem *S. lincolnensis* ATCC25466. 200 μ l tekutého fermentačního média bylo nanášeno do jamek v plotnách, které byly následně přelity suspenzí *K. rhizophila*.



Obr. 39: a. UPLC analýza agarového bločku, na kterém byl pěstován typový kmen *S. lincolnensis* ATCC 25466 (WT), *S. lincolnensis* ΔE (E) a *S. lincolnensis* ΔF (F).

b. UPLC analýza fermentačních médií typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 (WT), *S. lincolnensis* ΔE (E) a *S. lincolnensis* ΔF (F).

Kromě výše uvedených inaktivačních experimentů byla připravena série inaktivačních pokusů potvrzujících nezávislost sekvence kódující hypotetickou PCP 5' koncovou částí genu *lmbN* (kap. 4.3.3.). PCP doména by měla být nezbytnou součástí vícepodjednotkové NDLS, avšak nekóduje ji žádný z výše uvedených genů.

Byla inaktivována samostatně 5' koncová část *lmbN* pravděpodobně kódující PCP doménu, dále samostatně 3' koncová část *lmbN* pravděpodobně kódující enzym s isomerasovou aktivitou v biosyntéze MTL i celý gen *lmbN*. Obohacovací pokusy s MTL obnovily produkci linkomycinu pouze v případě mutanty s inaktivovanou 3' koncovou částí *lmbN*, což potvrzuje její účast v biosyntéze MTL i nezávislost PCP domény kódované 5' koncovou částí genu *lmbN* (ULANOVA 2009).

4.5. Navazující výsledky

V této kapitole uvádím kvůli vysvětlení souvislostí stručný přehled výsledků dalších spolupracovníků z naší laboratoře. Výsledky bezprostředně navazují na komparativní analýzu linkosamidových shluků a jsou nezbytné pro některé závěry týkající se procesu evoluce linkosamidových antibiotik formulované v diskusi (kap. 5.).

4.5.1. Biochemická charakterizace proteinů LmbC a CcbC; posun substrátové specifity adenylační domény aktivující aminokyselinu (výsledky Mgr. S. Kadlčíka)

Geny *lmbC/ccbC* dle analýzy jejich sekvencí (kap. 4.3.3.) kódují A-doménu NDLS. Celková míra podobnosti sekvencí LmbC a CcbC k ostatním samostatným A-doménám specifickým pro prolin je srovnatelná, nicméně vlastní vazebné místo pro substrát se u těchto dvou proteinů výrazně liší. Zatímco vazebné místo CcbC, proteinu specifického pro prolin, splňuje konsensus prolinových A-domén (tab. 15), vazebné místo proteinu LmbC je významně modifikováno; z osmi aminokyselinových, které jej tvoří, jsou v LmbC konzervovány pouze dva. Z pěti zbytků, kterými se vazebná místa CcbC a LmbC odlišují, má CcbC čtyři společné s ostatními samostatnými prolin-specifickými A-doménami (tab. 15). Mutace právě v těchto aminokyselinách jsou tedy pravděpodobnou příčinou modifikované substrátové specifity LmbC z prolinu na PPL.

Tab. 15: Aminokyseliny tvořící substrát-vazebná místa samostatných A-domén aktivujících prolin a jeho deriváty. Modře jsou označeny shodné aminokyseliny.

A-doména	substrát	236	239	278	299	301	322	330	331	organismus
		202	205	244	272	274	298	306	307	
		204	207	246	274	276	300	308	309	
LmbC	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C	<i>S. lincolnensis</i>
CcbC	prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C	<i>S. caelestis</i>
RedM	prolin	L	F	Y	L	A	L	V	C	<i>S. coelicolor</i>
PigL	prolin	L	F	Y	T	A	W	V	C	<i>Serratia marcescens</i>
PltF	prolin	L	L	Y	L	A	L	V	C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CloN4	prolin	L	L	Y	L	A	L	V	C	<i>S. roseochromogenes</i>
CouN4	prolin	L	L	Y	L	A	L	V	C	<i>S. rishiriensis</i>

Kinetické parametry ukazují, že CcbC má schopnost aktivovat pouze prolin, u substrátů EPL a PPL nebyla naměřena žádná aktivita ani při stonásobné koncentraci enzymu. Naproti tomu LmbC má schopnost aktivovat všechny tři substráty a to s klesající aktivitou PPL > EPL > prolin. Hodnoty K_m , k_{cat} a k_{cat}/K_m CcbC k prolinu a LmbC k PPL jsou téměř shodné. Široká substrátová specifita LmbC nezahrnuje pouze PPL a přirozené menší substráty EPL a prolin, ale i syntetické deriváty prolinu s delším alkylovým řetězcem BuPL ((2*S*,4*R*)-4-butylprolin) a PePL ((2*S*,4*R*)-4-pentylprolin). Překvapivě byly naměřené hodnoty K_m , k_{cat} a k_{cat}/K_m pro BuPL and PePL lepší než pro PPL (tab. 16).

Tab. 16: Kinetické parametry CcbC, LmbC a mutantního LmbC G308V.

	substrát	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ min ⁻¹)
CcbC	prolin	0.39	42	110
	EPL	nebylo detekováno	nebylo detekováno	nebylo detekováno
	PPL	nebylo detekováno	nebylo detekováno	nebylo detekováno
LmbC	prolin	480	20	0.042
	EPL	7.0	23	3.3
	PPL	0.28	33	120
	BuPL	0.12	43	350
	PePL	0.053	53	990
LmbC G308V	prolin	240	4.9	0.020
	EPL	25	0.25	0.010
	PPL	5.8	0.39	0.070

Z porovnání pěti aminokyselinových zbytků, ve kterých se vazebná místa CcbC a LmbC liší, vyplývá, že u LmbC tři z nich mají výrazně menší postranní řetězec, tedy umožňují umístění většího substrátu do vazebného místa. Konkrétně aminokyselina G308 u LmbC se nachází v těsné blízkosti „vstupu“ do substrát-vazebného místa. Byl připraven mutovaný protein LmbC G308V, ve kterém je glycin nahrazen valinem, stejně jako je tomu u CcbC. Výsledky ukazují, že substituce valinu za glycin během evoluce linkosamidů pravděpodobně umožnila aktivaci větších prolinových derivátů EPL a PPL.

4.5.2. Testování proteinových interakcí podjednotek NDLS (výsledky RNDr. J. Novotné Ph.D.)

Metodou „Matchmaker LexA Two-Hybrid System” byly testovány vzájemné interakce proteinů LmbC, LmbD, LmbE, LmbF, LmbN, které pravděpodobně tvoří podjednotky NDLS. Testovány byly i proteiny LmbIH, LmbQ, které by mohly mít regulační nebo pomocnou funkci. Výsledky jsou uvedeny v tab. 17. Protein LmbE, který pravděpodobně tvoří centrální jednotku NDLS, interaguje se všemi podjednotkami NDLS a zároveň i s proteiny LmbIH and LmbQ. Z tabulky je patrné, že testované proteiny tvoří síť interakcí, zejména pro proteiny LmbC, LmbD, LmbE, LmbF lze předpokládat, že se jedná o podjednotky multimerního komplexu.

Tab. 17: Vzájemné interakce vybraných Lmb proteinů.

+: proteiny interagují

(+): slabá interakce

-: bez interakce

		Lmb protein –fúze s aktivační doménou						
fúze s DNA vazebnou doménou		C	D	E	F	IH	N	Q
	C	-	+	+	+	-	-	-
	D	(+)	-	+	+	+	-	+
	E	+	+	-	+	(+)	+	+
	F	-	-	+	-	-	-	-
	IH	-	-	(+)	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-
	Q	-	-	-	-	-	-	-

5. DISKUSE

Linkomycin a celesticetin představují jediné dva přirozené zástupce malé, nicméně biosynteticky samostatné skupiny antibiotik. Linkosamidy inhibují proteosyntézu vazbou na 23S rRNA 50S podjednotky bakteriálního ribozómu a funkce většiny proteinů zúčastněných v jejich biosyntéze nebyla dosud vyřešena. Hlavním cílem práce bylo přiřazení funkce těmto proteinům.

Výchozím nástrojem bylo určení sekvence shluků obou přirozených zástupců linkosamidových antibiotik a jejich komparativní analýza. Navazující experimenty, které potvrdily hypotetické funkce genů předpovězené srovnávací analýzou, vyžadovaly zavedení nových metodik, jako je práce s kosmidy nesoucími dlouhé úseky DNA, heterologní exprese genových shluků sekundárního metabolismu nebo inaktivace genů u *S. lincolnensis*.

Metoda komparativní sekvenční analýzy je účinným nástrojem pro přiřazování funkcí jednotlivým genům biosyntetických shluků. Funkce většiny proteinů biosyntetických drah může být předpovězena na základě podobnosti sekvencí jejich genových shluků se shluky biosynteticky příbuzných molekul. Například porovnání genových shluků pěti glykopeptidových antibiotik umožnilo specifikovat jednotlivé kroky biosyntézy balhimicinu, chloroereomycinu, A40926, A47934 a teikoplaninu (DONADIO *et al.* 2005). V několika případech byla ze sekvence genového shluku kódujícího biosyntézu neznámého metabolitu předpovězena jeho struktura (CHALLIS a RAVEL 2000, CHALLIS a HOPWOOD 2003). Přirozená linkosamidová antibiotika jsou zatím známá pouze dvě, nicméně další možnost komparace otevírá srovnání linkosamidových a PBD antibiotik, které mají společnou část biosyntézy. Genové shluky linkosamidových a tří PBD antibiotik jsou tak příkladem evolučního průniku biosyntetických drah, jsou zde patrné modulární pohyby tří úrovní: pohyby skupin genů kódujících jednotlivé stavební jednotky antibiotik (kap. 2.5.3.), pohyby jednotlivých genů (kap. 2.5.2.) a v jednom případě byl u dvojice srovnávaných linkosamidů dokumentován i pohyb na podgenové úrovni (kap. 2.5.1.).

Shluky pro biosyntézu PBD antibiotik anthramycinu (HU *et al.* 2007), sibiromycinu (LI *et al.* 2009a) a tomaymycinu (LI *et al.* 2009b) byly publikovány v nedávné době. Z linkosamidových antibiotik byla známá pouze sekvence linkomycinového shluku genů z průmyslového kmene *S. lincolnensis* 78-11 (PESCHKE *et al.* 1995), ten však není přístupný ve veřejných sbírkách. Navíc linkomycinový shluk průmyslového, tj. vysoce šlechtěného kmene

není vhodný pro komparativní analýzu, jeho sekvence se od typového nutně musí odlišovat právě v důsledku šlechtění. Pro komparativní analýzu proto byl izolován a analyzován linkomycinový shluk z typového nízkoprodukčního kmene a na základě jeho sekvence byly připraveny sondy pro identifikaci genů pro biosyntézu celesticetinu.

Na výchozí komparativní sekvenční analýzu navazovaly i další experimentální práce, jako inaktivace vybraných genů a ověřování interakcí proteinů dvouhybridovým systémem (NOVOTNÁ 2008). Ve spolupráci s analytickými chemiky z laboratoře genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub byly vypracovány nové analytické metody: Pro měření malých množství linkomycinu a jeho prekurzorů byla vyvinuta nová metoda využívající UPLC a detekci pomocí UV (OLŠOVSKÁ *et al.* 2006). Obraz o evoluci linkosamidů na proteinové úrovni doplňuje probíhající práce Mgr. S. Kadlčíka, která se zabývá biochemickou charakterizací klíčových podjednotek multimerních kondenzačních enzymů biosyntézy linkosamidů NDLS, proteinů LmbC, resp. CcbC. Právě modifikace těchto proteinů, tj. A-domén rozpoznávajících a aktivujících příslušné aminokyselinové stavební jednotky je molekulární podstatou adaptace biosyntetické dráhy linkomycinu k modifikovanému aminokyselinovému prekurzoru PPL.

Linkomycinový shluk z typového kmene S. lincolnensis ATCC 25466

V roce 2008 byla publikována přípravná práce před celkovou komparativní analýzou (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008), kde byl izolován a sekvenován shluk genů pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466. Jeho porovnání se sekvencí vysokoprodukčního kmene ukázalo řadu odlišností, mezi které patří nukleotidové záměny, delece i inserce. Linkomycinový shluk genů byl dále heterologně exprimován v modelovém organismu *S. coelicolor*. Jedná se o často využívaný přístup (ONAKA *et al.* 2002, WIDDICK *et al.* 2003, EUSTÁQUIO *et al.* 2005, VELASCO *et al.* 2005, KAWASAKI *et al.* 2006, PENN *et al.* 2006): Přenos úseku DNA nesoucí shluk genů do hostitelského neprodukčního organismu a následná heterologní produkce antibiotika je důkazem, že shluk je kompletní a dostačuje pro produkci antibiotika. Navíc je výhodné přemístit shluk do dobře prostudovaného kmene, kde je díky propracovaným technikám snazší jeho genetická manipulace a analýza. U linkomycinového shluku absence neidentifikovaného kofaktoru nebo prvku působícího *in trans* v hostitelském organismu sice způsobila výrazné snížení produkce antibiotika, nicméně byla potvrzena úplnost

publikované sekvence pro produkci celé molekuly linkomycinu. Důležitým výstupem této přípravné práce je přesná sekvence linkomycinového shluku genů pro komparativní analýzu.

*Nový shluk pro biosyntézu celesticetinu z *S. caelestis* ATCC 15084*

Sekvence vybraných *lmb* genů kódujících proteiny cukerného metabolismu umožnila přípravu sond a následnou izolaci biosyntetického shluku celesticetinu, který byl kompletně sekvenován včetně blízkého okolí. Hlavním výstupem komparativní analýzy je predikce funkce většiny genů obou linkosamidových shluků, nejpodstatnější vytěženou informací tohoto přístupu bylo vytipování genů kódujících podjednotky centrálního enzymu biosyntézy linkosamidů, multimerní NDLS.

Srovnávané linkosamidové genové shluky sdílejí osmnáct homologních genů, jedná se o orthology. Dvanáct z nich, které pravděpodobně kódují biosyntézu aminocukerné podjednotky antibiotik (PESCHKE *et al.* 1995), je konzervováno v obou shlucích a rozděleno do dvou kompaktně se pohybujících modulů.

V celesticetinovém shluku je mezi tyto dva moduly biosyntézy aminocukru TCA vložena čtveřice genů, kódujících pravděpodobně podjednotky enzymu NDLS. Fyzické oddělení obou modulů v biosyntetickém shluku celesticetinu, konkrétně genů *ccbL–ccbZ* a *ccbP–ccbV* koresponduje s dřívějšími výsledky naší laboratoře. Ty ukázaly, že i *lmb* homology těchto genů tvoří dvě nezávislé transkripční jednotky (JELÍNKOVÁ, nepublikovaná data), přestože celý úsek *lmbL–lmbV* tvoří jediný blok souhlasně orientovaných genů. Kompaktní pohyby bloků umožňují odvodit funkci i u genů, kdy selhává vyhledávání homologů v databázích na základě sekvenční homologie. V případě linkosamidových shluků je funkce produktů genů *lmbQ/ccbQ* a *lmbV/lmbV* v cukerném metabolismu (pravděpodobně v jeho regulaci) přiřazována pouze na základě totožného umístění obou dvojic orthologních genů v aminocukerných modulech linkosamidových shluků a podle pohybu těchto genů spolu s moduly.

Kromě aminokyselinové (prolin) a aminocukerné (TCA) podjednotky obsahuje celesticetin i salicylátovou podjednotku připojenou dvouuhlíkatým řetězcem. Celesticetinový shluk obsahuje proto i pět specifických genů: geny *ccb2 – ccb5* tvoří samostatný modul, který kóduje biosyntézu salicylátové podjednotky a dvouuhlíkatého řetězce (geny *ccb2, ccb3* a *ccb5*), ale navíc i specifickou metylaci aminocukerné podjednotky celesticetinu (gen *ccb4*). Gen *ccb1* je ve shluku umístěn odděleně a kóduje unikátní enzym s kondenzační doménou (predikováno na

základě podobnosti sekvencí), který pravděpodobně katalyzuje připojení salicylátu. Unikátnost je typickým rysem enzymů spojujících jednotlivé stavební bloky antibiotik dohromady (FISCHBACH *et al.* 2008).

Na základě homologie enzymu Ccb3 s enzymy MbtI z *Mycobacterium tuberculosis* (HARRISON *et al.* 2006) nebo Irp9 z *Yersinia enterocolitica* (KERBARH *et al.* 2005, PELLUDAT *et al.* 2003) je zřejmé, že v biosyntéze celesticetinu dochází k jednostupňové konverzi chorismátu přímo na salicylát (kap. 2.3.3.4).

Centrální enzym biosyntézy linkosamidů NDLS, posun substrátové specifity

V literatuře je popsáno mnoho příkladů, kdy spojováním jednotlivých podshluků, tj. skupin genů kódujících podjednotky antibiotika, vznikají nové genové shluky. Nejméně jasný je původ genů kódujících proteiny schopné spojovat stavební jednotky dohromady. Tyto konjugační enzymy jsou nezbytné pro funkčnost nového fúzního shluku, nicméně v původních genových shlucích svou roli neměly (FISCHBACH *et al.* 2008). Evoluce konjugačních enzymů, zejména adaptace jejich substrátové specifity na nové intermediáty je klíčovým bodem k porozumění vzniku genových shluků nových sekundárních metabolitů.

Oba srovnávané linkosamidové shluky sdílejí modul čtyř genů *ccbC/lmbC-ccbF/lmbF* kódující proteiny, o kterých předpokládáme, že tvoří podjednotky klíčového kondenzačního enzymu NDLS. CcbC/LmbC rozpoznává a aktivuje příslušnou aminokyselinu, což bylo prokázáno funkčními testy proteinů (KADLČÍK, nepublikovaná data). CcbE/LmbE je podobný mykothiolové S-konjugát amidase Mca (CAMUS *et al.* 2002), proto předpokládáme, že se účastní tvorby amidové vazby. Překvapivě v případě *S. lincolnensis* s inaktivovaným genem *lmbE* byla částečně zachována produkce linkomycinu, byť pouze při kultivaci na pevném médiu. Nabízejí se dvě možnosti vysvětlení: Buď protein LmbE není pro produkci antibiotika přímo nezbytný (např. vykonává pouze pomocnou úlohu, nikoliv katalytickou) a jeho inaktivace proto produkci antibiotika pouze výrazně snížila, nebo je v buňce přítomná jiná aktivita, která je schopna svou substrátovou specifitou protein LmbE částečně nahradit. Proti první možnosti významně hovoří fakt, že kmen s inaktivovaným genem *lmbE* neprodukoval antibiotikum při kultivaci v tekuté půdě, tedy za totožných podmínek, kdy byla u divokého kmene produkce linkomycinu prokázána, tj. za podmínek, kdy byly všechny geny linkomycinového shluku exprimovány. Toto zjištění naopak podporuje druhou hypotézu, že funkci proteinu LmbE může

částečně nahradit jiný protein kódovaný genem, jehož exprese je řízena nezávisle na expresi genů linkomycinového shluku, tedy genem nacházejícím se jinde v genomu. K expresi tohoto nahrazujícího genu dochází jen za určitých podmínek, např. kultivačních. Nejpravděpodobnějším kandidátem této funkce je ortholog proteinu Mca, který se v *Mycobacterium smegmatis* účastní obecné detoxifikační dráhy produkující kyselinu merkapturovou. Protein Mca má signifikantní podobnost s proteinem LmbE a přítomnost jeho ortologů byla prokázána i u řady dalších aktinomycet. U Mca z *Mycobacterium tuberculosis* byla navíc prokázána široká substrátová specifita (STEFFEK *et al.* 2003). Je vysoce pravděpodobné, že homolog genu *mca* je přítomen i v genomu *S. lincolnensis* a že je jeho proteinový produkt částečně schopen nahradit i funkci LmbE. Podobný jev byl již v literatuře popsán: inaktivace genu *rifO*, homologu *mca* z biosyntetického shluku rifamycinu, nezrušila, a dokonce ani nesnížila produkci antibiotika (NEWTON *et al.* 2008). Vzhledem k široké substrátové specifitě Mca, by se i pro tento případ nabízelo stejné vysvětlení.

Účast dalších proteinů, kódovaných týmž modulem genů jako výše zmíněné dvě dvojice genů, CcbD/LmbD a CcbF/LmbF v kondenzační reakci není zřejmá ze sekvenční homologie, nicméně inaktivace genů *lmbD* a *lmbF* způsobila ztrátu produkce linkomycinu, která nebyla obnovena chemickou komplementací PPL ani MTL. Při mikrobiálním testu obnovené produkce *S. lincolnensis* s inaktivovaným genem *lmbF* se sice objevila minimální inhibiční zóna, nicméně UPLC měření přítomnost linkomycinu nepotvrdilo. Může tedy jít jen o artefakt stanovení, případně je produkována jiná antibakteriální látka.

Vzájemné interakce podjednotek LmbC, LmbD, LmbE a LmbF byly navíc potvrzeny pomocí dvouhybridového systému (NOVOTNÁ 2008).

K unikátnímu pohybu na podgenové úrovni došlo během vývoje linkosamidů v případě sekvence kódující PCP (kap. 4.3.3.), 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. Pozoruhodné je i to, že ani jeden z dvojice sousedních genů s integrovaným úsekem kódujícím PCP, nespojuje s NDLS, ale oba kódují proteiny biosyntézy aminocukerné stavební jednotky. Většinou jsou PCP domény součástí modulárních NRPS (CANE *et al.* 1998, SCHWARZER *et al.* 2003), bylo popsáno i několik samostatných PCP, nebo jako součást

neúplných modulů (FISCHBACH *et al.* 2006, GARNEAU *et al.* 2005). Právě přesun PCP kódující sekvence mezi dvěma sousedními geny nepřímo indikuje autonomii a nesourodost této sekvence se zbytkem genu. Série inaktivačních pokusů tuto funkční nezávislost potvrdila (ULANOVA *et al.* 2009). Význam fúze genů cukerného metabolismu s PCP zůstává otázkou.

Důležitým aspektem evoluce linkosamidů je adaptace NDLS na nový substrát (proteinogenní prolin vs. neobvyklá aminokyselina PPL). Z porovnání s databázemi vyplývá, že CcbC/LmbC podjednotka multimerního enzymu NDLS kóduje samostatnou A-doménu NRPS. Samostatná forma A-domén je vzácnější a evolučně starší, v literatuře není známá žádná jiná samostatná A-doména aktivující jakýkoliv derivát prolinu, nicméně ve shlucích nostopeptidových a nostocyklopeptidových antibiotik byly nalezeny geny kódující podjednotky modulární NRPS, které rozpoznávají a aktivují methyl-L-prolin (HOFFMAN *et al.* 2003, BECKER *et al.* 2004). Také ve shlucích PBD antibiotik se vyskytují geny kódující A-domény modulární NRPS aktivující prolinové deriváty s C2 a C3 postranními řetězci (viz dále).

Analýza sekvence genů kódujících podjednotky LmbC/CcbC multimerní NDLS a jejich biochemická analýza ukázaly, že oba mají společného předka, pravděpodobně úzce specifického pro prolin, podobně jako protein CcbC z biosyntézy celesticetinu. Tomu nasvědčuje skutečnost, že ze dvojice ortologních proteinů CcbC/LmbC vykazuje sekvence prolin-specifického CcbC vyšší stupeň celkové homologie se všemi dosud identifikovanými samostatnými A-doménami aktivujícími prolin než LmbC. Protein CcbC není vůbec schopný integrovat PPL do antibiotika, důvodem jsou zřejmě sterické zábrany některých bočních řetězců aminokyselinových zbytků tvořících vazebné místo pro aminokyselinový substrát. Podrobná biochemická charakterizace LmbC a CcbC je náplní práce Mgr. S. Kadlčíka. Substrát-vazebné místo LmbC a CcbC se liší v pěti aminokyselinách, z nichž čtyři jsou u samostatných A-domén rozpoznávajících prolin konzervované. Zatímco vazebné místo CcbC vcelku splňuje konsensus sekvenci společnou pro všechny prolin-specifické samostatné A-domény, LmbC nikoliv. To je dalším podpůrným důkazem, že protein CcbC je původnější. Adaptace na nový substrát PPL je tedy výsledkem série bodových mutací. V průběhu evoluce se ustavily K_m i K_{cat} u LmbC pro nový substrát PPL na hodnotách podobných jako má CcbC pro původní prolin. Hodnoty K_{cat}/K_m LmbC pro prolin jsou až 3000krát nižší než pro PPL (KADLČÍK, nepublikovaná data), během vývoje tedy došlo i k výraznému snížení afinity k původnímu substrátu, prolinu. To byl další nezbytný předpoklad

evoluce substrátové specifity, v opačném případě by do antibiotika byl s vysokou frekvencí včleňován vedle PPL i proteinogenní prolin konstitutivně přítomný v buňce.

Jak již bylo zmíněno, ve shlucích PBD antibiotik se také vyskytují geny kódující A-domény modulární NRPS aktivující prolinové deriváty s C2 (tomaymycin) nebo C3 (anthramycin, sibiromycin) postranními řetězci. U sibiromycinu se inkorporovaný derivát prolinu od PPL liší pouze mírou saturace C3 postranního řetězce. Sekvence kroků následující po aktivaci strukturně podobných substrátů, tj. tvorba amidové vazby je ale u PBD a linkosamidových antibiotik odlišná. Zajímavé je, že při částečné fúzi původního linkosamidového shluku začleňujícího specifický prolin s PBD shlukem začleňujícím prolinový derivát s C3 bočním řetězcem se spolu s transferem šestice genů kódující vznik PPL nepřenesla i kazeta specifická pro rozpoznání a aktivaci tohoto nově získaného meziprojektu. Adaptace prolin-specifické A-domény k derivátům s delším postranním řetězcem tak proběhla bodovými mutacemi jejího vazebného místa. Modifikace substrátové specifity aktivačního proteinu tedy proběhla nezávisle v multidoménových NRPS biosyntézy PBD a v samostatných A-doménách linkosamidů fenotypovou konvergencí (kap. 2.5.5.).

Podobný posun substrátové specifity změnou pouze několika aminokyselin lze popsat i na příkladu ne biosyntetických, ale rezistenčních enzymů, tj. enzymů rozpoznávajících linkosamidy. U *Staphylococcus haemolyticus* byla objevena nová rezistenční varianta genu *vga(A)_{LC}* udílející rezistenci nejen k streptograminům A (jako gen *vga(A)*), ale i k linkosamidům (NOVOTNÁ *et al.* 2006). Rezistenční protein *Vga(A)_{LC}* se od proteinu *Vga(A)* liší sedmi aminokyselinami, z nichž pouze čtyři jsou zodpovědné za změnu substrátové specifity. Existují i další proteiny s překrývající se specifitou k linkosamidům a streptograminu A, která pravděpodobně souvisí s překryvem ribozomálního vazebného místa těchto antibiotik (KERR *et al.* 2005).

Aminokyselinová část linkomycinu, společné kroky biosyntézy s PBD antibiotiky

Komparativní analýza linkosamidových a PBD shluků umožnila přiřadit funkce většině *lmb* genů. Ukazuje, že linkomycinový shluk pravděpodobně vznikl fúzí shluku genů linkosamidového antibiotika začleňujícího původně prolin se shlukem PBD antibiotika syntetizujícího a integrujícího do své struktury PPL stavební jednotku,

Směr evoluce mj. dokumentuje uspořádání šestice genů kódujících biosyntézu PPL v anthramycinovém (Hu *et al.* 2007) a sibiromycinovém (LI *et al.* 2009a) genovém shluku a pětice genů ve shluku pro biosyntézu tomaymycinu (LI *et al.* 2009b). Zatímco ve všech třech PBD shlucích tvoří homology *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX* a *lmbY* řadu překrývajících se genů, pouze dvojice *lmbA* a *lmbW* homologů je lokalizovaná na jiném místě shluku. U producenta anthramycinu, kde dochází k dalším ornamentačním krokům na PPL, sousedí s dvojicí *lmbA* a *lmbW* homologů navíc čtveřice dalších genů kódujících jednotlivé kroky této ornamentace. Rozdělení původně konzervované čtveřice genů B1-B2-X-Y na dvě dvojice, i oddělení genů *lmbA* a *lmbW* v linkomycinovém shluku je nepřímým důkazem evoluce ve směru PBD → linkomycin. Obecně nízká úroveň homologie *lmb* genů s geny PBD shluků spolu s popsanou difúzí genů pro PPL v linkomycinovém shluku naznačují, že k začlenění PPL biosyntetické větve do linkosamidového shluku došlo před dlouhou dobou. Difúze těchto genů v rámci shluku znesnadňuje další HGT skupiny genů jako celku, staly se tak integrální složkou linkomycinového shluku.

Pohyby genů kódujících rezistenci, regulaci a specifickou ornamentaci molekul

Geny kódující specifické ornamentace sekundárních metabolitů, rezistenci a regulaci se ve srovnání s rigidními podshluky pohybují nezávisle a s vyšší frekvencí. Linkosamidové shluky dohromady obsahují čtyři geny kódující methyltransferasy, nicméně pouze homology *ccbJ/lmbJ* se vyskytují v obou z nich. Z linkosamidových rezistenčních genů nemá ani jeden z celkem čtyř identifikovaných společný evoluční původ.

Identifikací genů kódujících proteiny s regulační funkcí v biosyntéze linkomycinu se zabývá připravovaná publikace RNDr. D. Ulanové Ph.D. Na základě sekvenční homologie byly vytipovány geny *lmbIH*, *Q*, *K*, *U* a *V*, jejichž funkce byla testována pomocí inaktivace a následným obohacením média prekurzory linkomycinu MTL a PPL. Geny kódující proteiny homologní s *LmbU* byly nalezeny u několika dalších aktinomycet, například u producentů aminokumarinů nebo rubradirinu (POJER *et al.* 2002, STEFFENSKY *et al.* 2000, WANG *et al.* 2000, KIM *et al.* 2008). Inaktivace *lmbU* vedla ke snížení produkce linkomycinu pod detekční limit a nebyla obnovena přidáním MTL ani PPL. Navíc vložení další kopie *lmbU* do chromozómu *S. lincolnensis* způsobilo dvojnásobný nárůst produkce. Tyto výsledky korespondují s pokusy s genem *novE* homologním s *lmbU*, který se účastní regulace v biosyntéze

novobiocinu (DANGEL *et al.* 2008). Gen *lmbU* také obsahuje vzácný kodón TTA (kap. 2.2.1.1.3.), který také naznačuje jeho regulační funkci. V celesticetinovém shluku ani v PPL shlucích genů homolog *lmbU* není, což odpovídá faktu, že HGT regulačních genů je nezávislý. Je možné, že protein LmbU řídí synchronizaci MTL a PPL biosyntetické větve, ta totiž není nutná v případě biosyntézy celesticetinu. Aminokyselinová stavební jednotka je přítomna v poolu proteinogenních aminokyselin. Inaktivace dalších pravděpodobně regulačních genů *lmbIH* a *lmbQ* snížila produkci linkomycinu na přibližně 3 %. Přidáním prekurzorů MTL nebo PPL k mutantním kmenům $\Delta lmbIH$ a $\Delta lmbQ$ se produkce antibiotika opět zvýšila, zvláště současným přidáním obou prekurzorů. Tato pozorování potvrzují hypotézu, že LmbIH a LmbQ jsou regulační geny ovlivňující funkci NDLS, nejsou však přímo jejími podjednotkami s esenciální katalytickou funkcí. Výsledky dvouhybridového systému navíc potvrzují interakce LmbIH i LmbQ s podjednotkami NDLS LmbD a LmbE. Homology LmbK (histidinolfosfát fosfatasa) byly identifikovány u mnoha jiných bakterií, kde se účastní biosyntézy histidinu. Inaktivace *lmbK* snížila produkci linkomycinu na cca 2 % a přidáním prekurzorů MTL a PPL byla zpětně obnovena. Vzhledem k tomu, že *lmbK* obsahuje konstitutivní promotor, mohlo by se jednat o pozitivní regulátor startu biosyntézy linkomycinu. Nejkomplikovanější rozhodnutí o funkci je u proteinu kódovaného genem *lmbV*, jehož jediným homologem je orthologní *ccbV* v celesticetinovém shluku genů. Inaktivace *lmbV* způsobila zrušení produkce linkomycinu (v mutantním kmenu $\Delta lmbV$ se akumuluje prekurzor PPL). Produkce nebyla obnovena přidáním ani jednoho z prekurzorů. Je možné, že LmbV má regulační funkci nebo se i účastní kondenzační reakce (ULANOVA 2009).

Začlenění linkosamidových shluků v genomu

Pohyby celých shluků a jejich začlenění do genomu producentů linkosamidových antibiotik bylo možné určit díky sekvenování jejich blízkého okolí. Linkomycinový shluk je lemován homology genů primárního metabolismu *S. coelicolor* *sco4638* a *sco4612*. Vzdálenost těchto genů přibližně odpovídá velikosti shluku, což svědčí o tom, že v evoluci *S. lincolnensis* při HGT došlo k nahrazení určité sekvence genomu linkomycinovým shlukem, ne k jeho inzerci do genomu.

Jiným případem je celesticetinový shluk, po jehož obou stranách se nachází sekvence homologní se stejnou nekódující oblastí v *S. coelicolor*. V literatuře je známo málo případů

biosyntetických shluků, které poskytují takto přímý důkaz HGT. Např. po obou stranách shluku mithramycinu *S. argillaceus* byly také nalezeny opakující se sekvence (LOMBO *et al.* 1999). Autoři se domnívají, že mithramycinový shluk byl součástí cirkulárního extrachromozomálního prvku, jehož součástí byla i sekvence, která se po stranách shluku opakuje. Celý cirkulární prvek byl začleněn pomocí Campbellovy rekombinace do stejné sekvence na chromozómu *S. argillaceus*. Po obou stranách shluku celesticetinu se navíc vyskytují pseudogeny transposas a integras. Na základě sekvenční analýzy je zřejmé, že gen pro transposasu *ccb5* má proti ostatním podobným transposasam posun čtecího rámce způsobený delecí 1 bp. Jedná se pravděpodobně o jeden z mechanismů regulace (CHANDLER *et al.* 1993, NAGY *et al.* 2004).

6. ZÁVĚRY

1. Byla určena sekvence shluku genů pro biosyntézu linkomycinu z typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466. Jeho heterologní exprese ukázala, že shluk je kompletní a dostačuje pro produkci celé molekuly linkomycinu.

Porovnání linkomycinových shluků typového kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 a nadprodukčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 ukázalo řadu odlišností.

2. Identifikace a izolace genového shluku celesticetinu ze *S. caelestis* ATCC 15084 umožnila určení celé sekvence nesoucí genetickou informaci pro jeho biosyntézu.

3. Pro predikci funkcí jednotlivých genů linkomycinového shluku byly zvoleny dva hlavní přístupy: jednak komparativní analýza s nově charakterizovaným celesticetinovým shlukem i PBD shluky, dalším nástrojem byla inaktivace vybraných genů linkomycinového shluku a analýza jimi produkováných látek.

3a. Komparativní analýza umožnila přiřadit funkce většině genů linkomycinového i celesticetinového shluku. Nejdůležitějším výstupem je predikce podjednotek NDLS, klíčového enzymu biosyntetické dráhy linkosamidů. Analýza v obecné rovině demonstrovala modulární uspořádání genových shluků na několika úrovních a ozřejmila pravděpodobné procesy molekulární evoluce biosyntézy linkosamidů i PBD sloučenin.

3b. Tři pravděpodobně regulační geny *lmbIH*, *lmbQ* a *lmbU* byly nahrazeny inaktivačními kazetami. Další postup a měření produkce byly součástí disertační práce D. Ulanové (ULANOVA 2009), výsledky svědčí pro podpůrnou funkci těchto genů v biosyntéze linkomycinu.

Inaktivace genů *lmbC*, *lmbD*, *lmbE* a *lmbF* a následné obohacovací pokusy prokázaly účast jimi kódovaných proteinů v závěrečné kondenzační reakci, jedná se pravděpodobně o podjednotky klíčového multimerního komplexu NDLS.

7. REFERENCE

- Ahlert, J., E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M. Farnet & J. S. Thorson, (2002) The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* **297**: 1173-1176.
- Achard, A., C. Villers, V. Pichereau & R. Leclercq, (2005) New lnu(C) gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2716-2719.
- Alam, M. T., M. E. Merlo, E. Takano & R. Breitling, (2009) Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Mol Phylogenet Evol* **54**: 763-772.
- Alley, M. C., M. G. Hollingshead, C. M. Pacula-Cox, W. R. Waud, J. A. Hartley, P. W. Howard, S. J. Gregson, D. E. Thurston & E. A. Sausville, (2004) SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity: part 2: efficacy evaluations. *Cancer Res* **64**: 6700-6706.
- Anderson, T. B., P. Brian & W. C. Champness, (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.
- Antonow, D., N. Cooper, P. W. Howard & D. E. Thurston, (2007) Parallel synthesis of a novel C2-aryl pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) library. *J Comb Chem* **9**: 437-445.
- Bachmann, B. O., McAlpine, J.B., Zazopoulos, E., Farnet, C.M., Pirae, M. , (2006). In: U.S. patent 7. pp. 872.
- Bainton, N. J., P. Stead, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, G. P. Salmond, G. S. Stewart & P. Williams, (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* **288** (Pt 3): 997-1004.
- Baltz, R. H., (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol* **8**: 557-563.
- Becker, J. E., R. E. Moore & B. S. Moore, (2004) Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. *Gene* **325**: 35-42.
- Bentley, S. D., S. Brown, L. D. Murphy, D. E. Harris, M. A. Quail, J. Parkhill, B. G. Barrell, J. R. McCormick, R. I. Santamaria, R. Losick, M. Yamasaki, H. Kinashi, C. W. Chen, G. Chandra, D. Jakimowicz, H. M. Kieser, T. Kieser & K. F. Chater, (2004) SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **51**: 1615-1628.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill & D. A. Hopwood, (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Bibb, M. J., (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**: 208-215.

- Bozdogan, B. & R. Leclercq, (1999) Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2720-2725.
- Brahme, N. M., Gonzales, J.E., Rolls, J.R., Hessler, E.J., Mizsak, 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., Mizsak, 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**.
- Brisson-Noel, A., P. Delrieu, D. Samain & P. Courvalin, (1988) Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol Chem* **263**: 15880-15887.
- Buriankova, K., F. Doucet-Populaire, O. Dorson, A. Gondran, J. C. Ghnassia, J. Weiser & J. L. Pernodet, (2004) Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 143-150.
- Calcutt, M. J. & E. Cundliffe, (1990) Cloning of a lincosamide resistance determinant from *Streptomyces caelestis*, the producer of celesticetin, and characterization of the resistance mechanism. *J Bacteriol* **172**: 4710-4714.
- Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Medigue & S. T. Cole, (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **148**: 2967-2973.
- Cane, D. E. & C. T. Walsh, (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: R319-325.
- Clardy, J., M. A. Fischbach & C. T. Walsh, (2006) New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* **24**: 1541-1550.
- Coates, A. R. & Y. Hu, (2007) Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br J Pharmacol* **152**: 1147-1154.
- Courvalin, P., (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1447-1451.
- Cermak L., Novotna J., Kopecky J., Najmanova L. & J. J., (2007) Hybridization Analysis and Mapping of the Celesticetin Gene Cluster Revealed Genes Shared with Lincomycin Biosynthesis. *Folia Microbiologica* **5**: 451.
- Dangel, V., A. S. Eustaquio, B. Gust & L. Heide, (2008) novE and novG act as positive regulators of novobiocin biosynthesis. *Arch Microbiol* **190**: 509-519.
- Dayem, L. C., J. R. Carney, D. V. Santi, B. A. Pfeifer, C. Khosla & J. T. Kealey, (2002) Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**: 5193-5201.
- Donadio, S., M. Sosio, E. Stegmann, T. Weber & W. Wohlleben, (2005) Comparative analysis and insights into the evolution of gene clusters for glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Mol Genet Genomics* **274**: 40-50.
- Eustaquio, A. S., B. Gust, U. Galm, S. M. Li, K. F. Chater & L. Heide, (2005) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2452-2459.
- Eustaquio, A. S., B. Gust, U. Galm, S. M. Li, K. F. Chater & L. Heide, (2005) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2452-2459.

- Eustaquio, A. S., T. Luft, Z. X. Wang, B. Gust, K. F. Chater, S. M. Li & L. Heide, (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.
- Farnet, C. M., Dimitradou, V., Bachmann, B.O., (2007). In: U.S. patent 7. pp. 713.
- Fernandez-Moreno, M. A., J. L. Caballero, D. A. Hopwood & F. Malpartida, (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.
- Fischbach, M. A., (2009) Antibiotics from microbes: converging to kill. *Curr Opin Microbiol* **12**: 520-527.
- Fischbach, M. A. & C. T. Walsh, (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* **106**: 3468-3496.
- Fischbach, M. A., C. T. Walsh & J. Clardy, (2008) The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4601-4608.
- Floriano, B. & M. Bibb, (1996) *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **21**: 385-396.
- Fuglsang, A., (2005) Intragenic position of UUA codons in streptomycetes. *Microbiology* **151**: 3150-3152.
- Gaille, C., P. Kast & D. Haas, (2002) Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *J Biol Chem* **277**: 21768-21775.
- Garau, G., I. Garcia-Saez, C. Bebrone, C. Anne, P. Mercuri, M. Galleni, J. M. Frere & O. Dideberg, (2004) Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2347-2349.
- Garneau, S., P. C. Dorrestein, N. L. Kelleher & C. T. Walsh, (2005) Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis. *Biochemistry* **44**: 2770-2780.
- Gil, J. A. & A. B. Campelo-Diez, (2003) Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 633-642.
- Gomez-Escribano, J. P., J. F. Martin, A. Hesketh, M. J. Bibb & P. Liras, (2008) *Streptomyces clavuligerus* *relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology* **154**: 744-755.
- Green, J. M., W. K. Merkel & B. P. Nichols, (1992) Characterization and sequence of *Escherichia coli* *pabC*, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J Bacteriol* **174**: 5317-5323.
- Griffith, K. S., L. S. Lewis, S. Mali & M. E. Parise, (2007) Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *JAMA* **297**: 2264-2277.
- Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser & K. F. Chater, (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.
- Gust, B., G. Chandra, D. Jakimowicz, T. Yuqing, C. J. Bruton & K. F. Chater, (2004) Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* **54**: 107-128.

- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer & H. Tschape, (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.
- Hansen, J. L., P. B. Moore & T. A. Steitz, (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**: 1061-1075.
- Harrison, A. J., M. Yu, T. Gardenborg, M. Middleditch, R. J. Ramsay, E. N. Baker & J. S. Lott, (2006) The structure of MbtI from Mycobacterium tuberculosis, the first enzyme in the biosynthesis of the siderophore mycobactin, reveals it to be a salicylate synthase. *J Bacteriol* **188**: 6081-6091.
- Haug, I., A. Weissenborn, D. Brolle, S. Bentley, T. Kieser & J. Altenbuchner, (2003) Streptomyces coelicolor A3(2) plasmid SCP2*: deductions from the complete sequence. *Microbiology* **149**: 505-513.
- Heir, E., B. A. Lindstedt, T. M. Leegaard, E. Gjernes & G. Kapperud, (2004) Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal Escherichia coli in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **3**: 12.
- Hertweck, C., A. Luzhetskyy, Y. Rebets & A. Bechthold, (2007) Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* **24**: 162-190.
- Hoffmann, D., J. M. Hevel, R. E. Moore & B. S. Moore, (2003) Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from Nostoc sp. GSV224. *Gene* **311**: 171-180.
- Hola, K., J. Janata, J. Kopecky & J. Spizek, (2003) LmbJ and LmbIH protein levels correlate with lincomycin production in Streptomyces lincolnensis. *Lett Appl Microbiol* **37**: 470-474.
- Holden, M. T., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt & J. Parkhill, (2004) Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9786-9791.
- Horinouchi, S., (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus streptomyces. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 283-299.
- Hu, Y., V. Phelan, I. Ntai, C. M. Farnet, E. Zazopoulos & B. O. Bachmann, (2007) Benzodiazepine biosynthesis in Streptomyces refuineus. *Chem Biol* **14**: 691-701.
- Hurley, H. & J. S. Rokem, (1983) Some insights into the possible development of a biosynthetic pathway and biological function for anthramycin in Streptomyces refuineus. *Folia Microbiol (Praha)* **28**: 229-236.
- Hurley, L. H., J. S. Rokem & R. L. Petrussek, (1980) Proposed structures of the pyrrolo(1,4)benzodiazepine antibiotic-deoxyribonucleic acid adducts. *Biochem Pharmacol* **29**: 1307-1310.
- Hutchings, M. I., (2007) Unusual two-component signal transduction pathways in the actinobacteria. *Adv Appl Microbiol* **61**: 1-26.

- Hutchings, M. I., P. A. Hoskisson, G. Chandra & M. J. Buttner, (2004) Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **150**: 2795-2806.
- Chakraborty, R. & M. Bibb, (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.
- Challis, G. L. & D. A. Hopwood, (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**: 14555-14561.
- Challis, G. L. & J. Ravel, (2000) Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* **187**: 111-114.
- Chandler, M. & O. Fayet, (1993) Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol* **7**: 497-503.
- Charan, R. D., G. Schlingmann, J. Janso, V. Bernan, X. Feng & G. T. Carter, (2004) Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod* **67**: 1431-1433.
- Chater, K. F., Bibb, M.J., (1997) Regulation of bacterial antibiotic production. Products of secondary metabolism. *Bio/Technology* **6**: 57-105.
- Chen, C. W., C. H. Huang, H. H. Lee, H. H. Tsai & R. Kirby, (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. & W. M.G., (1997) Fermentation, biosynthesis and molecular genetics of lincomycin *Drugs and the pharmaceutical science (Drugs pharm. sci.)* **82**.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori & S. Omura, (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**: 526-531.
- Ishiyama, D., D. Vujaklija & J. Davies, (2004) Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1297-1306.
- Jacoby, G. A. & L. S. Munoz-Price, (2005) The new beta-lactamases. *N Engl J Med* **352**: 380-391.
- Janata, J., L. Najmanova, J. Novotna, K. Hola, J. Felsberg & J. Spizek, (2001) Putative *lmbI* and *lmbH* genes form a single *lmbIH* ORF in *Streptomyces lincolnensis* type strain ATCC 25466. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 277-284.
- Joris, B., J. M. Ghuysen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frere, J. A. Kelly, J. C. Boyington, P. C. Moews & et al., (1988) The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem J* **250**: 313-324.
- Kadlec, J., (2000) Závěrečný krok biosyntézy linkomycinu. *Universita Karlova, Praha*.
- Kamal, A., M. V. Rao, N. Laxman, G. Ramesh & G. S. Reddy, (2002) Recent developments in the design, synthesis and structure-activity relationship studies of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines as DNA-interactive antitumour antibiotics. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**: 215-254.

- Kawaguchi, A., M. Ikeda, T. Endo, T. Kogai, A. Miyazaki & T. Onaya, (1997) Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻ symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* **7**: 789-794.
- Kawaguchi, T., M. Azuma, S. Horinouchi & T. Beppu, (1988) Effect of B-factor and its analogues on rifamycin biosynthesis in *Nocardia* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **41**: 360-365.
- Kawasaki, T., Y. Hayashi, T. Kuzuyama, K. Furihata, N. Itoh, H. Seto & T. Dairi, (2006) Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *J Bacteriol* **188**: 1236-1244.
- Kerbarh, O., A. Ciulli, N. I. Howard & C. Abell, (2005) Salicylate biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of Irp9, a bifunctional salicylate synthase from *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **187**: 5061-5066.
- Kerr, I. D., E. D. Reynolds & J. H. Cove, (2005) ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochem Soc Trans* **33**: 1000-1002.
- Kieser H.M., B. M. J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A., (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation Norwich (UK).
- Kim, C. G., J. Lamichhane, K. I. Song, V. D. Nguyen, D. H. Kim, T. S. Jeong, S. H. Kang, K. W. Kim, J. Maharjan, Y. S. Hong, J. S. Kang, J. C. Yoo, J. J. Lee, T. J. Oh, K. Liou & J. K. Sohng, (2008) Biosynthesis of rubradirin as an ansamycin antibiotic from *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Arch Microbiol* **189**: 463-473.
- Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers & W. M. de Vos, (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Klose, R. J., E. M. Kallin & Y. Zhang, (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**: 715-727.
- Koberska, M., J. Kopecky, J. Olsovska, M. Jelinkova, D. Ulanova, P. Man, M. Flieger & J. Janata, (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.
- Kocan, M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch & M. Bott, (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**: 724-732.
- Kopka, M. L., D. S. Goodsell, I. Baikalov, K. Grzeskowiak, D. Cascio & R. E. Dickerson, (1994) Crystal structure of a covalent DNA-drug adduct: anthramycin bound to C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and a molecular explanation of specificity. *Biochemistry* **33**: 13593-13610.
- Kumar, R. & J. W. Lown, (2003) Recent developments in novel pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine conjugates: synthesis and biological evaluation. *Mini Rev Med Chem* **3**: 323-339.
- Larsen, T. O., J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, M. E. Hansen & J. C. Frisvad, (2005) Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep* **22**: 672-695.
- Lawrence, J. G., (1999) Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* **2**: 519-523.

- Lee, P. C., T. Umeyama & S. Horinouchi, (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.
- Lell, B. & P. G. Kremsner, (2002) Clindamycin as an antimalarial drug: review of clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2315-2320.
- Leskiw, B. K., E. J. Lawlor, J. M. Fernandez-Abalos & K. F. Chater, (1991) TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2461-2465.
- Li, W., S. Chou, A. Khullar & B. Gerratana, (2009) Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2958-2963.
- Li, W., A. Khullar, S. Chou, A. Sacramo & B. Gerratana, (2009) Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2869-2878.
- Liu, G., Y. Tian, H. Yang & H. Tan, (2005) A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Mol Microbiol* **55**: 1855-1866.
- Lombo, F., A. F. Brana, C. Mendez & J. A. Salas, (1999) The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol* **181**: 642-647.
- Magerlein, B. J., (1971) Modification of lincomycin. *Adv Appl Microbiol* **14**: 185-229.
- Magerlein, B. J. & F. Kagan, (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.
- Matsumoto, A., S. K. Hong, H. Ishizuka, S. Horinouchi & T. Beppu, (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Matter, A. M., S. B. Hoot, P. D. Anderson, S. S. Neves & Y. Q. Cheng, (2009) Valinomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*: conservation, ecology and evolution. *PLoS One* **4**: e7194.
- McAlpine, J. B., B. O. Bachmann, M. Pirae, S. Tremblay, A. M. Alarco, E. Zazopoulos & C. M. Farnet, (2005) Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *J Nat Prod* **68**: 493-496.
- Moore, P. B. & T. A. Steitz, (2005) The ribosome revealed. *Trends Biochem Sci* **30**: 281-283.
- Mootz, H. D., D. Schwarzer & M. A. Marahiel, (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem* **3**: 490-504.
- 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 pmb A, csr A and a previously unrecognized gene ldD, in the control of DNA gyrase by letD (ccdB) of sex factor F. *Journal of Molecular Biology* **256**: 483-502.
- Nagy, Z. & M. Chandler, (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Res Microbiol* **155**: 387-398.

- Narva, K. E. & J. S. Feitelson, (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **172**: 326-333.
- Neusser, D., H. Schmidt, J. Spizek, J. Novotna, U. Peschke, S. Kaschabeck, P. Tichy & W. Piepersberg, (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.
- Newton, G. L., N. Buchmeier & R. C. Fahey, (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 471-494.
- Novotna, G. & J. Janata, (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.
- Novotná, J., (2008) Studium biosyntetické dráhy antibiotika linkomycinu. *Přírodovědecká fakulta, Universita Karlova Disertační práce.* .
- Novotna, J., A. Honzatko, P. Bednar, J. Kopecky, J. Janata & J. Spizek, (2004) 1-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur J Biochem* **271**: 3678-3683.
- Ohnishi, Y., H. Yamazaki, J. Y. Kato, A. Tomono & S. Horinouchi, (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 431-439.
- Olsovska, J., M. Jelinkova, P. Man, M. Koberska, J. Janata & M. Flieger, (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.
- Omura, S., H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, Y. Takahashi, H. Horikawa, H. Nakazawa, T. Osonoe, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki & M. Hattori, (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12215-12220.
- Onaka, H., S. Taniguchi, Y. Igarashi & T. Furumai, (2002) Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J Antibiot (Tokyo)* **55**: 1063-1071.
- Park, H. S., S. K. Shin, Y. Y. Yang, H. J. Kwon & J. W. Suh, (2005) Accumulation of S-adenosylmethionine induced oligopeptide transporters including BldK to regulate differentiation events in *Streptomyces coelicolor* M145. *FEMS Microbiol Lett* **249**: 199-206.
- Pelludat, C., D. Brem & J. Heesemann, (2003) Irp9, encoded by the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*, is able to convert chorismate into salicylate, the precursor of the siderophore yersiniabactin. *J Bacteriol* **185**: 5648-5653.
- Penn, J., X. Li, A. Whiting, M. Latif, T. Gibson, C. J. Silva, P. Brian, J. Davies, V. Miao, S. K. Wrigley & R. H. Baltz, (2006) Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**: 121-128.
- Peschke, U., H. Schmidt, H. Z. Zhang & W. Piepersberg, (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **16**: 1137-1156.

- Pissowotzki, K., K. Mansouri & W. Piepersberg, (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. *Mol Gen Genet* **231**: 113-123.
- Pojer, F., S. M. Li & L. Heide, (2002) Molecular cloning and sequence analysis of the chlorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**: 3901-3911.
- Puvvada, M. S., S. A. Forrow, J. A. Hartley, P. Stephenson, I. Gibson, T. C. Jenkins & D. E. Thurston, (1997) Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase in vitro transcription by DNA-binding pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *Biochemistry* **36**: 2478-2484.
- Recio, E., A. Colinas, A. Rumbero, J. F. Aparicio & J. F. Martin, (2004) PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarcin production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem* **279**: 41586-41593.
- Retzlaff, L. & J. Distler, (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.
- Robson, N. D., A. R. Cox, S. J. McGowan, B. W. Bycroft & G. P. Salmond, (1997) Bacterial N-acyl-homoserine-lactone-dependent signalling and its potential biotechnological applications. *Trends Biotechnol* **15**: 458-464.
- Rokem, J. S., A. E. Lantz & J. Nielsen, (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* **24**: 1262-1287.
- Ryding, N. J., T. B. Anderson & W. C. Champness, (2002) Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by absA, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* **184**: 794-805.
- Shawky, R. M., O. Puk, A. Wietzorrek, S. Pelzer, E. Takano, W. Wohlleben & E. Stegmann, (2007) The border sequence of the balhimycin biosynthesis gene cluster from *Amycolatopsis balhimycina* contains bbr, encoding a StrR-like pathway-specific regulator. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**: 76-88.
- Shivakumar, A. G. & D. Dubnau, (1981) Characterization of a plasmid-specified ribosome methylase associated with macrolide resistance. *Nucleic Acids Res* **9**: 2549-2562.
- Shu, D., L. Chen, W. Wang, Z. Yu, C. Ren, W. Zhang, S. Yang, Y. Lu & W. Jiang, (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.
- Schwarzer, D., R. Finking & M. A. Marahiel, (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **20**: 275-287.
- Smutná, Y., (2007) Analýza genu lmbX zahrnutého v biosyntéze propylprolinu. . *Universita Karlova, Praha* .
- Stachelhaus, T., H. D. Mootz, V. Bergendahl & M. A. Marahiel, (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **273**: 22773-22781.
- Steffek, M., G. L. Newton, Y. Av-Gay & R. C. Fahey, (2003) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothiol S-conjugate amidase. *Biochemistry* **42**: 12067-12076.
- Steffensky, M., A. Muhlenweg, Z. X. Wang, S. M. Li & L. Heide, (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1214-1222.

- Stratigopoulos, G., N. Bate & E. Cundliffe, (2004) Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TylR. *Mol Microbiol* **54**: 1326-1334.
- Susstrunk, U., J. Pidoux, S. Taubert, A. Ullmann & C. J. Thompson, (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 33-46.
- Szczepanowski, R., S. Braun, V. Riedel, S. Schneiker, I. Krahn, A. Puhler & A. Schluter, (2005) The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology* **151**: 1095-1111.
- Takano, E., (2006) Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **9**: 287-294.
- Tenson, T., M. Lovmar & M. Ehrenberg, (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.
- Thorpe, H. M., S. E. Wilson & M. C. Smith, (2000) Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol Microbiol* **38**: 232-241.
- Thurston, D. E., D. S. Bose, P. W. Howard, T. C. Jenkins, A. Leoni, P. G. Baraldi, A. Guiotto, B. Cacciari, L. R. Kelland, M. P. Foloppe & S. Rault, (1999) Effect of A-ring modifications on the DNA-binding behavior and cytotoxicity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *J Med Chem* **42**: 1951-1964.
- Tiberghien, A. C., D. Hagan, P. W. Howard & D. E. Thurston, (2004) Application of the Stille coupling reaction to the synthesis of C2-substituted endo-exo unsaturated pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs). *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 5041-5044.
- Trefzer, A., S. Pelzer, J. Schimana, S. Stockert, C. Bihlmaier, H. P. Fiedler, K. Welzel, A. Vente & A. Bechthold, (2002) Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1174-1182.
- Tyagi, J. S. & D. K. Saini, (2004) Did the loss of two-component systems initiate pseudogene accumulation in *Mycobacterium leprae*? *Microbiology* **150**: 4-7.
- Ulanova, D., (2009) Analýza genů biosyntetického shluku linkomycinu využitelných pro přípravu hybridních látek *Universita Karlova, Praha*.
- Ulanova, D., J. Novotna, Y. Smutna, Z. Kamenik, R. Gazak, M. Sulc, P. Sedmera, S. Kadlcik, K. Plhachova & J. Janata, (2010) Mutasyntesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 927-930.
- Umeyama, T., P. C. Lee & S. Horinouchi, (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 419-425.
- Umeyama, T., P. C. Lee, K. Ueda & S. Horinouchi, (1999) An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145** (Pt 9): 2281-2292.
- Velasco, A., P. Acebo, A. Gomez, C. Schleissner, P. Rodriguez, T. Aparicio, S. Conde, R. Munoz, F. de la Calle, J. L. Garcia & J. M. Sanchez-Puelles, (2005) Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: designing new cytotoxic compounds. *Mol Microbiol* **56**: 144-154.
- Vining, L. C., (1992) Roles of secondary metabolites from microbes. *Ciba Found Symp* **171**: 184-194; discussion 195-188.
- Visser, J., (1972) Preparation of lincomycin analogues. U.S.

- Walsh, C., (2003) Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* **1**: 65-70.
- Walsh, C., (2003) Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* **1**: 65-70.
- Walsh, C. T., (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *ChemBiochem* **3**: 125-134.
- Wang, Z. X., S. M. Li & L. Heide, (2000) Identification of the coumermycin A(1) biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3040-3048.
- Ward, J. M. & J. E. Hodgson, (1993) The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **110**: 239-242.
- Weber, T., K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente & W. Wohlleben, (2003) Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol* **106**: 221-232.
- 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.
- Widdick, D. A., H. M. Dodd, P. Barraille, J. White, T. H. Stein, K. F. Chater, M. J. Gasson & M. J. Bibb, (2003) Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4316-4321.
- Wietzorrek, A. & M. Bibb, (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.
- Williams, D. H., M. J. Stone, P. R. Hauck & S. K. Rahman, (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* **52**: 1189-1208.
- Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto & H. Okada, (1987) The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J Antibiot (Tokyo)* **40**: 496-504.
- Zalkin, H., (1985) Anthranilate synthase. *Methods Enzymol* **113**: 287-292.
- Zhang, H. Z., H. Schmidt & W. Piepersberg, (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **6**: 2147-2157.