

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Studijní program: Biologie (N1501)
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Martin Kracík

Exprese genů pro konverzi amidů a nitrilů v
Rhodococcus erythropolis

Expression of genes for the conversion of nitriles and amides in
Rhodococcus erythropolis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Miroslav Pátek, CSc.
Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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, 26. srpna 2011

Podpis

Práce byla vypracována v Laboratoři molekulární genetiky bakterií, Sektoru buněčné a molekulární mikrobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze v období září 2009 - květen 2011.

Děkuji svému školiteli Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Děkuji zaměstnancům Laboratoře molekulární genetiky bakterií Daně Lukavské, Adamu Pavlíkovi, MSc., Ing. Juraji Szókölovi, Mgr. Jiřímu Holátkovi Ph.D., Ing. Lence Rucké Ph.D., Mgr. Radoslavu Šilarovi, Ing. Monice Knoppové, Ph.D. a RNDr. Janu Nešverovi, CSc. za ochotu, pomoc a tvorbu příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a všem, co mě podporovali při psaní této práce.

ABSTRAKT

Kmen *Rhodococcus erythropolis* A4 je zdrojem enzymů nitrilhydratázy a amidázy katalyzujících konverze nitrilů a amidů. Tyto enzymy jsou používány při průmyslových biotransformacích a bioremediacích. Vzhledem k tomu, že genové manipulace vedoucí ke zvýšení produkce těchto enzymů bylo v kmeni A4 obtížné provést, byly v této práci identifikovány a analyzovány příslušné geny (*ami* a *nha1+nha2*) v příbuzném kmeni *R. erythropolis* CCM2595, v kterém lze manipulace s plazmidy i v chromozomu rutinně provádět. Geny *ami* a *nha1+nha2* z kmene *R. erythropolis* CCM2595 byly izolovány a společně se sousedícími oblastmi (celkem 5,5 kb) sekvenovány. Byla zjištěna organizace těchto genů a předpokládaných regulačních genů v kmeni CCM2595 a zkoumán způsob regulace exprese těchto genů. Pro analýzu transkripce genů pro amidázu a nitrilhydratázu z obou kmenů *R. erythropolis* byl použit *promoter-probe* vektor pEPR1 replikující se v *Escherichia coli* a *R. erythropolis*, v němž byly zkonstruovány transkripční fúze promotorů *Pami* z kmene A4 i CCM2595 a reportérového genu *gfp*. Aktivita promotorů *Pami* byla měřena prostřednictvím fluorescence produktu genu *gfp*, zeleného fluoreskujícího proteinu. Měření fluorescence buněk nesoucích vektor pEPR1 s promotory genů *ami* z obou zkoumaných kmenů prokázalo, že jejich aktivita je převážně konstitutivní a jen z malé části indukována nitrily a amidy.

Rhodococcus, amidáza, nitrilhydratáza, promotor, *promoter-probe* vektor, regulace, Gfp

ABSTRACT

The strain Rhodococcus erythropolis A4 is a source of enzymes nitrilhydratase and amidase, that catalyse conversion of nitriles and amides. These enzymes are used in industrial biotransformation and bioremediation. Since it was difficult to carry out genetic manipulations aimed at increasing the production of these enzymes in the strain A4, the corresponding genes (ami and nha1 + nha2) of a related strain R. erythropolis CCM2595, in which both plasmid and chromosome manipulations can be routinely performed, were identified and analyzed in this diploma theses. The ami and nha1 + nha2 genes from the strain R. erythropolis CCM2595 were isolated and sequenced together with the flanking regions (5.5 kb in total). The organization of these genes and the expected regulatory genes was described in the strain CCM2595 and mechanisms of regulation of expression of these genes were studied. For the analysis of transcription of amidase and nitrilhydratase genes from both strains of R. erythropolis, the promoter-probe vector pEPRI replicating in Escherichia coli and R. erythropolis was used. Transcriptional fusion of Pami promoters of the strains A4 and CCM2595 and the reporter gfp gene were constructed. The activity of the Pami promoter was measured by means of fluorescence of gfp gene product (green fluorescent protein). Measurements of fluorescence of cells that carried the vector pEPRI with the ami promoters from both examined strains showed that their activities are mostly constitutive and only to a limited extent induced by nitriles and amides.

Rhodococcus, amidase, nitrile hydratase, promoter, promoter-probe vector, regulation, Gfp

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
ACA	acetamid
ACN	acetonitril
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
C	cytosin
Cys	cystein
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonukleotidfosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
G	guanin
Gfp	zelený fluoreskující protein (<i>green fluorescent protein</i>)
Glu	kyselina glutamová
Lys	lysin
OD	optická densita
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	kyselina ribonukleová
SDS	dodecylsulfát sodný
T	thymin

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Taxonomie rodu <i>Rhodococcus</i>	9
2.2. Charakteristika rodu <i>Rhodococcus</i>	10
2.3. Genetika rodu <i>Rhodococcus</i>	13
2.4. Využití rhodokoků	17
2.5. Nitrily a amidy	18
3. Materiál	22
3.1. Použité chemikálie a materiál	22
3.2. Komerční soupravy	23
3.3. Přístroje	23
3.4. Použité bakteriální kmeny	24
3.5. Kultivační media	24
3.6. Pufry a roztoky	26
3.7. Plazmidy	27
3.8. Oligonukleotidy pro PCR a sekvenování	28
3.9. Použitý software	29
4. Metody	30
4.1. Kultivace <i>E. coli</i> a <i>R. erythropolis</i>	30
4.2. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	30
4.3. Izolace plazmidové DNA z <i>R. erythropolis</i>	31
4.4. Transformace <i>E. coli</i>	31
4.5. Transformace <i>R. erythropolis</i> plazmidovou DNA	32
4.6. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	33
4.7. Extrakce fenolem	33
4.8. Precipitace DNA ethanolem	33
4.9. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu	33
4.10. Izolace DNA z gelu	34
4.11. Ligace	34
4.12. Identifikace klonů <i>E. coli</i> a <i>R. erythropolis</i> nesoucích plazmidy zkonstruované na základě vektoru pEPR1	35
4.13. Sekvenování DNA	35
4.14. PCR	35
4.15. Stanovení aktivity promotorů fluorimetricky	36
5. Cíle práce	37
6. Výsledky	38
6.1. Nukleotidová sekvence klastru ami-nha <i>R. erythropolis</i> CCM2595	38
6.2. Porovnání sekvencí klastru ami-nha u kmenů <i>R. erythropolis</i> CCM2595 a <i>R. erythropolis</i> A4	42
6.3. Měření aktivity promotorů	44
7. Diskuze	51
8. Souhrn	54
9. Seznam literatury	55

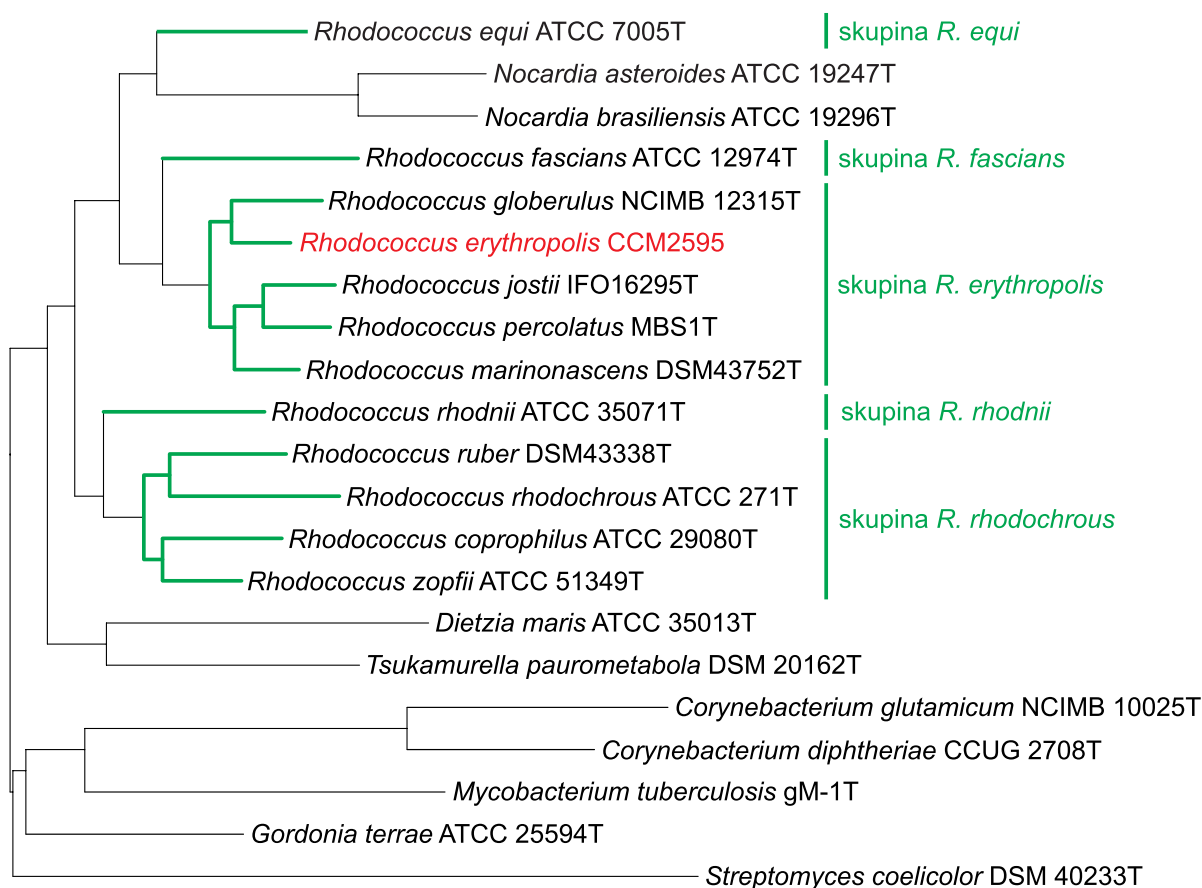
1. Úvod

Moderní společnost produkuje velké množství škodlivých či toxických chemických látek, které jsou přímo či nepřímo uvolňovány do životního prostředí. Mezi tyto látky patří nitrily, které jsou používány v chemickém a zemědělském průmyslu. Nitrily lze připravit pomocí řady různých syntetických reakcí a mohou sloužit jako výchozí surovina pro výrobu dalších organických látek (amidy, aminy, kyseliny). Tato univerzálnost je příčinou oblíbenosti nitrilů, která ale vede k nadměrnému uvolňování nitrilů do prostředí. Od osmdesátých let minulého století je vyvíjen tlak na odstraňování toxických látek z ekosystému. Jedním ze způsobů dekontaminace je biologické odbourávání toxických látek pomocí mikroorganismů neboli bioremediace. Za tímto účelem jsou vyhledávány bakteriální kmeny schopné přežít v toxickém prostředí a následně odbourávat kontaminující látky. Velký potenciál v degradaci nitrilů vykazují kmeny rodu *Rhodococcus*. Tento rod nese řadu genů pro utilizaci a degradaci nitrilů. Jedná se například o gen pro nitrilázu (*nitA*), která transformuje nitrily na karboxylové kyseliny či gen pro nitrilhydratázu (*nha*), který je součástí uceleného genového klastru obsahujícího geny pro amidázu (*ami*) a aldoximdehydrogenázu (*oxd*). Aldoximdehydrogenáza, nitrilhydratáza a amidáza katalyzují kaskádu degradačních reakcí umožňující transformaci aldoximů na nitrily, amidy až karboxylové kyseliny. Regulaci těchto dějů zajišťují geny *nhr1-nhr4*. Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu genů kódujících amidázu (*ami*) a nitrilhydratázu (*nha*) u kmene *Rhodococcus erythropolis* CCM2595. Bude určena jejich organizace v chromozomu, stanovena jejich nukleotidová sekvence a zjištěn způsob regulace jejich exprese. Na základě vektoru pEPR1 bude připraven konstrukt, pomocí kterého bude studována aktivita promotoru genu *ami* (*Pami*) v minimálním a komplexním médiu.

2. Literární přehled

2.1. Taxonomie rodu *Rhodococcus*

Bakterie rodu *Rhodococcus* lze izolovat z mnoha různých přírodních prostředí jakými jsou půda, hlubkové vrty, povrchové vody, mořské sedimenty a nebo zvířecí trus či zaživací trakt hmyzu (GOODFELLOW 1989). Rod *Rhodococcus* byl poprvé popsán v roce 1891, kdy takto byly pojmenovány dva druhy červeně pigmentovaných bakterií. Ke větším změnám v klasifikaci rhodokoků došlo v letech 1974-1977, kdy byly přidány bakterie, které nebylo možné zařadit do příbuzných rodů *Nocardia*, *Corynebacterium* a *Mycobacterium*. Teprve nedávno došlo k rozsáhlému přeorganizování taxonomie celého rodu. Mnoho druhů bylo z rodu *Rhodococcus* vyřazeno, jiné k němu byly přesunuty z příbuzných rodů a další zástupci byli nově objeveni a popsáni. Tyto razantní úpravy byly umožněny díky moderním taxonomickým metodám. Klasické metody zařazení druhů na základě fyziologické podobnosti a chemického složení buněčné stěny byly doplněny metodami genetickými, mezi které patří určování míry příbuznosti na základě podobnosti 16S RNA nebo stanovení příbuznosti pomocí hybridizace DNA-DNA. Podrobné zkoumání 16S RNA vedlo také k dalšímu dělení rhodokoků na pět odlišných skupin jejichž typickými představiteli byly určeny druhy *R. equi*, *R. fascians*, *R. erythropolis*, *R. rhodnii*, a *R. rhodochrous* (RAINEY *et al.* 1995). V současné době je popsáno více než čtyřicet druhů rhodokoků. Mezi nejznámější se řadí *R. equi*, *R. fascians*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. opacus*, *R. percolatus*, *R. rhodnii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* a *R. zopfii*. Typovým představitelem celého rodu je *R. rhodochrous*. Rod *Rhodococcus* byl zařazen do skupiny označované jako CMN – nokardioformní aktinomycety, ke které patří rody *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordona* a *Tsukamurella* (RUIIMY *et al.* 1994). Společnou charakteristikou této skupiny je přítomnost mykolových kyselin v buněčné stěně.

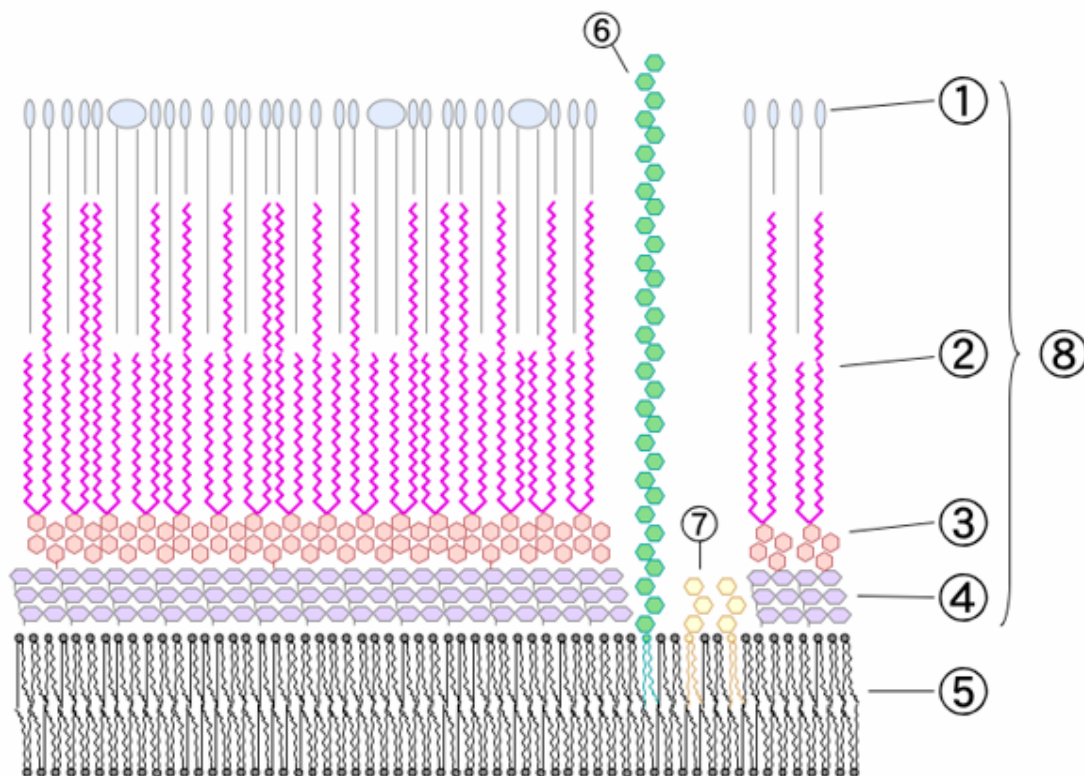


Obr. 1: Fylogenetická příbuznost vybraných kmenů rhodokoků a dalších nokardioformních aktinomycet podle srovnání 16S rDNA (VESELÝ 2006)

2.2. Charakteristika rodu *Rhodococcus*

Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou grampozitivní, nesporulující, aerobní, nepohyblivé a chemoorganotrofní organizmy (GOODFELLOW 1989). Vyznačují se myceliálním růstem, v jehož pozdní fázi dochází k fragmentaci mycelia na tyčinkovité či kokovité útvary (nokardioformita) (LECHEVALIER 1989). Rostou dobře na standardních laboratorních půdách. Některé kmeny ke svému růstu potřebují přidavek thiaminu. Buněčná stěna rhodokoků je složena ze tří vrstev, vnitřní peptydoglykanové, střední arabinogalaktanové a vnější lipidové. Svým složením patří k chemotypu IV. Peptydoglykan je složený z N-acetylglukosaminu a N-glykolylmuramové kyseliny, D-alaninu, L-alaninu, D-glutamátu a kyseliny meso-diaminopimelové. Běžné nasycené a nenasycené mastné kyseliny doprovází kyselina tuberkulostearová. Cukerné složky stěny tvoří D-arabinoza a D-galaktóza. Fosfolipidy jsou zastoupeny kardiolipinem, fosfatydeethanolaminem, fosfatidylinositolem a fosfatidylinositol manosidem (FINNERTY 1992). Vnější vrstva je ze 40 % tvořena mykolovými kyselinami. U ostatních mykolat tato hodnota dosahuje až 60 %. Hlavními typy menachinonu v buněčné stěně rhodokoků jsou dihydrogenované menachinony tvořené osmi

isoprenovými jednotkami, které neobsahují cyklické motivy charakteristické pro rod *Nocardia* (KLATTE *et al.* 1994). Dalším významným znakem rhodokoků je vysoký obsah G-C párů v genomové DNA (67-73 %) .



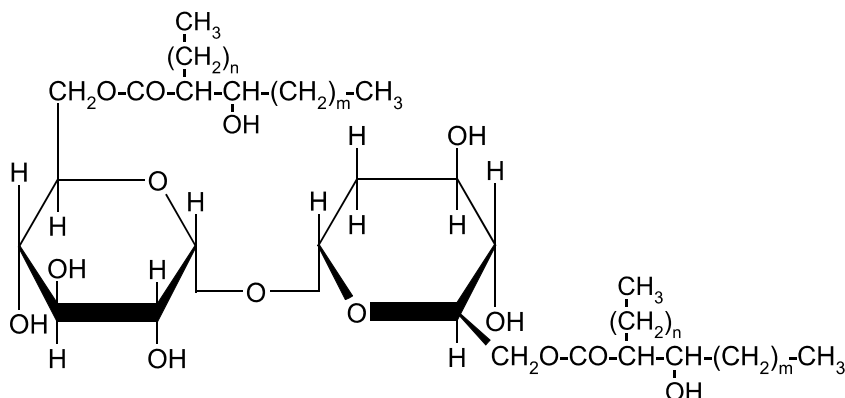
Obr. 2: Struktura buněčné stěny rhodokoků

1 - glykolipidy, 2 - mykolové kyseliny, 3 - arabinogalaktan, 4 - peptidoglykan, 5 - lipidová dvouvrstva, 6 - lipoarabinomanan, 7 - fosfatidylinositol manosid, 8 - buněčná stěna

2.2.1. Mykolové kyseliny

Stodola a jeho kolegové izolovali mykolové kyseliny poprvé v roce 1938 z *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o dlouhé alfa-alkyl-beta-hydroxy mastné kyseliny, tvořící hlavní složku buněčné stěny mykolat. Jsou tvořeny kratším beta-hydroxy řetězcem s velmi dlouhým alfa-alkylovým postraním řetězcem. Počet atomů uhlíku v mykolových kyselinách je jedním z taxonomických hledisek pro řazení mykolat. Rod *Mycobacterium* obsahuje 60-80 atomů uhlíku, *Corynebacterium* 32-48, *Nocardia* 46-60, *Rhodococcus* 34-52, *Dietzia* 34-38 a *Tsukamurella* 64-72 (ASSELINEAU a LEDERER 1950). *M. tuberculosis* produkuje tři typy mykolových kyselin. Alfa-mykolové kyseliny jsou převažujícím typem, dosahují 70 % zastoupení a obsahují několik cyklopropanových kruhů. Metoxy- a keto-kyseliny nesou metoxy a keto funkční skupiny a jejich zastoupení v buňce dosahuje 10-15 %. Obdobné dělení lze nalézt také u mykolových kyselin bakterií rodu *Rhodococcus*. Přesněji je

založeno na množství nenasycených vazeb v postranním řetězci. Rhodokoky tvoří dva typy mykolových kyselin. První má mezi 28-46 atomů uhlíku a nenesou žádnou nebo jednu nenasycenou vazbu. Druhý typ kyselin má 34-54 atomů uhlíku a 0-4 nenasycené vazby (SUTCLIFFE 1998). Mykolové kyseliny v buněčné stěně dávají buňce charakteristické vlastnosti. Zvyšují odolnost buňky proti toxickým látkám, zvyšují rezistenci k antibiotikům, brání dehydrataci buňky a patogenním druhům (*M. tuberculosis*) umožňují skrývat se před imunitním systémem hostitelů (přežívání uvnitř makrofágů).



Obr. 3: Chemická struktura mykolových kyselin (GURTLER *et al.* 2004)

2.2.2. Patogenita rodu *Rhodococcus*

Vlivem zdokonalování diagnostických metod pro identifikaci gram pozitivních bakterií se v poslední dekádě prudce zvýšil počet výskytu rhodokokových infekcí u lidí. Dříve byly infekční léze *R. equi* považovány za nepatogenní, avšak v dnešní době je popsáno mnoho případů, kdy infekce probíhala jak u imunokompromitovaných osob, tak u osob s nenarušeným imunitním systémem. Rhodokokové infekce lze nejčastěji pozorovat u pacientů nakažených virem HIV s propuknutým syndromem AIDS (SCOTT *et al.* 1995). Takovéto infekce se nejčastěji projevují jako zápal plic, či místní abscesy. Mohou se však rozšířit na další orgány a vzniká tak zánět pobřišnice, zánět kostní dřeně či zánět mozkových blan. Takto komplikované případy jsou velice závažné a z 55 % končí smrtí pacienta (ABOUT *et al.* 1996). Infekce neimunokompromitovaných osob není tak častá, avšak i zde je několik popsanych případů. Nejčastěji se jedná o infekční ložiska vzniklá jako následek nehod s hlubokým poraněním. Léčbu rhodokokových onemocnění komplikuje jejich značná rezistence k antibiotikům a schopnost skrýt se před imunitním systémem. Proto je nutné aplikovat co nejvhodnější kombinaci antibiotik po dostatečně dlouhou dobu tak, aby bylo zabráněno reinfekci ze skrytých ložisek (MASCELLIANO *et al.* 1994).

R. equi je dlouhodobě považován za významného patogena zvířat. Způsobuje zánět průdušek, zánět střev, potraty a další onemocnění dospělých koní, hříbat, ale i jiných savců (PRESCOTT 1991). Vyskytuje se v půdě a zažívacím traktu býložravců, jejichž trus je ideálním prostředím pro jeho pomnožení. Příčinou onemocnění hříbat bývá nejčastěji fekálně znečištěná potrava. Velkým problémem je chronická povaha infekce, kdy je hříbě vystaveno patogennímu organismu již týdny předtím než se infekce projeví a je diagnostikována. Antibiotická léčba v této fázi onemocnění není efektivní a proto je snaha o vývoj funkční vakcíny. Částečného úspěchu bylo dosaženo s vakcínou připravovanou z celých buněk rhodokoků (FINNERTY 1992). Virulence *R. equi* je ovlivněna přítomností kruhového plazmidu pOTS (85 kb), který usnadňuje jeho přežívání v hostitelském organismu (PRESCOTT 1991). Patogenita ovšem není závislá pouze na plazmidu. Byly popsány případy, kdy bezplazmidové rhodokoky byly celkově méně virulentní, avšak způsobovaly infekční léze. Tento efekt je připisován buněčné stěně rhodokoků, která má pravděpodobně vlastní patologické účinky (PRESCOTT 1991).

R. fascians je rostlinný patogen způsobující růstové poruchy jak u dvouděložných, tak u jednoděložných rostlin. Žije na jejich povrchu, přímo na nich neparazituje, ale produkuje cytokininy, které rostlinu ovlivňují. Nejčastěji napadá rostliny hrachu a tabáku, které ztrácí apikální dominanci a dochází u nich k přerůstání postraních výhonů a nadstandardnímu větvení (CRESPI *et al.* 1992). Virulence *R. fascians* je značně variabilní. Tato variabilita je připisována plazmidům, které rhodokok nese. U *R. fascians* byly objeveny až tři typy těchto plazmidů v jedné bakteriální buňce (LAWSON *et al.* 1982).

2.3. Genetika rodu *Rhodococcus*

Ačkoliv důležité informace o metabolických a virulentních vlastnostech bakterií rodu *Rhodococcus* byly známy již řadu let, základní poznání jejich genetické podstaty bylo nedostatečné. Tento fakt byl způsoben řadou barrier, které zpomalovaly zkoumání a studování jejich genomu. Jednou z hlavních příčin byl malý tlak, vyvíjený na nutnost studia pouze jednoho kmene rhodokoků. Místo toho byla zkoumána řada kmenů s nejrůznějšími vlastnostmi a variacemi genomu. Přidáme-li fakt, že množství kmenů bylo ke skupině rhodokoků přiřazeno chybně, nelze se divit, že selekce reprezentativního kmene byla velice obtížná. Dalším problémem při studiu genomu rhodokoků byla stavba jejich buněčné stěny, jejíž odolnost velice znesnadňuje izolaci genomové DNA. Závažnost této překážky byla ještě zvýšena pleomorfizmem rhodokoků - kmeny rostoucí v exponenciální fázi vytvářejí

multijaderná filamenta, která se při přechodu do stacionární fáze rozpadají na krátké tyčinky či koky. Multijadernost během exponenciální fáze růstu znesnadňuje izolaci mutant a tedy brzdí lepší poznání genomu rodu *Rhodococcus* (LARKIN *et al.* 1998).

Navzdory počátečním komplikacím, došlo v poslední době ve studiu genomu rhodokoků k pokroku. Podařilo se osekvenovat kompletní genom několika kmenů: *R. aethorovorans* I24 (7 Mb), *R. erythropolis* PR4 (7 Mb), *R. jostii* RHA1 (9,7 Mb), *R. opacus* B4 (9,7 Mb) a *R. equi* 103S (5 Mb). Genom *R. jostii* RHA1 patří mezi největší bakteriální genomy vůbec. Průměrná velikost genomu rhodokoků zjištěná pomocí metod pulzní gelové elektroforézy se pohybuje kolem hodnot 5,6-8,0 Mb. Variabilita ve velikosti genomu je dána obecnou různorodostí rodu, ale také přítomností velkých plazmidů, které rhodokoky obsahují. Zmíněný kmen *R. jostii* RHA1 obsahuje tři velké lineární plazmidy: pRHL1 (1122 kb), pRHL2 (444 kb) a pRHL3 (332 kb). Samotný chromozom má velikost 7,8 Mb. U některých kmenů rhodokoků (*R. fasciancs* - 5,6 Mb) se předpokládá, že lineární je také jejich chromozom (stejně jako chromozom streptomycet). Tyto teorie však nebyly zatím potvrzeny (PISABARRO *et al.* 1998). Poměrně rozsáhle genomy rhodokoků naznačují vysoký stupeň genové redundance. Rhodokoky syntetizují velké množství enzymů, které jsou funkčními homology. Předpokládá se, že právě tato vlastnost napomáhá rhodokokům přežít a adaptovat se na nejrůznějších typech substrátů jakými jsou například: polychlorované bifenyly (PCB), aromatické sloučeniny, uhlovodíky, nitrily či steroidy (LARKIN *et al.* 2005).

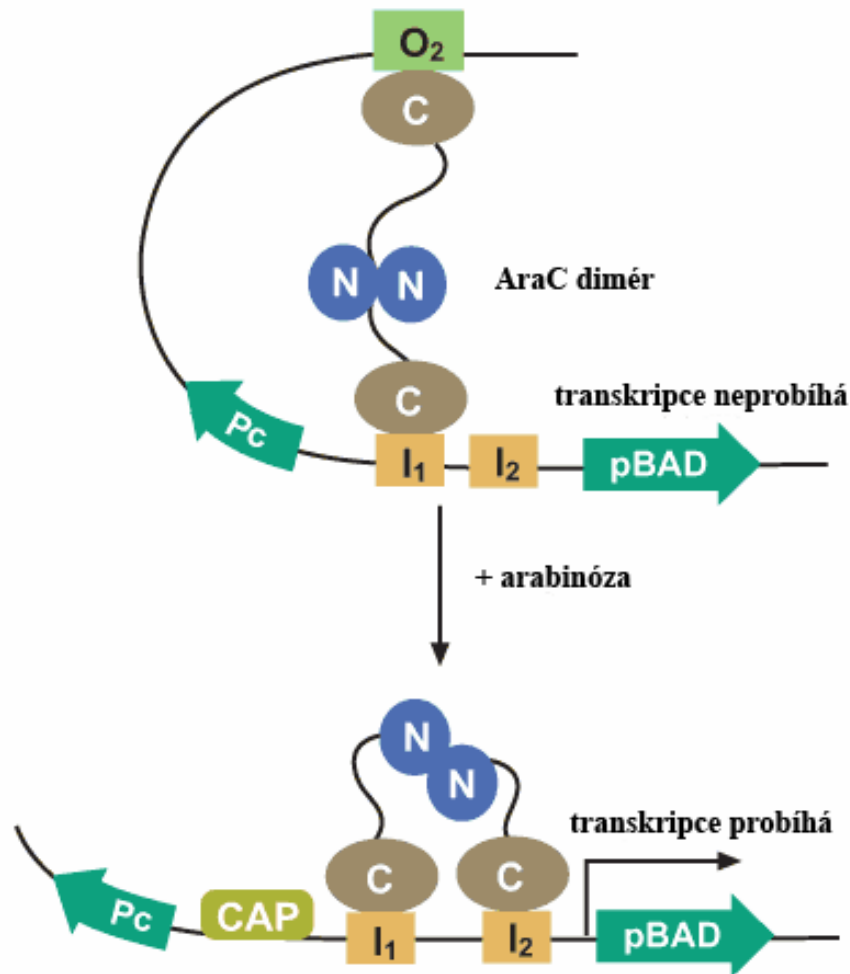
2.3.1 Plazmidy

Jako většina bakterií, i bakterie rodu *Rhodococcus* obsahují ve svém genomu plazmidovou DNA, a to od malých kruhových plazmidů (5 – 20 kb) až k velkým lineárním plazmidům (200 – 1000 kb). Lineární plazmidy jsou pro rhodokoky charakteristické. Poprvé byl tento typ plazmidů objeven u *Streptomyces rochei* v roce 1979 (HAYAKAWA *et al.* 1979). Dělí se na dva typy, podle způsobu zakončení své molekuly. Pro první typ jsou charakteristické palindromické vlásenkové struktury, zakončující lineární molekulu. Tímto způsobem je například zakončen i lineární chromozom patogenu *Borrelia burgdorferi*. Konce druhého typu lineárních plazmidů obsahují dlouhé obrácené repetice se specificky vázanými proteiny na 5'-konci. Těmto plazmidům se říká invertrony a je jím například plazmid pSCL1 (12 kb) ze *Streptomyces clavuligerus*. Lineární plazmidy rhodokoků mnohdy kódují enzymy degradačních drah a virulentní faktory a mohou být prostředkem pro horizontální přenos genů či jako nosiče genetické variabilnosti (STECKER *et al.* 2003). Kruhové plazmidy jsou nejčastěji studovány kvůli svému podílu na virulenci patogenních kmenů. Takovým případem

je plazmid pOTS (85 kb) z *R. equi*, který kóduje virulentní antigeny o velikosti 15,0 kDa a 17,5 kDa. Tyto proteiny umožňují přežití patogena v hostiteli (PRESCOTT 1991). Také u kruhových plazmidů byly nalezeny geny kódující enzymy katabolických drah. Příkladem mohou být plazmidy pRTL1 (100 kb) z *R. rhodochrous* NCIMB13064 nesoucí geny účastníci se degradace chloroalkanů (DOTEN a ORNSTON 1987) a pSOX (150 kb) z *R. erythropolis* IGTS8 obsahující geny účastníci se desulfurisace dibenzothiofenu (HARDISSON *et al.* 1969). Mechanismus regulace replikace kruhových plazmidů byl studován na malých plazmidech pKA22 (5 kb) a pFAJ2600 (5,9 kb). Na základě analýzy jejich replikačních genů byly zařazeny do rodiny plazmidů pAL5000, kam patří také mnohé plazmidy rodů *Brevibacterium*, *Corynebacterium* a *Mycobacterium* (DE MOT *et al.* 1997). Plazmidy typu pAL5000 využívají pro svoji replikaci systém založený na operonu *repAB*. Protein RepA je příbuzný proteinu Rep, enterobakteriálních plazmidů typu ColE2. Protein RepB je schopen vazby DNA na dvou místech, což opět připomíná Rep protein, přesněji jeho C koncovou doménu. Nízkoafinitní vazebná doména proteinu RepB se váže na počátek replikace a vysokoafinitní doména slouží k autoregulaci exprese *repB* genu. Protein RepA slouží jako primáza, začínající replikaci plazmidu tvorbou RNA-primeru. Samotná replikace plazmidů probíhá theta-mechanismem (DE MOT *et al.* 1997).

2.3.2. Regulace transkripce genů rhodokoků

Studium regulace exprese genů rhodokoků je v současné době ještě v počátcích. Je známa řada specifických aktivátorů či represorů, kteří ovlivňují průběh katabolických drah avšak genetické mechanismy regulace byly odhaleny pouze v několika málo případech. Regulační geny se většinou nacházejí v blízkosti genů, které regulují (LARKIN *et al.* 1998). Dobře prostudovaná regulace transkripce je u genu *nitA*, který kóduje nitrilázu z *Rhodococcus rhodochrous* J1. Expese tohoto genu je v přítomnosti transkripčního regulátoru NitR indukována isovaleronitrilem. Při úspěšné indukci dochází k masivní produkci příslušné nitrilázy: enzym tvoří až 35 % všech rozpustných proteinů buňky, což naznačuje, že gen *nitA* je pod kontrolou velmi silného promotoru. Pomocí metody *primer extension* byl nalezen počátek transkripce genu *nitA* a díky tomu byla odhalena i sekvence promotoru (TTCATG-(N)₁₅-TACTGT) která se podobá konvenční sekvenci promotorů streptomycet: TTGAC(A/G)-(N)₁₇-TAG(A/G)(A/G)T a v klíčových nukleotidech odpovídá i konsensus sekvenci vegetativních promotorů *E. coli*. (KOMEDA *et al.* 1996a). Regulátor NitR je příbuzný regulátorům rodiny AraC, a předpokládá se u něj obdobný mechanismus regulace (Obr. 4).



Obr. 4: Mechanismus působení regulátoru AraC

AraC je transkripční regulátor schopný tvorby komplexu s L-arabinózou. Za nepřítomnosti L-arabinózy tvoří dimér pomocí svých N konců. C konce se váží na I₁ a O₂ oblasti operátoru promotoru pBAD. Tato vazba způsobuje ohyb DNA o délce 210 bp, což znemožňuje nasednutí polymerázy a započetí transkripce. Nejvyšší aktivity promotoru pBAD je dosaženo, pakliže jsou přítomny L-arabinóza a aktivační protein CAP. L-arabinóza tvoří komplex s AraC dimérem, čímž ho uvolňuje z O₂ oblasti a umožňuje vazbu na oblast I₂. CAP protein vzniká jako odpověď na cAMP, váže se na DNA a stimuluje vazbu AraC do I₁ a I₂ oblastí.

2.3.3. Plazmidové vektory jako nástroje pro genetické manipulace

Pomalejší rozvoj studia genetiky rhodokoků byl způsoben mimo jiné i nedostatkem nástrojů a metod pro genetické manipulace. Plazmidové vektory replikující se v kmenech aktinomycet včetně rhodokoků vznikaly pomalu a do dnešní doby je jich poměrně malý počet s omezenými možnostmi využití. Prvním publikovaným vektorem replikujícím se v buňkách rhodokoků byl plazmid pMVS301 (10,1 kb). Byl zkonstruován z 3,8 kb velkého fragmentu kryptického plazmidu pMVS300 (13,4 kb, *Rhodococcus sp.* H13-A), replikonu pro udržení v *E. coli* a selekčních markerů. Pro selekci v buňkách rhodokoků byl použit gen *tsr*

(rezistence vůči thiostreptonu) ze *Streptomyces azureus* a pro selekci v *E. coli* byl použit gen pro rezistenci k ampicilinu. Stabilní transformanty byly získány u kmenů *R. equi*, *R. erythropolis* a *R. globerulus*, zatímco transformanty *R. rhodochrous* se získat nepodařilo (FINNERTY a SINGER 1988). Pro tento druh byl zkonstruován vektor pK4 (5,3 kb), jehož základem byl kryptický plazmid pRC4 (2,6 kb), který se přirozeně vyskytuje v buňkách *R. rhodochrous* IFO3338. Plazmid pK4 nese gen kódující rezistenci ke kanamycinu a byl využit pro studium konverze nitrilů (HASHIMOTO *et al.* 1992). Za účelem zkoumání patogeního kmene *R. fascians* vznikly vektory řady pRF: pRF28 (10,5 kb) s rezistencí vůči chloramfenykolu a pRF37 (10,8 kb) s genem zajišťujícím rezistenci vůči bleomycinu. Těmito vektory se podařilo úspěšně transformovat buňky *R. erythropolis* IGTS8. Modifikacemi vytvořených vektorů vznikaly další: pRR-6, zkonstruovaný pro charakterizaci genů pro desulfurizaci dibenzothiofenu nebo pBS305, který se využil pro studium bidegradace herbicidů (LARKIN *et al.* 1998). Obecně lze o klonovacích vektorech rhodokoků říci, že jsou poměrně velké, obsahují málo klonovacích míst a často nemají vhodné genetické markery. Pro pokročilé genetické manipulace u rhodokoků chybí dosud vektory pro speciální účely, např. expresní vektory a vektory pro analýzu promotorů (*promotor-probe*).

2.4. Využití rhodokoků

Postupné studování rhodokoků odhaluje jejich široký potenciál pro komerční využití. Rozsah látek, které jsou rhodokoky schopny transformovat či degradovat je řadí mezi perspektivní bakterie pro biotechnologický průmysl. Mezi látky, které rhodokoky degradují patří uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, aromatické uhlovodíky, nitroaromáty, chlorované aromáty a další. Průmyslové využití rhodokoků se zaměřuje zejména na jejich schopnost syntetizovat surfaktanty, flokulanty, amidy či nejrůznější polymery.

Molekuly surfaktantů obsahují silné hydrofilní a hydrofóbní skupiny, což jim umožňuje hromadit se na mezifázovém rozhraní (např. oleje a vody). Tato vlastnost surfaktantů silně ovlivňuje degradační schopnosti rhodokoků: 1) surfaktanty umožňují přímou adhezi buněk na hydrofóbní partikule polutantů a zrychlují tak jejich degradaci, 2) surfaktanty snižují povrchové napětí mezi fázemi a tím usnadňují vstup hydrofóbních partikulí do buňky 3) extracelulární surfaktanty rozptylují větší hydrofóbní partikule na menší a tím zvětšují jejich povrch, což je činí dostupnější buňkám. Biosurfaktanty jsou také často efektivnější jak jejich syntetické analogy a jsou přirozeně degradovatelné, což snižuje jejich případnou toxicitu (FINNERTY 1994). Purifikace biosurfaktantů je však velice nákladná, a proto je jejich hlavní využití v oblasti prací se surovou ropou či v bioremediacích. Přežívají totiž

v prostředí chudém na živiny a jejich degradační schopnosti mnohdy nejsou negativně ovlivněny snadněji využitelnými zdroji uhlíku. Řada kmenů je psychrofilních, čehož lze využít v chladnějších oblastech (ABU-RUWAIDA *et al.* 1991). Rhodokoky mají také uplatnění v bioreaktorech, kde detoxikují odpadní vody nejrůznějších průmyslových výroby a předcházejí tím jejich toxickému působení po vypuštění. Tímto způsobem lze z odpadních vod odstranit také těžké kovy.

Dále jsou využívány desulfurizační vlastnosti rhodokoků, které lze využít k úpravě uhlí tak, aby následně při hoření uvolňovalo minimální množství síry. Bylo též popsáno využívání rhodokoků při hledání ropných nalezišť, kde jsou rhodokoky aplikovány jako indikátory uhlovodíků v prostředí a svojí přítomností naznačují možný zdroj ropy. Rhodokoky lze využít také jako biosenzory. Biosenzory mohou být využity např. pro rychlou detekci toxických látek v prostředí nebo jako kriminalistický nástroj pro odhalení drog (CAMERON *et al.* 1994).

V současné době jsou rhodokoky průmyslově využívány při výrobě akrylamidu, firmou Nitto Chemistry Industry Company Ltd (Japonsko) (KOBAYASHI a YAMADA 1996) a firmou Merck, která využívá *Rhodococcus sp.* I24 a NCIMB12038 pro přípravu meziprojektu pro syntézu inhibitoru HIV proteázy s komerčním názvem *Crixivan*.

2.5. Nitrily a amidy

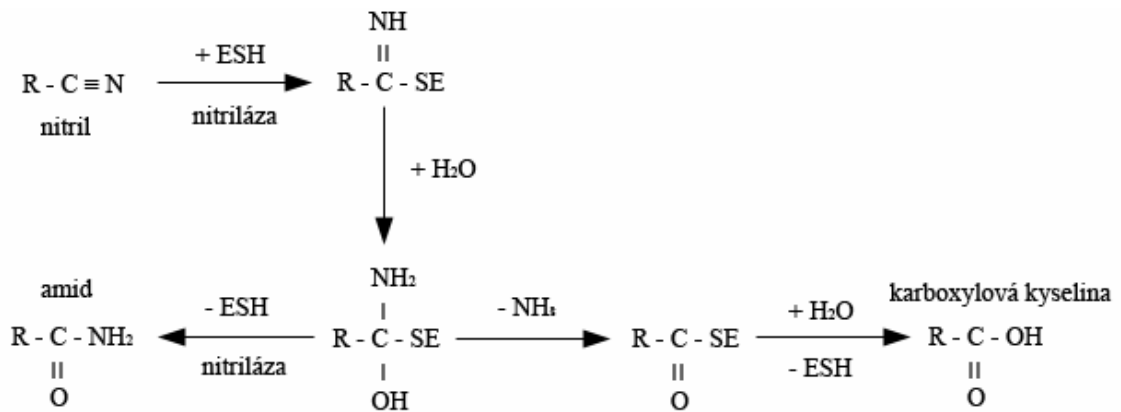
Nitrily jsou látky obecně charakterizované vzorcem R-CN, které se v prostředí vyskytují jak přirozeně tak vlivem činnosti člověka. Mezi nitrily lze nalézt jak molekuly jednoduché (2-phenylacetonitril, indolilacetonitril, 3-phenylpropionitril, kyanohydrin), tak komplexní sloučeniny (kyanoglykosidy, kyanolipidy). Přirozeným zdrojem nitrilů jsou rostliny jako fazole, len či bambus (JALLAGEAS *et al.* 1980). Nejvýznamnější produkci nitrilů má ale na svědomí člověk. Organické nitrily jsou syntetizovány řadou reakcí a slouží jako výchozí látky pro výrobu kyselin, amidů, aminů a dalších sloučenin, které masivně využívá chemický průmysl (akrylonitril – výroba polymerů) či zemědělství (aromatické nitrily – herbicidy) (CROSBY *et al.* 1994). Široké využití nitrilů však přináší i jejich škodlivé účinky na prostředí a člověka. Některé z nich (např. kyanhydriny) jsou klasifikovány jako toxické až vysoce toxické látky jiné jsou považovány za potencionální karcinogeny (např. akrylonitril). Z těchto důvodů se čím dál více usiluje o odstranění nitrilů z prostředí. Bioremediace pomocí rhodokoků schopných utilizace a degradace nitrilů se zdá být vhodnou volbou jak koncentraci nitrilů snížit. Degradace nitrilů v buňkách rhodokoků je založena na hydrolýze, při níž nitrily přecházejí až na karboxylové kyseliny. Transformace může probíhat

dvěma mechanismy. Přímou pomocí enzymu nitriláza nebo nepřímou, dvoustupňově pomocí enzymů nitrilhydratáza a amidáza (MARTÍNKOVÁ *et al.* 2009a). Ačkoliv nitriláza a nitrilhydratáza katalyzují transformaci stejného substrátu, mají odlišný genetický základ a patří do jiné rodiny enzymů.

2.5.1. Nitriláza

Genetický základ nitriláz rhodokoků byl poprvé popsán u *R. rhodochrous* J1, který tvoří isovaleronitrilem indukovanou nitrilázu kódovanou genem *nitA*. Tento gen byl klonován na plazmid s *lacZ* promotorem, kterým byly následně transformovány buňky *E. coli*. Transformanty tvořily extrémní množství nitrilázy, které dosahovalo až 50 % všech rozpustných proteinů buňky (KOBAYASHI *et al.* 1992a). Obdobné geny byly nalezeny také u dalších rhodokoků a příbuzných druhů. Nitriláza *R. rhodochrous* R22 vykazuje 55% identitu aminokyselinové sekvence s nitrilázou kmene *R. rhodochrous* J1. Regulace exprese genu *nitA* je řízena pozitivním transkripčním regulátorem NitR, který spadá do rodiny regulátorů AraC (KOBAYASHI *et al.* 1992b).

Nitrilázy rhodokoků jsou multimerní proteiny tvořené dvěma až šestnácti podjednotkami. Tyto podjednotky jsou tvořeny α/β proteinem, který vytváří čtyřvrstevnou strukturu $\alpha\beta\beta\alpha$. (BANERJEE a SHARMA 2002). Krystalografickou analýzou bylo odhaleno aktivní místo nitrilázy ve formě triády Glu-Lys-Cys. Nitrilázy jsou schopné katalyzovat transformaci nitrilů na dva typy produktů – karboxylové kyseliny a amidy. Katalýza začíná nukleofilním atakem SH skupiny cysteinu na uhlík kyano-skupiny nitrilu, čímž se hydrogenuje dusík na imino skupinu a vzniká tak kovalentní komplex thioimid-enzym. Hydratací tohoto komplexu vzniká molekula, jejíž následný rozpad určuje typ výsledného produktu. První z možností rozpadu je uvolnění amoniaku, které vede k tvorbě karboxylové kyseliny. Druhá možnost je odloučení enzymu a vznik amidu. Mechanismus katalýzy je schematicky znázorněn na obr. 5 (O'REILLY a TURNER 2003). Tvorba dvou různých produktů není z hlediska chemického průmyslu žádoucí, avšak nitrilázy rhodokoků mají oproti nitrilázám jiných druhů rovnováhu katalýzy přesunutou blíže ke karboxylovým kyselinám. U kmene *Rhodococcus sp.* ATCC39484 je poměr produkce karboxylových kyselin k amidům 98:2. Enzymové studie, provedené na dalších kmenech rhodokoků při různých zdrojích uhlíku tuto výjimečnou vlastnost potvrdily a dokonce naznačily, že některé nitrilázy rhodokoků amidy vůbec netvoří .

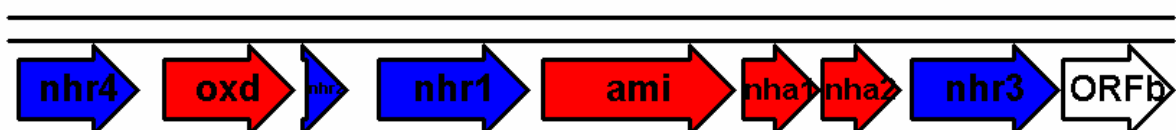


Obr. 5: Transformace nitrilů pomocí nitrilázy

2.5.2. Nitrilhydratáza

Nitrilhydratázy jsou enzymy schopné hydratace nitrilů na amidy. Rhodokoky jich tvoří široké spektrum. Nejčastěji se jedná o nitrilhydratázy jejichž kofaktorem jsou ionty železa či kobaltu. Podle nich se dělí na Fe či Co typ. Ačkoliv každý typ nitrilhydratáz je součástí jiné větve evolučního vývoje a jejich genetický základ je různorodý, všechny nitrilhydratázy jsou vždy tvořeny dvěma podjednotkami (α a β).

Genetický základ Fe typu nitrilhydratáz, geny *nha1* a *nha2*, jsou u kmene *R. globerulus* A-4 přidruženy ke genům pro amidázu (*ami*) a aldoximdehydrogenázu (*oxd*) (KATO *et al.* 2005). Společně tvoří genový klast, který obsahuje čtyři geny pro regulátory (*nhr1*, *nhr2*, *nhr3* a *nhr4*). Všechny čtyři regulační geny i geny kódující enzymy jsou orientované stejným směrem a celá skupina genů tak tvoří strukturu podobnou operonům. Schéma organizace genů na chromozomu je na obrázku 6. Gen *nhr3* kóduje aktivátor nitrilhydratázy, který napomáhá jejímu správnému složení (foldingu) a správné inkorporaci Fe iontu (KOBAYASHI a YAMADA 1996). Funkce ostatních regulátorů není v současnosti příliš známa. Je možné, že ovlivňují indukcii exprese jednotlivých genů, což potvrzují studie provedené na *R. erythropolis* AJ270. Oproti tomu práce na jiných kmenech rhodokoků (*Rhodococcus* sp. N-771, *Rhodococcus* sp. R312) docházejí k závěru, že exprese genů *oxd-ami-nha* je konstitutivní.



Obr. 6: Uspořádání genů nitrilhydratázového klastu *R. erythropolis* A4 (9,5 kb)

Nejlépe popsané nitrilhydratázy Co typu pochází z *R. rhodochrous* J1. Dělí se na těžké a lehké, které vznikají při růstu rhodokoků v přítomnosti močoviny či cyklohexan karboxamidu (KOBAYASHI *et al.* 1992a). Podjednotky těžkých nitrilhydratáz jsou kódovány chromozomovými geny *nhhA* (α -podjednotka) a *nhhB* (β -podjednotka). V těsné blízkosti se nachází geny *nhhC* (homolog regulátoru amidáz), *nhhD* (pozitivní regulátor genů nitrilhydratázy) a *nhhG* (homolog genu *nhhB*). Organizace nitrilhydratázových genů v *R. rhodochrous* J1 je odlišná od jiných kmenů. Geny nitrilhydratázových podjednotek jsou méně propojeny s geny amidáz. Jsou rozděleny genem *nhhF*, což je inzertní sekvence IS1164, kódující transponázu. Ta se do nitrilhydratázového klastru dostala pravděpodobně horizontálním přenosem genů (KOMEDA *et al.* 1996b). Organizace genů pro lehké nitrilhydratázy je podobná Fe typu. Geny nitrilhydratázových podjednotek (*nhlB*, *nhlA*) jsou sice jako u těžké verze řazeny opačně, avšak jejich sousedství s amidázovými geny (*amdA*) je stejně úzké jako u Fe typu nitrilhydratáz.

2.5.3 Amidáza

Amidázy jsou všudypřítomné enzymy, schopné hydrolyzy amidů až na karboxylové kyseliny. Jsou děleny do dvou skupin. První skupinu představují alifatické amidázy, které hydrolyzují alifatické amidy s krátkým uhlíkovým řetězcem (acetamid, akrylamid, propionamid). Patří sem amidázy produkované *Rhodococcus sp.* R312, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Helicobacter pylori* (MAESTRACCI *et al.* 1984). Do druhé skupiny patří amidázy enantioselektivní schopné hydrolyzovat amidy se středně dlouhými uhlíkovými zbytky, arylamidy, α -aminoamidy a α -hydroxyamidy (isobutyramid, valeramid, hexanamid). Enantioselektivní amidázy jsou produkované převážně rhodokoky - *Rhodococcus sp.* R312, *Rhodococcus sp.* N-774, *R. erythropolis* JCM6823, *R. rhodochrous* J1 a jejich genetický základ je úzce spojen s geny nitrilhydratáz (KOBAYASHI *et al.* 1993). Oproti tomu geny alifatických amidáz jsou spíše přidruženy k nitrilázám. Dalším rozdílem je základ jejich katalytického centra. Alifatické amidázy jsou sulfhydrylové enzymy jejichž katalytické centrum je tvořeno cysteinem přičemž katalytické centrum enantioselektivních amidáz je tvořeno asparginem a serinem. Enantioselektivní amidázy jednotlivých kmenů v rámci rodu *Rhodococcus* jsou blízké příbuzné. Shoda aminokyselinové sekvence u amidáz *R. erythropolis*, *Rhodococcus sp.* a *R. globerulus* je více jak 96 %. Méně příbuzné jsou amidázy přidružené k nitrilhydratázám Co typu. Například amidázy *R. rhodochrous* vykazují k amidázám výše zmíněných kmenů pouze 61 % homologii (KOBAYASHI *et al.* 1993).

3. Materiál

3.1. Použité chemikálie a materiál

Agaróza pro elektroforézu	<i>Lachema, ČR</i>
Bakteriologický agar	<i>Oxoid, UK</i>
Deionizovaná voda	<i>ELIX[®], Millipore, ČR</i>
DNA markery	<i>New England Biolabs, USA</i>
Dodecylsulfát sodný (SDS)	<i>Serva, SRN</i>
dNTP	<i>Top-Bio, ČR</i>
EDTA	<i>Lachema, ČR</i>
Elektroporační kyvety	<i>Bio-Rad, Kanada</i>
Ethidium bromid	<i>Serva, SRN</i>
Ethanol	<i>Lachema, ČR</i>
Fenol	<i>Serva, SRN</i>
Glukóza	<i>Lach-ner, ČR</i>
Glycerol	<i>Lachema, ČR</i>
goTaq DNA polymeráza	<i>Top-Bio, ČR</i>
Hydroxid sodný (NaOH)	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid draselný (KCl)	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid sodný (NaCl)	<i>Lachema, ČR</i>
Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
KOD hot start DNA polymeráza	<i>Merck KGaA, SRN</i>
Kvasničný extrakt	<i>Liofilchem, Itálie</i>
Lysozym	<i>Serva, SRN</i>
Mikrozkumavky 1,5 a 2,0 ml	<i>P-Lab a. s., ČR</i>
NuSieve [®] 3:1 agaróza	<i>BMA BioProducts, USA</i>
Octan draselný	<i>Lachema, ČR</i>
Oligonukleotidy	<i>VBC-Genomics, Rakousko</i>
Platinum [®] Pfx DNA polymeráza	<i>Invitrogen, USA</i>
PCR pufr	<i>Invitrogen, USA</i>
PCR pufr	<i>Top-Bio, ČR</i>
Restrikční endonukleázy	<i>BioLabs</i>
Restrikční endonukleázy	<i>MBI Fermentas, SRN</i>

Restrikční endonukleázy	<i>Takara</i> , Japonsko
Ribonukleáza A	<i>Serva</i> , SRN
T4 DNA ligáza	<i>MBI Fermentas</i> , SRN
Taq DNA polymeráza	<i>Top-Bio</i> , ČR
Tris(hydroxymethyl)aminoethan	<i>Serva</i> , SRN
Trypton	<i>Oxoid</i> , UK
Tween80	<i>Merck</i> , SRN

3.2. Komerční soupravy

QIAGEN® <i>Plasmid Mini Kit</i> Qiagen	<i>QiagenGmbH</i> , SRN
QIAquick® Gel Extraction Kit	<i>Qiagen GmbH</i> , SRN

3.3. Přístroje

Automatický autokláv	<i>MAC-235EX Sanyo</i> , USA
Dokumentační systém pro agarózové gely	<i>Kodak</i> , USA
Elektroporátor <i>Bio-Rad Gene Pulser</i>	<i>Bio-Rad</i> , USA
ELIX®	<i>Millipore</i> , USA
Laboratorní váhy L610D	<i>Sartorius</i> , SRN
Odstředivka RT6000B	<i>Sorvall</i> , USA
Odstředivka EBA 12R	<i>Hettich</i> , SRN
Odstředivka Sigma 112	<i>Sigma</i> , SRN
pH-metr PHM210	<i>Radiometer Analytical S.A.</i> , Francie
Spektrofluorimetr <i>Sapphire2</i> plate reader	<i>Tecan</i> , USA
Spektrofotometr Biomate 5	<i>Thermospectronics</i> , UK
Svářečka folií	<i>ETA</i> , ČR
Termocykler s teplotním gradientem TGradient	<i>Biometra</i> , SRN
Termocykler Techne FPROG05D	<i>Progene</i> , UK

3.4. Použité bakteriální kmeny

Escherichia coli DH5 α (*supE44* Δ (*lacU*)169 (Φ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (HANAHAN 1983)

Rhodococcus erythropolis A4 (VEJVODA *et al.*, 2007)

Rhodococcus erythropolis CCM 2595 (EGGER *et al.* 1997)

3.5. Kultivační media

3.5.1. Médium Luria Bertani (LB) (1 000 ml)

LB medium bylo použito ke kultivaci *E. coli* a *R. erythropolis*.

Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
pH	6,8

Mofifikace:	LB + 6% NH ₄ NO ₃	10 ml
	LB + 3 M acetamid	10 ml
	LB + 3 M acetonitril	10 ml

3.5.2. Médium 2 \times TY (1 000 ml)

2 \times TY medium bylo použito ke kultivaci *E. coli* a *R. erythropolis*.

Trypton	16 g	Po sterilizaci přidáno: 1 ml	FeSO ₄ .7H ₂ O	5 g.l ⁻¹
Kvasničný extrakt	10 g	1 ml	MnSO ₄ .4H ₂ O	5 g.l ⁻¹
NaCl	5 g	10 ml	50% glukózy	
pH	6,8			

3.5.3. Médium SOC (1 000 ml)

Médium SOC bylo použito při transformaci buněk *E. coli* plazmidovou DNA.

Trypton	20,0 g	Po sterilizaci přidáno: 10 ml 1M MgCl ₂ +1M MgSO ₄
Kvasničný extrakt	5,0 g	7 ml 50% glukózy
NaCl	0,6 g	
KCl	0,2 g	
pH	6,8	

3.5.4. Medium BSBT (1 000 ml)

Medium BSBT bylo použito při fluorescenčním měření aktivity promotorů.

NaCl	0,1 g
K ₂ HPO ₄	1,03 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
EDTA	0,015 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0067 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,0007 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0015 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,00049 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,00072 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,00045 g
Sukcinát (50%)-zdroj C	20 ml
MgSO ₄ (2%)	10 ml
CaCl ₂ (0,31%)	10 ml
Thiamin (10 g/l)	200 µl
Kanamycin (100 g/l)	3 µl

pH 7

Zdroj N:	BSBT + 6% NH ₄ NO ₃	10 ml
	BSBT + 3 M acetamid	10 ml
	BSBT + 3 M acetonitril	10 ml

3.5.5. Agarové půdy

Do 1000 ml půdy LB nebo 2xTY bylo přidáno 15 g agaru

3.6. Pufry a roztoky

3.6.1. Pufr 50xTAE (1000 ml)

Tris-Cl 242 g, kyselina octová 57,1 ml, EDTA (0,5M) 100 ml, pH 8,0

3.6.2. Pufr PBS (1000 ml)

Na₂HPO₄ 8,25 g, NaH₂PO₄ 2,05 g, NaCl 4 g, pH 7,4

3.6.3. Pufr GET

Glukóza 50mM, EDTA 10mM, Tris-Cl 25mM, pH 8,0

3.6.4. Pufr TE

Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,8

3.6.5. Pufr SET

Sacharóza 300mM, EDTA 20mM, Tris-Cl 15mM, pH 8,0

3.6.6. Pufr GT

Glyceron 10%, Tris-Cl 10mM, pH 8,0

3.6.7. Roztok RF1

RbCl 100mM, MnCl₂ 4H₂O 80mM, CaCl₂ 2H₂O 10mM, CH₃COOK 30mM, glycerol 15%, pH 6,8 (upraveno 0,2M kys. octovou), sterilizováno filtrací

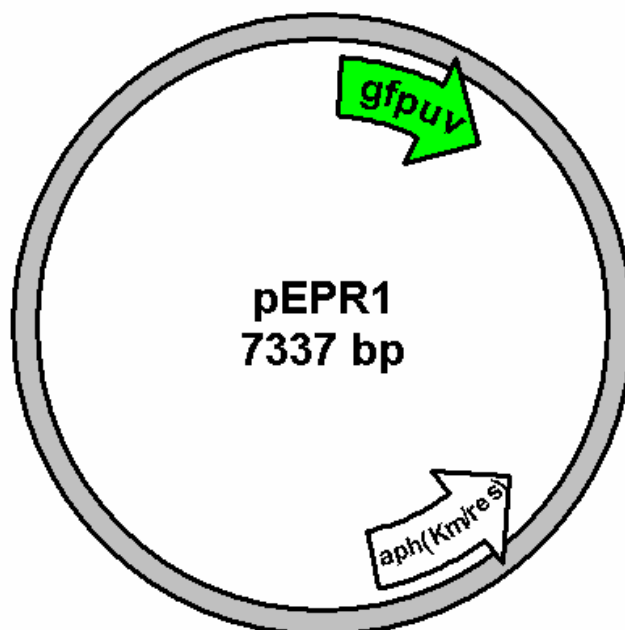
3.6.8. Roztok RF2

MOPS 10mM, RbCl 10mM, CaCl₂ 2H₂O 70mM, glycerol 15%, pH 6,8 (upraveno 0,2M NaOH), sterilizováno filtrací

3.7. Plazmidy

3.7.1 pEPR1

Promoter-probe vektor s reportérovým genem *gfpuv* (replikuje se v *E. coli*, *R. erythropolis*, *C. glutamicum*)



Obr. 7. *Promoter-probe* vektor pEPR1

gfpuv - gen pro zeleně fluorescenční protein Gfp

aph (Km/res) – gen pro rezistenci na kanamycin

3.8. Oligonukleotidy pro PCR a sekvenování

Tab. 1.: Použité primery pro PCR a sekvenování

Primer	Komplementární sekvence	Sekvence ^a	Použití
AMIF	<i>R. e.</i> A4	GGCTGCAGTCGGCTACTTTCA	PCR
1RNH2	<i>R. e.</i> A4	ATCAGGCTGTACGGCAGGTGTT	PCR
4FNH2	<i>R. e.</i> A4	TAACGATCGACCACACAAC	PCR, SQ
4FNH5	<i>R. e.</i> A4	CCTACATGCTTTCCACATCT	PCR, SQ
4RNH3	<i>R. e.</i> A4	TGAATCGGTGGAATTTGTTGT	PCR
C2KOD01L	<i>R. e.</i> A4	GAAACTTCCTCGACCTGAGCTAC	PCR, SQ
C2KOD02L	<i>R. e.</i> A4	AATATCGACATCGACGGAACTT	PCR
C2KOD02R	<i>R. e.</i> A4	CACGGTATTCGAAACTCTTGTTACC	PCR, SQ
CCMAMIR1	<i>R. e.</i> CM2595	GGTCAGGGCCACTAGTTT	PCR
CCMAMIR2	<i>R. e.</i> CM2595	GATGACCGAGAGCATCAG	PCR, SQ
CCMINTERF1	<i>R. e.</i> CM2595	GACAAGTGAAGCCGATCA	PCR, SQ
CCMINTERF2	<i>R. e.</i> CM2595	GAGCCCAGCATCTATTT	PCR, SQ
CCMINTERF3	<i>R. e.</i> CM2595	CCCGAACTTAACGAGTCA	PCR, SQ
CCMINTERR1	<i>R. e.</i> CM2595	GTGAATCGGTGGAATTTG	PCR, SQ
CCMINTERR2	<i>R. e.</i> CM2595	CCTGCCTGAAATAGATGC	PCR, SQ
CCMNHR1F1	<i>R. e.</i> CM2595	CAGGCCACAGAAACACTC	PCR, SQ
CCMNHR1F2	<i>R. e.</i> CM2595	CGGAACTGATTCCTTTCCA	PCR, SQ
CCMNHR1R1	<i>R. e.</i> CM2595	CAGCGAGTGTTTCTGTGG	PCR, SQ
FAMIE	<i>R. e.</i> A4	CCGAATTCATCAGGAGCACACTT	PCR, SQ
GFP4	vektor pEPR1	GTTCTTCTCCTTTACTCATTT	PCR
NHAF4	<i>R. e.</i> A4	TTCGAATACCCAAGAAAGAAGCACACCAT	PCR, SQ
NHR1R2	<i>R. e.</i> A4	AAGTAGCCGAATGCCGCCAGA	PCR, SQ
NHR2F1	<i>R. e.</i> A4	CGTTCCAAGACGACCTCCCC	PCR, SQ
PAMIF1	<i>R. e.</i> A4	GGGCGGCATTCGGCTACTTT	PCR
PAMIR1	<i>R. e.</i> A4	TTAGATCTGAGTGATGCCGTAATGCTTT	PCR, SQ
PNHA1F1	<i>R. e.</i> A4	GATCACCGGCAAGACCTT	PCR, SQ
PNHA1R1	<i>R. e.</i> A4	AAGGATCCCTTCATGCTTCGACGTAA	PCR
RNHAX	<i>R. e.</i> A4	TGTCTAGACCATGATTTCCAGTGTCTT	PCR
SMANHF3	<i>R. e.</i> A4	GAGGAATTGTTCCGGTAGC	PCR
SMANHR5	<i>R. e.</i> A4	TTCACCTGGAGTTCTTGT	PCR
TRPTCGF1	vektor pEPR1	CAGTTGTGTGATGTGGCAATGTTTCACG	PCR

^a Tučně jsou vyznačeny nukleotidy, které nejsou komplementární k templátu, byly změněny, aby vznikla zásahová místa pro restrikční enzymy

PCR – amplifikační primery

SQ – sekvenační primery

3.9. Použitý software

Analýza a zpracování sekvencí – DNASTar LaserGene 99

<http://www.dnastar.com>

Analýza a zpracování sekvencí – pDRAW32

<http://www.acaclone.com>

Analýza sekvenačních chromatogramů – Chromas 1.43

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

Analýza a porovnávání sekvencí

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Grafické úpravy – Adobe Photoshop 7.0CE

<http://www.adobe.com>

Textové nástroje – MS Office 2003CZ

<http://office.microsoft.com>

4. Metody

4.1. Kultivace *E. coli* a *R. erythropolis*

Buňky *E. coli* byly kultivovány při 37 °C v médiu LB. Ve stejném médiu byly kultivovány buňky *R. erythropolis* při teplotě 25 °C. Krátkodobě byly buněčné kultury uchovávány v lednici při 4 °C na Petriho miskách. Dlouhodobě se kultury uchovávaly při teplotě –70 °C jako buněčné suspenze s přídavkem glycerolu (15 %).

4.2. Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

K izolaci plazmidové DNA z *E. coli* byla použita komerční souprava QIAGEN® *Plasmid Mini Kit*. Izolace byla prováděna podle doporučení výrobce.

Alternativně byla použita metoda alkalické lyse (BIRNBOIM 1983). Do 2 ml média LB s příslušným antibiotikem byla zaočkována 1 kolonie a buňky rostly přes noc na rotační třepačce při 37 °C a 170 ot./min. Následně bylo 1,5 ml narostlé kultury centrifugováno (2 min; 9 000×g). Po pečlivém odstranění supernatantu byl buněčný sediment resuspendován ve 100 µl pufru GET a inkubován 5 minut při 0 °C. Po této inkubaci bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH a suspenze opatrně promíchána několikanásobným převrácením. Poté bylo přidáno 150 µl 5M octanu draselného (pH 5,2) a obsah byl opatrně promíchán převrácením. Po 10min inkubaci v ledu následovala centrifugace (10 min; 18 000×g). Čirý supernatant byl odebrán tak, aby neobsahoval bílou sraženinu a DNA byla ze supernatantu precipitována přidáním 850 µl 96% ethanolu při teplotě –20 °C po dobu 10 minut. Vysrážená DNA byla sedimentována centrifugací (10 min; 18 000×g). Po oddělení supernatantu byl získaný sediment DNA dále promýván přídavkem 200 µl 70% ethanolu a opakovaně centrifugován (2 min; 18 000×g). Supernatant byl poté odstraněn pipetováním, sediment DNA vysušen za sníženého tlaku a následně resuspendován ve 30 µl RNázy (40 µg.ml⁻¹). Po 30min inkubaci při 37 °C byly 3 µl vzorku analyzovány elektroforézou v agarózovém gelu odpovídající koncentrace.

4.3. Izolace plazmidové DNA z *R. erythropolis*

K izolaci plazmidové DNA z *R. erythropolis* byla použita komerční souprava QIAGEN® *Plasmid Mini Kit*. Samotné izolaci předcházela částečná degradace buněčné stěny lysozymem.

Alternativně byla pro izolaci plazmidové DNA z *R. erythropolis* použita metoda alkalické lyse. Buňky *R. erythropolis* byly kultivovány v 5 ml LB média s příslušným antibiotikem na rotační třepačce při 25 °C a 200 ot./min. Z narostlé kultury byly 2 ml centrifugovány (1,5 min; 9 000×g) a buňky byly promyty 2 ml pufru TE. Po opětovné centrifugaci (1,5 min; 9 000×g) byl supernatant pečlivě odstraněn a buňky byly resuspendovány ve 250 µl pufru SET s lysozymem (10 mg.ml⁻¹). Po 2h inkubaci při 25 °C bylo přidáno 400 µl čerstvě připraveného 5% SDS v 0,2M NaOH. Směs byla promíchána opakovaným obracením a ponechána 10 min v ledu. Po této inkubaci bylo přidáno 300 µl 5M octanu draselného (pH 5,2), obsah byl opatrně promíchán a inkubován 15 minut v ledu. Následovala centrifugace (10 min; 18 000×g) a plazmidová DNA obsažená v supernatantu byla precipitována přidáním 0,8 násobku objemu isopropylalkoholu a inkubací (15 min) při laboratorní teplotě. Následovala další centrifugace (10 min; 18 000×g), po které byl suchý sediment plazmidové DNA rozpuštěn ve 200 µl pufru TE. Přítomné proteiny byly odstraněny extrakcí fenolem, DNA následně precipitována ethanolem a rozpuštěna ve 20 µl vody s přídavkem RNázy (40 µl.ml⁻¹). Po 30min inkubaci při 37 °C bylo 5–10 µl vzorku analyzováno elektroforézou v agarósovém gelu vhodné koncentrace.

4.4. Transformace *E. coli*

4.4.1. Příprava kompetentních buněk

50 ml půdy SOC bylo inokulováno několika koloniemi *E. coli*. Buňky byly kultivovány při 37 °C za stálého třepání a po dosažení OD₆₀₀ 0,20–0,25 byla buněčná kultura ponechána 10 minut v ledu a poté centrifugována (10 min). Supernatant byl důkladně odstraněn, buněčný sediment resuspendován v 17 ml roztoku RF1 a ponechán 15 minut v ledu. Po centrifugaci (10 min) a odstranění supernatantu byl buněčný sediment resuspendován ve 4 ml roztoku RF2 a ponechán 15 minut v ledu. Poté byla buněčná suspenze rozplněna po 200 µl do mikrozkušavek. Po tomto kroku byly kompetentní buňky buď ihned použity pro transformaci nebo pro pozdější použití uchovány při –70 °C.

4.4.2. Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA

K čerstvě připraveným nebo v ledu roztátým kompetentním buňkám (200 μ l) bylo přidáno maximálně 20 μ l plazmidové DNA (0,1–0,5 μ g) nebo ligační směsi. Po 30min inkubaci v ledu byl proveden teplotní šok (90 s; 42 °C) a transformační směs buňky/DNA byla ihned zchlazena v ledu. K transformační směsi bylo přidáno 800 μ l půdy SOC a následovala inkubace transformovaných buněk 45 minut při 37 °C za stálého třepání. Poté bylo po 100 μ l transformovaných buněk vyseto na misky s půdou LB obsahující příslušné antibiotikum (Km, 30 μ g.ml⁻¹).

4.5. Transformace *R. erythropolis* plazmidovou DNA

4.5.1. Příprava kompetentních buněk

Buňkami z několika kolonií čerstvě narostlé kultury bylo zaočkováno 10 ml média 2 \times TY. Následovala kultivace přes noc při 25 °C a třepání 200 ot./min. Z narostlé kultury bylo zaočkováno 100 ml 2 \times TY média (doplňného 0,5 % Tween80) na OD₆₀₀ 0,1. Při dosažení OD₆₀₀ 0,6 byla kultura zchlazena v ledu, rozdělena do 2 kyvet a centrifugována (10 min). Supernatant byl odstraněn, buněčný sediment resuspendován v 25 ml pufru GT a opět centrifugován. Tento krok byl poté ještě jednou opakován. Při třetím promývání byl obsah obou kyvet spojen, promyt 25 ml pufru GT a opět centrifugován (10 min). Poté byly buňky resuspendovány ve 2 ml ledového 10% glycerolu a rozplněny po 200 μ l do mikrozkuvek. Takto připravené kompetentní buňky byly použity na transformaci elektroporací nebo uchovány při –70 °C.

4.5.2. Elektroporace

Buněčná suspenze (200 μ l) byla smíchána s maximálně 10 μ l plazmidové DNA (0,5–2,0 μ g) a po promíchání a 1min inkubaci v ledu přenesena do 2 mm široké elektroporační kyvety. Následoval elektrický puls v elektroporátoru GenePulser s napětím 2,5 kV, kapacitou 25 μ F a vnějším odporem 600 Ω . Tomuto nastavení odpovídala délka pulsu 14–16 ms. Ihned po pulsu bylo přidáno 800 μ l média 2 \times TY (bez Tween80) a buňky byly inkubovány 4 h při

25 °C na rotační třepačce (170 ot./min). Poté bylo 200 µl transformovaných buněk vyséváno na selektivní půdy LB s příslušným antibiotikem (Km, 200 µg.ml⁻¹).

4.6. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Enzymové reakce (obvykle v objemu 20-100 µl) byly připraveny podle instrukcí v příloženém návodu příslušného enzymu. Vzorek DNA byl smíchán s 1/10 objemu doporučeného 10× koncentrovaného reakčního pufru a ke směsi bylo přidáno potřebné množství (obvykle 1-2 µl) restrikční endonuklázy. Směs byla poté inkubována 2–4 h při doporučené teplotě.

4.7. Extrakce fenolem

K roztoku DNA byl přidán stejný objem směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1). Po důkladném promíchání a krátké centrifugaci byla odebrána horní vodná fáze obsahující DNA. Pokud byla kontaminace proteiny vysoká, byl tento krok opakován. Následovalo odstranění zbytků fenolu ze vzorku extrakcí do stejného objemu směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1). Obsah byl opět promíchán, centrifugován a nakonec byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující DNA, která se dále přečistila srážením ethanolem.

4.8. Precipitace DNA ethanolem

DNA byla precipitována přidáním dvojnásobku objemu 96% ethanolu a desetinou objemu 5M octanu draselného (pH 5,2). Následovala 15min inkubace při –20 °C a centrifugace (10 min; 18 000×g; 4 °C). Vzniklý sediment DNA byl promyt 200 µl 70% ethanolu a po opětovné centrifugaci (2 min; 18 000×g; 4 °C) vysušen a rozpuštěn ve vodě nebo vhodném pufru.

4.9. Elektroforetická analýza DNA v agarósovém gelu

Elektroforetická analýza plazmidové DNA nebo jejích fragmentů byla prováděna v horizontálním agarózovém gelu v pufru 1xTAE. Koncentrace agarózového gelu (0,6-1,5%) se měnila v závislosti na velikosti analyzované DNA. Před nanesením do gelu byly k 10 µl

roztoku DNA přidány 2 µl nanášecího roztoku. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 50–75 V. Gel obsahující DNA byl po skončení elektroforézy barven 10–20 min v ethidumbromidové lázni. Po obarvení gelu byla DNA vizualizována UV zářením a elektroforeogram zdokumentován pomocí systému EDAS 290. Pro určení velikosti a koncentrace DNA byly používány komerčně dostupné standardy PCR fragmenty o známé velikosti připravené z definované matricové DNA.

4.10. Izolace DNA z gelu

K izolaci DNA z agarózového gelu byla použita komerční souprava QIAquick® Gel Extraction Kit. Po elektroforetické separaci byl pás obsahující požadovanou DNA vyříznut z agarózového gelu a dále zpracován postupem doporučeným výrobcem kitu. Během vyřezávání byla co největší část pásu s DNA zastíněna před negativními účinky záření UV-transiluminátoru hliníkovou folií.

4.11. Ligace

Pro ligační reakci prováděné v celkovém objemu 20 µl se používalo 100–200 ng vektoru, přičemž molární poměr mezi vektorem a insertem byl obvykle 1:3. Množství vkládaného fragmentu se vypočítalo z následného vzorce:

$$m_I = \frac{1}{3} \cdot \frac{m_V \cdot n_I}{n_V}$$

m_I - množství insertu (ng), m_V - množství vektoru (ng), n_I -velikost insertu (kb), n_V -velikost vektoru (kb)

Podle vypočítaných hmotností se připravila ligační směs (v některých případech byl poměr množství fragmentu a vektoru zvýšen), přidaly se 2 µl ligačního pufru, objem byl doplněn H₂O do 18 µl a jako poslední byly přidány 2 µl (pro ligaci kohezních konců) nebo 4 µl (pro tupé konce) T4-DNA ligázy (1 U. µl⁻¹). Ligace probíhala při 20 °C minimálně 2 h, případně až 12 h. Poté byla T4-DNA ligáza inaktivována při 65 °C 10 min a ligační směs byla použita k transformaci buněk *E. coli*.

4.12. Identifikace klonů *E. coli* a *R. erythropolis* nesoucích plazmidy zkonstruované na základě vektoru pEPR1

Buňky *E. coli* a *R. erythropolis* byly kultivovány v Petriho misce na LB půdě s antibiotikem (Km, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Narostlé klony byly pozorovány pod UV zářením, jehož účinkem dochází k excitaci zeleného fluorescenčního proteinu (Gfp). Uvolněním emisního záření z excitovaného Gfp se kolonie s rekombinantním plazmidem zbarvily do zelena. Z takto vybraných klonů byla izolována plazmidová DNA, jejíž velikost byla analyzována pomocí gelové elektroforézy. Jako referenční vzorek byl použit výchozí vektor pro tvorbu rekombinantního plazmidu. U vybraných plazmidů odpovídající velikosti byla provedena kontrola inserčního fragmentu pomocí PCR.

4.13. Sekvenování DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno servisně ve Středisku sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Fragmenty DNA vložené do příslušného plazmidového vektoru byly sekvenovány s použitím sady *ABI PRISM BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit*. Nukleotidové sekvence byly určovány na přístroji *ABI PRISM 3100 DNA sequencer* a zpracovány programem Chromas.

4.14. PCR

Metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) byla používána pro amplifikaci fragmentů DNA následně použitých při klonování nebo pro potvrzení přítomnosti klonovaných fragmentů. Všechny reakce proběhly v theromocykleru Techne nebo Biometra. PCR směs se skládala z templátu - plazmidová DNA (5–10 ng) nebo 10 μl buněčného lyzátu., reakčního pufru s MgCl_2 (5 μl), enhanceru (5 μl), oligonukleotidových primeru (0,5 μl), dNTP (1,5 μl) a Taq / Kod hot start / Pfx DNA polymerázy (0,5 μl). Do celkového objemu 50 μl byla směs doplněna vodou. PCR probíhala dle programu uvedého v Tab. 2.

Tab. 2. Obecné schéma programu reakce PCR

Číslo kroku	Krok	Teplota	Čas	Počet Cyklů
1	denaturace	94 °C	2 min	1x
2	denaturace	94 °C	20-30 s	25-30x
	hybridizace	T _m -5 °C	10-30 s	
	polymerace	72 °C	0,5-2 min	
3	dokončení polymerace	72 °C	0,5-2 min	1x

4.15. Stanovení aktivity promotorů fluorometricky

Aktivita promotorů byla stanovována na základě fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu, který byl použit jako reportér.

Buňky *R. erythropolis* obsahující vektor s genem *gfpuv* pod kontrolou studovaného promotoru byly kultivovány v minimálním médiu (BSBT) či LB médiu na rotační třepačce při 25 °C a 200 ot./min (24 h). Z buněčné suspenze byly každé 2 hodiny odebírány 2 ml a následně centrifugovány (10 min). Sediment byl 1× promyt pufrům PBS. Po další centrifugaci byly buňky resuspendovány v pufru PBS a zředěny na OD₆₀₀ = 0,25. Vlastní měření fluorescence bylo prováděno na spektrofluorimetru. Excitační vlnová délka byla 397 nm, emisní 509 nm, šířka excitační štěrby byla 5 nm a emisní štěrby 20 nm.

5. Cíle práce

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu genů kódujících amidázu (*ami*) a nitrilhydratázu (*nha*) u kmene *Rhodococcus erythropolis* CCM2595: izolace těchto genů z chromozomu *R. erythropolis* CCM2595, určení jejich organizace v chromozomu, stanovení jejich nukleotidové sekvence a zjištění způsobu regulace jejich exprese. Organizace a sekvence těchto genů a jejich produktů (proteinů) bude porovnána s příslušnými údaji o těchto genech získanými u kmene *R. erythropolis* A4. Pro studium aktivity promotoru genu *ami* (*Pami*) v minimálním a komplexním médiu s přidavkem potenciálních induktorů bude využit *promoter probe* vektor pEPR1. Na základě tohoto vektoru bude připraven konstrukt, který ponese regulační oblast obsahující promotor genu pro amidázu a umožní měřit aktivitu promotoru *Pami* prostřednictvím fluorescence proteinu Gfp kódovaného reportérovým genem.

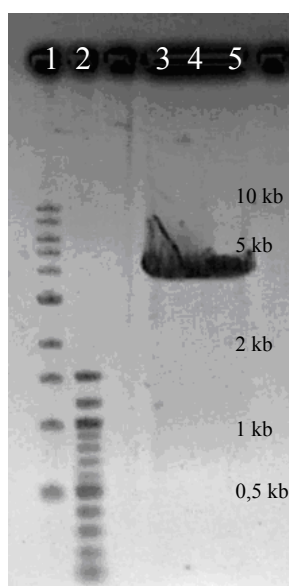
6. Výsledky

V souvislosti se studiem biodegradačních vlastností rhodokoků je v Laboratoři molekulární genetiky bakterií Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. studován i kmen *R. erythropolis* A4. U tohoto kmene byla již dříve stanovena nukleotidová sekvence genového klastru obsahujícího geny pro amidázu a nitrilhydratázu (databáze GenBank, Acc. No AM946017). Byla zjištěna organizace jednotlivých genů v klastru a bylo provedeno transkripční mapování pro odhalení promotorů genů. Analýza promotorů s použitím *promoter-probe* vektoru pEPR1 však nemohla být provedena, protože u tohoto kmene dochází pravděpodobně k integraci vnášených plazmidů do chromozomu. Navíc nebylo možné provádět genové manipulace s cílem zvýšit expresi genu *ami* kódujícího amidázu s použitím plazmidů které se replikují v buňkách rhodokoků. Z těchto důvodů byla zkoumána přítomnost genu *ami* (a dalších genů v sousedících částech chromozomu) v příbuzném kmeni *R. erythropolis* CCM2595, který je v Laboratoři rutinně používán k manipulacím s použitím plazmidů. Identifikace genu *ami* v kmeni *R. erythropolis* CCM2595, popis okolních genů a jejich sekvenování byl výchozí úkol této diplomové práce. Dále mělo být porovnání uspořádání nalezených genů u dvou studovaných kmenů rhodokoků a sledována exprese genu *ami* v kmeni CCM2595 a její regulace.

6.1. Nukleotidová sekvence klastru *ami-nha* *R. erythropolis* CCM2595

Pro stanovení nukleotidové sekvence genů *ami* a *nha* z kmene *R. erythropolis* CCM2595 byla využita známá sekvence souboru genů *oxd*, *nhr2*, *nhr*, *ami*, *nha1*, *nha2* a *nhr3* kmene A4 (databáze GenBank, Acc. No AM946017). Pomocí programu BLAST byly porovnány sekvence těchto genů z kmene A4 a z dalších rhodokoků, které jsou dostupné v databázi GenBank a v konzervovaných oblastech byly navrženy primery pro amplifikaci úseků pomocí PCR s chromozomovou DNA kmene *R. erythropolis* CCM2595 jako templátem. Získané fragmenty *ami-nha* klastru byly sekvenovány. Bylo zjištěno, že velké úseky klasteru *ami-nha* u kmenů *R. erythropolis* A4 a *R. erythropolis* CCM2595 mají vysoký stupeň podobnosti nukleotidových sekvencí (95-99 %). Proto byly podle sekvence kmene A4 navrženy primery v krajních oblastech klastru tak, že výsledný amplikon PCR reakce obsahoval celý hledaný úsek (geny pro amidázu a podjednotky nitrilhydratázy). Tento 4,3 kb dlouhý amplikon byl získán pomocí KOD Xtreme Hot Start polymerázy a primerů

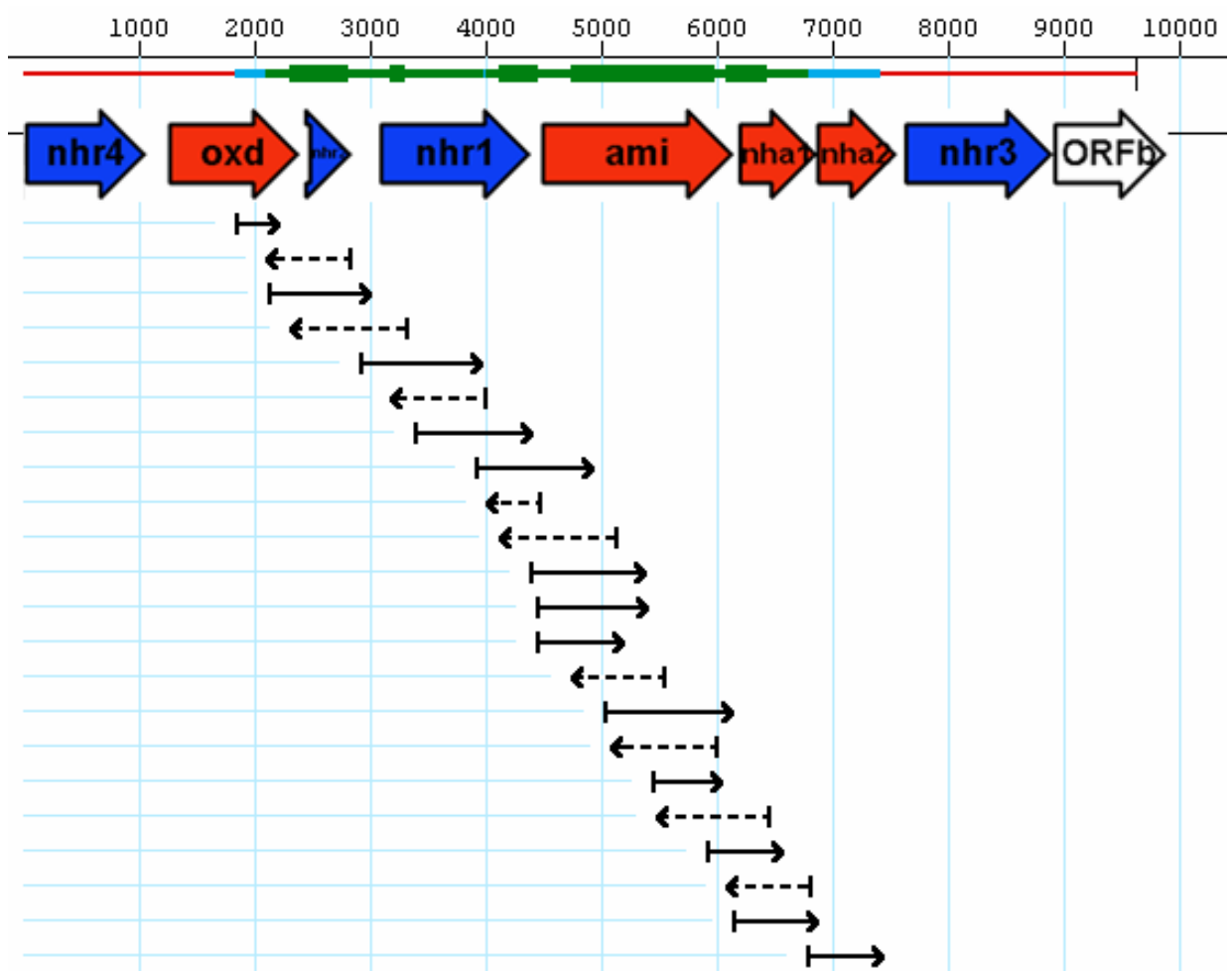
C2KOD01L a C2KOD02R. Celá reakce byla provedena ve celkovém objemu 300 μ l pro získání dostatečného množství produktu (Obr. 8), který byl přečištěn izolací z gelu a využit jako sekvenační templát.



Obr. 8. Elektroforéza PCR fragmentu (4,3 kb) amplifikovaného pro sekvenování *ami-nha* klastru

(1). velikostní standard (1 kb *ladder*) (2). velikostní standard (100 bp *ladder*), (3,4,5). fragment (4,3 kb) získaný amplifikací *ami-nha* klastru genů *R. erythropolis* CCM2595.

Následně byla prováděna sekvenace při níž byly využity jak sekvenační primery navrhnuté podle sekvence kmene A4, tak primery navrhnuté podle již známých fragmentů sekvence kmene CCM2595 (*primer walking*). Templát byl sekvenován obousměrně, průměrná délka jednotlivých sekvencí byla přibližně 700 bp. Postup sekvenace naznačuje obrázek 9. Všechny získané dílčí sekvence byly spojeny pomocí programu *Seqman* (DNAStar *LaserGene* 99) do výsledné sekvence o délce 5,5 kb (Obr. 10). V kompletní sekvenci byly nalezeny otevřené čtecí rámce a porovnáním se známými homologními sekvencemi z jiných rhodokoků bylo určeno přesné umístění jednotlivých genů.



Obr 9. Schéma postupu sekvenování oblasti *ami-nha* klastru genů kmene CCM2595

Poloúsečky představují jednotlivé sekvence získané sekvenací PCR ampliconů. Genová mapa zobrazuje *ami-nha* klastr kmene A4. Barva a výška úseků pod velikostními kótami určují multiplicitu sekvenování daných úseků. *nhr4* – regulátor nitrilhydratázy 4, *oxd* – aldoximdehydrogenáza, *nhr2* – regulátor nitrilhydratázy 2, *nhr1* – regulátor nitrilhydratázy 1, *ami* – amidáza, *nha1* – α podjednotka nitrilhydratázy, *nha2* – β podjednotka nitrilhydratázy, *nhr3* – regulátor nitrilhydratázy 3, ORFb – hypotetický gen

>> *oxd*

TCTCAGACCG ACTGGATGCA GGCCTCGGGC GAACTACGGG TCGTCGCCGG TGACCCCGCC GCAGGTGGAC GCGTAGTAGT
GCGGGGACAC GACAACATCG CACTGATCAG ATCCGGGCAG GACTGGGCGG ACGCGGAAGC AGACGAGCGC AGCCTCTACC
TCGACGAAAT CCTGCCACT CTTCAATCGG GCATGGACTT CCTCCGCGAC AACGGCCCCG CCGTCGGGTG CTACAGCAAC
CGTTTCGTAC GCAATATCGA CATCGACGGA AACTTCCTCG ACCTGAGCTA CAACATCGGT CACTGGGCCT CACTCGACCA
ACTCGAGCGG TGGTCGGAAT CCCACCCGAC CCATCTACGG ATCTTCACGA CGTTCTTCCG GGTCCGCCGAG GGCTGTGCA
AATTACGTCT CTACCATGAG GTCTCGGTAT TCGATGCCGC CGATCAGCTG TACGAGTACA TCAACTGCCA TCCCGGGACC
GGGATGCTGC GCGACGCGGT GACCACCGCC GCGCACTGAC CGAAGCCGCC GAAAACTTC GGCCACGTTT TTTCCCTCGG

oxd <<

>> *nh2*

AGGCAACTCG AGATATGTTG ACGAGTGTG ACATATCTCA GTAGAGGCCA TCGAGGAAGC GCGGACAGCA CACAGTGACT
ACTCAACGAA ACGAAGAGTT GGCCTTTGCT GTGCTGGCCG ACCAGGTGCG CCGACAGATT CTCGACACTC TGGCTACCCA
CGGCGAATGC AACGCAGGCT TCATCAGCGA TCAAATTTCC ACGGTCGGTC GCACCACGGT ATCCACACAT CTCAAGGCGC
TGCGGCTGTC CGGAGTTATC GTCGAACGCC GTCAAGGACG TCATCGCTTG TTTTCGATCG ATCCGTCTGG GCCCCCAAC
GATGCACTCC AGTTCTGCG CGACGTCCTC GGGCGAGCGC TGAAGCAGG TTCGAACGCC TCCGAGTTGC CGACCACGGC
GACTGAGGAT TCCGACGCGG CTTGCGGTGCG TCGCCGGGCT TGAGGCCCTG TTTGAGCCCC AGCATCTATT TCAGGCAGGA

nh2 <<

AGTAGAACGT GCCAGGTCTC TCCGTAACGG CACAGATCGT GACGACGGAC CCGCCAGGGT CAGCCTTCGA GCGCTTCGAA
ACGGGGCAAC TGCTCGAACT CGAATGTGAG CAACTGACGG TCGGGGCCGC CGTCGCCATC TCCTTCCCG TCGGCAACGG

>> *nh1*

CGCACGCGCA GATGTAGCCG GAATGCCGAT CACTCTGTTG GGGTACGTCG CCGGCGTGAA GCGGGGCCGA TCGGTGCTGA
TCGTGCACCA CCAACCGTGG CGCGGCCGTC TGACGATCCG GTTCTTTCCC GACGGCACCG GCACCCGAAT CGTTCTCGAG
TCCAGCCTCG ATCAGGACGG CATTCTGCG CTTGCCAACA AGCGCGGATT CGCTCCACCC GAACCTCCGC GCTCCGACCG
ACATCGGATC GGACTGCTGG TCAGCAAATC CGGCTCGGCG GCTGTATTCC CCCAGGCCAC AGAAACACTC GCTGCCCTGG
CGGTGCAAGA GATCAATGCC GACAGCGGTG TCGGCGGCGT TCTCGTCGAC TTGGTGATCG GCGATGACGC TTCCGACTCG
GCGGCCGGAG CGGCGACCCG ACTGCGATTG GTGAAAAGCG GATGTCGCGC CATTTTTGCG TCGGTGACGT CGTCGACCTT
CAACGCCGCC GCATCTGCGT TGCAAAACAC CGGTGTGTTG TTGGTACACA CAGTTCTCAA CGAAGGAGGT CGATCGCGTC
CGGGGATCCT TCGATTGGGT GAGCGGCCAC TCGACCAGAC GCGAGCGTGC ATACCCGCAA TGATGTCCGA GACCGGTTCT
CGCACTTGGT TCCTGGTCGG TCAGCAGTAT TCGTGGTTCG TCGGAGCACA TTGGGCGGCT CCGCGTGTGA TCGCCGAATC
CACAGGTTCC GTGGCCGGCG AAGTCTACGT ACCGTTGGGA ACAACCGACT TCTCACGGAT CATCGAGTCG ATAGTCGACT
CGGGGGCGGA ACTGATCTTT TCCACCTGCG TGGGCCATGA CGAGGTCTTC TTCGAACGGC AATGCGCCCA GCACGGACTG
CGGGCCACCA CGCGGACGTT CGCGCTGGTC CTCGACGAGG CCACCTCAGCA GCTCATCGGc AaTTCCGATG CCGACGGAGT
CTGGGCGGCA TTCGGTACT TTCAATCCCG AGCCGGCGAG CACGACCTCG AAAAGCGATA CAGCGCAAGC TCGAACGAAAC
TCCTGCCTCC GCTCAGCTCT CTGTCCGAGA CAACGTACGA AGCGATCGTC GCTTACGCAC GCGCAGTCGA ACGAACGTCG
GCGGGCGATC CGGAAACAGT ACTTCGGCAG CTTGTACAAA CGTCGAAAAG CTCGACGGAC ACCGGCGTTC CACTGCATCG
GCCGATCTG ATCGCTGAAT CACGCCATGG GCGTCTGTAC CCCCCTCTC TCTGAGCGCG CGTAACCCGA ACTTAACGAG

nh1 <<

TCAAATATGC GATACCTATT GACGCAATTA CTGATCCGGC CCTAGTCTGA AAGACAAGTG AAGCCGATCA CATCAGGAGC

>> *ami*

CACTTCTCA TGGCGACAAT CCGACCTGAC GACAATGCAA TAGACACCGC TGCAAGGCAT TACGGCATCA CTCTCGACCA
ATCAGCCCGG CTCGAGTGGC CGGCACTGAT CGACGGAGCA CTGGGCTCCT ACGACGTCGT CGACCAGTTG TACGCCGAGC
AGGCAACCCC GCCGACCACG TCACGCGAGC ATGCGGTGCC AACTGCGAAC GAAAATCCTT TGAGCGCTTG GTATGTGACC
ACAAGCATCC CGCCGACGTC GGACGGCGTC CTGACCGGCC GACGCGTGGC GATCAAGGAC AACGTGACCG TGGCCGGAGT
TCCGATGATG AACGGATCTC GGACGGTAGA GGGATTCACT CCGTCTCGCG ACGCAACTGT GGTCACTCGA CTACTGGCGG
CCGGTGCAAC CGTCGCAGGC AAAGCTGTGT GCGAAGACCT GTGTTTCTCC GGTTCGAGCT TCACACCGGC AAGCGGACCG
GTCCGCAATC CATGGGACCC ACAGCGCGAA GCAGGTGGAT CATCCGGTGG CAGTGCAGCT CTCGTTGCAA ACGGTGACGT
CGATTTTGCC ATCGGCGGGG ATCAAGGCGG ATCGATCCGG ATCCCGCGCG CATTCTGCGG CGTCGTCCGA CACAAGCCGA
CGTTCGGGCT CGTCCCCTAT ACCGGCGCAT TTCCCATCGA GCGGACAATC GACCATCTCG GCCCGATCAC ACGCACGGTC
CACGAAGCCG CACTGATGCT CTCGGTCATC GCCGTCGCG ACGGTAACGA CCCACGCCAA GCCGACAGCG TCGAAGCAGG
TGACTATCTG TCCACCCTCG ACTCCGATGT GGATGGTCTG CGAATCGGGA TCGTTCGAGA AGGTTTCGGG CACGCGGTCT
CACAGCCCGA GGTGACGAC GCAGTCCGCG CAGCGGCACA CAGTCTGACC GAAATCGGTT GCACGGTAGA GGAAATAAAC
ATCCCGTGGC ACCTGCATGC TTTCCACATC TGGAACGTGA TCGCCACGGA CGGTGGTGCC TACCAGATGT TGGACGGCAA
CGGATACGGC ATGAACCGCG AAGGTTTGTA CGATCCGGAA CTGATGGAAC ACTTTGCTTC TCGACGCATT CAGCACGCCG
ACGCTCTGTC CGAAACCGTC AAACTAGTGG CCCTGACCGG CCACCACGGC ATCACCGCCC TCGGCGGCGC GAGCTACGGC

```

AAAGCCCGGA ACCTCGTACC GCTCGCCCGC GCCGCCTACG AACTGCCTT GAGACAATTC GACGTCTGG TGATGCCAC
ACTGCCCTAC GTCGCATCCG AATTGCCGGC GAAGGACGTG GATCGTGCAA CCTTCATCAC GAAGGCTCTC GGGATGATCG
CCAACACGGC ACCATTTCGAC GTGACCGGAC ATCCGTCCCT GTCCGTTCCG ACCGGCCTGG TAAACGGGCT TCCGGTCGGA
ATGATGATCA CCGGCAAGAC CTTCGACGAT GCGACGGTCC TCCGGGTCGG GCGCGCATTC GAAAAGCTTC GCGGCGCGTT
TCCGACGCCT GCCGACCGCA TCTCCGACTC TGCACCACAA CTCAGCCTCA CCTAATCCTG TATCCGCACT TGCAACAACA

```

ami << >> *nha1*

```

ATTCCACCGA TTCACACATG ATCAGCCCGC ATAGAAAAGG TGAACCAGAT GTCAGTAACG ATCGACCACA CAACGGAGAA
CGCCGCACCG GCCCAGGCGC CGGTCTCCGA TCGCGCGTGG GCCCTGTTC GCGCACTCGA CGGTAAGGGA TTGGTACCCG
ACGGTTACGT CGAGGGATGG AAGAAGACCT TCGAGGAGGA CTTTACGTCCA AGGCGCGGAG CGGAATTGGT CCGCGGGCT
TGGACCGACC CCGATTTCGG GCAACTGCTT CTCACCGACG GTACCGCCGC GGTGCCCCAG TACGGATATC TGGGCCCCCA
GGGCGAATAC ATCGTGGCAG TCGAAGACAC CCCGACCTC AAGAACGTGA TCGTGTGCTC GCTGTGTTC TGCACCGCGT
GGCCATCCT CGGTCTGCCG CCGACCTGGT ACAAGAGTTT CGAATACCGT GCACGCGTGG TCCGCGAGCC ACGGAAGGTT
CTCTCCGAGA TGGGAACCGA GATCGCGTCG GACGTGCGA TCCGCGTCTA CGACACCACC GCCGAAACTC GTTACATGGT
CCTACCGCAA CGTCCCGCAG GCACCGAAGG CTGGAGCCAG GAACAACGTC AGGAAATCGT CACCAAGGAC TGCTGATCG
GCGTCCGAGT CCCGCAGGTC CCCACCGTCT GA

```

nha1 << >> *nha2*

```

CCACCCCG ACAAGAAAGA AGCACACCAT GGATGGAGTA CACGATCTTG
CCGGAGTTCA AGGCTTCGGC AAAGTCCCGC ATACCGTCAA CGCCGACATC GGCCCCACCT TCCACGCCGA GTGGGAACAC
CTGCCGTACA GCCTGATGTT CGCCGGTGTG GCCGAACTCG GGGCCTTCAG CGTCGACGAA GTTCGATACG TCGTCGAGCG
GATGGAGCCC CGCCACTACA TGATGACCCC GTACTACGAG CGGTACGTCA TCGGCGTCGC GGCCTGATG GTCGAAAAGG
GAATCCTGAC GCAGGAAGAG CTCGAAAGCC TTGCAGGAG ACCGTTCCTA CTCTCACGGC CAAGCGAATC CGAAGGCCGA
CCGGCTCGCG TCGACACAAC CACCTTCGAG GTCGGTCAGC GAGTACGTGT GCGAGACGAA TACGTTCCTG GGCATATTCG
AATGCCCTGT TACTGCCGAG GACGGGTGGG GACCATCGCT CACCGGACCA CCGAGAAGTG GCCGTTCCTG GACGCAATCG
GTCACGGCCG CAACGACGCC GGCGAAGAAC CCACCTACCA CGTGACGTTT GCTGCGGAGG AATTGTTCCG CAGCGACACC
GACGGCGGAA GCGTCGTTGT CGACCTCTT CAGGGTTACC TCGAGCCTGC GGCCTGATCT TCCAGCATTC CAGGCGGCGG

```

nha2 <<

```

TCACGCGATC GCAGCGGTTT GCGTGA

```

Obr. 10. Sekvence klastru genů *ami-nha* kmene *R. erythropolis* CCM2595

Modře jsou vyznačeny kódující oblasti genů. Červeně jsou vyznačeny předpokládané promotory a transkripční počátky genů pro amidázu a nitrilhydratázu.

6.2. Porovnání sekvencí klastru *ami-nha* u kmenů *R. erythropolis* CCM2595 a *R. erythropolis* A4

Úspěšná amplifikace úseků DNA pomocí PCR reakcí, v nichž byla jako templát použita DNA z kmene *R. erythropolis* CCM2595 a primery navržené na základě sekvence z kmene *R. erythropolis* A4, naznačovala, že sekvence DNA zkoumané oblasti chromozomů těchto kmenů mají vysoký stupeň podobnosti. Tento fakt byl potvrzen při porovnání kompletních sekvencí DNA. Průměrná úroveň identity sekvencí oblasti o velikosti 5,5 kb je 96 %, přičemž shoda sekvencí jednotlivých genů dosahuje až 98 %. Zajímavé hodnoty byly získány u mezigenových oblastí *oxd-nhr2*, *nhr2-nhr1*, *nhr1-ami*, *ami-nha1* a *nha1-nha2*, které obvykle bývají velice variabilní i u velmi příbuzných kmenů. Tyto oblasti totiž dosahovaly 94% až 100% shody. Přesné hodnoty uvádí tabulka 3.

Tab. 3.: Porovnání nukleotidových sekvencí *ami-nha* klastrů z *R. erythropolis* CCM2595 a *R. erythropolis* A4

Gen/mezigenová oblast	Shoda (%)	Shodné nt / celkem nt
celková sekvence	96	5316/5544
<i>oxd</i>	97	497/513
<i>nhr2</i>	94	346/370
<i>nhr1</i>	95	1172/1234
<i>ami</i>	98	1527/1566
<i>nha1</i>	97	608/624
<i>nha2</i>	93	597/639
<i>oxd-nhr2</i>	94	108/115
<i>nhr2-nhr1</i>	96	201/210
<i>nhr1-ami</i>	98	113/115
<i>ami-nha1</i>	100	71/71
<i>nha1-nha2</i>	100	25/25

Na základě nukleotidových sekvencí zkoumaných genů byly překladem do sekvence aminokyselin odvozeny sekvence příslušných proteinů. Porovnáním těchto sekvencí byl zjištěn poměrně velký rozdíl mezi proteiny odpovídající *ami-nha* klastrům kmenů CCM2595 a A4. Nitrilhydratázový regulátor 2 kmene CCM2595 má oproti kmenu A4 posunutý čtecí rámec od kodonu pro aminokyselinu v pozici 79. Tento posun způsobil, že protein Nhr2 kmene CCM2595 je pouze ze 65 % shodný s proteinem Nhr2 kmene A4. Ostatní proteiny podobné rozdíly nevykazovaly. Příslušné hodnoty porovnání uvádí tabulka 4. Z důvodu nekompletní sekvence genu *oxd* u kmene CCM2595 byl pro překlad použit čtecí rámec odpovídající genu *oxd* kmene A4. Podrobné porovnání proteinů Nhr2 obou kmenů lze vidět na obrázku 11.

Tab. 4.: Porovnání sekvencí aminokyselinových zbytků proteinů *ami-nha* klastru *R. erythropolis* CCM2595 a kmene A4

Protein	Shoda (%)	shodné AK/cekem AK
Oxd	98	169/172
Nhr2 ¹	100	78/78
Nhr2 ²	65	80/123
Nhr1	97	397/410
Ami	98	509/521
Nha1	100	207/207
Nha2	97	205/212

¹ Porovnání prvních 78 aminokyselinových zbytků

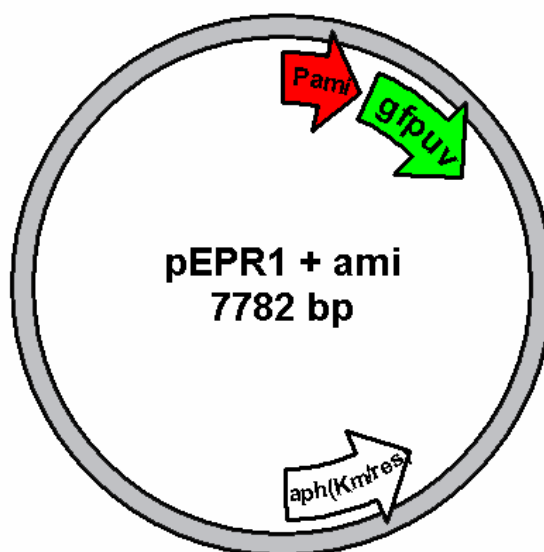
² Porovnání celého proteinu Nhr2

CCM	1	MTTQRNEELAFVLADQVRRQILDTLATHGECNAGFISDQISTVGRTTVSTHLKALRLSG	60
A4	1	MTTQRNEELAFVLADQVRRQILDTLATHGECNAGFISDQISTVGRTTVSTHLKALRLSG	60
CCM	61	VIVERRQGRHRLFSIDPSGPANDALQFLRDVLGRALEAGSNASELPTTATEDSDAASVRR	120
A4	61	VIVERRQGRHRLFSIDPS.....R.....A.....	
CCM	121	RA. 122	
A4		...	

Obr. 11. Porovnání proteinů Nhr2 kmenů CCM2595 a A4

6.3. Měření aktivity promotorů

Jediný promotor klasteru *ami-nha*, který byl přesně zmapován stanovením počátku transkripce, byl nalezen před genem *ami* (M. Pátek nepublikované výsledky). Práce se proto zaměřila na stanovení aktivity promotoru *Pami*. Promotory genů *ami* a *nha1+nha2* jsou obvykle indukovány různými nitrily nebo amidy. K měření aktivity promotoru byl využit *promotor-probe* vektor pEPR1, který umožňuje vytvoření transkripční fúze mezi sledovaným promotorem a reportérovým genem *gfpuv*, který kóduje zeleně fluoreskující protein Gfp. Koncentraci tohoto proteinu lze měřit fluorescenčně, čímž se stanoví také aktivita promotoru. Míra exprese genu *gfpuv* je totiž přímo závislá na aktivitě vloženého promotoru. Příprava konstruktů na základě vektoru pEPR1 byla důležitým krokem této diplomové práce. Pro tento účel byl v PCR reakci pomocí primerů PAMIF1 a CCMPAMIR1 amplifikován fragment DNA (479 bp) nesoucí promotor *Pami* z *R. e.* CCM2595. Fragment nesl na jednom konci zásahové místo pro restriční endonukleázu BglII, zatímco druhý konec byl ponechán tupý pro klonování do zásahového místa pro enzym SmaI. Tento fragment byl štěpen enzymem BglII a ligován do vektoru pEPR1 štěpeného restričními endonukleázami SmaI a BamHI. Ligační směsí byly transformovány buňky *E. coli* a transformanti byli selektováni na miskách s kanamycinem. Z 24 klonů byla izolována plazmidová DNA a podle velikosti (7,8 kb) byl identifikován požadovaný konstrukt. Konstrukt pEPR1+ami (Obr. 12) byl izolován z *E. coli* a poté jím byly transformovány buňky *R. erythropolis* CCM2595.



Obr. 12: Konstrukt nesoucí promotor *Pami* v promotor-probe vektoru pEPR1

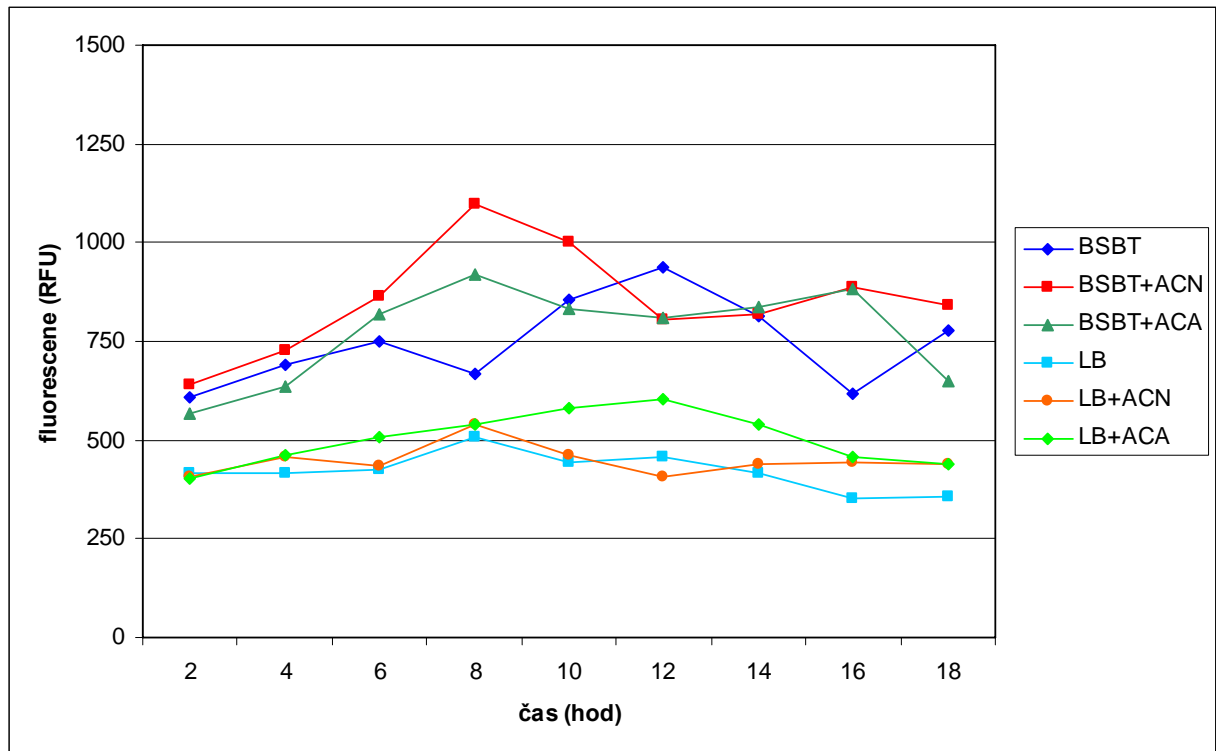
Pami – vložený insert s promotorovou oblastí genu pro amidázu z *R. erythropolis* CCM2595, *gfpuv* – gen pro zeleně fluoreskující protein Gfp, *aph* (Km/res) - gen pro rezistenci vůči kanamycinu

Z narostlých kolonií *R. erythropolis* byl vybrán klon (A) u kterého byla potvrzena přítomnost vytvořeného konstrukt. Konstrukt byl izolován a jeho velikost byla porovnána s výchozím vektorem izolovaným z *E. coli*. Přítomnost vloženého insertu byla potvrzena pomocí PCR reakcí, při kterých byla ověřena jeho velikost a orientace ve vektoru. Klon (A) byl následně použit pro měření aktivity promotoru *Pami* pomocí měření fluorescence proteinu Gfp. K tomuto měření byl využit také klon B obsahující konstrukt pEPR1 + *Pami* z *R. erythropolis* A4 a klon C nesoucí samotný vektor pEPR1. Tyto klony byly získány již dříve v Laboratoři molekulární genetiky bakterií. Přesné složení testovaných klonů uvádí tabulka 5. pro porovnání úrovně indukce byla měřena aktivita promotoru *PpheA2*, který je silně indukován fenolem. Tento promotor byl součástí konstrukt pEPR1*pheA2*, který byl přítomen v buňkách kontrolního klonu *R. erythropolis* CCM2595 (klon D). Získané hodnoty u tohoto klonu byly využity jako referenční pro případ indukce promotoru *Pami*.

Tab. 5.: Klony *R. erythropolis* použité pro měření aktivity promotorů a kontrolní kmeny

Klon	Vektor	Insert	Zdroj insertu	Hostitelský organizmus
A	pEPR1	<i>Pami</i>	<i>R. e.</i> CCM2595	<i>R. e.</i> CCM2595
B	pEPR1	<i>Pami</i>	<i>R. e.</i> A4	<i>R. e.</i> CCM2595
C	pEPR1	-	-	<i>R. e.</i> CCM2595
D	pEPR1	<i>PpheA2</i>	<i>R. e.</i> CCM2595	<i>R. e.</i> CCM2595

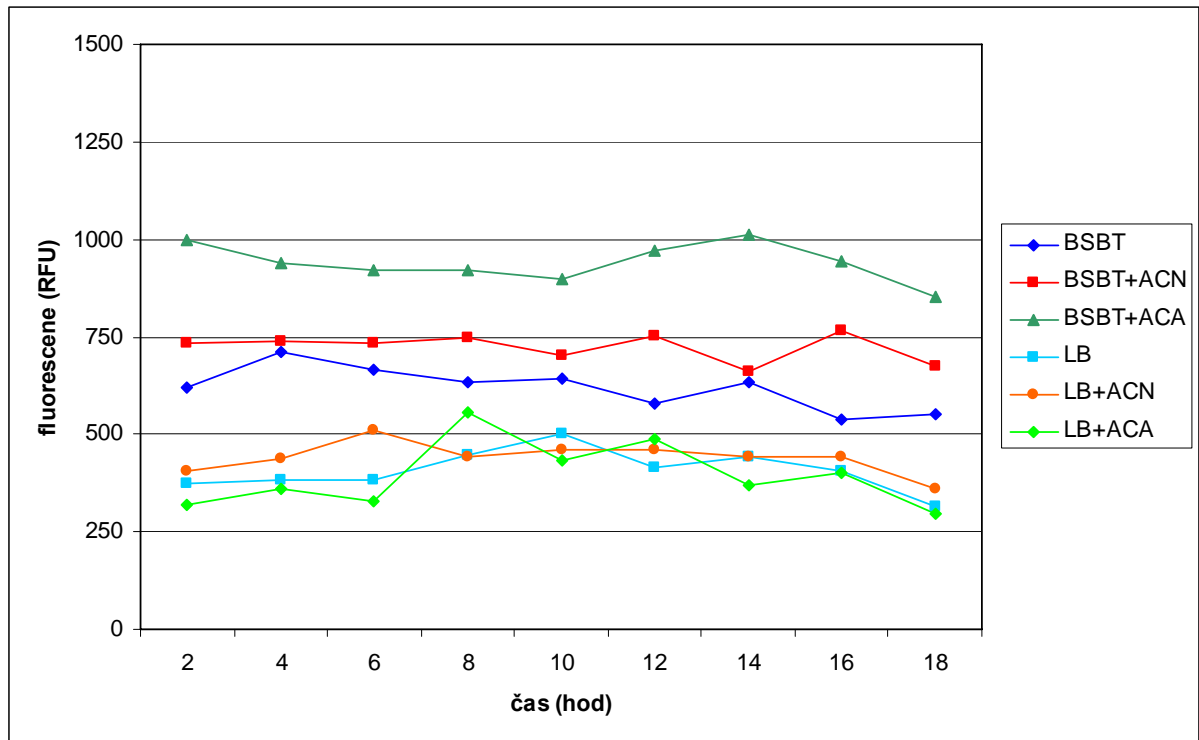
Pro měření fluorescence byly získávány vzorky během kultivace jednotlivých klonů v LB či v minimálním médiu BSBT. Buňky kultivované v LB médiu sloužily jako kontrola a neočekávala se u nich vysoká aktivita promotoru *Pami*. Základní média byla modifikovaná přidáním potenciálních induktorů – acetamidem (ACA) a acetonitrilem (ACN). Vzniklo tak šest různých typů médií: LB, LB+ACA, LB+ACN, BSBT, BSBT+ACA, BSBT+ACN. Kultivace probíhala po dobu osmnácti hodin. Odběry byly prováděny každou druhou hodinu. Výsledky z měření fluorescence (tedy aktivity promotorů) ukazují Obr. 13, 14 a 15.



Obr 13.: Aktivita promotoru *Pami* z *R. erythropolis* CCM2595 v médiích BSBT a LB

Stanovení aktivity promotoru *Pami* v médiích BSBT (tmavěmodrá), s přidavkem acetonitrilu (červená) či acetamidu (tmavězelená) a v médiích LB (světlemodrá), s přidavkem acetonitrilu (oranžová) a acetamidu (světlezelená). Aktivita promotoru *Pami* byla stanovena jako intenzita fluorescence proteinu Gfp v *R. erythropolis* CCM2595 nesoucí konstrukt pEPR1+*Pami*. RFU – jednotka relativní fluorescence

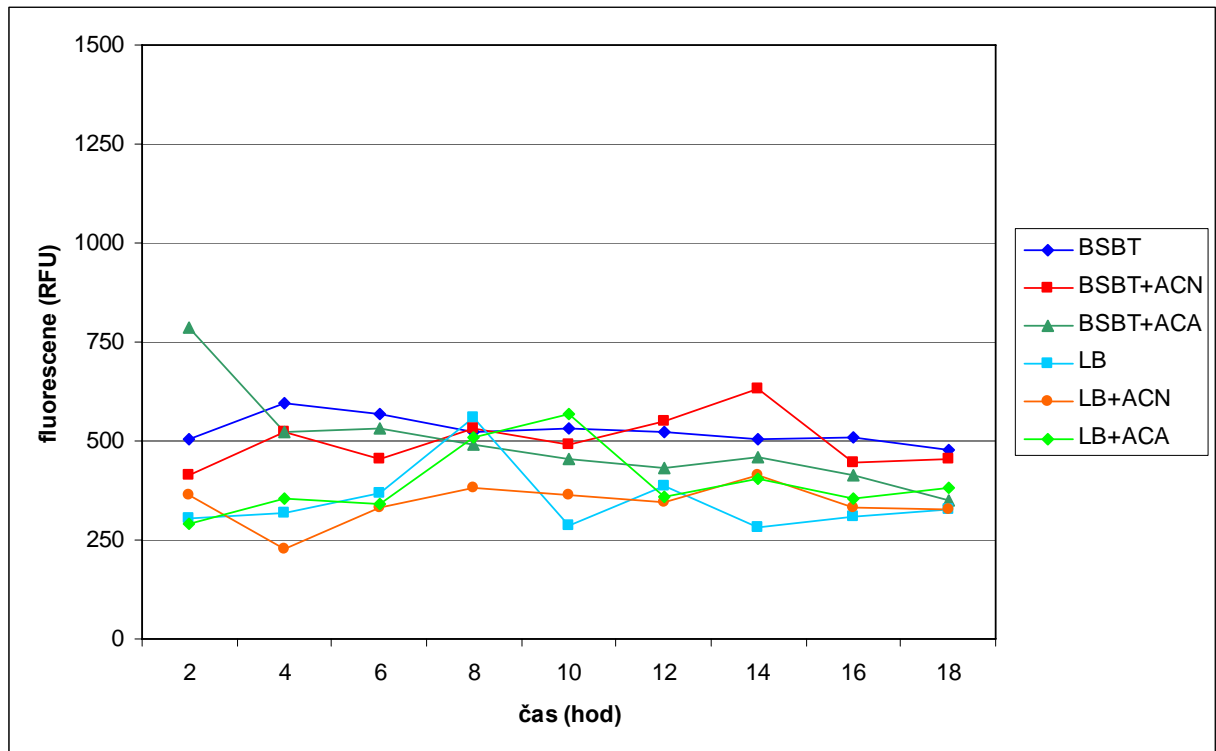
Aktivita promotoru *Pami* z *R. erythropolis* CCM2595 byla v médiích založených na LB přibližně o polovinu nižší než v médiích na základě BSBT. Aktivity promotoru *Pami* v médiích LB a LB+ACA vykazovaly podobný charakter a dosahovala 400-550 RFU. V médiu LB+ACN byl pozorován mírný vzestup fluorescence od začátku kultivace do 12. hodiny odpovídající 400-600 RFU. V BSBT médiích (BSBT, BSBT+ACA, BSBT+ACN) byl ve všech případech pozorován mírný nárůst fluorescence s maximem v 8. – 12. hodině kultivace. Maximální míry fluorescence dosahovaly buňky v médiu BSBT+ACN (1100 RFU).



Obr. 14.: Aktivita promotoru *Pami* z *R. erythropolis* A4 v BSBT a LB typech medií

Stanovení aktivity promotoru *Pami* v médiích BSBT (tmavěmodrá), s přidavkem acetonitrilu (červená) či acetamidu (tmavězelená) a v médiích LB (světlemodrá), s přidavkem acetonitrilu (oranžová) a acetamidu (světlezelená). Aktivita promotoru *Pami* byla stanovena jako intenzita fluorescence proteinu Gfp v *R. erythropolis* CCM2595 nesoucí konstrukt pEPR1+*Pami*. RFU – jednotka relativní fluorescence

Měření aktivity promotoru *Pami* z *R. erythropolis* A4 bylo provedeno za účelem dalšího porovnání kmenů A4 a CCM2595. Z grafu je vidět, že aktivita promotoru *Pami* z kmene A4 v jednotlivých médiích je podobná jako aktivita tohoto promotoru z kmene CCM2595. I zde se hodnota fluorescence v LB médiích pohybuje kolem 400-500 RFU a je cca o polovinu nižší než průměrná hodnota v BSBT médiích. Hodnoty fluorescence jsou spíše konstantní a nedochází k růstu intenzity fluorescence během růstu jako u promotoru *Pami* z *R. erythropolis* CCM2595. Nejintenzivnější fluorescence byla zaznamenána u buněk rostoucích v BSBT médiu s acetamidem.

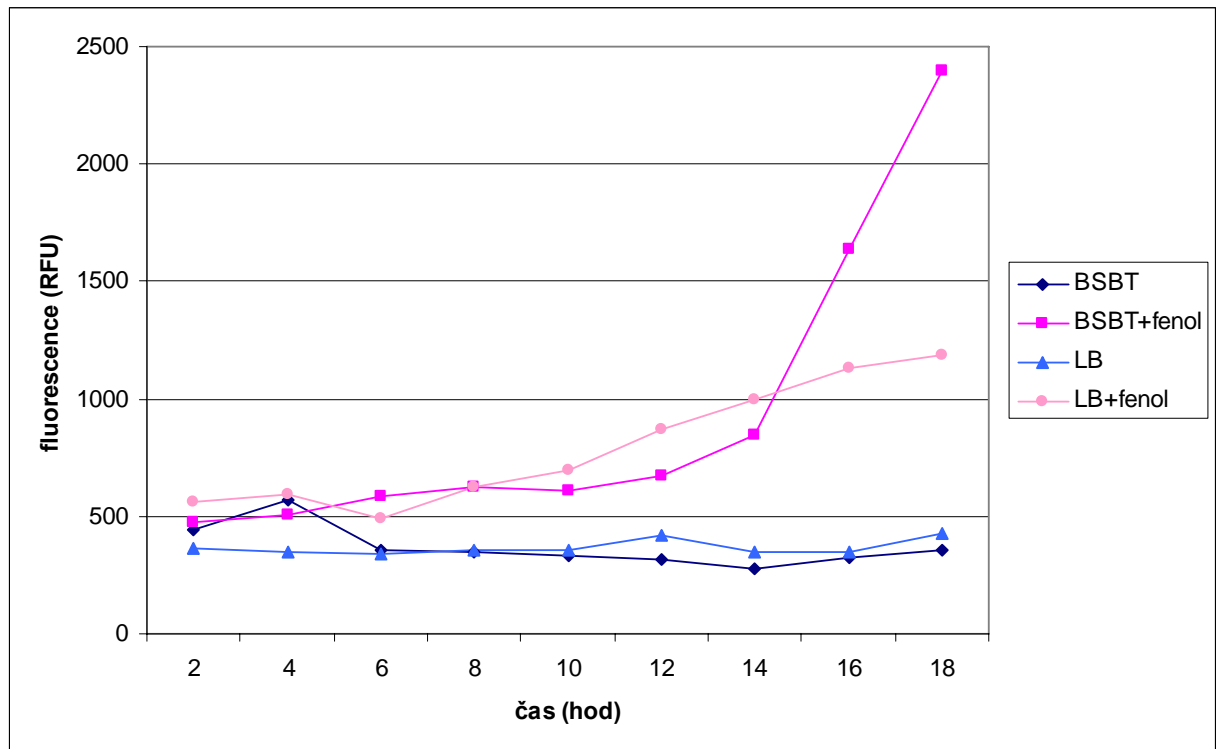


Obr 15.: Fluorescence buněk *R. erythropolis* CCM2595 nesoucích *promotor-probe* vektor pEPR1 bez vloženého promotoru.

Stanovení míry fluorescence buněk *R. erythropolis* CCM2595 v médiích BSBT (tmavěmodrá), s přidavkem acetonitrilu (červená) či acetamidu (tmavězelená) a v médiích LB (světlemodrá), s přidavkem acetonitrilu (oranžová) a acetamidu (světlezelená). Míra fluorescence byla dána množstvím proteinu Gfp v *R. erythropolis* CCM2595 nesoucí prázdný *promotor-probe* vektor pEPR1. Toto měření bylo provedeno jako kontrola k měřením obr. 13, 14 a 16.

RFU – jednotka relativní fluorescence

Pro stanovení pozadí měření fluorescence v kmenech nesoucích plazmid pEPR1 s promotory byla změřena fluorescence buněk *R. erythropolis* CCM2595 obsahujících prázdný vektor pEPR1. Hodnoty intenzity fluorescence buněk rostoucích v BSBT typech médií byly přibližně konstantní a pohybovaly se kolem 500 RFU. Fluorescence buněk rostoucích v médiích na základě LB jen mírně oscilovala mezi hodnotami 250-500 RFU.



Obr. 16.: Aktivita promotoru *PpheA2* z *R. erythropolis* CCM2595 v BSBT a LB typech medií

Stanovení aktivity promotoru *PpheA2* v médiích BSBT (tmavěmodrá), s přidavkem fenolu (tmavěfialová) a v médiích LB (světlemodrá), s přidavkem fenolu (světlefialová). Aktivita promotoru *PpheA2* byla stanovena jako intenzita fluorescence proteinu Gfp v *R. erythropolis* CCM2595 nesoucí konstrukt pEPR1+ *PpheA2*.

RFU – jednotka relativní fluorescence

U promotoru genu *ami* se předpokládalo, že bude indukován amidem nebo nitrilem přítomným v minimálním médiu. Pro porovnání byl použit promotor *PpheA2* u něhož byla popsána silná indukce fenolem (M. Pátek, nepublikované výsledky). Z tohoto promotoru jsou přepisovány geny *pheA2* a *pheA1*, které kódují podjednotky fenolhydroxylázy, enzymu, který katalyzuje první reakci aerobní degradace fenolu. Z grafu lze vidět, že fluorescence v BSBT médiu bez induktoru je nízká a pohybuje se kolem 400 RFU. V BSBT médiu s přidavkem fenolu fluorescence buněk po 14 h kultivace prudce vzrůstala téměř až k 2500 RFU. V LB médiu bez fenolu byla fluorescence buněk také velmi nízká zatímco v LB s fenolem došlo k jejímu významnému nárůstu přes 1000 RFU. Indukce promotoru *PpheA2* tak posloužila jako typický příklad indukované exprese a je možné ho porovnávat s průběhem exprese z promotoru *Pami*.

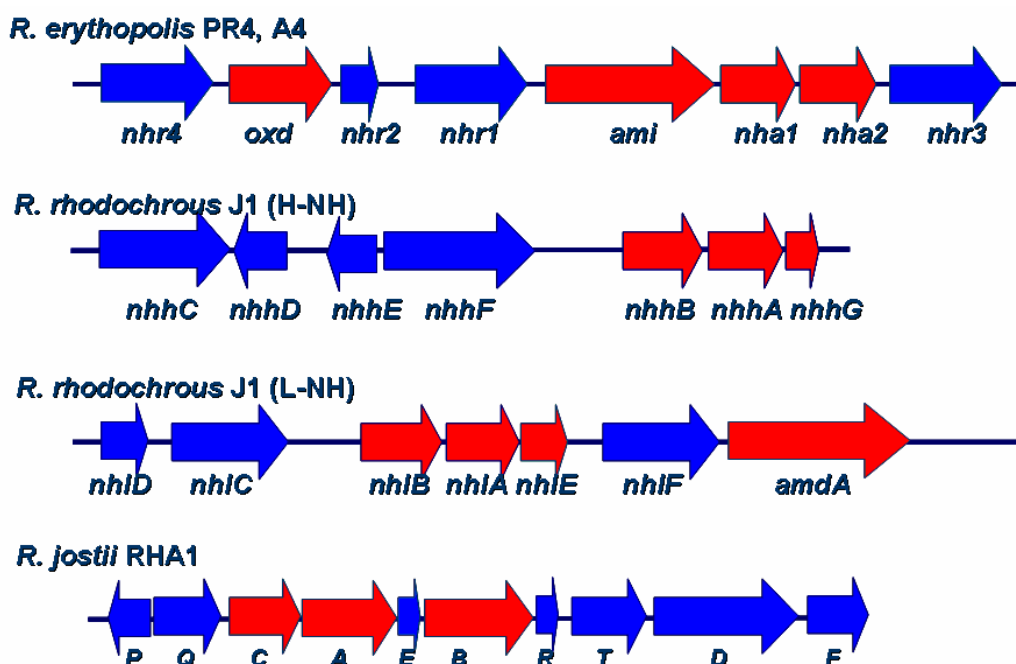
7. Diskuze

Předmětem této diplomové práce bylo studium genů kódujících amidázu (*ami*) a nitrilhydratázu (*nha1+nha2*) u kmene *R. erythropolis* CCM2595. U tohoto kmene byla již dříve popsána schopnost degradovat řadu chemických látek, např. fenol, katechol, naftalen, p-hydroxybenzoát a další (MASAK 2005). Dále u něj byla prokázána rezistence k řadě toxických látek, či tvorba biofilmů, což jsou vhodné vlastnosti pro využití bakteriálních kmenů v biotechnologiích. Byly také zkonstruovány plazmidové vektory replikující se v buňkách *E. coli* a *R. erythropolis* CCM2595 (VESELÝ 2006). U tohoto kmene byly zavedeny metody genových manipulací a ověřeny metody chromozomových modifikací. (MASAK 2005). Tato práce navazuje na genetické analýzy kmene *R. erythropolis* CCM2595 a je zaměřena na analýzu genů kódujících amidázu (*ami*) a nitrilhydratázu (*nha*). Cílem práce bylo určení jejich organizace v chromozomu, stanovení jejich nukleotidové sekvence a studium aktivity promotoru genu *ami* (*Pami*).

V předchozí práci v Laboratoři molekulární genetiky bakterií Mikrobiologického ústavu AV ČR byl studován kmen *R. erythropolis* A4, který je účinným producentem amidázy a nitrilhydratázy. Příslušné geny (*ami* a *nha1+nha2*) byly z kmene izolovány a úsek chromozomu (9,5 kb, 9 genů), který je zahrnoval, byl sekvenován. Při pokusech vnášet do tohoto kmene plazmidové vektory a provádět další genové modifikace se ukázalo, že tento kmen není k takovým manipulacím vhodný. Pozornost se proto obrátila k příbuznému kmeni *R. erythropolis* CCM2595, který byl studován jako degradér fenolu a u kterého byly manipulace s využitím plazmidů rutinně prováděny. Protože tento kmen nevykazoval tak výrazné aktivity amidázy a nitrilhydratázy, bylo cílem zjistit, zda kmen obsahuje homologní geny *ami* a *nha1+nha2* a jak je regulována jejich exprese.

Pomocí PCR reakcí bylo zjištěno, že mezi kmény *R. erythropolis* A4 a *R. erythropolis* CCM2595 existuje výrazná podobnost sekvencí DNA v oblasti genů *ami* a *nha1+nha2*. Tato oblast chromozomu z kmene *R. erythropolis* CCM2595 byla v této práci izolována a sekvenována. V kompletní sekvenci DNA byly nalezeny otevřené čtecí rámce, které byly porovnány se známými homologními sekvencemi z jiných rhodokoků a bylo určeno přesné umístění jednotlivých genů. Sekvence DNA těchto genů a sekvence aminokyselin v jejich dedukovaných produktech (proteinech) byly porovnány s již známými sekvencemi odvozenými ze souboru genů *oxd*, *nhr2*, *nhr1*, *ami*, *nha1*, *nha2* a *nhr3* kmene *R. erythropolis* A4 (databáze GenBank, Acc. No AM946017). Bylo zjištěno, že shoda sekvencí DNA jednotlivých genů dosahuje až 98 %. Shoda mezigenových oblastí *oxd-nhr2*, *nhr2-nhr1*, *nhr1-ami*, *ami-nha1* a *nha1-nha2* byla 94 % až 100 % a shoda v sekvenci aminokyselinových

zbytků jednotlivých proteinů se pohybovala mezi 97 % až 100 %. Výjimkou byl regulátor Nhr2, který měl u kmene CCM2595 oproti kmenu A4 posunutý čtecí rámec od kodonu pro aminokyselinu v pozici 79. Bylo zjištěno, že organizace genů *ami-nha* klastru z kmene *R. erythropolis* CCM2595 je stejná jako organizace těchto genů u kmene *R. erythropolis* A4. Hlavní odlišnost těchto dvou kmenů tedy spočívá v rozdílném produktu genu *nhr2*. U dalších kmenů rhodokoků jsou dlišně organizované *ami-nha* klastry genů. Na Obr. 17. je porovnání organizace těchto genů u typických zástupců kmenů produkujících jiné typy amidáz a nitrilhydratáz.



Obr. 17.: Organizace *ami-nha* klastru genů v rhodokokách

amidázy – *ami*, *amdA*, *C*, nitrilhydratázy – *nha1*, *nha2*, *nhhB*, *nhhA*, *nhlE*, *A*, *B*, regulační geny – *nhr4*, *nhr2*, *nhr1*, *nhr3*, *nhhC*, *nhhD*, *nhlD*, *nhlC*, *P*, *Q*, *R*, aldoximdehydrogenáza – *oxd*, transponáza – *nhhF*, acetyl Co-A hydratáza – *T*, *D*, *F*, enzym zajišťující Co transport – *nhlF*

Měření aktivit enzymů amidázy a nitrilhydratázy z kmene *R. erythropolis* A4 i výsledky Northern hybridizace DNA z oblasti genů *ami*, *nha1* a *nha2* naznačovaly, že exprese těchto genů je konstitutivní (O. Volkova, nepublikované výsledky). U řady amidáz, nitriláz a nitrilhydratáz je však jejich tvorba indukována nitrily nebo amidy (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2009). Promotor genu pro amidázu z *R. erythropolis* A4 byl již dříve identifikován stanovením transkripčního počátku, ale jeho aktivita a případně indukovatelnost nitrily nebo amidy nebyla testována. Funkci promotoru *Pami* naklonovaného v promoter-probe vektoru pEPR1 nebylo možné v kmene *R. erythropolis* A4 testovat, protože plazmid podléhal

pravděpodobně nekontrolovatelným rekombinacím. Proto byla aktivita promotoru *Pami* v transkripční fúzi s reportérovým genem *gfp* testována v kmeni *R. erythropolis* CCM2595, v němž měla sekvence klastru genů *ami-nha* a jejich okolí vysoký stupeň identity se sekvencí z *R. erythropolis* A4. Aktivita promotoru *Pami* z kmene A4 byla pak porovnána s aktivitou homologního promotoru *Pami* z kmene CCM2595 ve stejném systému. Fluorescence proteinu Gfp byla měřena u buněk kultivovaných v médiích LB, BSBT a jejich modifikacích vzniklých přidáním potenciálních induktorů – acetamidem (ACA) a acetonitrilem (ACN).

U obou promotorů byly hodnoty naměřené fluorescence v kompletním médiu nižší než v minimálním a tyto hodnoty byly na úrovni fluorescence naměřené v buňkách obsahujících prázdný vektor pEPR1. Přítomnost potenciálních induktorů (acetamidu a acetonitrilu) v kompletním médiu neměla na aktivitu promotorů významný vliv. V kompletním médiu jsou pravděpodobně přítomny substráty (zdroje C a N), které způsobují úplnou represi promotoru *Pami*. V minimálním médiu byl průběh aktivit promotoru *Pami* z CCM2595 ve všech případech velmi podobný a vliv potenciálních induktorů ACA a ACN na aktivitu promotorů nebyl prokazatelný. Během kultivace došlo pouze mezi 2. a 8. hodinou k určitému nárůstu aktivit, v dalším průběhu růstu se však aktivity téměř neměnily. Lze uzavřít, že exprese z promotoru *Pami* z CCM2595 je konstitutivní.

Poněkud odlišný byl průběh aktivity promotoru *Pami* z kmene A4. Hodnoty aktivit promotoru byly v minimálním médiu s přidavkem acetonitrilu (jako zdroje N) v celém průběhu kultivace přibližně o 20 % vyšší než v médiu do něhož acetonitril přidán nebyl a kde zdrojem N byl NH_4NO_3 . V případě kde zdrojem N byl acetamid, byly aktivity promotoru v celém průběhu kultivace přibližně o 40 % vyšší než bez jeho přidavku. Funkce tohoto promotoru byla tedy zčásti konstitutivní a zčásti indukována acetonitrilem a acetamidem. Je však třeba vzít v úvahu, že měření aktivity promotoru *Pami* z kmene A4 probíhalo v heterologním systému, kde hostitelem plazmidu pEPR1-*Pami* s promotorem z *R. erythropolis* A4 byl kmen *R. erythropolis* CCM2595.

Měření aktivity promotoru *PpheA2* z *R. erythropolis* CCM2595 v minimálním i kompletním médiu potvrdilo, že fenol v médiu způsobuje silnou indukci exprese genu *pheA2*, jak bylo již dříve zjištěno. Toto měření sloužilo jako kontrola a příklad systému, kde aktivita promotoru je převážně indukovaná substrátem.

8. Souhrn

Hlavními cíli této diplomové práce byla analýza genů kódujících amidázu (*ami*) a nitrilhydrazázu (*nha*) u kmene *Rhodococcus erythropolis* CCM2595, určení jejich organizace v chromozomu, stanovení jejich nukleotidové sekvence a zjištění způsobu regulace jejich exprese. Bylo dosaženo těchto konkrétních výsledků:

- 1) Byla získána kompletní nukleotidová sekvence oblasti genů *oxd*, *nhr2*, *nhr1*, *ami*, *nha1*, *nha2* a *nhr3* z kmene *R. erythropolis* CCM2595 a zjištěna jejich organizace na chromozomu. Upořádání genů (všechny jsou orientovány ve stejném směru) připomíná strukturu operonu.
- 2) Byla porovnána organizace a sekvence genů z oblasti *ami* a *nha1+nha2* kmene *R. erythropolis* CCM2595 a jejich produktů (proteinů) s odpovídajícími údaji kmene *R. erythropolis* A4. Shoda sekvencí DNA jednotlivých genů dosahuje až 98 %. Shoda mezigenových oblastí *oxd-nhr2*, *nhr2-nhr1*, *nhr1-ami*, *ami-nha1* a *nha1-nha2* je 94 % až 100 % a shoda v sekvenci aminokyselinových zbytků jednotlivých proteinů se pohybuje mezi 97 % až 100 %.
- 3) Bylo zjištěno, že C-konec regulátoru Nhr2 se u kmenů *R. erythropolis* CCM2595 a *R. erythropolis* A4 liší vlivem posunu čtecího rámce.
- 4) S využitím plazmidového *promotor-probe* vektoru pEPR1 byl sestrojen konstrukt pEPR1+*Pami* nesoucí promotorovou oblast genu *ami* (*Pami*) z kmene *R. erythropolis* A4 v transkripční fúzi s genem pro zeleně fluoreskující protein Gfp.
- 5) Způsob regulace exprese genů *ami* z *R. erythropolis* CCM2595 a *R. erythropolis* A4 byl studován prostřednictvím testování aktivit jejich promotorů *Pami* s použitím připravených konstruktů pEPR1+*Pami* z obou kmenů v kmenu *R. erythropolis* CCM2595. Bylo zjištěno že exprese genu *ami* z *R. erythropolis* CCM2595 je konstitutivní a exprese genu *ami* z *R. erythropolis* A4 je zčásti konstitutivní a zčásti indukovaná acetonitrilem a acetamidem.

9. Seznam literatury

1. About, I., Castan, B., Capdeville, J., Vanche, J. (1996): Cavitory pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in HIV infection. *Revue de Medecine Interne* 17, 410-414.
2. Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Khamis, A. (1991): Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7, 53-61.
3. Asselineau, J., Lederer, E. (1950): Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature* 166, 782-783.
4. Banerjee, A., Sharma, R. (2002): The nitrilase-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 33-44.
5. Birnboim, H.C. (1983): A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243.
6. Cameron, G.W.W., Jordna, K.N., Holt, P.J., Baker, P.B., Lowe, C.R., Bruce, N.C. (1994): Identification of heroin esterase in *Rhodococcus* sp. strain H1. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3881-3883.
7. Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., van Montanu, M., Desomer, J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO Journal* 11, 795-804.
8. Crosby, J., Moilliet, J., Parratt, J.S., Turner, N.J. (1994): Regioselective hydrolysis of aromatic dinitrils using a whole-cell catalyst. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1679-87.
9. De Mot, R., Nagy, I., De Schrijver, A., Pattanapitpaisal, P., Schoofs, G., Vanderleyden, J. (1997): Structural analysis of the 6kb cryptic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 and construction of *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiology* 143, 3137-3147.
10. Doten R.C., Ornston L.N. (1987) Protocatechuate is not metabolized via catechol in *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriol* 169, 5827-30.
11. Egger, L.A., Park, H., Inouye, M. (1997): Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* 2, 167-84.
12. Finnerty, W.M. (1992): The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Review of Mikrobiology* 46, 193-218.
13. Finnerty, W.M. (1994): Biosurfactants in enviromental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 291-295.
14. Finnerty, W.M., Singer (1988): Construction of an *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* species. *J. Bacteriol.* 170, 638-645.

15. Goodfellow, M. (1989): Genus *Rhodococcus*. In: Williams, S.T., Sharp, M.E., Holt, J.G. (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 2333-2339.
16. Gurtler, V., Mayall, B.C., Senior, R. (2004): Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiol Rev* 28, 377.
17. Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
18. Hashimoto, Y., Nishiyama, M., Yu, F., Watanabe, I., Horinouchi, S., Beppu, T. (1992): Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1003-1010.
19. Hardisson C., Sala-Trepas J.M., Stainer R.Y. (1969) Pathways for the oxidation of aromatic compounds by *Azotobacter*. *J Gen Microbiol* 59, 1-11.
20. Haykawa, T., Tanaka, T., Sakaguchi, K., Otake, N. Yonehara, H. (1979): A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 255-260.
21. Jallageas, J.C., Arnaud, A., Galzy, P. (1980): Bioconversion of nitriles and their applications. *Adv Biochem Eng* 14, 1-32.
22. Kato, Y., Yoshida, S., Asano, Y. (2005): Polymerase chain reaction for identification of aldoxime dehydratase in aldoxime- or nitrile-degrading microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 246, 243-249.
23. Klatt, S., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A. (1994): *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusually nutritionally versatile *Rhodococcus* species. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 355-360.
24. Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H. (1992a): Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J Biol Chem* 267, 20746-20751.
25. Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H. (1992b): Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry* 31, 9000-9007.
26. Kobayashi, M., Komeda, H., Nagasawa, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S., Beppu, T., Yamada, H., Shimizu, S. (1993): Amidase coupled with low molecular-mass nitrile hydratase from *Rh. rhodochrous* J1. *European Journal of Biochemistry* 217, 327-336.
27. Kobayashi, M., Yamada, H. (1996): Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60, 1391-1400.
28. Komeda, H., Hori, Y., Kobayashi, M., and Shimizu, S. (1996a): Transcriptional regulation of the *Rhodococcus rhodochrous* J1 *nitA* gene encoding nitrilase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10572.

29. Komeda, H., Kobayashi, M., Shimitzu, S., (1996b): Characterization of the gene cluster of high molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4267-4272.
30. Larkin, M.J., De Mot, R., Kulakov, L.A., Nagy, I. (1998): Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74, 133.
31. Larkin, M.J., De Mot, R., Kulakov, L.A., Allen, C.C. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol* 16, 282.
32. Lawson, E.N., Gantotti, B.V., Starr M.P. (1982): A 78-megadalton plasmid ours in avirulent as well as virulent strains of *orynebaterium fasians*. *Curr. Microbiol.* 7:327-32
33. Lechevalier, H.A. (1989): Nocardioform actinomycetes. In: Williams, S.T., Sharp, M.E., Holt, J.G. (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bakteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 2348-2350.
34. Maestracci, M., Thiery, A., Arnaud, A., Galzy, P. (1984): Activity and regulation of an amidase (acylamide amidohydrolase, EC 3.5.1.4) with a wide substrate spectrum from a *Brevibacterium* sp. *Archives of Microbiology* 138, 315-320.
35. Martínková, L., Uhnátová, B., Pátek, M., Nešvera, J., Křen, V. (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int* 35, 162-177.
36. Masak, J. (2005): Colonization of surfaces by phenolic compounds utilizing microorganisms. *Environ Int* 31: 197-200.
37. Mascelliano, M.T., Iona, E., Ponzo, R., Mastroianni, C.M., Delia, S. (1994): Infections due to *Rhodococcus equi* in 3 HIV-infected patients. Microbiological findings and antibiotics susceptibility. *International Journal of Clinical Pharmacology Research* 14, 157-163.
38. O'Reilly, C., Turner, P.D. (2003): The nitrilase family CN hydrolysing enzymes a comparative study. *J Appl Microbiol* 95, 1161-1174.
39. Pisabarro, A., Correia, A., Martin, J.F., (1998): Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Rhodococcus fascians*: genome size and linear and circular replicon composition in virulent and avirulent strains. *Curr Microbiol* 36, 302.
40. Prescott, J.F. (1991): *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Mikrobiology* 4, 20-34.
41. Rainey, F.A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R.M., Klatte, S., Stackebrandt, E. (1995): Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Mikrobiology* 141, 523-528.
42. Ruimy, R., Boiron, P., Boivin, V., Christen, R. (1994): A phylogeny of the genus *Nocardia* deduced from the analysis of small subunit ribosomal DNA sequences, including the transfer of *Nocardia amarae* to the genus *Gorgona* as *Gorgona amarae* comb. nov. *FEMS Mikrobiology Letters* 123, 261-268.

43. Scott, M.A., Graham, B.S., Verrall, R., Dixon, R., Schaffner, W., Tham, K.T. (1995): *Rhodococcus equi* – an increasingly recognized opportunistic pathogen – report of 12 cases and review of 65 cases in the literature. *American Journal of Clinical Pathology* 103, 649-655.
44. Stecker, C., Johann, A., Herzberg, C., Averhoff, B., Gottshalk, G. (2003) Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. *J Bacteriol* 185, 5269.
45. Sutcliffe, I.C., Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998 74, 49-58.
46. Vejvoda, V., Švéda, O., Kaplan, O., Přikrylová, V., Elišáková, V., Himl, M., Kubáč, D., Pelantová, H., Kuzma, M., Křen, V., Martínková, L. (2007) Biotransformation of heterocyclic dinitriles by *Rhodococcus erythropolis* and fungal nitrilases. *Biotechnol Lett* 29, 1119-1124.
47. Veselý, M. (2006): Vývoj a využití genových manipulací u kmene *Rhodococcus erythropolis* degradující fenol.