

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Martin Culka

Environmentální DNA - nevyčerpatelný zdroj unikátních bakteriálních genů

Environmental DNA - inexhaustible source of unique bacterial genes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Věra Kotrbová, Ph.D.

Školitelka: RNDr. Renáta Valešová Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.6.2011

.....
Martin Culka

Tato práce byla vypracována v Laboratoři enzymových technologií Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Renátě Valešové, Ph.D. za vedení a rady během celého zpracování této práce. Poté patří můj obrovský dík RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. jak za jeho cenné rady během provádění experimentů, tak i za plodné poznámky k textu mé práce. Dále děkuji vedoucímu Laboratoře enzymových technologií RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. za umožnění vypracování této práce a všem ostatním pracovníkům této laboratoře za příjemné pracovní prostředí a možnost si vyzkoušet prezentaci svých výsledků před odborným publikem.

Nakonec moc děkuji své vedoucí práce RNDr. Věře Kotrbové, Ph.D. za to, že zaštitila moji práci na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty UK a umožnila tak její vypracování a také za její užitečné připomínky a rady během sepisování.

Obsah

Obsah.....	3
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam zkratek.....	7
1. Přehled literatury.....	8
1.1 Úvod.....	8
1.2 Zdroje environmentální DNA.....	9
1.3 Izolace půdní metagenomické DNA.....	9
1.4 Kvantifikace, stanovení čistoty environmentální DNA a její purifikace	10
1.4.1 Kvantifikace izolované DNA.....	10
1.4.2 Stanovení čistoty DNA.....	10
1.4.3 Purifikace izolované DNA.....	11
1.5 Biodiverzita.....	11
1.6 Hledání nových funkčních genů.....	12
1.6.2 Sekvenční analýza.....	13
1.6.3 Funkční analýza.....	13
1.7 Penicilinacylasy.....	14
1.7.1 Typy penicilinacylas.....	15
1.7.2 Penicilin-G-acylasy z <i>Escherichia coli</i>	16
1.7.3 Synthesa polosyntetických β -laktamových antibiotik za katalýzy PGA.....	17
1.7.4 Nové penicilin-G-acylasy.....	18
2. Cíl práce.....	20
3. Materiál a metody.....	21
3.1 Materiál.....	21
3.1.1 Vzorokky půdy.....	21
3.1.2 Bakteriální kmeny a DNA.....	21
3.1.3 Primery.....	22
3.1.4 Kultivační média a antibiotika.....	23
3.1.5 Chemikálie, enzymy a roztoky.....	23
3.1.6 Použité komerční kity.....	25

3.1.7 Použité přístroje	25
3.2 Metody.....	26
3.2.1 Izolace celkové DNA ze vzorků půdy.....	26
3.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	26
3.2.3 Adenylace 3' konců PCR amplikonů.....	27
3.2.4 Elektroforetická analýza DNA.....	27
3.2.5 Restrikční analýza DNA a ligace úseků DNA.....	28
3.2.6 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	28
3.2.7 Izolace plasmidové DNA minipreparativní metodou.....	28
3.2.8 Sekvenční analýza.....	29
4. Výsledky.....	30
4.1 Izolace a detekce metagenomické DNA.....	30
4.2 Test funkčnosti degenerovaných primerů pro penicilin-G-acylasu.....	31
4.3 Vyhledávání genů pro PGA v metagenomické DNA.....	32
4.4 Kontrolní „polozahnížděná“ PCR.....	33
4.5 Klonování PCR produktu „P1200“	34
4.6 Sekvenční analýza.....	35
5. Diskuse.....	37
6. Souhrn.....	40
7. Seznam použité literatury.....	41

Abstrakt

Enzymologický výzkum se v současné době zaměřuje na hledání variant známých enzymů s pozměněnými vlastnostmi či zcela nových katalyticky účinných proteinů. Klasický přístup vyhledávání nových genů založený na kultivaci mikroorganismů však selhává u environmentálních vzorků, neboť je tvoří zejména nekultivovatelné mikroorganismy. Proto byl vyvinut nový tzv. „metagenomický“ přístup umožňující přímou komplexní analýzu mikrobiálních populací, který spočívá v izolaci celkové DNA (RNA) z daného prostředí a její následné sekvenční (genotypové) či funkční (fenotypové) analýze.

V této práci byl aplikován metagenomický přístup při hledání nových variant penicilin-G-acylasy, enzymu katalyzujícího hydrolysu, resp. tvorbu vazby acylu na β -laktamové jádro a uplatňujícího se při výrobě polosyntetických β -laktamových antibiotik, v jedenácti vzorcích odpovídajících 4,5 m půdnímu horizontu. Pomocí sekvenční analýzy PCR ampliconů získaných na metagenomických templátech byly získány nukleotidové sekvence podstatné části potenciálních strukturních penicilinacylasových genů vykazujících po překladu nejvyšší stupeň homologie s penicilinamidaseou z *Conexibacter woesei*.

Pokračováním této metagenomické studie bude amplifikace alespoň jednoho kompletního strukturního genu pro environmentální penicilinacylasu, avšak klonované oblasti genu lze již nyní využít ke konstrukci hybridních penicilinacylas pomocí metody „gene shuffling“.

Klíčová slova: půdní metagenomika, nekultivovatelné mikroorganismy, PCR, penicilin-G-acylasa, beta-laktamová antibiotika, Actinobacteria

Abstract

Search for new enzymes or variants of known ones is now a hot issue in enzymological research. The classical culture-based approach, however, often fails when applied on environmental samples, because they contain uncultured microorganisms at most. For this reason, a new approach has been developed – the metagenomics. This approach is based on direct isolation of total DNA (RNA) from specific environment and its subsequent sequence-based (genotype) or function-based (phenotype) analysis.

In this work, the metagenomic approach has been used to find new forms of penicillin G acylase, the enzyme that catalyze cleavage or formation of acyl – β -lactam nucleus bond and is used in industry for synthesis of semi-synthetic β -lactam antibiotics, in eleven samples from 4.5 m soil horizon. Sequence analysis of PCR amplicons on metagenomic templates revealed nucleotide sequences of major part of potential structural penicillin acylase genes. After translation it has been found that the sequences are most homologous to penicillin amidase from *Conexibacter woesei*.

Further perspective of this metagenomic study is amplification of at least one complete structural gene of environmental penicillin acylase. However, the cloned regions of the gene can also be used to create hybrid penicillin acylases using gene shuffling method.

(In Czech)

Key words: soil metagenomics, uncultured microorganisms, PCR, penicillin G acylase, beta-lactam antibiotics, Actinobacteria

Seznam zkratek

- 6-APK – kyselina 6-aminopenicilanová
7-ACK – kyselina 7-aminocefalosporanová
AEH – α -aminoacid ester hydrolase (hydrolasa esterů α -aminokyselin)
Amp - ampicilin
ATCC - American Type Culture Collection (americká sbírka typů kultur)
CCM – Czech Collection of Microorganisms (česká sbírka mikroorganismů)
CTAB – cetyltrimethylamoniumbromid (hexadecyltrimethylamoniumbromid)
DMSO – dimethylsulfoxid
dNTP – deoxynukleotid trifosfát
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EtBr - ethidiumbromid
FOK – fenylactová kyselina
GLB – gel loading buffer (pufr pro nanášení na gel, vzorkový pufr)
IPTG - isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB – lysogeny broth (lysogenní půda)
MOPS – morfolinopropansulfonová kyselina
PA – penicilinacylasa / penicilinamidasa
pb – páry basí
PCR – polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
pga – gen pro penicilin-G-acylasu
PGA – penicilin-G-acylasa
SDS – sodium dodecyl sulfate (dodecylsulfát sodný)
TBE – tris-borát-EDTA pufr
TE – Tris-EDTA
Tris – tris-(hydroxymetyl)-aminomethan
X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. Přehled literatury

1.1 Úvod

Enzymy jsou biologické katalyzátory, které mají nezastupitelnou roli v metabolismu všech živých organismů. V posledních letech ovšem nacházejí stále větší uplatnění jak v medicíně, tak v chemickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Někdy je použití enzymaticky katalysované reakce elegantní alternativou ke klasické organické synthese, která může být energeticky náročná (např. nutnost práce za vysokých teplot a tlaků) a neekologická, protože se při ní uvolňují do okolí látky nebezpečné pro životní prostředí.^[1] Nespornou výhodou enzymů je jejich enantioselektivita a regioselektivita. To umožňuje eliminovat vznik vedlejších produktů, čehož lze při organické synthese docílit mnohdy jen obtížně.

Bohatým zdrojem nových enzymů nebo i celých metabolických drah pro výrobu nesčetných sloučenin jsou mikroorganismy. Celkový počet jen prokaryotických buněk na Zemi je odhadován na $4-6 \times 10^{30}$. Jejich počet v půdě je odhadován na $2,6 \times 10^{29}$. Kromě půdy jsou prokaryota nejvíce zastoupena v oceánech a hluboko pod zemským povrchem a dnem oceánů.^[2] Diverzita prostředí, která obývají, je obrovská a taktéž jejich enzymová výbava, přizpůsobená k přežití v mnohdy extrémních podmínkách vysokých teplot, tlaků, extrémního pH apod., je nesmírná. Existují v zásadě dva základní přístupy, jak tuto diverzitu zkoumat a dále využít.

Tradiční způsob získání nových enzymů z mikroorganismů spočívá v jejich kultivaci a zkoumání enzymů, které produkují. Je ovšem známo, že z celkového počtu mikroorganismů je pouhý zlomek kultivovatelný standardními technikami. Druhý možný přístup spočívá v izolaci veškeré DNA ze vzorku z daného prostředí, její analýze, a následné expresi zajímavých genů ve standardních hostitelích, jejichž kultivace je již dobře zvládnutá. Tento přístup se nazývá metagenomický, celková DNA izolovaná ze vzorku z daného prostředí je pak metagenom.^[3]

Metagenomický přístup není zaměřen pouze na prokaryota, nicméně u eukaryotického genomu nastává problém s introny. Proto je u eukaryot snaha o tvorbu cDNA knihoven, které vzniknou přepsáním mRNA, kódující již pouze gen bez intronů, do DNA pomocí reverzní transkriptasy.^[4]

1.2 Zdroje environmentální DNA

Jak bylo uvedeno, hlavními zdroji zajímavé environmentální DNA jsou půda a mořská voda. Používají se vzorky jak povrchové, tak z vysokých hloubek, kontaminované lidskou činností (benzínové pumpy, skládky apod.)^[5], nebo naopak lidskou činností nepoznamenané^[6], z prostředí primárně bohatého na mikroflóru^[7], či z prostředí pro život na první pohled nehostinného (ledovce, horké prameny).^[8] Často se prostředí pro odebrání vzorku volí cíleně, protože se předpokládá výskyt organismu produkujícího specifický enzym. Dále se zaměříme na vzorky DNA z půdy.

1.3 Izolace půdní metagenomické DNA

Byla vyvinuta řada postupů pro izolaci metagenomické DNA z půdy, z nichž některé byly dokonce komercializovány do podoby kitů. Nelze jednoduše rozhodnout, který způsob je nejvhodnější, protože vzorky půdy z různých prostředí přináší specifické problémy při izolaci. Také záleží na tom, jestli potřebujeme získat DNA s co nejvyšší čistotou, nebo získat co nejvyšší množství izolované DNA. Existují dva základní přístupy k izolaci DNA - **přímý**, který spočívá v přímé lysi buněk a následném čištění uvolněné DNA, a **nepřímý**, kde se nejprve izolují buňky od neživé hmoty a následně se provádí lyse.

Prvním krokem přímé metody je lyse buněk, tedy rozrušení buněčných stěn a membrán přítomných buněk a uvolnění DNA do roztoku. Může se jednat o lysi buď chemickou, mechanickou, nebo o jejich kombinaci. Z mechanických metod se jedná o drcení, teplotní šoky (opakované zmrazování a roztávání), ohřívání mikrovlnami a sonikaci. Z chemických se jedná o lysi enzymatickou (lysozym) a detergentovou (dodecylsulfát sodný). Nevýhodou mechanické lyse je nekontrolovatelné rozštěpení DNA na různě velké fragmenty, zatímco chemická lyse sice DNA nepoškodí, zato je specifitější a tudíž nedojde k uvolnění DNA z některých buněk. Mechanická lyse je tedy efektivnější, chemická je však selektivnější a jemnější.^{[9][10]}

Prvním krokem nepřímé metody je oddělení buněk od částic půdy, čehož může být dosaženo užitím detergentu, následované centrifugací při pomalých rychlostech, při které dojde k sedimentaci pouze částic půdy, zatímco buňky zůstanou v roztoku. Takto oddělené buňky se pak rozbijí pomocí lysozymu a detergentu. Tento přístup je cílený specificky na prokaryota, omezuje extrakci extracelulární DNA a umožňuje získání

dlouhých úseků DNA o vysoké čistotě. Na rozdíl od přímého přístupu ale zdaleka nedojde k izolaci DNA všech přítomných bakterií, protože některé jsou pevně vázány na částice půdy.^[10]

Po lysi buněk následuje odstranění lipidů a proteinů, k němuž se používají organická rozpouštědla, jako například chloroform, fenol, směsi chloroform – fenol nebo fenol – chloroform – isoamyl alkohol v různých poměrech, DNA vždy zůstává ve vodné fázi. Další možností je vysolení proteinů například chloridem sodným, octanem amonným, síranem amonným, octanem draselným nebo octanem sodným. Při nízkorychlostní centrifugaci dojde k sedimentaci proteinů a DNA zůstane v roztoku.^[11]

Dalším krokem je precipitace DNA, čímž se z izolované DNA odstraní zbytky pufru a ostatních nečistot v roztoku. Provádí se buď isopropanolem, ethanolem, nebo polyethylenglykolem. Některé studie uvádějí, že ethanolová precipitace vede k větší koprecipitaci kontaminantů, než při použití isopropanolu nebo polyethylenglykolu.^[12]

1.4 Kvantifikace, stanovení čistoty environmentální DNA a její purifikace

1.4.1 Kvantifikace izolované DNA

Informaci o koncentraci izolované environmentální DNA lze získat spektrofotometrickým měřením při 260 nm, což je absorpční maximum pro nukleové kyseliny. Absorbanci 1 pak odpovídá koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dvojitě vázané DNA. Toto stanovení však může být rušeno znečištěním (viz dále). Další možností je odhad koncentrace z výsledků agarosové elektroforesy v porovnání se standardem o známé koncentraci.^[11]

1.4.2 Stanovení čistoty DNA

Pro další zpracování získané environmentální DNA je nutné, aby neobsahovala nečistoty, které inhibují polymerasovou řetězovou reakci (PCR), restriční štěpení a další molekulárně-biologické techniky. Takovéto nečistoty se souhrnně označují jako huminové sloučeniny (též nazývané huminové kyseliny). Jedná se o produkty rozkladu organismů obsažené v půdě, na jejichž přítomnost v extrahovaném vzorku ukazuje zbarvení dohněda. Ke koextrakci huminových kyselin dojde spíše při použití přímé metody lyse.^[13]

Údaje o čistotě izolované DNA udávají poměry absorbancí vzorku při vlnových délkách, specifických pro nukleové kyseliny a příslušné kontaminanty. O proteinové

kontaminaci vypovídá poměr absorbcí 260/280 nm, o kontaminaci huminovými kyselinami vypovídá poměr 260/230 nm.^[9] Množství huminových kyselin lze také určit měřením absorbance při 320 nm, kde již nukleové kyseliny ani proteiny výrazně neabsorbují. Byla zjištěna přímá souvislost mezi absorbcí při 320 nm a inhibicí PCR.^[14]

1.4.3 Purifikace izolované DNA

Huminové sloučeniny se z půdní DNA neodstraňují snadno, protože jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou velmi podobné nukleovým kyselinám. Lze použít ultracentrifugaci v gradientu chloridu cesného (používáno dříve), chromatografii, elektroforézu nebo dialýzu.^[15] Z chromatografie se používá například gelová permeační chromatografie, při níž dochází k oddělení malých fragmentů (nečistoty) od velkých (souvislé úseky DNA).^[16]

Elektroforetické dělení uplatňuje podobný princip, navíc zde ještě hraje roli rozdílná pohyblivost v elektrickém poli. Lze tedy provádět buď klasické dělení podle velikosti, nebo do gelu přidat polyvinylpyrrolidon, který na sebe pomocí vodíkových můstků naváže huminové sloučeniny a tím zapříčiní jejich nepohyblivost a tudíž umožní jejich oddělení od DNA.^[17]

Déle existují různé komerční kity, specializované na čištění environmentální DNA z půdy.

1.5 Biodiverzita

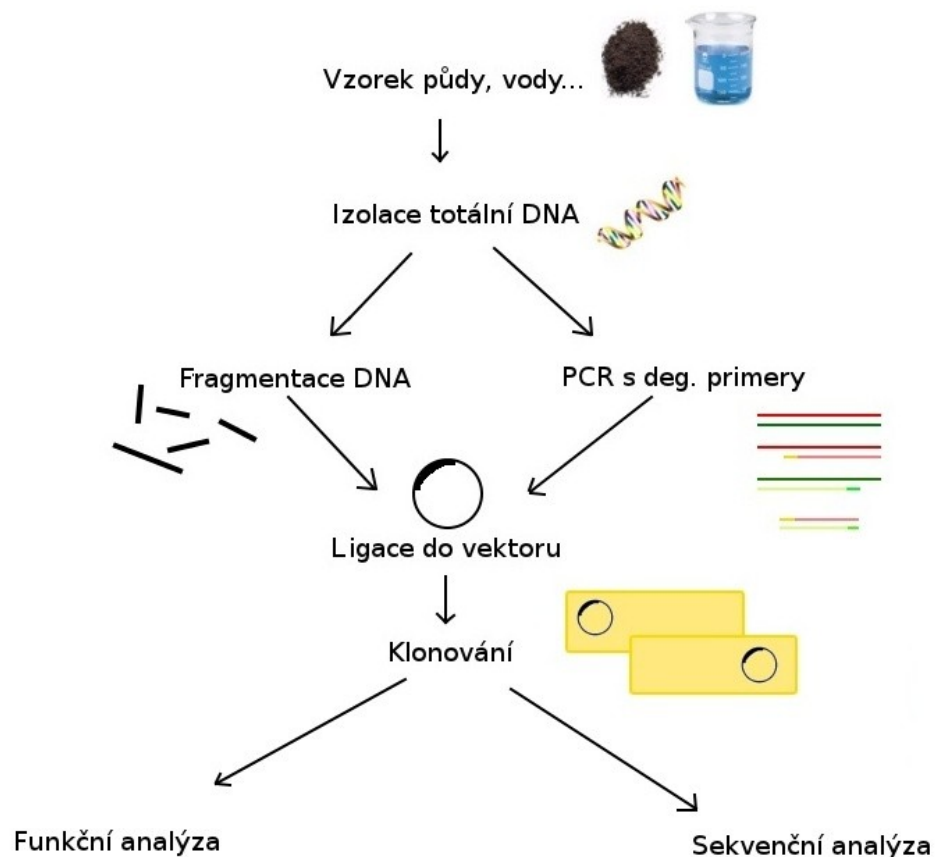
Většina technik zkoumajících bakteriální diverzitu v environmentální DNA je dnes založena na srovnávání genů pro 16S rRNA (část ribozomu). Geny pro rRNA jsou silně druhově konzervované a téměř neovlivněné horizontálním přenosem genetické informace, proto jsou ideálními identifikačními znaky při konstrukci fylogenetického stromu. Většina technik obnáší amplifikaci 16S rRNA genů pomocí PCR za použití univerzálních primerů. U eukaryot lze obdobně použít geny pro 18S rRNA.^[18]

Mezi techniky pro analýzu diverzity patří denaturační gradientová gelová elektroforéza nebo teplotně-gradientová gelová elektroforéza, kde se rozdílné 16S rDNA (tedy geny pro 16S rRNA) rozdělí na základě různého chování v gradientu denaturačního činidla nebo teploty. Technika jednovláknového sekvenčního polymorfismu je založena na různé sekundární struktuře jednovláknové rDNA a jejím vlivu na pohyblivost při

elektroforéze. Další technika délkového polymorfismu terminálního restrikčního fragmentu je založená na PCR s fluorescenčně značenými primery, při níž vzniknou značené amplikony, které se následně rozštěpí restrikční endonukleasou a elektroforeticky se analyzují jen tyto značené terminální sekvence. Nakonec lze PCR amplikony 16S rRNA genů naklonovat (ligovat do bakteriálního plasmidu, který se vloží do vhodného hostitele), čímž dojde k rozdělení různých variant PCR amplikonů, klony takto vzniklé knihovny následně sekvenovat a porovnat s počítačovou databází (např. pomocí NCBI - Blast).^[19]

1.6 Hledání nových funkčních genů

Existují dva způsoby, jak hledat nové enzymy v metagenomu. První přístup se nazývá sekvenční analýza a je založen na sekvenování úseků metagenomu a následném srovnávání s již známými sekvencemi a hledání homologií *in silico*. Druhý přístup je funkční analýza, kde se po naklonování úseku metagenomu do vhodného hostitele hledají ty klony, které exprimují produkt s určitou žádanou funkcí. Možné postupy k získání nových genů z environmentální DNA shrnuje obrázek 1.



Obrázek 1: Schematické znázornění hledání nových genů v metagenomu

1.6.2 Sekvenční analýza

Sekvenční analýza (neboli homologní přístup) obvykle obnáší použití PCR k amplifikaci hledaných genů za pomoci degenerovaných primerů, vytvořených tak, aby nasedaly na místa hledaného genu, která jsou pokud možno homologní u známých variant hledaného typu genu. Je vidět, že tímto přístupem nelze najít zcela nové geny, vždy v podstatě hledáme varianty již známých genů, protože automaticky předpokládáme homologii minimálně v úsecích primerů. Za výhodu lze považovat, že nezáleží na volbě hostitele pro klonování, protože nám nejde o expresi daného úseku metagenomu. Například u analýzy 16S rRNA genů (biodiverzita - viz výše) je tento přístup zcela vhodný.^[20]

Byly jím ovšem nalezeny i nové zajímavé enzymy, jako například nové chitinasy^[21] nebo β -laktamasy.^[22]

1.6.3 Funkční analýza

Jak bylo již naznačeno, je často vhodné udělat si takzvanou metagenomovou knihovnu klonů, při jejíž konstrukci se izolovaná DNA fyzicky rozštěpí na úseky o požadované délce a ty se vloží do klonovacích vektorů a následně do některého ze standardních hostitelů. Délka úseků se liší podle toho, jestli je cílem následná identifikace jednotlivých enzymů (tisíce párů basí) nebo celých enzymových komplexů či metabolických drah, jejichž geny se mohou vyskytovat blízko u sebe (desetitisíce párů basí). Pro klonování delších úseků se také volí speciální vektory, jako například umělý bakteriální chromosom (BAC), fosmid nebo kosmid.^[23]

Funkční analýza (neboli fenotypový přístup) často vede k identifikaci zcela nových genů pro enzymy se známou funkcí, které nejsou vůbec homologní s již známými enzymy s touto funkcí. Zkoumá se, jestli hostitelé s vneseným vektorem exprimují žádaný enzym například přidáním substrátu, který enzym zpracovává (pokud například má exprimovat β -laktamasu, bude rezistentní na penicilin). Problémem ale bývá slabá transkripce vneseného genu hostitelem, následně pak slabá translace a sekrece žádaného proteinu, chybné složení vzniklého proteinu nebo absence potřebného kofaktoru. Vznikající enzym nemusí plnit svou funkci a tudíž příslušné klony nedetekujeme.^[24]

Právě kvůli nedostačující expresi fragmentů environmentální DNA ve standardním hostiteli *Escherichia coli* se hledají jiné v laboratoři kultivovatelné kmeny,

kteřé by mohly být pro expři genů z metagenomu vhodnějši. Byly úspěšně vyzkoušeny například *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces lividas* nebo *Rhizobium leguminosarum*.^[20]

Bylo vyvinuto několik technik, které se snaží zefektivnit funkční analýzu metagenomu. Jedna z nich se nazývá SIGEX (substrate-induced gene expression screening – screening substrátem indukované expři genu) a spočívá podle názvu v hledání takových genů, které se exprimují v přítomnosti daného substrátu, ale v jeho nepřítomnosti nejsou produkovány. Jestli daný klon exprimuje vnesený gen či ne je indikováno pomocí fluorescence, na jejímž základě jsou poté klony rozříděny.^[25]

Další metodou je METREX (metabolite-regulated expression – expři regulovaná metabolitem), kde má hostitelská buňka receptor pro látky, jejichž produkci chceme detekovat. Pokud buňka s vloženým metagenomickým vektorem tyto látky produkuje, dojde k expři genu pro výrobu indikační molekuly (například zelený fluorescenční protein - GFP).^[26]

Mezi nové geny, nalezené funkční analýzou environmentální DNA, patří například celulasy^[27], β -laktamasy^[28], esterasy^[29], racemasy^[30] a mnohé další.

1.7 Penicilinacylasy

Penicilinacylasy (penicilinamidasy, PA, EC 3.5.1.11) jsou enzymy, které štěpí postranní řetězce penicilinů a cefalosporinů. Tyto enzymy se vyskytují u řady bakterií i eukaryotických mikroorganismů, ovšem jejich význam v metabolismu nebyl zatím zcela objasněn. Předpokládá se, že by tyto mikroorganismy mohly využívat jednak fenylacetylované sloučeniny jako zdroj uhlíku^[31], ale také β -laktamová jádra díky spolupřáci penicilinacylas a β -laktamas^[32], což bylo ověřeno na rekombinantním kmeni *Escherichia coli*, který exprimuje oba typy genů a díky tomu byl úspěšně kultivován v půdě obsahující jako jediný zdroj uhlíku a energie hydrolysát kaseinu a penicilin G.^[33]

Největší význam PA pro člověka tkví v jejich využití v průmyslu při výrobě polosyntetických β -laktamových antibiotik. Ze světové produkce antibiotik tvoří β -laktamová antibiotika asi 65 %, z toho je většina polosyntetických (β -laktamové jádro se substituovaným postranním řetězcem), protože přirodní antibiotika již vesměs nejsou účinná kvůli rozšířené rezistenci mezi patogeny.^[34] V procesu výroby těchto polosyntetických derivátů nachází dnes penicilinacylasy uplatnění především při hydrolyse

přírodních β -laktamových antibiotik (např. penicilinu G nebo cefalosporinu G) za vzniku kyseliny 6-aminopenicilanové (6-APK) resp. kyseliny 7-aminocefalosporanové (7-ACK). Ty se následně modifikují za vzniku polosyntetických β -laktamových antibiotik. Klasickou metodou jejich výroby je chemická syntéza, která s sebou nese řadu nevýhod např. nutnost chránění a aktivace reaktantů, použití organických rozpouštědel a vznik mnoha nežádoucích vedlejších produktů, nicméně v poslední době se daří prosazovat značně šetrnější syntézu enzymatickou, kde se také dá využít katalýzy penicilinacylasami.^[35]

Dále lze penicilinacylasy využít k enantioselektivní hydrolyse či acylaci^[36] nebo k navázání a odstranění chránících skupin při peptidových syntésách (využito například při syntéze sladidla aspartamu^[37]).

1.7.1 Typy penicilinacylas

Penicilinacylasy se dají rozdělit na tři základní typy. Typ I jsou PA specifické k penicilinu V (fenoxymethylpenicilin), které se vyskytují zejména u eukaryotických organismů. Kvůli vyšší substrátové specifitě k postrannímu řetězci se jejich použití omezuje spíše na hydrolysu přírodních β -laktamových antibiotik.^[38]

Typ II jsou PA specifické k penicilinu G (penicilin-G-acylasy, PGA). Vyskytují se jak u gramnegativních bakterií (např. rody *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Providencia* nebo *Kluyvera*), kde jsou produkovány do periplasmatického prostoru, tak u grampozitivních bakterií (např. rody *Bacillus* nebo *Arthrobacter*), kde jsou sekretovány do prostředí. V současnosti mají největší průmyslový význam jak pro hydrolysu penicilinů a cefalosporinů, tak pro syntézu polosyntetických β -laktamových antibiotik.^[39]

Typ III jsou penicilinacylasy specifické k ampicilinu (D- α -aminobenzylpenicilin), nyní již klasifikované jako hydrolasy esterů α -aminokyselin (AEH, EC 3.1.1.43). Vyskytují se u řady bakteriálních kmenů jako *Xantomonas* nebo *Acetobacter*.^[40] Jsou vhodné k syntéze ampicilinu a dalších polosyntetických β -laktamových antibiotik. Nadějná se jeví syntéza ampicilinu z penicilinu G za spolupráce PGA a AEH, která oproti syntéze za použití pouze PGA vykazuje vyšší výtěžky, protože AEH není inhibována vedlejším produktem prvotní hydrolysy penicilinu G – kyselinou fenylactovou.^[41]

1.7.2 Penicilin-G-acylasa z *Escherichia coli*

Penicilin-G-acylasa a všechny ostatní penicilinacylasy jsou řazeny k N-terminálním hydrolasám (Ntn-hydrolase superfamily), které se přes značnou různorodost v aminokyselinových sekvencích vyznačují stejným základním rysem – aktivním centrem je jediná aminokyselina na N konci proteinu (u jednotlivých N-terminálních hydrolas se liší, u PGA se konkrétně jedná o serin). Mechanismus hydrolysy je podobný serinovým proteasám.^[42]

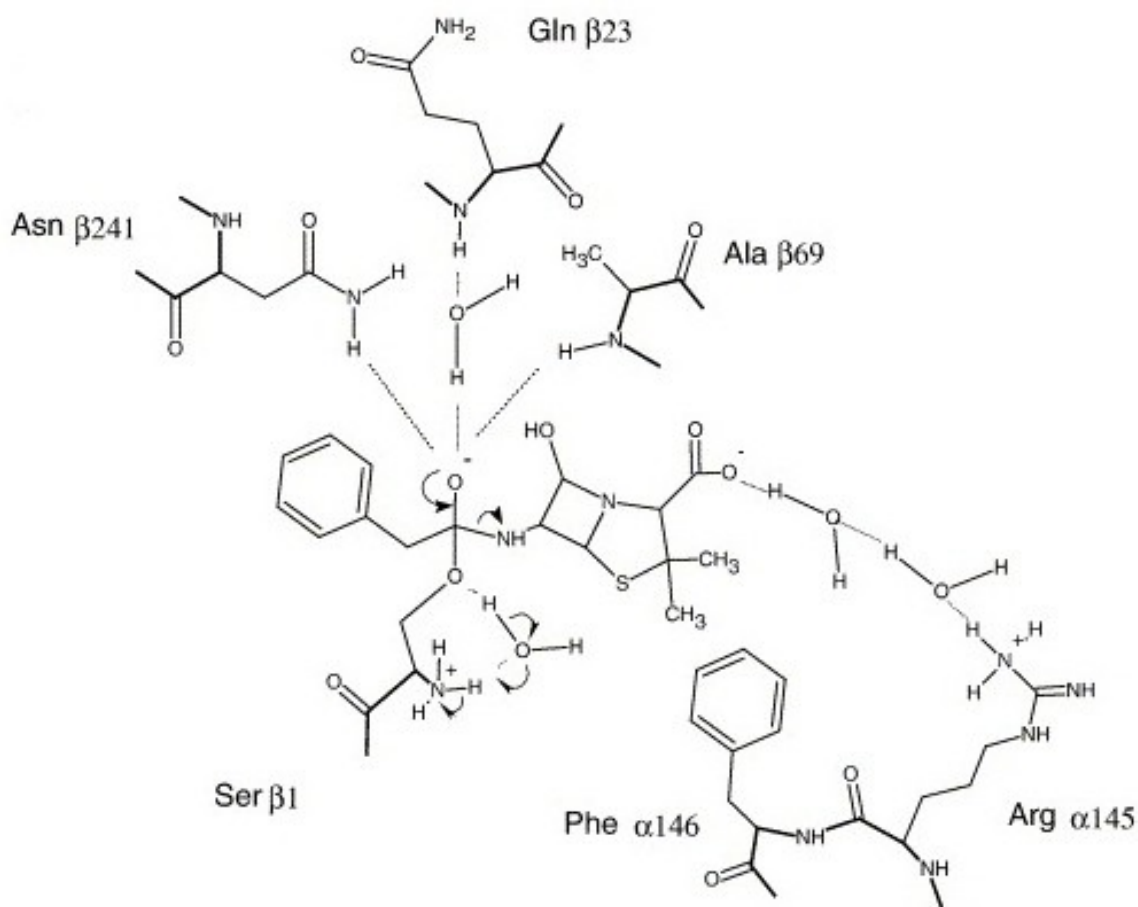
Nejlépe prostudovanou penicilin-G-acylasou je PGA z kmene *Escherichia coli* ATCC 11105, jejíž struktura byla vyřešena^[43] (obrázek 2).



Obrázek 2: Model struktury PGA z *Escherichia coli* ATCC 11105^[43] (www.pdb.org, PDB ID 1gk9)

Tento enzym je heterodimer, složený ze dvou částí označovaných jako α a β podjednotka. Hlavním strukturním motivem katalytického centra jsou dva antiparalelní β -listy, obalené dvěma antiparalelními α -helixy, nacházející se na β podjednotce. Za vlastní katalýzu je zodpovědný N konec β podjednotky, kde se nachází serin. Postranní hydroxyl serinu spolu s N-koncovým aminem a molekulou vody katalyzují hydrolysu.^[44] Tetrahedrální intermediát je stabilizován amidy peptidové vazby aminokyselin Gln 23 a Ala 69 a N^δ aminem Asn 241 z β podjednotky.^[45] Substrát je vázán v aktivním centru

pomocí postranních řetězců Phe β 71, Phe α 146 a Arg α 145 (obrázek 3, str. 17).^[46]



Obrázek 3: Klíčový krok hydrolysy penicilinu G pomocí PGA. Schema převzato z literatury.^[38]

PGA je v *E. coli* syntetizována ve formě prekursoru, který se skládá ze čtyř domén. První je signální peptid (26 aminokyselin), který je zodpovědný za export prekursoru PGA do periplasmatického prostoru. Dalšími doménami jsou již zmíněné podjednotky α (209 aminokyselin) a β (557 aminokyselin), které jsou propojené spojovacím peptidem o délce 54 aminokyselin.^[47] Po odštěpení signálního peptidu při transportu do periplasmatického prostoru je autokatalyticky vyštěpen spojovací peptid za vzniku podjednotky α a β , čímž je odkryt katalytický Ser β 1.^[48]

1.7.3 Synthesa polosyntetických β -laktamových antibiotik za katalýzy PGA

β -laktamové jádro získané hydrolysou přírodních penicilinů nebo cefalosporinů se kondenzuje s acylem, který tak nahradí původní acyl přírodního antibiotika. Synthesa

může být řízena buď termodynamicky, kde dochází ke kondenzaci přímo s karboxylem, nebo kineticky, kde je donorem acylu ester nebo amid dané kyseliny.^[49]

U termodynamicky řízené syntesy je třeba posunout rovnováhu na stranu produktů, čehož lze dosáhnout volbou vhodného pH, aby mohlo dojít k nukleofilnímu ataku na neutrální karboxyl a zároveň zůstala neutrální i amino skupina β -laktamového jádra, což může být problematické. Dále je možno posunout rovnováhu ve prospěch produktů užitím různých organických rozpouštědel, která však mohou zapříčinit ztrátu enzymové aktivity.^[50] Nejúčinnější strategií jak tomu předejít se ukázala imobilisace enzymu, což je kovalentní navázání enzymů na pevné nosiče (např. na agarosu) či provázání proteinů mezi sebou. Imobilisovaný enzym je také opakovatelně použitelný, což snižuje cenu takovéto syntesy.^[51]

Druhou možností je syntesa kineticky řízená, tedy kondenzace β -laktamového jádra s aktivovaným acylem (esterem či amidem). Problém s nábojem zde díky esterové nebo amidové vazbě odpadá, avšak dochází zde kvůli dvojí aktivitě PGA – transferasové a hydrolasové (obrázek 4, str. 19) k nežádoucí hydrolyse jak substrátu (tedy amidu nebo esteru), tak produktu. Byla vyzkoušena řada postupů ke zvýšení selektivity a výtěžku: odebírání produktu krystalizací, imobilisace enzymu, užití dvoufázových systémů, přidání organických rozpouštědel, snížení teploty (dokonce užití zmrzlých médií), případně užití kombinací těchto postupů.^[52]

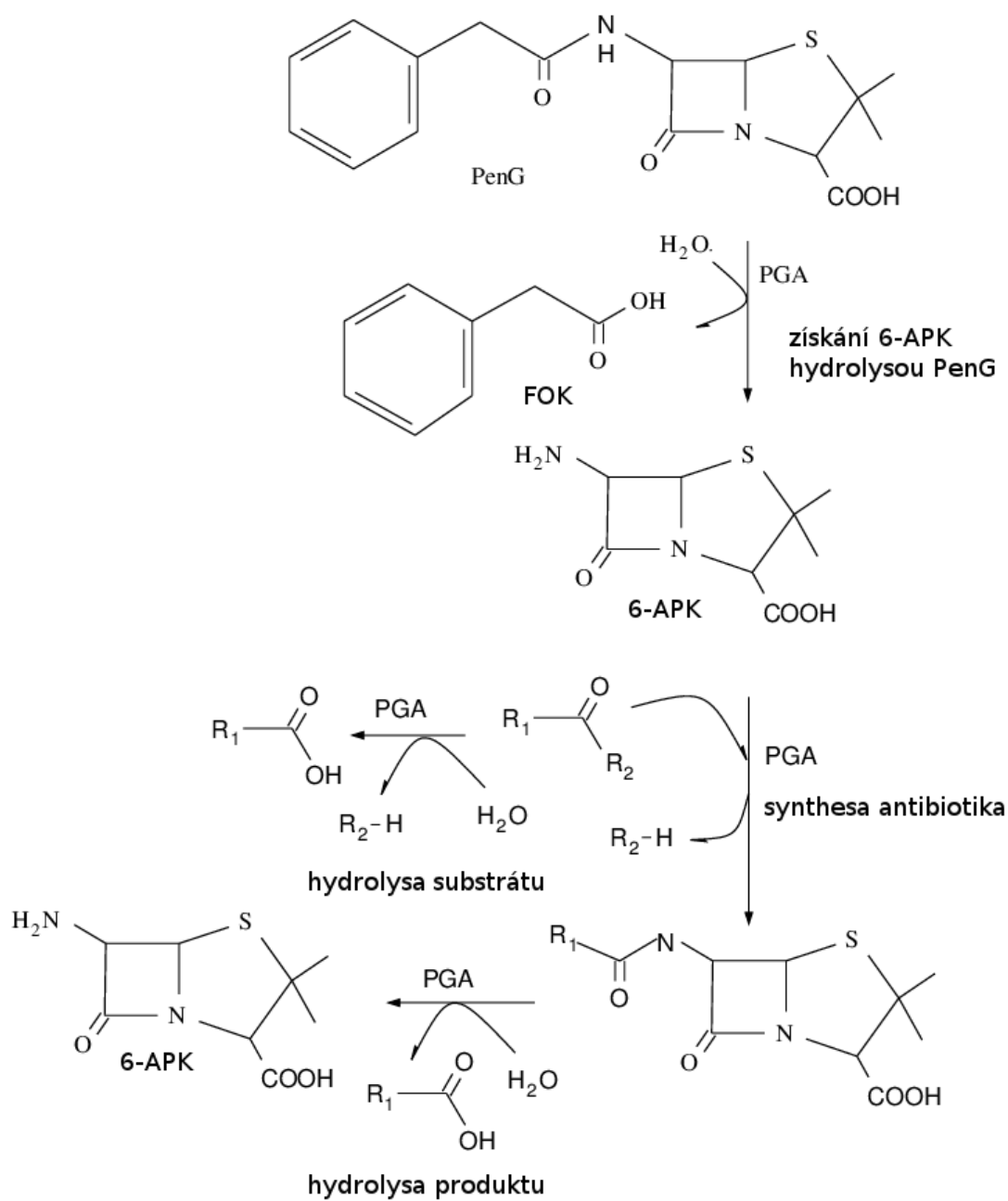
1.7.4 Nové penicilin-G-acylasy

Pro překonání obtíží s hydrolysou substrátu a produktu při syntese polosyntetických antibiotik, inhibice PGA vedlejším produktem (kyselinou fenyloctovou) při hydrolyse penicilinu G a dalších se hledají nové varianty PGA s lepšími vlastnostmi. Mezi užívané postupy se zaprvé řadí techniky modifikující již známé *pga* geny, ať jde o nesespecifickou mutagenesi působením fyzikálních a chemických vlivů na daný produkční kmen či jen úsek DNA, nebo o specificky cílenou záměnu kodonů v sekvenci genu.^[53]

Další možností je technika skládání fragmentů *pga* genů z několika různých organismů do celistvého genu (tzv. „gene shuffling“), jejich exprese ve vhodném hostiteli a selekce mutantů, produkující enzym s nejlepšími vlastnostmi.^[54]

Poslední variantou je získávání zcela nových *pga* genů, kde se půda ukazuje jako vhodný zdroj nových penicilin-G-acylas. Novou PGA se podařilo najít jednak klasickou

technikou kultivace půdních mikroorganismů např. u kmene *Achromobacter sp.* CCM 4824^[55], tak i v metagenomické DNA technikou funkční analýzy^[56].



Obrázek 4: Reakční schéma kineticky řízené syntézy obecného derivátu kyseliny 6-aminopenicilanové .

Vysvětlivky: PenG – penicilin G, FOK – fenylactová kyselina, 6-APK – kyselina 6-aminopenicilanová

2. Cíl práce

Cílem této práce je prokázat přítomnost strukturního genu penicilin-G-acylasy v environmentální DNA izolované ze vzorků půdy odebraných z různých hloubek, získat jeho nukleotidovou sekvenci a tu po překladu porovnat s aminokyselinovými sekvencemi již známých variant tohoto enzymu.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky půdy

Vzorky půdy o přibližné hmotnosti 500 g byly odebrány z výkopu stavby železničního tunelu Osek (okres Beroun, Česká republika) jak z povrchu, tak z hloubek 0,25 m a 0,5 – 4,5 m po 0,5 m, což představovalo jedenáct vzorků půdy různé geologické povahy. Vzorky byly uchovány v -70 °C.

3.1.2 Bakteriální kmeny a DNA

Použité bakteriální kmeny:

Escherichia coli **TOP10**: F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M1,5$ *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA, I*, *nupG* [57]

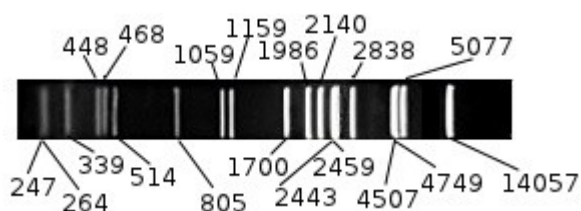
Kmen byl dlouhodobě uchováván při teplotě -70 °C ve formě glycerinových konzerv.

Použitá DNA:

Chromosomální DNA z *Escherichia coli* **RE3** (CCM 4228): prototrofní PGA-produkční kmen odvozený od průmyslového kmene *Escherichia coli* RE2 (CCM 3759) [58]

Chromosomální DNA z *Achromobacter* sp. CCM 4824: půdní izolát produkující acylasu β -laktamových antibiotik [55]

λ_{DNA} (Fermentas): *dam*⁻, *dcm*⁻, štěpena enzymem *Pst*I (obrázek 5)

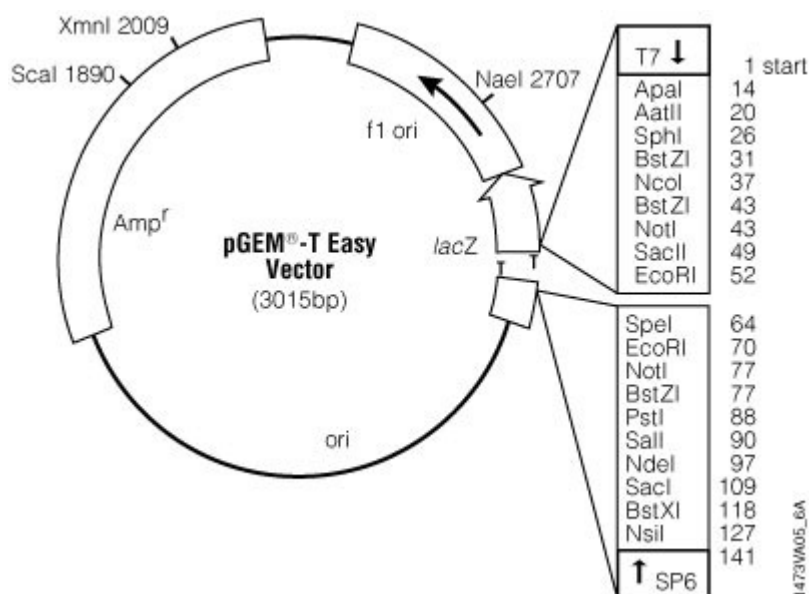


Obrázek 5: λ_{DNA} štěpená enzymem *Pst*I rozdělená na zóny agarosovou elektroforesou (1% agarosový gel). Čísla představují délky jednotlivých zón v párech basí (pb).

Všechna použitá DNA byla uchována při teplotě -20 °C ve formě roztoku v TE pufru.

Použité plasmidy:

pGEM[®]-T Easy (3015 pb, Amp^R, Promega): linearizovaný vektor vhodný pro klonování PCR produktů nesoucích adenyl na 3' koncích. (obrázek 6)



Obrázek 6: Mapa vektoru pGEM-T Easy se zvýrazněnými klíčovými oblastmi. V pravé části je vidět přerušovaný *lacZ* operon opatřený volnými thymidyly pro ligaci 3' adenylaných úseků DNA a v rámečcích jsou vyjmenována místa pro štěpení restrikčními endonukleasami. (zdroj: Promega, manuál)

3.1.3 Primery

Použité primery jsou shrnuty v tabulce 1 (str. 23). Univerzální primery pro 16S rRNA byly převzaty z literatury^[59]. Degenerované primery pro penicilin-G-acylasu byly navrženy v programech MegAlign a PrimerSelect (DNASTAR) s vhodnými degeneracemi, aby odpovídaly konvenčním oblastem proteinových sekvencí v databázích deponovaných PGA z kmenů: *Escherichia coli* ATTC 11105 (GenBank AAA24324)^[60], *Achromobacter xylosoxidans*(GenBank AAP20806)^[61], *Achromobacter* sp. CCM 4824 (GenBank AAY25991)^[55], *Alcaligenes faecalis* (GenBank AAB71221)^[62], *Arthrobacter viscosus* (GenBank AAA22077)^[63], *Kluyvera cryocrescens* (GenBank AAA25047)^[64], *Providencia rettgeri* (GenBank AAP86197)^[65] a penicilin-G-acylasy ze zástupce γ -*proteobacteria*, izolované z půdního metagenomu (GenBank AAS87335)^[56]. Primery byly syntetizovány firmou Metabion International AG. Výchozí koncentrace byla 100 μ M (roztok v TE pufru),

přičemž 16S rRNA primery byly 10x naředěny .

Tabulka 1: Použité primery

Gen	Název	Sekvence (5' → 3')
16S rRNA	fwd27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S rRNA	rev1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
<i>pga</i>	fwd90	GCACARGAYCGNCTNTTYCARATGGA
<i>pga</i>	fwd200	GGAWCNATGGCAAAYCGNTTYTCNGA
<i>pga</i>	fwd360	TACACGTAYGGNATHGGNCTNCAYG
<i>pga</i>	rev510	CRTCNGCARTARTACCARTTNA
<i>pga</i>	rev570	GGNGARTTRTTCCARTTNRCNA
<i>pga</i>	rev815	CATRTYRTTYTCNGTNCCNCGRTT
<i>pga</i>	rev840	GCNAYRAANCCNGAYTGNCNCGG

3.1.4 Kultivační média a antibiotika

Kultivační půda LB - Trypton (Oxoid) 10 g.l⁻¹, kvasinkový extrakt (Oxoid) 5 g.l⁻¹, NaCl 10 g.l⁻¹, pH 7,5 (upraveno NaOH).

Pevné půdy byly připraveny přidáním 15 g agaru (Difco) na 1 l tekuté půdy.

Kultivace rekombinantních kmenů byly prováděny v přítomnosti antibiotika ampicilinu (Amp). Roztok antibiotika byl uchováván při -20°C ve formě koncentrovaného (1000x) zásobního roztoku (100 mg.ml⁻¹). Do medií byl roztok antibiotika přidáván až po jejich zchladnutí pod 50 °C.

3.1.5 Chemikálie, enzymy a roztoky

Použité chemikálie:

Agar – Difco

Agarosa – Lonza

CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) – Fluka

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) – Sigma-Aldrich

ethanol (čistota pro UV spektroskopii) – Lachema

H₃BO₃ – Lachema

HCl – Lachema

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) - Duchefa
MOPS (morfolinopropansulfonová kyselina) – Serva
NaCl – Lachema
NaOH - Lachema
octan sodný – Sigma-Aldrich
pyrofosfát sodný – Lachema
SDS (dodecylsulfát sodný) – Serva
Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) – Lachema
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) - Duchefa

Pokud není uvedeno jinak, byla čistota všech použitých chemikálií p.a.

Použité enzymy:

*Eco*RI restriční endonukleasa (Fermentas, 10 U. μ l⁻¹)
Herculase Hot Start DNA polymerasa (Stratagene, 5 U. μ l⁻¹)
lysozym (Serva): 50 mg . ml⁻¹ v roztoku „P1“
proteínasa K (Roche): 20 mg.ml⁻¹
ribonukleasa A (Qiagen): 1 mg . ml⁻¹ v 5 mM Tris-HCl (pH = 8,0)
T4 DNA ligasa (Fermentas)
Taq DNA polymerasa (Fermentas, 1 U. μ l⁻¹)

Pufry k enzymům jsou dodávány výrobcem spolu s enzymy.

Použité pufry a ostatní roztoky:

Acetát MOPS: 0,10 M octan sodný, 0,05 M MOPS, pH 8,0
dNTP – směs deoxynukleotid trifosfátů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) každý o koncentraci 10 mM (Fermentas)
Ethidium bromid (EtBr): 0,05 μ g.ml⁻¹
GLB (gel loading buffer) (10x): 40% sacharosa, 0,05% bromfenolová modř
Chrombachův pufr: 0,33 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
IPTG: 200 mg.ml⁻¹ roztok v H₂O
lysační pufr: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 1% CTAB, pH 8,0

pufr B: 100mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 0,1% SDS, 1 % CTAB, pH 8,0

roztok „P1“ (Qiagen): 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (+100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ribonukleasa A)

roztok „P2“ (Qiagen): 200 mM NaOH, 1% SDS

roztok „P3“ (Qiagen): 3,0 M octan draselný (pH 5,5)

TBE pufr: 45 mM Tris-HCl, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA, pH 8,0

TE pufr: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5

Tris-HCl pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

X-gal: 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ roztok v dimethylformamidu

Kultivační půdy a roztoky byly sterilizovány horkou parou v autoklávu při 120 °C po dobu 45-60 min.

3.1.6 Použité komerční kity

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)

3.1.7 Použité přístroje

Analytické váhy – AE200 (Mettler)

Automatické pipety - sada (Gilson, Inc.)

Box s termostatem - Biological thermostat (Laboratorní přístroje Praha, s.p.)

Centrifuga - 5403 (Eppendorf)

Centrifuga - JS-21 (Beckman)

Dokumentační systém - Gel Logic 200 (Kodak)

Minicentrifuga – DW-41 (Qualitron, Inc.)

Minishaker - MS1 (IKA)

Mixér - 0010 (ETA)

Orbitální inkubátor - Orbital Incubator (Gallenkamp, Inc.)

Předvážky – PJ600 (Mettler)

Suchý blok – 17600 (Thermolyne)

Termální cyklátor - PTC-200 (MJ Research)

Zdroj napětí - EC 1000-90 (E-C Apparatus Corporation)

3.2 Metody

3.2.1 Izolace celkové DNA ze vzorků půdy

Pro izolaci DNA z jednotlivých vzorků byl použit modifikovaný postup nepřímé metody izolace tzv. mixovací metodou (z angl. blending method).^[66]

Ke každému vzorku (50 g) bylo přidáno 100 ml pufru B. Směs byla důkladně promíchána a následně tři minuty homogenizována v mixéru. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při nízkých otáčkách (500 x g a 10 °C). Supernatant byl uchován a sediment byl podroben stejnému postupu ještě dvakrát. Z cca 300 ml supernatantu obsahujícího buňky oddělené od částic půdy byly odstraněny zbytky půdy filtrací přes sterilní gázu a poté byl roztok centrifugován 30 minut při vysokých otáčkách (11000 x g, 4 °C). Získaný sediment resuspendován v 150 ml 0,1% pyrofosfátu sodného a následně centrifugován (30 min, 11000 x g, 4 °C). Sediment byl opět resuspendován, a to ve 100 ml Chrombachova pufru, načež byl centrifugován (30 min, 11000 x g, 4 °C).

Nakonec byl sediment resuspendován v 10 ml lisačního pufru. K této směsi bylo přidáno 160 µl lysozymu, 20 µl proteinasy K, 50 µl ribonukleasy A a směs byla inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byl k směsi přidán 1 ml 20% SDS a směs byla inkubována 2 hodiny při 65 °C na třepačce (200 ot.min⁻¹). Posléze byla směs protřepána s 10 ml chloroformu. Vodná fáze byla oddělena, smíchána s 0,6-ti násobným množstvím objemu isopropanolu a inkubována přes noc při 4 °C, aby došlo k vysrážení veškeré DNA.

Další den byl roztok centrifugován (30 min, 13500 x g, 4 °C) a supernatant byl odstraněn. Sraženina byla omyta 1 ml 70% ethanolu a po centrifugaci (4 min, 13500 x g, 4 °C) byla resuspendována v 250 µl TE pufru a uchována při -20 °C.

3.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce (PCR z angl. polymerase chain reaction) je biochemická metoda, která využívá termostabilní DNA polymerasu k opakovanému kopírování DNA.

Metoda PCR byla prováděna v mikrozkušavkách Eppendorf (0,5 ml) za použití automatického termálního PCR cyklátoru (MJ Research PTC-200). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala 2,5 µl Herculase pufru, 0,5 µl 10 mM dNTP (směs deoxynukleotid trifosfátů), 0,5 µl přímého primeru, 0,5 µl zpětného primeru, 1 µl DMSO

(dimethylsulfoxid), 0,5 - 1 μ l DNA templátu, 0,2 μ l enzymu Herculase Hot Start polymerasa a sterilní destilovanou vodu.

Zobecněný PCR program je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Program automatického termálního PCR cyklátoru

Název kroku	Teplota [°C]	Doba trvání [min:s]	Počet opakování
Úvodní denaturace	95	2:00	1
Denaturace	95	0:30	35
Nasedání primerů	55 - 62	0:30	35
Polymerace	72	0:30 – 2:30	35
Konečná polymerace	72	10:00	1

Teplota nasedání primerů byla volena v závislosti na délce obou primerů a zastoupení GC párů v jejich sekvenci. Pro lepší odhad této teploty byl použit program PrimerSelect (DNASTAR). Doba polymerace závisela na délce amplifikovaného úseku tak, že 1 kpb PCR produktu odpovídala přibližně 1 min polymerace.

3.2.3 Adenylace 3' konců PCR amplikonů

Adenylace na 3' koncích obou vláken DNA probíhala pomocí *Taq* polymerasy v mikrozkušavkách Eppendorf (0,5 ml) v celkovém objemu 40 μ l. Směs obsahovala: 30 μ l přečištěného PCR produktu (High Pure PCR Product Purification Kit), 4 μ l *Taq* pufru, 3,2 μ l 25mM $MgCl_2$, 0,5 μ l 10mM dNTP, 1 μ l *Taq* polymerasy a sterilní destilovanou vodu. Směs byla vložena do automatického termálního PCR cyklátoru (MJ Research PTC-200) na 30 min při 72 °C.

3.2.4 Elektroforetická analýza DNA

K detekci a analýze dvojvláknové DNA byla použita horizontální agarosová elektroforesa v TBE pufru. Rozměry používaných gelových nosičů byly: 9x7,5 cm a 9x10 cm. Koncentrace agarosy v gelu byla zvolena podle velikosti a charakteru analyzovaných molekul DNA, přičemž standardně byl připravován 1% gel v TBE pufru. Před nanesením na gel byl ke vzorkům DNA přidáván pufr GLB. Jako standard molekulových hmotností pro lineární DNA byla používána nejčastěji λ DNA štěpená restriční enzymem *Pst*I. K barvení DNA v gelu bylo použito fluorescenční barvivo EtBr, přidané do gelu. Jako zdroj napětí (30 mA) byl používán EC 1000-90, E-C

Apparatus Corporation. Elektroforesa probíhala obvykle 40-60 minut. Elektroforetogramy byly snímány dokumentačním systémem Gel Logic 200 (Kodak) a konvertovány do digitální podoby. Další zpracování probíhalo pomocí softwaru Kodak MI - Molecular Imaging System.

3.2.5 Restrikční analýza DNA a ligace úseků DNA

DNA určená pro restrikční analýzu či ligaci byla vždy přečištěna od enzymů, pufrů a dalších reakčních činidel pomocí komerčně dostupných kitů High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) pro lineární dvojvláknovou DNA nebo High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) pro kruhovou dvojvláknovou DNA dle návodu výrobce.

Restrikční analýza DNA probíhala za použití restrikční endonukleasy *EcoRI* v mikrozkušavkách Eppendorf v pracovním objemu 10 μl dle návodu výrobce enzymu po dobu 30 – 60 minut při teplotě 37 °C.

Ligace vkládaného úseku DNA, adenylovaného na 3' koncích, a vektoru pGEM-T Easy probíhala v mikrozkušavkách Eppendorf, celkový objem ligační směsi byl 10 μl , z toho 4 μl vkládané DNA, 0,3 μl vektoru a 1 μl enzymu T4 DNA ligasy. Směs byla ponechána při laboratorní teplotě 3 hodiny.

3.2.6 Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Ligační směs byla přidána k zamraženým kompetentním buňkám *Escherichia coli* TOP10 a ponechána 30 minut na ledu. Následoval teplotní šok 90 s při 42 °C v suchém bloku (Thermolyne 17600), po němž byla transformovaná směs přenesena do ledu na 10 minut. Poté bylo přidáno 400 μl sterilního tekutého LB media a buňky byly inkubovány 40 min při 37 °C na třepačce (200 ot.min⁻¹). Nakonec byla suspenze vyseta na misky s pevným LB médiem obsahujícím ampicilin (125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), IPTG (80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) a X-gal (40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) tak, že na každou misku bylo naneseno 120 – 160 μl suspenze. Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Kolonie obsahující plasmid s vkládaným úsekem DNA byly vybrány na základě tzv. modrobílé selekce (kolonie se správně vloženým úsekem DNA jsou bílé či světle modré).

3.2.7 Izolace plasmidové DNA minipreparativní metodou

K izolaci plasmidové DNA z buněk *Escherichia coli* TOP10 byla použita modifikovaná rychlá minipreparativní metoda alkalické extrakce dle Birnboima.^[67]

Kultura rekombinantních buněk narostlá přes noc ve 2 ml LB media s ampicilinem ($125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla centrifugována (1 min, $23000 \times g$, 10°C), získaný pelet byl resuspendován v 200 μl roztoku „P1“ s přidavkem lysozymu a inkubován 30 minut při 37°C . Po přidání 400 μl roztoku „P2“ byla suspenze lehce promíchána a nechána 5 min při 0°C . Následně bylo přidáno 300 μl roztoku „P3“, vše lehce promícháno a necháno 15 min při 0°C . Poté byla směs centrifugována (1 min, $23000 \times g$, 10°C), 700 μl supernatantu bylo odebráno do čisté mikrokumavky Eppendorf, důkladně promícháno s 1,5 ml koncentrovaného ethanolu (99,8 %) a ponecháno 15 min při -20°C . Po centrifugaci (1 min, $23000 \times g$, 10°C) byl supernatant odstraněn a pelet resuspendován v 200 μl acetát-MOPS. Po přidání 400 μl koncentrovaného ethanolu (99,8 %) byla směs důkladně promíchána a opět centrifugována (1 min, $23000 \times g$, 10°C). Vysrážená DNA byla resuspendována v 50 μl pufru Tris-HCl. Úspěšnost izolace plasmidové DNA byla zhodnocena elektroforeticky.

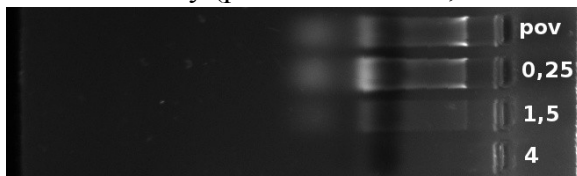
3.2.8 Sekvenční analýza

Vybrané plasmidy byly servisně sekvenovány Sangerovou dideoxynukleotidovou terminační metodou^[68] sekvenačním střediskem Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i. za použití systému BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) a univerzálních sekvenačních primerů. Vzorky sekvenačních reakcí byly elektroforeticky děleny v 6% polyakrylamidovém gelu s močovinou^[69] a vyhodnocovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3130xl. Získané sekvence byly zpracovány pomocí softwaru Lasergene (DNASTAR).

4. Výsledky

4.1 Izolace a detekce metagenomické DNA

Environmentální DNA izolovaná ze vzorků půdy postupem uvedeným v kapitole 3.2.1 byla detekována elektroforeticky (příklad obrázek 7, shrnutí tabulka 3).



Obrázek 7: Elektroforetická detekce izolované environmentální DNA. Izolát z povrchu (pov) a z hloubky 0,25 m byl detekován zřetelně, izolát z hloubky 1,5 m byl již detekován slaběji a izolát z hloubky 4 m nebyl detekován vůbec.

Jelikož byla elektroforetická vizualizace DNA, a to zejména u vzorků z větších hloubek, mnohdy neúspěšná, byla pro její citlivější detekci použita PCR amplifikace oblasti nesoucí gen pro 16S rRNA nalézající se u všech prokaryot. Tato PCR byla provedena na souboru jedenácti metagenomických DNA templátů pomocí univerzálních primerů pro 16S rRNA (tabulka 1, str. 23) za teploty nasedání primerů 55 °C a doby polymerace 1,5 min.

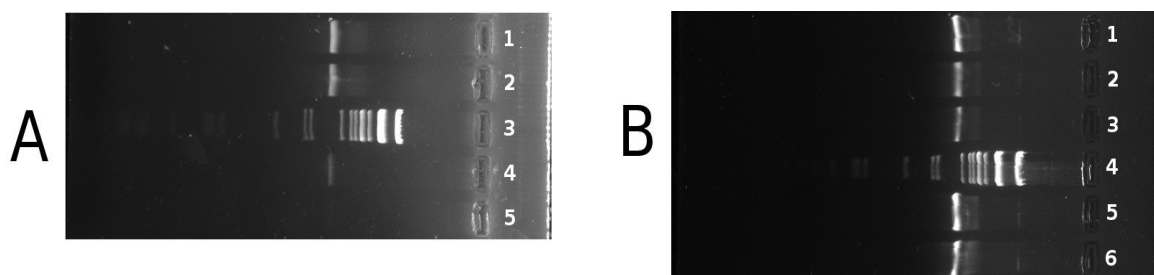
Následná agarosová elektroforesa (obrázek 8, str. 31) prokázala přítomnost PCR produktů o délce okolo 1500 pb, což odpovídá velikosti amplifikovaného úseku. V případě neúspěchu byla PCR provedena znovu, avšak nyní již na řaděném DNA templátu (10x, 100x, 1000x). Tabulka 3 shrnuje výsledky elektroforetické detekce a úspěšnost amplifikace na jednotlivých vzorcích.

Tabulka 3: Detekce izolované environmentální DNA

Hloubka [m]	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
Izolovaná DNA	++	++	+	-	+	-	-	-	-	-	+
PCR neř. templát				++		++	++	++	++	++	++
PCR 10x ř. templát	-	-			++						
PCR 100x ř. templát	-	+				++	++		++	+	++
PCR 1000x ř. templát	++	++	++								

Vysvětlivky:

- ++ DNA elektroforeticky zřetelně detekována
- + DNA elektroforeticky detekována
- DNA elektroforeticky nedetekována



Obrázek 8: Elektroforetická detekce 16S rRNA PCR amplikonů na metagenomických templátech.

A: amplikony na: 1 – 1000x ř. templ. z hloubky 0,25 m, 2 - 1000x ř. templ. z povrchu , 4 - 100x ř. templ. z hloubky 0,25 m, 5 - 100x ř. templ. z povrchu. B: amplikony na: 1 – 100x ř. templ. z hloubky 4,5 m, 2 – neř. templ. z hloubky 4,5 m, 3 – neř. templ. z hloubky 3 m, 5 - 1000x ř. templ. z hloubky 0,5 m, 6 - neř. templ. z hloubky 1 m. A3 a B4 – standard molekulových hmotností λ (viz obrázek 5, str. 21)

4.2 Test funkčnosti degenerovaných primerů pro penicilin-G-acylasu

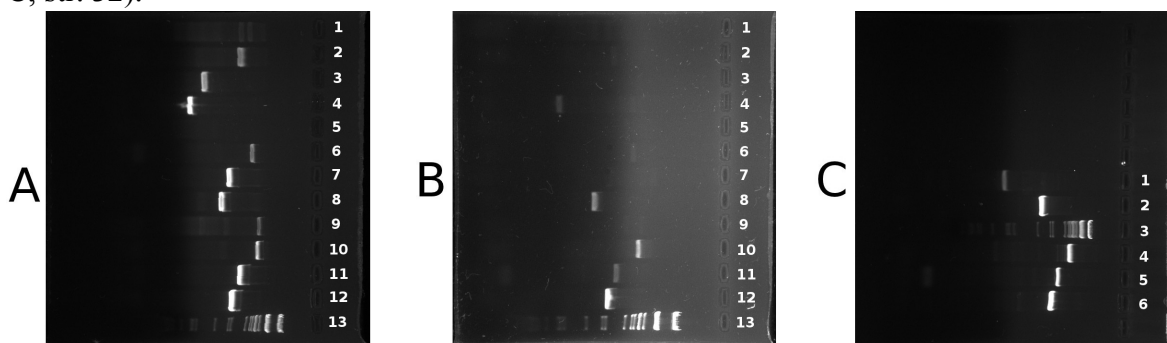
Pomocí programu EditSeq (DNASTAR) byly na sekvenci *pga* genu z *Escherichia coli* RE3 zjištěny délky úseků vymezených všemi kombinacemi *pga* primerů (tabulka 4).

Tabulka 4: Délka úseků mezi kombinacemi *pga* primerů na teplátu *pga* z *E. coli* RE3 v pb.

fwd90+ rev510	fwd90+ rev570	fwd90+ rev815	fwd90+ rev840	fwd200+ rev510	fwd200+ rev570	fwd200+ rev815	fwd200+ rev840
1230	1410	2136	2214	918	1098	1824	1902
fwd360+ rev510	fwd360+ rev570	fwd360+ rev815	fwd360+ rev840				
456	636	1362	1440				

Všechny kombinace degenerovaných *pga* primerů (sekvence viz tabulka 1, str. 23) byly poté testovány na chromosomální DNA z *Escherichia coli* RE3 a to při dvou teplotách nasedání primerů: 55 °C a 62 °C a trvání polymerace 2,5 min. U teploty nasedání primerů 55 °C byl produkt o správné délce elektroforeticky detekován u všech primerových kombinací, byť u kombinací fwd200 + rev840 a fwd360 + rev840 byl takřka nezatelný (obrázek 9 A, str. 32). U teploty nasedání primerů 62 °C nebyla amplifikace tak úspěšná, nicméně pro pět kombinací (fwd90 + rev510, fwd90 + rev570, fwd90 + rev815, fwd200 + rev510 a fwd360 + rev510) byl odpovídající produkt zřetelně detekován (obrázek 9 B, str. 32).

Těchto pět funkčních kombinací primerů bylo dále úspěšně otestováno při teplotě nasedání primerů 60 °C na chromosomální DNA z *Archmomobacter sp.* CCM 4824 jakožto templátu s vysokým podílem G+C [70] a tedy odlišném od DNA *E. coli* (obrázek 9 C, str. 32).



Obrázek 9: Test funkčnosti kombinací degenerovaných *pga* primerů

A: templát *E. coli* RE3, teplota nasedání primerů 55 °C, 1 – fwd360 + rev840, 2 – fwd360 + rev815, 3 – fwd360 + rev570, 4 – fwd360 + rev510, 5 – fwd200 + rev840, 6 – fwd200 + rev815, 7 – fwd200 + rev570, 8 – fwd200 + rev510, 9 – fwd90 + rev840, 10 – fwd90 + rev815, 11 – fwd90 + rev570, 12 – fwd90 + rev510, 13 - standard molekulových hmotností λ (viz obrázek 5, str. 21)

B: templát *E. coli* RE3, teplota nasedání primerů 62 °C, pořadí drah jako část A

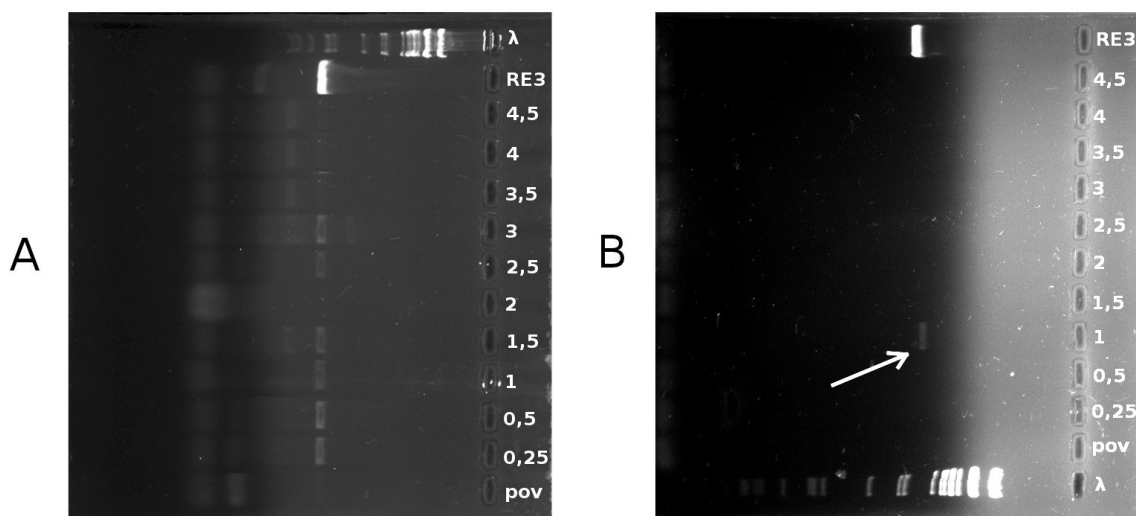
C: templát *Achromobacter sp.* CCM 4824, 1 – fwd360 + rev510, 2 – fwd200 + rev510, 3 – standard molekulových hmotností λ (viz obrázek 5, str. 21), 4 – fwd90 + rev815, 5 – fwd90 + rev570, 6 – fwd90 + rev510

4.3 Vyhledávání genů pro PGA v metagenomické DNA

Na všech jedenácti metagenomických templátech byla vyzkoušena PCR se třemi vhodnými kombinacemi primerů (fwd360 + rev510, fwd90 + rev510, fwd90 + rev815) amplifikujícími úseky o stoupající délce. Templáty byly použity v ředění, které se ukázalo nejvhodnější při testování PCR pro amplifikaci genů pro 16S rRNA (viz tabulka 3, str.30). Bylo-li vhodných ředění více, bylo zvoleno nejnižší z nich. Jako pozitivní kontrola byl použit templát chromosomální DNA z *Escherichia coli* RE3. Teplota nasedání primerů byla 55 °C, doba polymerace v závislosti na délce úseku 0,5 – 2,5 min. Výsledky PCR byly vyhodnoceny elektroforeticky (obrázek 10, str. 33).

Při amplifikaci pomocí kombinace primerů fwd360 + rev510 (cca 450 pb) byl detekován produkt o správné délce u vzorků z hloubky 0,25 m, 0,5 m, 1 m, 1,5 m, 2,5 m a 3 m. Při amplifikaci fragmentu potenciálního *pga*, vymezeného primery fwd90 a rev510 byl detekován produkt odpovídající délky (cca 1200 pb) pouze u vzorku z hloubky 1 m. U

poslední zmíněné kombinace fwd90 + rev815 nebyla amplifikace úspěšná. Všechny amplifikace byly pro kontrolu opakovány se stejným výsledkem.

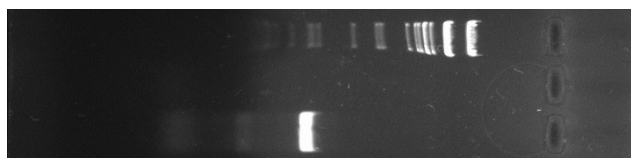


Obrázek 10: Amplifikace *pga* pomocí PCR na metagenomických templátech s primery fwd360 + rev510 (A) a fwd90 + rev510 (B).

Pov = vzorek z povrchu, čísla představují hloubku v metrech, RE3 = amplicon na DNA z *E.coli* RE3, λ = standard molekulových hmotností (viz obrázek 5, str. 21).

4.4 Kontrolní „polozahnížděná“ PCR

Nejdelší PCR produkt získaný na metagenomických templátech – produkt amplifikace pomocí kombinace primerů fwd90 + rev510 na environmentální DNA ze vzorku z hloubky 1 m (dále jen produkt „P1200“) byl přečištěn užitím High Pure PCR Product Purification Kitu. Na takto připraveném a 1000x naředěném templátu byla provedena tzv. „polozahnížděná“ (angl. semi-nested) PCR s vnitřními primery fwd360 + rev510 při teplotě nasedání primerů byla 55 °C a době polymerace 30 s. Získaný produkt měl odpovídající délku - cca 450 pb (obrázek 11).

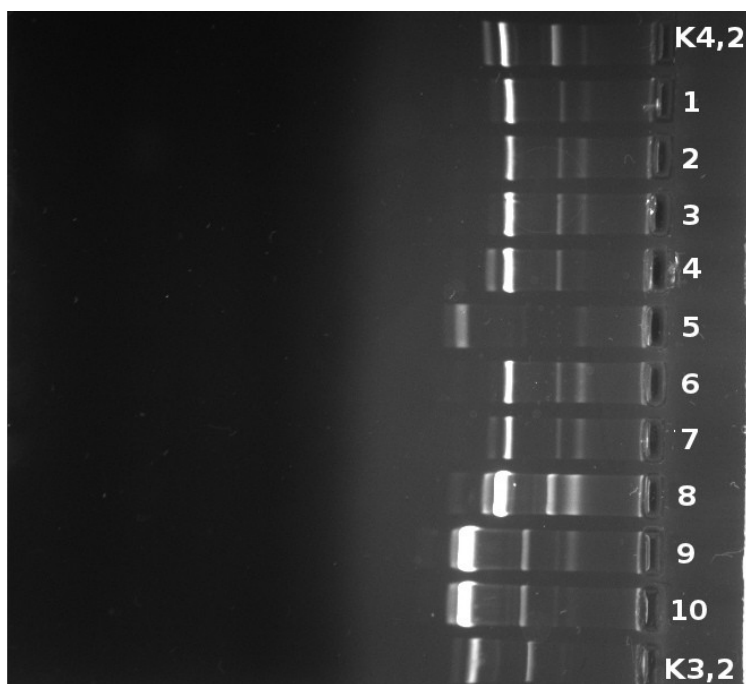


Obrázek 11: Produkt „polozahnížděné“ PCR s primery fwd360 + rev510 na ampliconu „P1200“ (PCR produkt s primery fwd90 + rev510 na metagenomické DNA z hloubky 1 m) v porovnání se standardem molekulových hmotností λ (viz obrázek 5, str. 21).

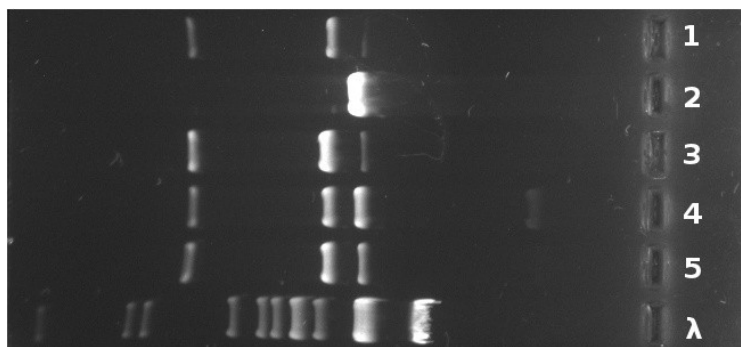
4.5 Klonování PCR produktu „P1200“

Přečištěný PCR produkt „P1200“ byl na 3' konci adenylován a purifikován z gelu pomocí High Pure PCR Product Purification Kitu. Následně byla takto připravená DNA ligována do vektoru pGEM-T Easy a transformována do kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10, které byly kultivovány přes noc na pevném LB Amp X-gal mediu.

Bylo vybráno 24 kolonií potenciálně obsahujících rekombinantní plasmid (modrobílá selekce na základě přerušení *lacZ* operonu vloženým úsekem DNA) a každá byla zaočkována pomocí sterilního párátko do 2 ml tekutého LB media s ampicilinem. Třepaná kultura byla inkubována přes noc při 37 °C a následně sloužila k izolaci plasmidové DNA minipreparativní metodou. Izolovaná DNA z 24 rekombinantních klonů byla nejprve elektroforeticky porovnána s plasmidy o známé délce 4200 pb a 3200 pb (obrázek 12), poté bylo pro další analýzu vybráno 9 plasmidů požadované velikosti cca 4,2 kpb. Ty byly následně přečištěny pomocí High Pure Plasmid Isolation Kitu a kontrolně štěpeny enzymem *EcoRI* (obrázek 13, str. 35). Pro sekvenční analýzu bylo vybráno osm rekombinantních plasmidů nesoucích cca 1200 pb dlouhý vložený úsek.



Obrázek 12: Srovnání délek části rekombinantních plasmidů s plasmidy o známé délce 3,2 kpb (K3,2) a 4,2 kpb (K4,2). Plasmidy o velikosti cca 4,2 kpb (1-4, 6-8) byly vybrány pro další zpracování.



Obrázek 13: Restrikční analýza části vybraných plasmidů enzymem *EcoRI*. Z plasmidů 1, 3, 4 a 5 se vyštěpil vložený PCR amplikon a byly vybrány pro další zpracování. Standard molekulových hmotností λ viz obrázek 5, str. 21.

4.6 Sekvenční analýza

Získané sekvence osmi klonovaných PCR produktů „pga1200“ byly pomocí programu SeqMan (DNASTAR) srovnány Clustalovou metodou a shodné byly přiřazeny k sobě, takže byly získány čtyři typy částečně se lišících nukleotidových sekvencí (délka a podíl G+C viz tabulka 5), které byly v programu EditSeq (DNASTAR) následně přeloženy užitím univerzálního genetického kódu. Takto získané proteinové sekvence byly nakonec v programu Blast (NCBI) porovnány s proteiny deponovanými v databázích.

Tabulka 5: Charakterizace klonovaných PCR amplikonů

Typ sekvence	Velikost [pb]	zastoupení G+C [%]	Počet aminokyselin
1	1073	68,5	356
2	882	73,7	293
3	1091	68,0	360
4	1210	69,1	398

Bylo zjištěno, že všechny čtyři typy aminokyselinových sekvencí vykazovaly nejvyšší homologii s penicilinamidásou (GenBank YP_003393654) z *Conexibacter woesei* DSM 14684 (tabulka 6, str. 36).

Dále bylo pomocí programu Blast provedeno srovnání nalezených sekvencí s PGA (GenBank AAY25991) z *Achromobacter sp.* CCM 4824^[55], PGA (GenBank AAA24324) z *Escherichia coli* ATCC 11105^[60] a metagenomickou penicilinacylasou z nekultivovatelného zástupce třídy γ -*proteobacteria* (GenBank AAS87335)^[56], u nichž byla zjištěna daleko nižší homologie se získanými sekvencemi potenciálních fragmentů PGA (tabulka 6, str. 36).

Tabulka 6: Srovnání získaných aminokyselinových sekvencí se sekvencemi PA z vybraných bakteriálních kmenů

Typ sekvence	<i>Conexibacter woesei</i>		<i>Achromobacter sp.</i>		<i>E. coli</i>		Metag. PA	
	I [%]*	P [%]**	I [%]*	P [%]**	I [%]*	P [%]**	I [%]*	P [%]**
1	44	57	28	39	24	40	23	37
2	43	55	26	38	26	41	26	38
3	44	56	24	39	26	40	23	39
4	39	52	27	42	29	44	28	41

Poznámky:

* I = Identita

** P = Pozitivita – procento identických + podobných aminokyselin (např. hydrofobních, kyselých apod.)

5. Diskuse

Metagenomická DNA izolovaná ze 4,5 m půdního horizontu byla, co se týče její následné použitelnosti v technikách molekulární biologie, a to zejména PCR, získána v relativně dostatečné čistotě, ačkoliv u neřaděných či málo řaděných DNA izolátů z nižších hloubek včetně povrchu docházelo k inhibici PCR během testovací amplifikace 16S rRNA genů nacházejících se u všech prokaryotických organismů.^[59] Tento jev může být způsoben nejen kontaminací, tedy přítomností huminových kyselin či jim podobných látek, které se váží na DNA nebo tvoří komplex s DNA polymerasou a tím blokují její nasedání, popřípadě aktivitu, ale i příliš vysokou koncentrací samotné DNA, která byla použita jako templát.^{[71][72]} Jelikož bylo možné odstranit oba výše zmíněné inhibiční vlivy na PCR amplifikaci najednou, a to vhodným naředěním templátu, nebylo blíže zkoumáno, který z nich převažuje.

Všechny kombinace degenerovaných *pga*-specifických primerů byly testovány na taxonomicky definovaných DNA templátech (templátem celková DNA sbírkového mikroorganismu) lišících se svým obsahem G+C v genomu. Jako „klasický“ templát byla zvolena totální DNA z PGA produkčního kmene *Escherichia coli* RE3 (zastoupení G+C činí u *E. coli* 52 %^[70]), zatímco jakožto templát s vysokým podílem G+C sloužila totální DNA z PGA⁺ kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 (zastoupení G+C činí u tohoto kmene 69 %^[70]). Je totiž známo, že půdní metagenomické izoláty často nesou vysoký obsah G+C^[73], což znesnadňuje samotný průběh PCR, neboť takovéto templáty kvůli své pevné sekundární struktuře odolávají denaturaci, snadněji reasociují a tvoří křížové struktury, čímž brání nasedání primerů či prodlužování nukleotidového řetězce.^[74] Tuto neblahou skutečnost lze částečně eliminovat změnou podmínek amplifikační reakce, a to např. přidáním DMSO do PCR reakční směsi, čímž dochází ke snadnějšímu rozvolňování zmíněné pevné sekundární struktury DNA^[75], avšak ne vždy tato PCR aditiva postačí.

Ukázalo se, že ne všechny kombinace primerů jsou vhodné pro následné rutinní PCR, což bylo spíše způsobeno nezajištěním optimálních podmínek PCR amplifikace (související např. s rozdílnou teplotou tání primerů) společné pro konkrétní „neúspěšný“ primerový pár než samotnou genomovou nespecifičností toho kterého degenerovaného primeru, neboť PCR produkty odpovídající teoretické délce amplifikovaného úseku u kontrolního genomického templátu z *Escherichia coli* byly získány alespoň v jedné

kombinaci primerů od každého z nich.

Vybrané kombinace *pga* primerů byly následně využity pro PCR na izolátech environmentální DNA z půdního horizontu, avšak zatímco amplifikace nejkratšího úseku potenciálních genů kódujících PGA pomocí kombinace primerů fwd360 + rev510 byla relativně úspěšná, amplifikovat delší „*pga*“ fragmenty se až na jeden případ s kombinací primerů fwd90 + rev510 u metagenomického izolátu získaného z hloubky 1 m nezdařilo. Jedním z možných vysvětlení neúspěšnosti PCR amplifikace kombinací primerů fwd90 + rev510 na templátech umožňujících kratší amplifikaci kombinací fwd360 + rev510 je, že získaný PCR produkt fwd360 + rev510 je značně heterogenní, a tudíž obsahuje nejen délkově odpovídající fragment strukturního *pga*, ale i zcela jiných genů, které se amplifikovaly sice nespecificky, ale zato ve velkém nadbytku, popř. jediné.

Ačkoli potvrzení či vyvrácení této hypotézy by podala sekvenční analýza klonovaných PCR amplikonů fwd360 + rev510, z časových i finančních důvodů nebyla prováděna, ale rovnou jsem se zaměřil na analýzu výše uvedeného jediného delšího, a tedy mnohem zajímavějšího, PCR produktu získaného pomocí kombinace primerů fwd90 + rev510 na templátu izolovaném z půdy z hloubky 1 m (zkráceně nazýván „P1200“) a následně ověřeného „polozahnížděnou“ PCR. Sekvenací osmi vybraných rekombinantních plazmidů nesoucích PCR amplikon „P1200“ bylo prokázáno, že všechny klonované fragmenty vykazovaly po překladu do aminokyselinové sekvence sekvenční homologii s penicilinacylasami (penicilinamidasy). Sekvenační výstup tedy vyvrátil možnou „kontaminaci“ nespecifickými produkty. Otázka, proč nebyla na témže templátu úspěšná amplifikace i podstatně delších fragmentů potenciálních metagenomických *pga*, když degenerovaný primer fwd90 nasedal správně, zůstává stále otevřena, avšak alespoň dvě možná vysvětlení se přímo nabízejí: 1) nebyly nalezeny takové podmínky PCR reakce umožňující pomocí degenerovaných primerů amplifikovat víc jak 2 kpb dlouhé úseky na metagenomických templátech; 2) potenciální metagenomické *pga* geny nalézající se u mikroorganismů z této půdní vrstvy jsou na svém 3' konci tak odlišné od známých variant genu, že neumožňují nasednutí specifických degenerovaných primerů za „žádných“ okolností, tj. hledaným metagenomickým proteinům chybějí na C-konci obvyklé konvenční aminokyselinové oblasti PGA. Tuho hypotézu podporuje zjištěná nízká homologie získaných sekvencí s vybranými *pga* geny použitými k návrhu degenerovaných primerů.

Srovnáním *in silico* byly získané sekvence rozříděny do čtyř typů, což potvrdilo očekávanou mikroheterogenitu PCR amplikonu způsobenou metagenomickým, tj. genomově smíšeným, templátem. Nicméně všechny typy sekvencí vykazovaly nejvyšší stupeň homologie (identita činila 39-44%), s penicilinamidaseou (GenBank YP_003393654) z kmene *Conexibacter woesei* DSM 14684, což je z lesní půdy izolovaná gram pozitivní aktinobakterie z řádu *Solirubrobacterales* vykazující velmi vysoké zastoupení G+C párů (71 %) v genomu.^[76] Jelikož dalšími v „pořadí homologií“ byly penicilinacylasy z různých zástupců rodu *Streptomyces* (řád *Actinomycetales*), lze se oprávněně domnívat, že amplifikací získané fragmenty genů s vysokým obsahem G+C by mohly rovněž patřit některému ze zástupců třídy *Actinobacteria*.

Co se týče strukturní analýzy klonované oblasti potenciální penicilinacylasy a bereme-li jako základ nejprozkoumanější PGA z *Escherichia coli* ATCC 11105^[60], můžeme s vysokou pravděpodobností tvrdit, že naklonovaná oblast by měla pokrývat sekvenci odpovídající přibližně 80% α -podjednotky z její C-koncové oblasti, celému potenciálnímu oddělovacímu peptidu a necelé třetině β -podjednotky z jejího N-konce. Jelikož se v těchto oblastech nacházejí aminokyselinové zbytky důležité pro katalytické vlastnosti známých a funkčně ověřených PGA^[46], lze předpokládat, že by získané a sekvencně ověřené amplikony mohly již teď sloužit jako možný zdroj genetického materiálu pro „gene shuffling“ s funkčními strukturními geny *pga* a získat tak hybridní geny s novými, a snad i prakticky využitelnými, vlastnostmi.

Dalším směrem, kterým by se mohly a měly ubírat pokračující experimenty, je získat sekvence celých strukturních metagenomických genů, tj. od iniciačního až po terminační STOP kodón, a následně, pokud se nebudou od sebe příliš lišit, alespoň jeden z nich naklonovat v expresním vektoru a provést s ním expresní studie včetně charakteristik získaného enzymu. Jelikož při klonování zatím neznámých 5'- a 3'-koncových oblastí našich potenciálních strukturních penicilinacylasových genů získáme i sekvence jejich okolních oblastí, lze výše navržené experimenty rozšířit např. i o analýzu jejich promotorových oblastí (jen *in silico* popřípadě i *in vivo*).

6. Souhrn

- Byla shrnuta známá fakta o environmentální DNA a metagenomickém přístupu k hledání nových zajímavých genů. Dále byly rozebrány poznatky o penicilin-G-acylase.
- Byla izolována environmentální DNA z půdního horizontu a ověřena její použitelnost pro techniky molekulární biologie.
- Pomocí degenerovaných primerů navržených na základě konvenčních oblastí osmi známých sekvencí *pga* genů byl užitím PCR v environmentální DNA nalezen přibližně 1,2 kpb dlouhý fragment potenciálního *pga* genu, který byl klonován a sekvenován.
- Sekvenční analýzou byl zjištěn nejvyšší stupeň homologie získaného fragmentu genu s penicilinamidaseou z kmene *Conexibacter woesei*, patřícím do třídy *Actinobacteria*.
- Získané fragmenty potenciálních *pga* genů o známých sekvencích lze využít k tvorbě hybridních *pga* metodou „gene shuffling“, případně se pokusit o získání kompletní nukleotidové sekvence daných *pga* genů a jejich následnou expresi ve vhodných expresních systémech.

7. Seznam použité literatury

1. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B: Industrial biocatalysis today and tomorrow; *Nature* 409 (6817), 258-268 (2001)
2. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ: Prokaryotes: The unseen majority; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (12), 6578-6583 (1998)
3. Ferrer M, Beloqui A, Timmis KN, Golyshin PN: Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16 (1-2), 109-123 (2009)
4. Grant S, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, Ma YH, Ventosa A, Heaphy S: Identification of eukaryotic open reading frames in metagenomic cDNA libraries made from environmental samples; *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1), 135-143 (2006)
5. Freitas DB , Reis MP , Freitas LM , Assis PS , Chartone-Souza E, Nascimento AMA: Molecular bacterial diversity and distribution in waste from a steel plant; *Can. J. Microbiol.* 54 (12), 996-1005 (2008)
6. Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J: Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil; *ISME J.* 3 (2), 243-251 (2009)
7. Wang FC, Li F, Chen GJ, Liu WF: Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches; *Microbiol. Res.* 164 (6), 650-657 (2008)
8. Simon C, Wiezer A, Strittmatter AW, Daniel R: Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential Revealed in a Glacier Ice Metagenome; *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23), 7519-7526 (2009)
9. Purohit MK, Singh SP: Assessment of various methods for extraction of metagenomic DNA from saline habitats of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity; *Lett. Appl. Microbiol.* 49 (3), 338-344 (2009)
10. Roh C, Villatte F, Kim BG, Schmid RD: Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 134 (2), 97-112 (2006)
11. Rajendhran J, Gunasekaran P: Strategies for accessing soil metagenome for desired applications; *Biotechnol. Adv.* 26 (6), 576-590 (2008)
12. Cullen DW, Hirsch PR: Simple and rapid method for direct extraction of microbial

- DNA from soil for PCR; *Soil Biol. Biochem.* 30 (8-9), 983-993 (1998)
13. Tebbe CC, Vahjen W: Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and a Yeast; *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (8), 2657-2665 (1993)
 14. Miller DN: Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments; *J. Microbiol. Methods* 44 (1), 49-58 (2001)
 15. Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M: Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples; *Appl. Soil Ecol.* 18 (1), 47-60 (2001)
 16. Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, Roden EE, Churchill PF: A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples; *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12), 4993-4995 (1997)
 17. Young CC, Burghoff RL, Keim LG, Minakberner V, Lute JR, Hinton SM: Polyvinylpyrrolidone-Agarose Gel Electrophoresis Purification of Polymerase Chain Reaction-Amplifiable DNA from Soils; *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (6), 1972-1974 (1993)
 18. Pontes DS, Lima-Bittencourt CI, Chartone-Souza E, Nascimento AMA: Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (7), 463-473 (2007)
 19. Zhang L, Xu ZH: Assessing bacterial diversity in soil; *J. Soils Sediments* 8 (6), 379-388 (2008)
 20. Ferrer M, Beloqui A, Timmis KN, Golyshin PN: Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16 (1-2), 109-123 (2009)
 21. LeClerc GR, Buchan A, Hollibaugh JT: Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions; *Appl. Environ. Microbiol.* (70), 6977-6983 (2004)
 22. Song JS, Jeon JH, Lee JH, Jeong SH, Jeong BC, Kim SJ, Lee JH, Lee SH: Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea); *J. Microbiol.* (43), 172-178 (2005)
 23. Kotrba P, Uhlík O, Ječná K, Máčková M, Máček T: Metagenom - bohatý zdroj nových biomolekul; *Chem. Listy* 102 (11), 960-968 (2008)
 24. Singh J, Behal A, Singla N, Joshi A, Bitbian N, Singh S, Bali V, Betra N:

Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances; *Biotechnol. J.* 4 (4), 480-494 (2009)

25. Yun J, Ryu S: Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as away to improve it; *Microb. Cell Fact.* 4 (1), (2005)

26. Williamson LL, Borlee BR, Schloss PD, Guan CH, Allen HK, Handelsman J: Intracellular Screen To Identify Metagenomic Clones That Induce or Inhibit a Quorum-Sensing Biosensor; *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10), 6335–6344 (2005)

27. Wang FC, Li F, Chen GJ, Liu WF: Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches; *Microbiol. Res.* 164 (6), 650-657 (2009)

28. Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J: Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil; *ISME J.* 3 (2), 243-251 (2009)

29. Li G, Wang K, Liu YH: Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome; *Microb. Cell Fact.* 7, 38 (2008)

30. Chen IC, Lin WD, Hsu SK: Isolation and Characterization of a Novel Lysine Racemase from a Soil Metagenomic Library; *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (15), 5161-5166 (2009)

31. Valle F, Balbás P, Merino E, Bolivar F: The role of penicillin amidases in nature and in industry; *Trends Biochem. Sci.* 16 (1), 36-40 (1991)

32. Baker WL: Co-existence of β -lactamase and penicillin acylase in bacteria; detection and quantitative determination of enzyme activities; *J. Appl. Bacteriol.* 73 (1), 14–22 (1992)

33. Merino E, Balbás P, Recillas F, Becerril B, Valle F, Bolivar, F: Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (*pac*) gene; *Mol. Microbiol.* 6 (15), 2175-2182 (1992)

34. Elander RP: Industrial production of beta-lactam antibiotics; *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5-6), 385-392 (2003)

35. Wegman MA, Janssen MHA, van Rantwijk F, Sheldon RA: Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics; *Adv. Synth. Catal.* 343 (6-7), 559-576 (2001)

36. Cabrera Z, Lopez-Gallego F, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Montes T, Grazu V, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R: Asymmetric hydrolysis of dimethyl phenylmalonate

by immobilized penicillin G acylase from *E. coli*; *Enzyme Microb. Technol.* 40 (5), 997-1000 (2007)

37. Fuganti C, Grasselli P: Immobilized penicillinacylase: Application to the synthesis of the dipeptide aspartame; *Tetrahedron Lett.* 27 (27), 3191-3194 (1986)

38. Shewale JG, Sudhakaran VK: Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid; *Enzyme Microb. Technol.* 20 (6), 402-410 (1997)

39. Rajendhran J, Gunasekaran P: Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases; *J. Biosci. Bioeng.* 97 (1), 1-13 (2004)

40. Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Williams C, Wybenga G, Janssen DB, Dijkstra BW: *Acetobacter turbidans* alpha-amino acid ester hydrolase - How a single mutation improves an antibiotic-producing enzyme; *J. Biol. Chem.* 281 (9), 5804-5810 (2006)

41. Blum JK, Deaguero AL, Perez CV, Bommarius AS: Ampicillin Synthesis Using a Two-Enzyme Cascade with Both alpha-Amino Ester Hydrolase and Penicillin G Acylase; *ChemCatChem* 2 (8), 987-991 (2010)

42. Oinonen C, Rouvinen J: Structural comparison of Ntn-hydrolases; *Protein Sci.* 9 (12), 2329-2337 (2000)

43. McVey CE, Walsh MA, Dodson GG, Wilson KS, Brannigan JA: Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism; *J. Mol. Biol.* 313 (1), 139-150 (2001)

44. Duggleby HJ, Tolley SP, Hill CP, Dodson EJ, Dodson G, Moody PC: Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre; *Nature* 373 (6511), 264-268 (1995)

45. Zhiryakova D, Ivanov I, Ilieva S, Guncheva M, Galunsky B, Stambolieva N: Do N-terminal nucleophile hydrolases indeed have a single amino acid catalytic center?; *FEBS J.* 276 (9), 2589-2598 (2009)

46. McVey CE, Walsh MA, Dodson GG, Wilson KS, Brannigan JA: Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism; *J. Mol. Biol.* 313 (1), 139-150 (2001)

47. Hewitt L, Kasche V, Lummer K, Lewis RJ, Murshudov GN, Verma CS, Dodson GG, Wilson KS: Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft; *J. Mol. Biol.* 302 (4), 887-898 (2000)

48. Kasche V, Lummer K, Nurk A, Piotraschke E, Rieks A, Stoeva S, Voelter W: Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*; *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1433 (1-2), 76-86 (1999)
49. Kasche V: Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products; *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1), 4-16 (1986)
50. Arroyo MI, de la Mata C, Acebal C, Castellón MP: Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 (5), 507-514 (2002)
51. Wilson L, Illanes A, Romero O, Vergara J, Mateo C: Carrier-bound and carrier-free penicillin acylase biocatalysts for the thermodynamically controlled synthesis of beta-lactam compounds in organic medium; *Enzyme Microb. Technol.* 43 (6), 442-447 (2008)
52. Giordano RC, Ribeiro MPA, Giordano RLC: Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillinG acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization; *Biotechnol. Adv.* 24 (1), 27– 41 (2006)
53. Chandel AK, Rao LV, Narasu ML, Singh OV: The realm of penicillin G acylase in beta-lactam antibiotics; *Enzyme Microb. Technol.* 42 (3), 199-207 (2008)
54. Jager SAW, Jekel PA, Janssen DB: Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of beta-lactam antibiotics; *Enzyme Microb. Technol.* 40 (5), 1335-1344 (2007)
55. Plháčková K, Bečka S, Škrob F, Kyslík P: Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp with beta-lactam antibiotic acylase activity; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (5-6), 507-516 (2003)
56. Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB: A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties; *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2-3), 182-190 (2005)
57. Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D: Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs Into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (12), 4645-4649 (1990)
58. Sobotková, L., Plháčková, K., Kyslík, P., Vojtíšek, V.: Recombinant plasmids bearing the gene encoding penicillin G acylase and strains of *Escherichia coli* containing these plasmids. CZ patent 278516 (1993)

59. Lane DJ: 16S/23S rRNA sequencing, v knize *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (E. Stackebrandt and M. Goodfellow), John Wiley & Sons, New York, str. 115–148 (1991)
60. Oh SJ, Kim YC, Park YW, Min SY, Kim IS, Kang HS: Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*; *Gene* 56 (1), 87-97 (1987)
61. Cai G, Zhu S, Yang S, Zhao G, Jiang W: Cloning, overexpression, and characterization of a novel thermostable penicillin G acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: probing the molecular basis for its high thermostability; *Appl Environ Microbiol* 70 (5), 2764-2770 (2004)
62. Kasche V, Galunsky B, Nurk A, Piotraschke E, Rieks A: The dependency of the stereoselectivity of penicillin amidases enzymes with R-specific S-1- and S-specific S'(1)-subsites on temperature and primary structure; *Biotechnol Lett* 18 (4), 455-460 (1996)
63. Konstantinović M, Marjanović N, Ljubijankić G, Glisin V: The penicillin amidase of *Arthrobacter viscosus* (ATCC 15294); *Gene* 143 (1), 79-83 (1994)
64. Barbero JL, Buesa JM, González de Buitrago G, Méndez E, Péz-Aranda A, García JL: Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene from *Kluyvera citrophila*; *Gene* 49 (1), 69-80 (1986)
65. Ljubijankić G, Konstantinović M, Glisin V.: The primary structure of *Providencia rettgeri* penicillin G amidase gene and its relationship to other gram negative amidases; *DNA Seq.* 3 (3), 195-200 (1992)
66. Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB: Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods; *FEMS Microbiol. Ecol.* 44 (2), 153-163 (2003)
67. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acids Res.* 7 (6), 1513-1523 (1979)
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (12), 5463-5467 (1977)
69. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)
70. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T: Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000; *Nucleic Acids Res.* 28 (1), 292-292 (2000)

71. Watson RJ, Blackwell B: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction; *Can. J. Microbiol.* 46 (7), 633-642 (2000)
72. Baar C, d'Abbadie M, Vaisman A, Arana ME, Hofreiter M, Woodgate R, Kunkel TA, Holliger P.: Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors; *Nucleic Acids Res.* 39 (8), e51 (2011)
73. Foerstner KU, von Mering C, Hooper SD, Bork P: Environments shape the nucleotide composition of genomes; *EMBO Rep.* 6 (12), 1208-1213 (2005)
74. Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Gruel Y: Improved PCR method for amplification of GC-Rich DNA sequences; *Mol. Biotechnol.* 31 (1), 81-84 (2005)
75. Chakrabarti R, Schutt CE: The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones; *Gene* 274 (1-2), 293–298 (2001)
76. Monciardini P, Cavaletti L, Schumann P, Rohde M, Donadio S: *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class *Actinobacteria*; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2), 569-576 (2003)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka