

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

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Mikrobiologie



Bc. Šimon Vobruba

Substrátová specifita adenylačních domén synthetas v sekundárním metabolismu

The substrate specificity of adenylation domains of synthetases in secondary metabolism

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2015

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 dne

.....

Šimon Vobruba

Poděkování:

Zde bych chtěl poděkovat svému školiteli Jiřímu Janatovi za vedení diplomové práce a Stanislavu Kadlčíkovi za pomoc při návrhu pokusů i cenné rady v průběhu práce. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře za pomoc i vytvoření přátelského prostředí.

Tato diplomová práce byla vypracována v období říjen 2013 – duben 2015 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu. Práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy grantovým projektem CZ.1.07/2.3.00/20.0055. Za finanční podpory Nadace Českého literárního fondu a Nadání Josefa, Marie a Zdenky Hlávkových mi bylo umožněno zúčastnit se vědecké konference „International Symposium on the Biology of *Actinomycetes*, Turecko 2014“ a získat zde cenné poznatky a zkušenosti.

Abstrakt

Klíčovým krokem biosyntézy linkosamidových antibiotik je kondenzace řízená oligomerním enzymem linkosamidsyntetázou (LS). Tento unikátní enzym katalyzuje spojení aminokyselinové a aminocukerné složky obou linkosamidů – linkomycinu a celesticetinu. Jednou z nejdůležitějších komponent LS je adenylační doména rozpoznávající a aktivující aminokyselinové prekurzory. Substrátová specifita adenylační domény je určena souborem 10 aminokyselinových zbytků, nazývaných neribozomální kód, jejichž postranní řetězce jsou v kontaktu se substrátem. Homologní adenylační domény LmbC z biosyntézy linkomycinu a CcbC z biosyntézy celesticetinu aktivují odlišné aminokyselinové prekurzory (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin (PPL) resp. L-prolin.

V první části práce byl experimentálně otestován vliv vybraných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu LmbC na substrátovou specifitu celé domény. Byly určeny aminokyselinové zbytky, jejichž postranní řetězce mají největší význam pro preferenci PPL substrátu oproti L-prolinu: G308, A207 a L246.

V druhé části práce byl posuzován vliv dvojíých mutací v neribozomálním kódu LmbC a CcbC na substrátovou specifitu obou domén. Byly připraveny a biochemicky charakterizovány domény LmbC G308V + A207F a CcbC V306G + F205A. Výsledky obou bloků experimentů přinesly nové důkazy pro platnost homologních modelů vazebných míst obou adenylačních domén LmbC a CcbC. Především přinesly důkazy pro existenci hydrofobního kanálu ve vazebném místě LmbC.

Klíčová slova:

Sekundární metabolity, genové shluky, neribozomální peptidové syntetázy, linkosamidy, adenylační domény, biochemická charakterizace, substrátová specifita

Abstract

The crucial part of the biosynthesis of lincosamide antibiotics lincomycin and celesticetin is the condensation of amino sugar and amino acid moieties. This reaction is catalysed by the oligomeric enzyme lincosamide synthetase (LS). One of the most important components of LS is adenylation domain recognizing and activating amino acid precursor. The substrate specificity of adenylation domain is determined by “nonribosomal code”, 10 amino acids residues which side chains are in close contact with the activated substrate. The homologous adenylation domains LmbC from biosynthesis of lincomycin and CcbC from biosynthesis of celesticetin exhibit strong substrate specificity for their natural substrates (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-proline (PPL) and L-proline, respectively.

At first the effect of selected amino acid residues of LmbC nonribosomal code on the substrate specificity of the whole domain was tested. The amino acids residues, most important for preference of PPL substrate over L-proline, were determined: G308, A207 and L246.

Then the effect of double mutations in nonribosomal codes of both LmbC and CcbC on their substrate specificity was evaluated. The double mutants LmbC G308V + A207F and CcbC V306G + F205A were prepared and tested biochemically. The results brought new evidence of validity of homologous models of substrate binding pockets of LmbC and CcbC, especially the evidence of existence of hydrophobic channel in the substrate binding pocket of LmbC.

Keywords:

Secondary metabolites, gene clusters, nonribosomal peptide synthetases, lincosamides, adenylation domains, biochemical characterization, substrate specificity

Obsah

1	Úvod	11
2	Přehled literatury	12
2.1	Obecné pojmy	12
2.1.1	Sekundární metabolity a antibiotika.....	12
2.1.2	Genové shluky a jejich umístění v genomu.....	12
2.1.3	Horizontální genový přenos	13
2.2	Mechanismy biosyntézy antibiotik	14
2.2.1	Neribozomální peptidy	14
2.2.2	Polyketidy.....	16
2.2.3	Hybridní NRP/PK látky.....	17
2.2.4	Evoluce genů kódujících biosyntézu sekundárních metabolitů	17
2.3	Linkosamidy.....	19
2.3.1	Evoluce linkosamidů na úrovni genů	20
2.3.2	Evoluce linkosamidů na úrovni genových shluků.....	22
2.3.2.1	Přenos podshluku kódujícího biosyntézu PPL	22
2.3.3	Linkosamidsyntetáza	25
2.3.3.1	Aktivace aminokyselinové složky.....	27
2.3.3.2	Kondenzace aminokyselinové a aminocukerné složky	29
2.3.4	Adenylační domény LmbC a CcbC.....	31
2.3.4.1	Neribozomální kód	32
2.3.4.2	Modely vazebných míst pro substrát.....	33
2.3.4.3	Biochemická charakterizace adenylačních domén LmbC a CcbC.....	36
2.3.4.4	Změna substrátové specifity adenylačních domén.....	37
2.4	Cíle práce	38
3	Materiál.....	39
3.1	Bakteriální kmeny	39
3.2	Kultivační média	39
3.3	Pufry a roztoky	40
3.4	Enzymy	41
3.5	Chemikálie	41
3.6	Komerční standardy, soupravy a materiál.....	43
3.7	Speciální přístroje.....	43
3.8	Vektory.....	44
3.9	Oligonukleotidy.....	46
3.10	Software	47

4	Metody.....	48
4.1	Kultivace <i>E. coli</i> na pevných půdách a v tekutých médiích	48
4.2	Metody práce s DNA	48
4.2.1	Příprava kompetentních buněk.....	48
4.2.2	Transformace <i>E. coli</i> tepelným šokem	48
4.2.3	Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk (Midiprep)	48
4.2.4	Štěpení plazmidové DNA.....	49
4.2.5	Defosforylace linearizovaného vektoru.....	49
4.2.6	Ligace	49
4.2.7	Cílená mutageneze metodou QuikChange	50
4.2.7.1	PCR využitá při metodě QuikChange	51
4.2.7.2	Štěpení restrikční endonukleázou DpnI	52
4.2.8	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	52
4.2.9	Izolace DNA z agarózového gelu.....	53
4.2.10	Přečištění DNA po enzymatických reakcích.....	53
4.2.11	Sekvenování DNA.....	53
4.3	Metody práce s proteiny.....	54
4.3.1	Heterologní produkce proteinů.....	54
4.3.2	Sonikace buněk.....	54
4.3.3	Metaloafinitní chromatografie.....	54
4.3.4	Detekce proteinů roztokem Ponceau S.....	55
4.3.5	Dialýza.....	55
4.3.6	SDS-PAGE.....	55
4.3.7	Měření koncentrace purifikovaných proteinů	56
4.3.8	Biochemická charakterizace adenylačních domén.....	57
4.3.8.1	Vyhodnocení výsledků biochemické charakterizace	58
5	Výsledky.....	59
5.1	Stanovení vlivu aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu na substrátovou specifitu domény LmbC	59
5.1.1	Heterologní produkce a purifikace mutovaných proteinů LmbC.....	60
5.1.2	Biochemická charakterizace adenylačních domén.....	63
5.1.2.1	Protein LmbC A207F	64
5.1.2.2	Protein LmbC L246Y.....	65
5.1.2.3	Protein LmbC V274C.....	66
5.1.2.4	Protein LmbC I300L	67
5.2	Stanovení vlivu dvou mutací v neribozomálním kódu na substrátovou specifitu LmbC a CcbC.....	68
5.2.1	Příprava dvojitých mutant	69

5.2.2	Příprava expresních vektorů.....	69
5.2.3	Přenos mutovaných genů <i>ccbC</i> do vektoru pET28b	70
5.2.4	Přenos genu <i>lmbC</i> G308V + F205A do vektoru pET42b	71
5.2.5	Heterologní produkce a purifikace proteinů.....	72
5.2.5.1	Protein CcbC a jeho mutanty.....	72
5.2.5.2	Protein LmbC G308V + A207F	74
5.2.6	Biochemická charakterizace adenylačních domén.....	74
5.2.6.1	Protein CcbC	75
5.2.6.2	Protein CcbC V306G.....	76
5.2.6.3	Protein CcbC V306G + F205A	77
5.2.6.4	Protein LmbC G308V + A207F	77
6	Diskuze	79
7	Souhrn.....	86
8	Seznam literatury	87

Seznam použitých zkratek

HGT	Horizontální genový přenos
NRP	Neribozomální peptid
PK	Polyketid
NRPS	Neribozomální peptidová syntetáza
PKS	Polyketidová syntáza
CP	Přenášející protein
C	Kondenzační doména
TE	Thioesterázová doména
PPL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-propyl-L-prolin
LS	Linkosamidsyntetáza
PBD	Pyrrlobenzodiazepin
EPL	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-ethyl-L-prolin
MSH	Mykothiol
EGT	Ergothionein
GlcN-Ins	1- <i>O</i> -glukosamin- <i>D</i> - <i>myo</i> -inositol
BULIN	4'-butyl-4'-depropyl-linkomycin
PELIN	4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Zkratky pro použité materiály jsou uvedeny v kapitole 3 Materiál.

1 Úvod

Sekundární metabolity jsou historicky velmi bohatým zdrojem bioaktivních látek pro farmakologický průmysl. Mezi nejvýznamnější z nich patří antibiotika, využívaná k léčbě mnoha infekčních onemocnění způsobených mikroorganismy. Kvůli šíření rezistence k současným léčivům je však nutné neustále vyhledávat nové antimikrobiální látky. Během posledních padesáti let byly zdrojem těchto léčiv předně semisyntetické modifikace přírodních antibiotik objevených kolem poloviny 20. století (Clardy *et al.*, 2006). V současné době se však výzkum přesouvá mimo jiné zpět k hledání nových antibiotik v přírodních zdrojích (nejčastěji bakteriích a houbách), ale i k možné přípravě tzv. hybridních látek. Ta je umožněna rozvojem znalostí o biosyntéze přírodních bioaktivních látek i identifikací genů a genových shluků, kódujících biosyntetické enzymy. Hybridní látky vznikají kombinacemi různých biosyntetických drah či jejich částí, kódovaných geny pocházejícími původně z genových shluků různých sekundárních metabolitů.

Tato metoda by mohla být využita i v případě linkosamidů, malé skupiny antibakteriálních látek skládajících se z aminocukerné a aminokyselinové části. V tomto roce byl odhalen unikátní způsob jejich kondenzace, kombinující některé prvky aminoglykosidových i peptidových antibiotik (Janata *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). A právě znalost kondenzačního enzymu linkosamidsyntetázy je nezbytným předpokladem pro přípravu hybridních linkosamidů. Jedním z klíčových proteinů kondenzačního systému je adenylační doména, zodpovědná za rozpoznání a aktivaci aminokyselinového prekurzoru linkosamidů (Kadlčík *et al.*, 2013). Mutace adenylační domény by tak mohly vést k inkorporaci odlišného prekurzoru do výsledného hybridního linkosamidu. Těmito novými prekurzory by v budoucnu mohly být například dihydropyrrolové prekurzory látek ze skupiny pyrrolbenzodiazepinů (Gerratana, 2012).

2 Přehled literatury

2.1 Obecné pojmy

2.1.1 Sekundární metabolity a antibiotika

Sekundární metabolity (někdy také označované jako přírodní produkty) jsou látky neesenciální pro růst produkčního organismu. Hrají však důležitou úlohu v mikrobiální ekologii a přežití producenta v nepříznivých podmínkách (Demain, 1998).

Mezi nejvýznamnější sekundární metabolity patří antibiotika, která inhibují růst jiných mikroorganismů nebo je usmrcují. Jejich nejdůležitějšími bakteriálními producenty jsou gram pozitivní *Actinobacteria* zodpovědná za produkci nejméně dvou třetin z celkového množství antibiotik (Challis & Hopwood, 2003). V rámci třídy *Actinobacteria* jsou hlavními producenty bakterie z rodu *Streptomyces* (Watve *et al.*, 2001). Tyto bakterie produkují antibiotika nejčastěji v přechodové fázi vývoje kolonie, kdy dochází ke zpomalování růstu vegetativního mycelia důsledkem vyčerpávání živin. Antibiotika pak nejspíše slouží k obraně zbývajících živin před dalšími půdními mikroorganismy a poskytují producentovi selekční výhodu (Challis & Hopwood, 2003). Některá antibiotika by mohla mít i dvojí funkci. Za nízkých koncentrací by sloužila jako regulační molekuly, za vyšších koncentrací jako antimikrobiální látky (Tsui *et al.*, 2004).

2.1.2 Genové shluky a jejich umístění v genomu

Genové shluky jsou skupiny úzce funkčně propojených genů, společně zajišťující biosyntézu sekundárních metabolitů. Patří mezi ně geny kódující syntézu základní molekulární kostry i geny kódující další úpravy sekundárního metabolitu. Dále mohou genové shluky obsahovat regulační geny nebo geny kódující rezistenci k produktu biosyntetické dráhy (Osborn, 2010). V rámci genomu jsou tyto geny umístěny v jednom topologickém celku, shluku sousedících genů, netvoří však jeden operon (Fischbach *et al.*, 2008).

Právě tato organizace genů kódujících biosyntézu sekundárních metabolitů se vyskytuje i v genomu bakterií rodu *Streptomyces*. Genové shluky jsou zde nejčastěji umístěny na variabilních ramenech lineárního chromozomu (Omura *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002; Myronovskyi *et al.*, 2013; Rückert *et al.*, 2013). U mnoha kmenů streptomycet se však vyskytují i obří lineární plazmidy nesoucí genové shluky. Ty mohou kódovat řadu antibiotik, například

methylenomycin produkovaný *Streptomyces coelicolor* (Kinashi & Shimaji-Murayama, 1991; Kinashi, 2011).

2.1.3 Horizontální genový přenos

Horizontální genový přenos (HGT) zahrnuje přenos genetického materiálu jinými směry než z mateřské buňky na dceřinou a jeho případné začlenění do nového hostitelského genomu pomocí rekombinace (Boto, 2010). Pomocí HGT může být přenášeno různé množství genetického materiálu od genových fragmentů přes geny (Chan *et al.*, 2009), operony (Olendzenski *et al.*, 2000) až po superoperony kódující celé komplexní biochemické dráhy (Igarashi *et al.*, 2001). Mohou se takto šířit například geny kódující rezistenci k antibiotikům, což může přijímajícímu organismu poskytovat konkurenční výhodu (Grundmann *et al.*, 2006).

K HGT nedochází mezi různými bakteriálními druhy se stejnou pravděpodobností. Genetická informace je přednostně vyměňována mezi organismy s podobnou velikostí genomu, množstvím GC párů v genomu, způsobem využití uhlíku a požadavkem na molekulární kyslík (Jain *et al.*, 2003). Omezením při horizontálním přenosu genů kódujících biosyntetické dráhy je také nedostupnost určitých metabolitů v buňce příjemce. Jde například o propionát potřebný pro biosyntézu některých polyketidů (Dayem *et al.*, 2002).

2.2 Mechanismy biosyntézy antibiotik

Biosyntéza sekundárních metabolitů vychází z jednoduchých prekurzorů, z nichž některé jsou součástí primárního metabolismu. V průběhu biosyntézy mohou být tyto prekurzory jen modifikovány nebo, jako v případě neribozomálních peptidů (NRP) či polyketidů (PK), kondenzovány do větších molekul a poté modifikovány. Neribozomální peptidy a polyketidy jsou syntetizovány multimodulárními enzymy o velikosti 200 – 2000 kDa - neribozomálními peptidovými syntetázami (NRPS) a polyketidovými syntázami (PKS). NRPS a PKS se skládají z jednoho nebo více polypeptidů. Součástí každého z nich je jeden nebo více modulů, zodpovědných za začlenění stavebních bloků do rostoucího řetězce. Počet, typ a pořadí modulů určuje, které monomery a v jakém pořadí budou inkorporovány (Cane & Walsh, 1999).

Po uvolnění řetězce mohou být neribozomální peptidy i polyketidy chemicky modifikovány dalšími enzymy kódovanými geny v jejich biosyntetických shlucích. Nejčastěji jde o hydroxylace, methylace, glykosylace nebo alkylace NRP nebo PK řetězců (Fischbach & Walsh, 2006). Příkladem může být glykosylace antibiotika teikoplaninu, při které jsou k NRP kostře připojovány aktivované NDP-hexózy, což má velký vliv na jeho antibiotickou aktivitu (Solenberg *et al.*, 1997; Losey *et al.*, 2001).

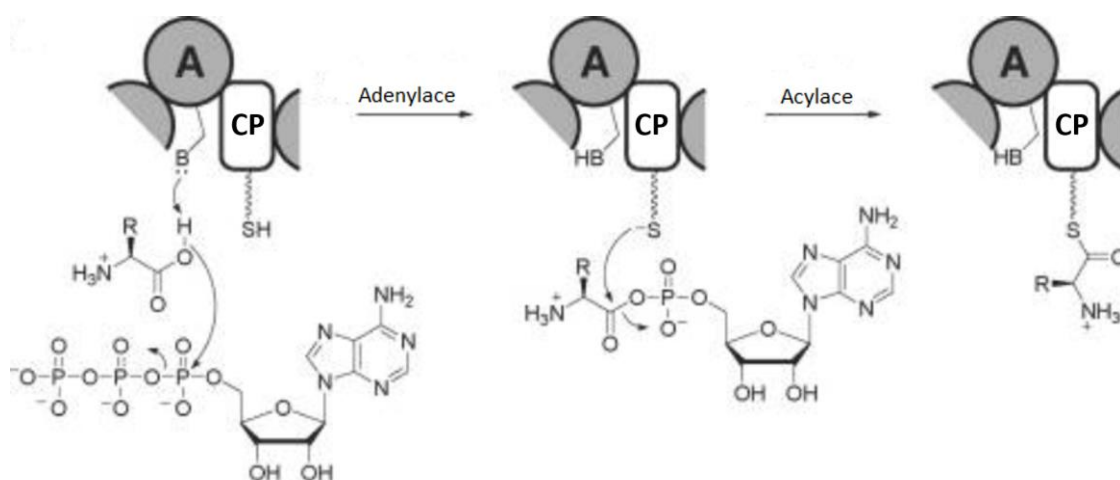
2.2.1 Neribozomální peptidy

Stavebními jednotkami neribozomálních peptidů jsou proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny. Z nich jsou některé součástí primárního metabolismu, pro vznik dalších jsou ovšem třeba specializované biosyntetické dráhy (Walsh & Fischbach, 2010). Geny kódující biosyntézu těchto aminokyselin jsou často součástí genového shluku daného NRP, jako v případě teikoplaninu (Donadio *et al.*, 2005).

Moduly mohou být v případě NRPS součástí jednoho polypeptidu, jako je tomu často u hub (Jirakkakul *et al.*, 2008), nebo mohou být na několika samostatných interagujících proteinech. Taková organizace je typická především pro bakteriální systémy (Guenzi *et al.*, 1998; Keating *et al.*, 2000).

Součástí všech NRPS jsou tři typy modulů – iniciační, elongační a terminační. Každý elongační modul obsahuje dvě katalytické domény zajišťující připojení monomeru k vznikajícímu NRP a jednu doménu sloužící jako přenašeč. Zhruba 80 – 100 aminokyselinových zbytků velká přenašečová doména (CP) obsahuje 4'-fosfopantetheinové rameno ke kterému se thioesterovou vazbou váže prodlužovaný peptidyl.

Adenylační doména o velikosti cca 550 aminokyselinových zbytků aktivuje karboxylovou skupinu vybrané aminokyseliny za vzniku aminoacyl-AMP a spotřeby ATP. Tento energeticky bohatý meziprodukt je předáván na terminální thiol 4'-fosfopantetheinového ramena sousední CP za vzniku acylthioesteru a uvolnění AMP (Obrázek 2.1) (Hur *et al.*, 2012). Substrátová specifita adenylační domény tak rozhoduje o tom, jaká aminokyselina bude v daném kroku zařazena do vznikajícího NRP (Stachelhaus *et al.*, 1999). Vznik amidové vazby mezi aminoacylem připojeným na CP, a vznikajícím peptidylem zajišťuje kondenzační doména (C), která se nachází na N-konci každého elongačního modulu (Obrázek 2.2).



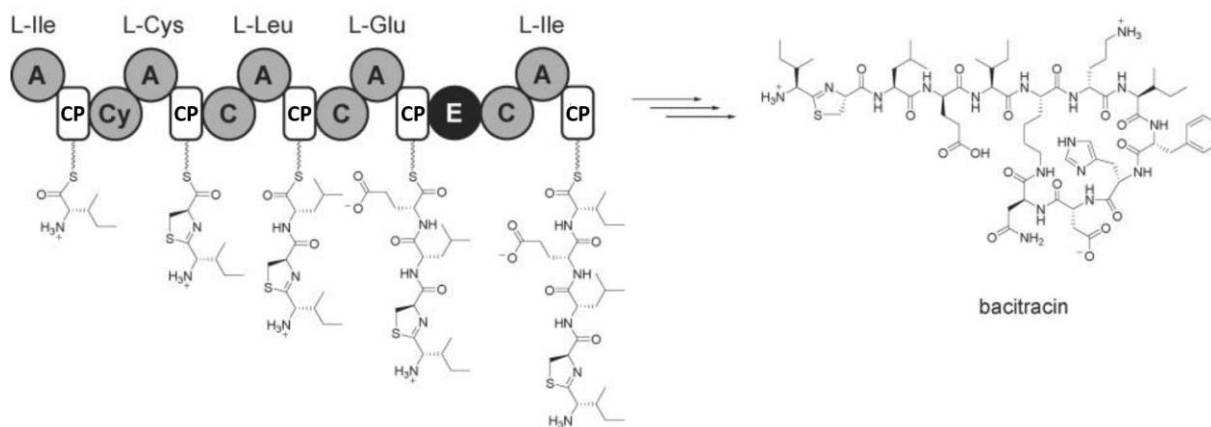
Obrázek 2.1: Aktivita adenylační domény

Adenylační doména (A) katalyzuje adenylaci substrátové aminokyseliny a poté acylaci sousední přenašečové domény (CP). Převzato a upraveno z Fischbach & Walsh (2006).

Iničiační modul NRPS neobsahuje kondenzační doménu. Terminální modul je zakončen thioesterázovou doménou (TE), která uvolňuje neribozomální peptid z poslední přenašečové domény. Peptidový řetězec může být uvolněn hydrolyticky za vzniku lineárního peptidu nebo makrocyclizací za vzniku makrocyclického peptidu. Existuje ovšem i alternativní TE-nezávislá cesta uvolnění řetězce. Jednotlivé moduly mohou navíc obsahovat domény modifikující zařazovaný prekursor. Jsou to například epimerizační, cyklizační, methyltransferázová nebo aminotransferázová doména (Fischbach & Walsh, 2006). Významným rysem některých NRP je přítomnost D-aminokyselin, díky kterým mohou mít unikátní konformace a aktivity. D-aminokyseliny mohou být produkovány buď externími racemázami a poté aktivovány adenylačními doménami (Li & Jensen, 2008) nebo může dojít

k *in situ* epimerizaci L-aminokyselin navázaných na přenašečové doméně během elongace NRP (Konz *et al.*, 1997).

Mezi farmaceuticky významné neribozomální peptidy patří například látky z rodin penicilinů a cefalosporinů (Martín, 1998) či ze skupiny glykopeptidů (Losey *et al.*, 2001).



Obrázek 2.2: Syntéza neribozomálního peptidu bacitracinu

Prvních pět modulů bacitracin syntetázy. Adenylační domény (A) rozpoznávají a aktivují specifické L-aminokyseliny. Dalšími doménami v těchto modulech jsou kondenzační domény (C), přenašečové domény (CP), cyklizační doména (Cy) a epimerizační doména (E). Převzato a upraveno z Fischbach & Walsh (2006).

2.2.2 Polyketidy

PKS jsou sekvenčně i strukturně homologní se syntetázami mastných kyselin z primárního metabolismu, ze kterých se pravděpodobně vyvinuly (Smith & Sherman, 2008). Mezi PKS jsou nejvýznamnější PKS Typu I, které mají analogický modulární princip syntézy jako NRPS, a budu se jimi dále zabývat.

Povinnou součástí všech elongačních i terminačních modulů PKS jsou acyltransferázová, ketosyntázová a thiolační doména. Acyltransferázová doména zajišťuje rozpoznání prekurzorů, které jsou pak přeneseny na fosfopantetheinové rameno thiolační domény. Ketosyntázová doména zajišťuje tvorbu C-C vazby mezi prekurzorem a vznikajícím polyketidem. V iniciačním modulu opět chybí ketosyntázová doména a terminační modul obsahuje navíc thioesterázovou doménu, uvolňující polyketid z PKS (Fischbach & Walsh, 2006).

Většinu monomerů inkorporovaných při prodlužování polyketidového řetězce tvoří malonyl-CoA a methylmalonyl-CoA. Prvními monomery v řetězci bývají acetyl-CoA, propionyl-CoA, benzoyl-CoA nebo jejich strukturní varianty. Velké strukturní i funkční

diverzity polyketidů je tak dosaženo jen díky několika málo stavebním blokům (Moore & Hertweck, 2002).

Klinicky významnými polyketidy jsou například tetracyklinová antibiotika (Chopra & Roberts, 2001) nebo antibiotikum erythromycin (Donadio *et al.*, 1991).

2.2.3 Hybridní NRP/PK látky

Tyto látky jsou syntetizovány hybridními enzymy obsahujícími moduly z neribozomálních peptidových syntetáz i z polyketidových syntáz. Narůstající řetězce pak mohou být přenášeny přes NRPS-PKS rozhraní a může docházet ke střídání inkorporace aminokyselinových prekurzorů (tvorba N-C vazby) a acyl-CoA prekurzorů (tvorba C-C vazby) (Fischbach & Walsh, 2006). Mezi NRP/PK hybridní látky patří například imunosupresant rapamycin (syntetizovaný enzymem složeným z 12 PKS modulů a 1 NRPS modulu) (Aparicio *et al.*, 1996) nebo také siderofor yersiniabaktin (enzym složen ze 3 NRPS modulů a 1 PKS modulu) (Gehring *et al.*, 1998).

2.2.4 Evoluce genů kódujících biosyntézu sekundárních metabolitů

Geny kódující biosyntézu NRP a PK jsou stejně jako biosyntetické geny mnoha jiných sekundárních metabolitů organizovány do genových shluků. Genové shluky jsou jednou z nejrychleji se vyvíjejících částí bakteriálního genomu, což je dáno mimo jiné jejich umístěním v genomu nebo častým přenosem horizontálním transferem (Ochman *et al.*, 2000).

K evolučním změnám biosyntetických genů sekundárních metabolitů i celých genových shluků může docházet na mnoha různých úrovních. Tyto změny pak mohou vést k diverzifikaci sekundárních metabolitů a ke vzniku účinnějších látek či látek se zcela novými biologickými aktivitami.

První úrovní změn jsou modifikace jednotlivých genů. Jedním z mechanismů změn biosyntetických genů jsou intragenové přestavby. Jejich důsledkem mohou být například změny pořadí adenylačních domén v rámci NRPS, jejich duplikace či ztráta, způsobená intragenovou delecí (Fischbach *et al.*, 2008). Dalším způsobem jsou mutace v genech kódujících biosyntetické enzymy, které mohou vést k zisku či ztrátě funkce enzymu či ke změně jeho specifity. V NRPS syntetizující bakteriální hormon hormaomycin byly objeveny dvě adenylační domény aktivující strukturně velmi odlišné substráty (β -Me) fenylalanin a 3-nitrocyclopropylalanin. Přesto mají genové úseky kódující obě domény více než 90% sekvenční shodu, a to až na střední část pokrývající oblast rozeznávající substrát. To naznačuje,

že během evoluce hormaomycinové biosyntetické dráhy došlo k duplikaci genových úseků kódujících adenylační domény, následované mutacemi a intragenovými přestavbami. To mohlo vést ke změnám substrátové specifity adenylačních domén a tím i celých NRPS modulů (Crüsemann *et al.*, 2013). Existují i adenylační domény s relaxovanou substrátovou specifitou aktivující více aminokyselin. Důsledkem je tvorba několika variant NRP s odlišnými aminokyselinami zařazenými na dané pozici (Konz *et al.*, 1999). Takovéto adenylační domény mohou být evolučním mezistupněm mezi doménami s rigidnější substrátovou specifitou.

Druhou úrovní evolučních změn je vývoj celých genových shluků. Ty se mohou měnit spojováním s menšími podshluky, které se vyskytovaly v genomu samostatně, nebo tvořily podshluky ve větším útvaru. Může tak dojít ke splynutí vzdálených metabolických drah a inkorporaci zcela nového prekurzoru kódovaného podshlukem. Tato inkorporace proběhla například u antibiotika linkomycinu, jak bude popsáno v další části práce, či u jiného antibiotika simocyklinonu. Simocyklinon se skládá ze tří stavebních jednotek – aminokumarinu, anthracyklinu a lineárního polyenu. Stejně tak obsahuje genový shluk simocyklinonu tři odpovídající biosyntetické podshluky (Trefzer *et al.*, 2002).

Podobně může docházet také k přijetí podshluků kódujících enzymy modifikující základní kostru sekundárního metabolitu. Příkladem může být většina klinicky významných aminoglykosidových antibiotik. Tyto látky se skládají z neobvyklého cukru, 2-deoxystreptaminu, kódovaného konzervovanou částí biosyntetického shluku. K němu jsou připojeny další cukry v pozicích C4, C5 či C6 (Park *et al.*, 2013). Právě geny kódující syntézu a připojení těchto cukrů jsou variabilní částí biosyntetických shluků a mohou se mezi nimi přemísťovat ve formě podshluků. Tím přispívají ke vzniku zcela nových biosyntetických shluků a tím i aminoglykosidů (Flatt & Mahmud, 2007).

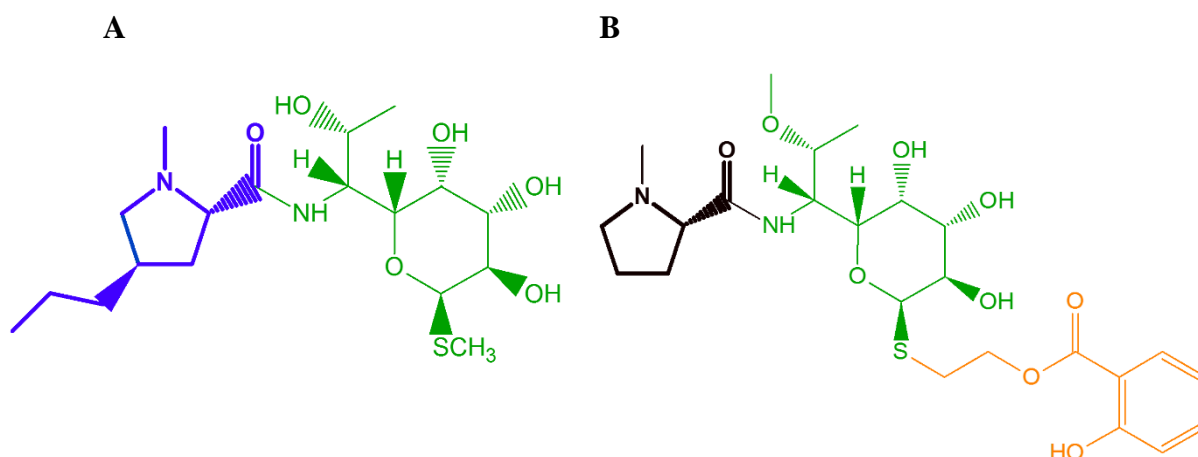
2.3 Linkosamidy

Linkosamidy jsou malou skupinou antibiotik, která má velmi zajímavou evoluční historii. Postupně se u nich totiž uplatnilo mnoho obecných mechanismů evoluce sekundárních metabolitů. Lze zde pozorovat jak mutace v genech kódujících biosyntetické enzymy, tak přenosy jednotlivých genů či celých genových podshluků a dokonce i přesun genových fragmentů mezi sousedními geny.

Do skupiny linkosamidů patří dvě strukturně příbuzné látky - linkomycin produkovaný druhem *Streptomyces lincolnensis* (Bergy & Herr, 1963) a celesticetin produkovaný bakteriemi *Streptomyces caelestis* (De Boer & Dietz, 1960). Kromě těchto přirozeně produkovaných sekundárních metabolitů je do skupiny řazen také semisyntetický derivát linkomycinu – klindamycin. Ten vzniká substitucí hydroxylové skupiny v pozici 7 v cukerné části linkomycinu za chlór. Klindamycin je využíván v klinické praxi pro léčbu některých infekcí způsobených anaerobními bakteriemi a také proti původci malárie *Plasmodium falciparum* (Birkenmeyer & Kagan, 1970; Lell & Kremsner, 2002).

Linkomycin i klindamycin blokuje proteosyntézu v cílových grampozitivních bakteriích. Zde interagují s 50S podjednotkou ribozomu, konkrétně s 23S rRNA v A a P místě ribozomu, čímž brání prodlužování vznikajícího peptidu (Douthwaite, 1992; Schlünzen *et al.*, 2001).

Strukturně se linkosamidy skládají z aminocukerné a aminokyselinové složky (Obrázek 2.3). Jejich biosyntéza tak kombinuje některé prvky aminoglykosidových a peptidových antibiotik. Společnou částí obou antibiotik je aminocukerná složka. Ta je v linkomycinu tvořena methylthiolinkosamidem a v celesticetinu thiocelестоamidinem, které se od sebe liší jen jednou methylační modifikací. K thio skupině thiocelестоamidinu je navíc dvouuhlíkatým řetězcem připojen salicylát. Aminokyselinovým prekurzorem celesticetinu je proteinogenní aminokyselina L-prolin, volně dostupná v buňce. Naopak u linkomycinu je jím neobvyklá aminokyselina (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin (PPL) syntetizovaná specifickou drahou z L-tyrosinu. Kondenzací obou částí zajišťuje oligomerní enzym linkosamidsyntetáza (LS) (Chung, 1997). Společným znakem obou biosyntetických drah je také methylace aminokyselinové složky, která probíhá po kondenzaci (Najmanová *et al.*, 2013).



Obrázek 2.3: Struktura linkosamidů

A – Linkomycin - modře aminokyselinová složka (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin, zeleně aminocukerná složka methylthiolinkosamid

B – Celesticetin - černě aminokyselinová složka L-prolin, zeleně aminocukerná složka thiocelestoamidin, oranžově salicylátová složka

2.3.1 Evoluce linkosamidů na úrovni genů

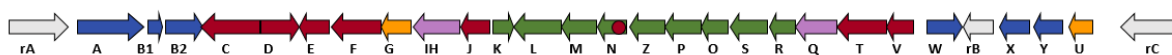
Mnoho evolučních událostí je dobře patrných při srovnání linkomycinového a celesticetinového biosyntetického shluku. Linkomycinový genový shluk má velikost 32 kbp a obsahuje 26 biosyntetických genů a tři rezistenční geny (Peschke *et al.*, 1995; Koberská *et al.*, 2008). Oproti němu je celesticetinový biosyntetický shluk menší (27 kbp) a obsahuje 23 biosyntetických genů a pouze jeden rezistenční gen (Obrázek 2.4) (Janata *et al.*, 2015).

První z evolučních událostí je změna organizace genů v podshlucích kódujících sdílenou část biosyntézy obou sekundárních metabolitů - syntézu aminocukerných složek (Obrázek 2.4, zeleně). Zatímco v linkomycinovém shluku tvoří geny kompaktní podshluk, v celesticetinovém jsou rozděleny na dvě části (Janata *et al.*, 2015).

Dalším evolučním mechanismem prokazatelným porovnáním obou genových shluků jsou přenosy samostatných genů. Žádný z rezistenčních genů v linkomycinovém shluku (*lmrA*, *lmrB* a *lmrC*) (Peschke *et al.*, 1995) není evolučně spojen s jediným rezistenčním genem celesticetinového shluku (*ccb1*). Tyto geny byly do jednotlivých shluků pravděpodobně přeneseny HGT. Stejně byly pravděpodobně přijaty geny *lmbG* a *ccb4*, kódující hypotetické methyltransferázy, které také nemají své protějšky v celesticetinovém respektive linkomycinovém shluku. Gen *lmbG* zřejmě kóduje protein zajišťující specifickou S-methylaci linkomycinu, zatímco gen *ccb4* kóduje O-methyltransferázu katalyzující specifickou methylaci celesticetinové aminocukerné složky v pozici 7' (Janata *et al.*, 2015). Posledním genem, který

byl pravděpodobně samostatně přenesen do linkomycinového shluku je regulační gen *lmbU*, který také není homologní s žádným genem v celesticetinovém shluku (Janata *et al.*, 2015). Dosud byly objeveny dva homology genu *lmbU* kódující proteiny s prokázanou regulační funkcí - *novE* kódující pozitivní regulátor v biosyntéze aminokumarinového antibiotika novobiocinu (Dangel *et al.*, 2008) a *hrmB* jehož produkt pozitivně reguluje produkci bakteriálního hormonu hormaomycinu (Cai *et al.*, 2013). Homology s dosud neprokázanou funkcí jsou součástí dalších genových shluků pro aminokumarinová antibiotika - *cloE* z chlorobiocinového shluku a *couE* ze shluku kumermycinu A (Eustáquio *et al.*, 2003). Původ genu *lmbU* v linkomycinovém genovém shluku však stále zůstává otázkou.

Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu



Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu



- ➔ Geny kódující kondenzační a postkondenzační kroky biosyntézy linkosamidů
- Sekvence kódující CP (viz kapitola 2.3.3.1)
- ➔ Geny účastníci se biosyntézy aminocukerné části linkosamidů
- ➔ Geny s neznámou funkcí
- ➔ Geny specifické pro celesticetin
- ➔ Geny účastníci se biosyntézy PPL
- ➔ Geny specifické pro linkomycin neúčastníci se biosyntézy PPL
- ➔ Rezistenční geny

Obrázek 2.4: Biosyntetické genové shluky linkomycinu a celesticetinu

Přístupové kódy genových shluků v databázi GenBank – linkomycin EU124663, celesticetin GQ844764.

2.3.2 Evoluce linkosamidů na úrovni genových shluků

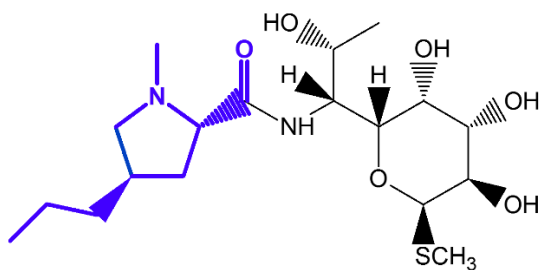
Jeden z nejpodstatnějších strukturních rozdílů mezi linkomycinem a celesticetinem je v jejich aminokyselinové složce. Přítomnost neobvyklé aminokyseliny PPL ve struktuře linkomycinu má mimo jiné velký vliv na antibakteriální účinek celého antibiotika. Propylový boční řetězec linkomycinu v pozici C-4' byl určen jako jedna z pozic, jejichž modifikace nejvíce ovlivňuje antibakteriální účinek. Při testování chemicky syntetizovaných 4'-alkyl-4'-depropyllinkomycinů se čtyřuhlíkatými, pětiuhlíkatými i šestiuhlíkatými bočními řetězci v pozici C-4' docházelo dokonce ke zvyšování účinnosti oproti linkomycinu (Magerlein, 1971).

2.3.2.1 Přenos podshluku kódujícího biosyntézu PPL

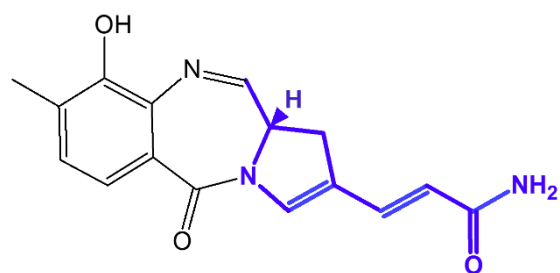
Inkorporace PPL, zvyšující antibakteriální účinek, je ovšem zajímavá i z evolučního pohledu. PPL je syntetizován specifickou dráhou kódovanou v linkomycinovém genovém shluku. Součástí této dráhy jsou produkty šesti genů, jejichž homology nebyly nalezeny v celesticetinovém shluku (Obrázek 2.4, modře) (Janata *et al.*, 2015).

Tato neobvyklá biosyntetická dráha ovšem sdílí některé kroky s biosyntetickou dráhou dihydropyrrolové složky několika látek ze skupiny pyrrolbenzodiazepinů (PBD) (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a, 2009b; Najmanová *et al.*, 2014) a propenylprolinové složky bakteriálního hormonu hormaomycinu produkovaného mikroorganismem *Streptomyces griseoflavus* (Höfer *et al.*, 2011).

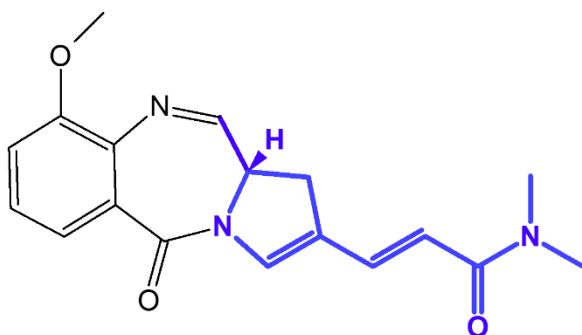
PBD jsou cytotoxické a potenciálně protinádorové látky (Baraldi *et al.*, 2004), skládající se z anthranilátových a dihydropyrrolových prekurzorů (Obrázek 2.5). Jejich kondenzaci katalyzuje NRPS se dvěma moduly (Hu *et al.*, 2007). Právě dihydropyrrolová složka je u anthramycinu, porothramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu analogická k PPL a vzniká analogickým způsobem. Bakteriální hormon hormaomycin je depsipeptid (peptid, ve kterém je jedna nebo více peptidových vazeb nahrazena esterovými vazbami) skládající se z několika stavebních jednotek kondenzovaných NRPS se sedmi moduly. Jedním z prekurzorů je (2*S*,4*R*)-4-propenyl-L-prolin (Obrázek 2.5) (Zlatopolskiy & De Meijere, 2004), syntetizovaný dráhou analogickou s PPL z L-tyrosinu (Höfer *et al.*, 2011).



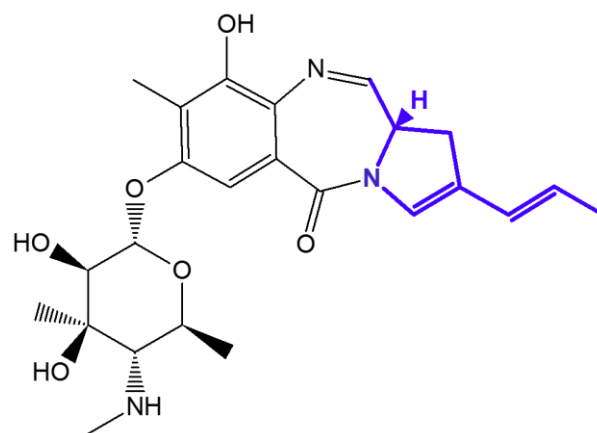
Linkomycin



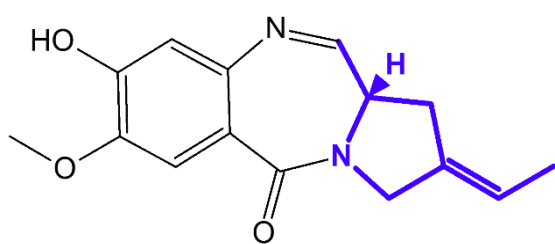
Anthramycin



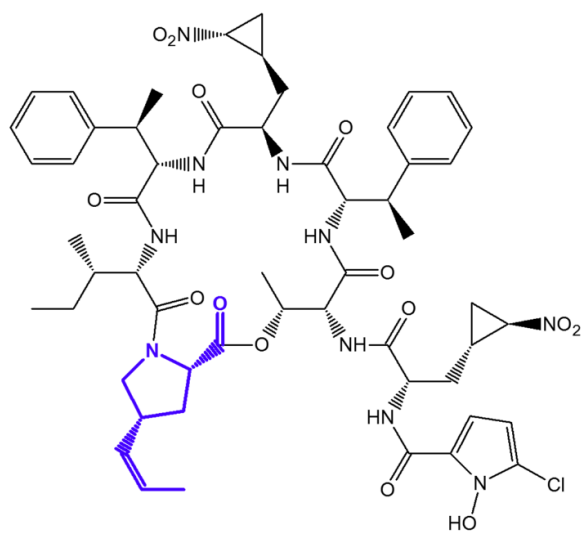
Porothramycin



Sibiromycin



Tomaymycin



Hormaomycin

Obrázek 2.5: Struktura linkomycinu, vybraných PBD a hormaomycinu

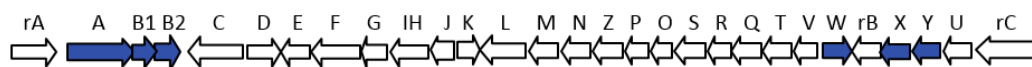
Modře jsou vyznačeny podjednotky analogické k PPL.

Sekvenování biosyntetických genových shluků všech těchto sekundárních metabolitů prokázalo přítomnost souboru homologních genů pro biosyntézu modifikovaného prolinu (Obrázek 2.6). Linkomycinový genový shluk obsahuje šestici genů zodpovědných za biosyntézu PPL - *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX*, *lmbY* a *lmbW* (Koběrská *et al.*, 2008). V genových shlucích anthramycinu, porothramycinu a sibiromycinu se navíc nachází další geny kódující následné úpravy dihydropyrrolové složky (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009b; Najmanová *et al.*, 2014). Oproti tomu v genovém shluku tomaymycinu je pouze pět homologních genů. Chybí zde gen kódující methyltransferázu homologní k *LmbW*. Pravděpodobně proto obsahuje molekula tomaymycinu derivát L-prolinu s dvouuhlíkatým bočním řetězcem (Li *et al.*, 2009a). I při biosyntéze linkomycinu totiž může vznikat vedlejší produkt s dvouuhlíkatým bočním řetězcem. (2*S*,4*R*)-4-ethyl-L-prolin (EPL) je inkorporován do méně účinného linkomycinu B (Argoudelis & Fox, 1965), pokud je v biosyntetické dráze PPL vynechán odpovídající methylační krok. V genovém shluku hormaomycinu pak bylo také nalezeno pět homologních genů, chybí zde ovšem gen homologní k *lmbX*. Důsledkem je přítomnost dvojné vazby v bočním řetězci propenylprolinu (Höfer *et al.*, 2011).

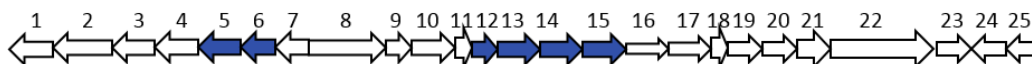
Také organizace těchto biosyntetických genů je u linkomycinového genového shluku a PBD shluků částečně shodná. V linkomycinovém genovém shluku jsou dva páry překrývajících se genů *lmbB1-lmbB2* a *lmbY-lmbX*. Stejně jsou organizované i jejich homology v anthramycinovém, porothramycinovém, sibiromycinovém a tomaymycinovém shluku. Oproti tomu rozmístění genů v genových shlucích je odlišné. V genových shlucích PBD tvoří homology *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX* a *lmbY* kompaktní podshluk, zatímco v linkomycinovém shluku jsou na opačných koncích shluku. Stejně tak jsou v linkomycinovém shluku oddělené geny *lmbA* a *lmbW*, jejichž homology tvoří v genových shlucích PBD kompaktní dvojici (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a, 2009b; Najmanová *et al.*, 2014).

Výskyt těchto homologních genů i jejich uspořádání naznačuje, že linkomycinový genový shluk pravděpodobně vznikl fúzí dvou shluků. Prvním byl biosyntetický shluk původního linkosamidu inkorporujícího prolin a druhým podshluk kódující biosyntézu modifikovaného prolinu. Ten byl pravděpodobně přenesen HGT z některého producenta PBD. Nízká homologie genů v linkomycinovém a PBD shlucích pak ukazuje na dlouhou dobu, která uběhla od tohoto přenosu. Tuto hypotézu také podporuje přítomnost genů kódujících biosyntézu modifikovaného prolinu ve větším množství PBD shluků. Oproti tomu ve skupině linkosamidů jsou tyto geny součástí pouze linkomycinového shluku. Ve skupině PBD se navíc vyvinuly dráhy syntetizující širší spektrum modifikovaných prolinových prekurzorů (Obrázek 2.5).

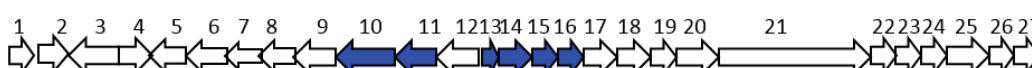
Linkomycin



Anthramycin



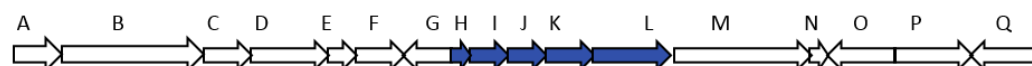
Porothramycin



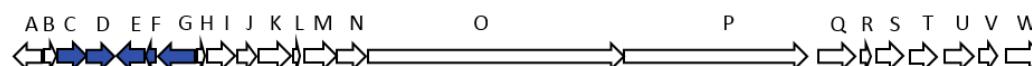
Sibiromycin



Tomaymycin



Hormaomycin



Obrázek 2.6: Genové shluky pro biosyntézu linkomycinu, anthramycinu, porothramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu a hormaomycinu

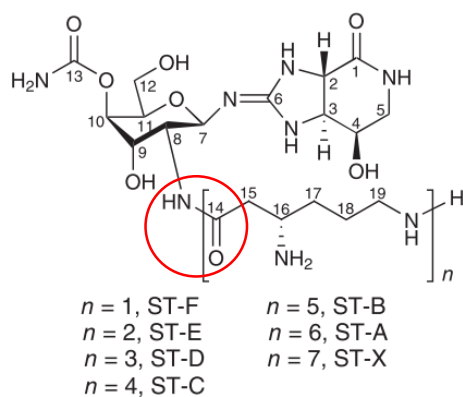
Modře jsou zvýrazněny homologní geny účastníci se biosyntézy prolinových derivátů. Přístupové kódy genových shluků v databázi GenBank – linkomycin EU124663, anthramycin EU195114, porothramycin HQ872605, sibiromycin FJ768674, tomaymycin FJ768957 a hormaomycin HQ542230.

2.3.3 Linkosamidsyntetáza

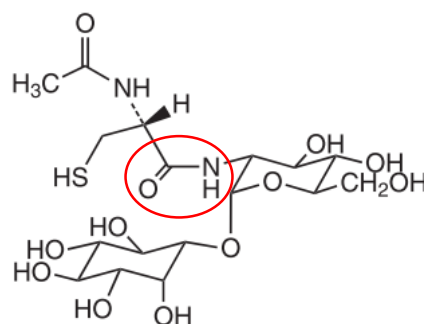
Po přijetí genů pro biosyntézu PPL do linkosamidového genového shluku muselo dojít ke druhému evolučnímu kroku, kterým byla změna substrátové specifity kondenzačního enzymu linkosamidsyntetázy (LS). To umožnilo spojení nově získaného PPL s aminocukernou složkou (Kadlčík *et al.*, 2013). Takto modifikovaný kondenzační enzym je klíčový pro produkci sekundárního metabolitu kódovaného novým genovým shlukem, ale nebyl nutný pro syntézu původní látky (Fischbach *et al.*, 2008). Proto je důležité prozkoumat jeho evoluční původ a mechanismus funkce i s ohledem na případnou budoucí přípravu hybridních látek genetickými úpravami biosyntetických shluků.

LS je zcela unikátní oligomerní systém, kombinující proteiny homologní s doménami NRPS, které aktivují aminokyselinový prekurzor, s neobvyklými proteiny katalyzujícími připojení aminocukerné složky amidovou vazbou. Tvorba takovéto vazby mezi aminocukrem a α -karboxylovou skupinou aminokyseliny je v přírodě velmi vzácná. Kromě linkosamidů byla dosud objevena v biosyntéze antibiotika streptothricinu (Maruyama *et al.*, 2012), v metabolismu mykothiolu, který je součástí detoxikačního systému aktinobakterií (Newton *et al.*, 2008) a v několika dalších méně objasněných biosyntézách (Grammel *et al.*, 2002; Gaballa *et al.*, 2010). V případě streptothricinu (Obrázek 2.7, A) dochází ke kondenzaci streptothrisaminu, látky obsahující aminocukernou složku, s L- β -lysinem případně s oligopeptidem složeným ze dvou až sedmi L- β -lysinů. Pro reakci je nezbytný neobvyklý NRPS modul (kódovaný genem *orf18*) skládající se z přenášejícího proteinu (CP) a kondenzační domény. CP váže L- β -lysin (nebo L- β -lysinový oligopeptid) a kondenzační doména katalyzuje vznik amidové vazby (Maruyama *et al.*, 2012). Při biosyntéze mykothiolu (Obrázek 2.7, B) dochází nezávisle na NRPS k tvorbě amidové vazby mezi α -karboxylovou skupinou L-cysteinu a aminocukrem. Kondenzace je katalyzována enzymem MshC, který je homologní s cysteinyl-tRNA syntetázami (Sareen *et al.*, 2002).

A



B



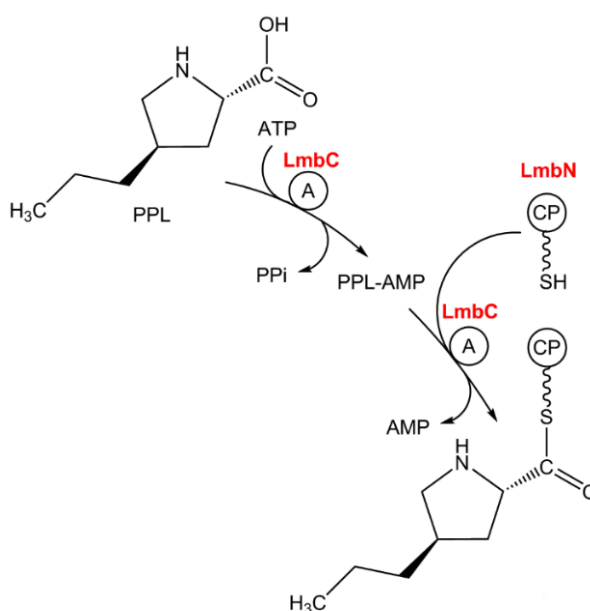
Obrázek 2.7: Chemická struktura streptothricinu (ST) a mykothiolu

A – Strukturní varianty streptothricinu (ST) lišící se délkou oligopeptidového řetězce. Červeně vyznačena amidová vazba mezi aminokyselinovou a aminocukernou složkou. Převzato a upraveno z Maruyama *et al.* (2012).

B – Struktura mykothiolu. Červeně vyznačena amidová vazba mezi aminokyselinovou a aminocukernou složkou. Převzato a upraveno z Newton *et al.* (2008).

2.3.3.1 Aktivace aminokyselinové složky

Část LS aktivující aminokyselinový prekurzor se skládá z adenylační domény a přenášejícího proteinu (CP), složením tak odpovídá iniciačnímu modulu NRPS (Janata *et al.*, 2015). Adenylační doména LmbC, která je součástí linkomycinsyntetázy, specificky aktivuje PPL, aminokyselinový prekurzor linkomycinu. Homologní protein CcbC pak specificky aktivuje proteinogenní L-prolin v průběhu biosyntézy celesticetinu. Substrátová specifita adenylační domény tak i v případě LS určuje, která aminokyselina bude zařazena do molekuly výsledného linkosamidu (Kadlčík *et al.*, 2013). Funkce CP je úzce spojena s adenylační doménou, kdy se aktivovaná substrátová aminokyselina váže thioesterovou vazbou k 4'-fosfopantetheinovému ramenu CP (Obrázek 2.8).



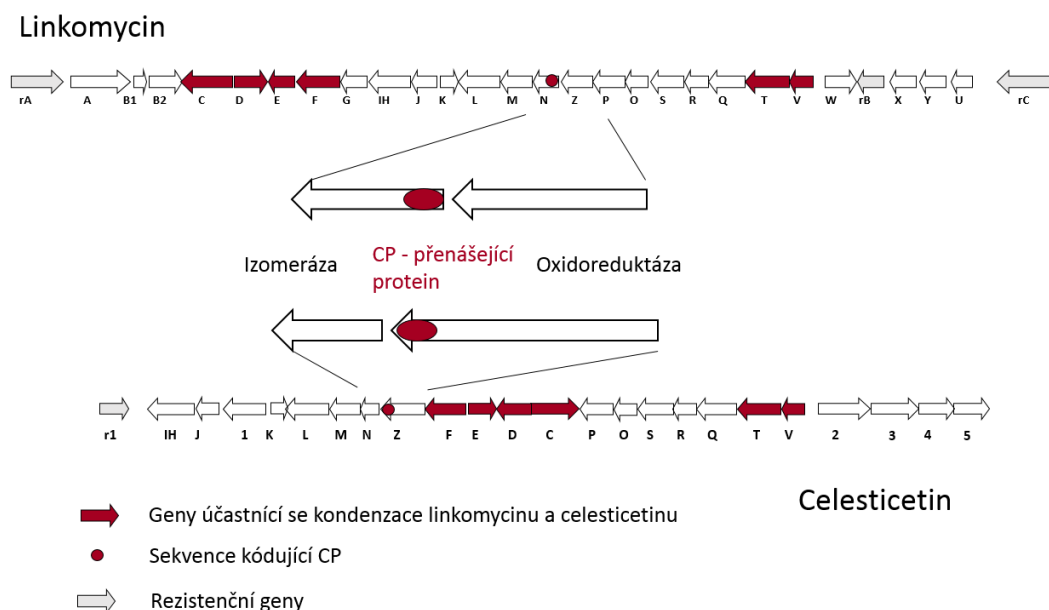
Obrázek 2.8: Schéma aktivace aminokyselinového prekurzoru linkomycinu PPL

Samostatně stojící adenylační doména LmbC (A) aktivuje PPL vazbou AMP. Následuje připojení aktivované substrátové aminokyseliny thioesterovou vazbou k přenášejícímu proteinu LmbN (CP). Převzato a upraveno z Janata *et al.* (2015)

Vzhledem k funkčnímu propojení je CP doména často fúzována s odpovídající adenylační doménou (Fischbach & Walsh, 2006). V sekvenci genů *lmbC/ccbC* však nebyla sekvence kódující CP nalezena. Stejně tak nebyl v linkomycinovém ani celesticetinovém shluku nalezen gen kódující samostatnou CP doménu. Sekvence kódující CP však byla objevena jako součást dvou vzájemně nehomologních biosyntetických genů - *lmbN* v linkomycinovém genovém shluku a *ccbZ* v celesticetinovém shluku (Janata *et al.*, 2015).

Protein LmbN katalyzuje izomeraci oktulóza 8-fosfátu (októza obsahující keto skupinu) na októza 8-fosfát v biosyntéze methylthiolinkosamidu (Sasaki *et al.*, 2012). Protein CcbZ je hypotetická C8 oxidoreduktáza účastní se biosyntézy thiocelestoamidinu. Sekvence kódující CP konkrétně tvoří 5' koncovou část genu *lmbN* a 3' koncovou část genu *ccbZ* (Obrázek 2.9) (Janata *et al.*, 2015). Obecně je fúze sekvence kódující CP s genem kódujícím funkčně vzdálený protein velmi vzácná. Přesto už bylo několik podobných případů popsáno – v biosyntéze sideroforu enterobaktinu, kde CP doména tvoří C-koncovou část izochorismát lyázy EntB (Gehring *et al.*, 1997), či v biosyntéze antibiotika nourseothricinu (Grammel *et al.*, 2002). Další analýzou byl objeven druhý translační počátek v genu *lmbN* za sekvencí kódující CP. Díky tomu jsou produkovány dvě formy proteinu LmbN – plnohodnotný bifunkční protein LmbN a samostatná izomerázová doména (Janata *et al.*, 2015).

Umístění sekvence kódující CP v genech *lmbN* a *ccbZ* dokumentuje přesun genového segmentu mezi dvěma sousedícími geny ve shluku. Není však známo, zda měla tato přestavba nějaký funkční význam (Janata *et al.*, 2015). Druhý translační počátek uvnitř genu *lmbN* navíc naznačuje, že sekvence kódující CP byla původně součástí jiného genu a k její fúzi s genem *lmbN* došlo relativně nedávno. Organizace genu *ccbZ*, kde tato sekvence navazuje na sekvenci kódující oxidoreduktázovou doménu bez vnitřního translačního počátku, pravděpodobně odpovídá evolučně původnímu stavu. Tento přenos genového segmentu je další událostí naznačující směr evoluce linkosamidů - od původního linkosamidu inkorporujícího prolin k linkomycinu inkorporujícímu PPL (Janata *et al.*, 2015).



Obrázek 2.9: Genové shluky linkomycinu a celesticetinu

Převzato a upraveno z Janata *et al.* (2015).

2.3.3.2 Kondenzace aminokyselinové a aminocukerné složky

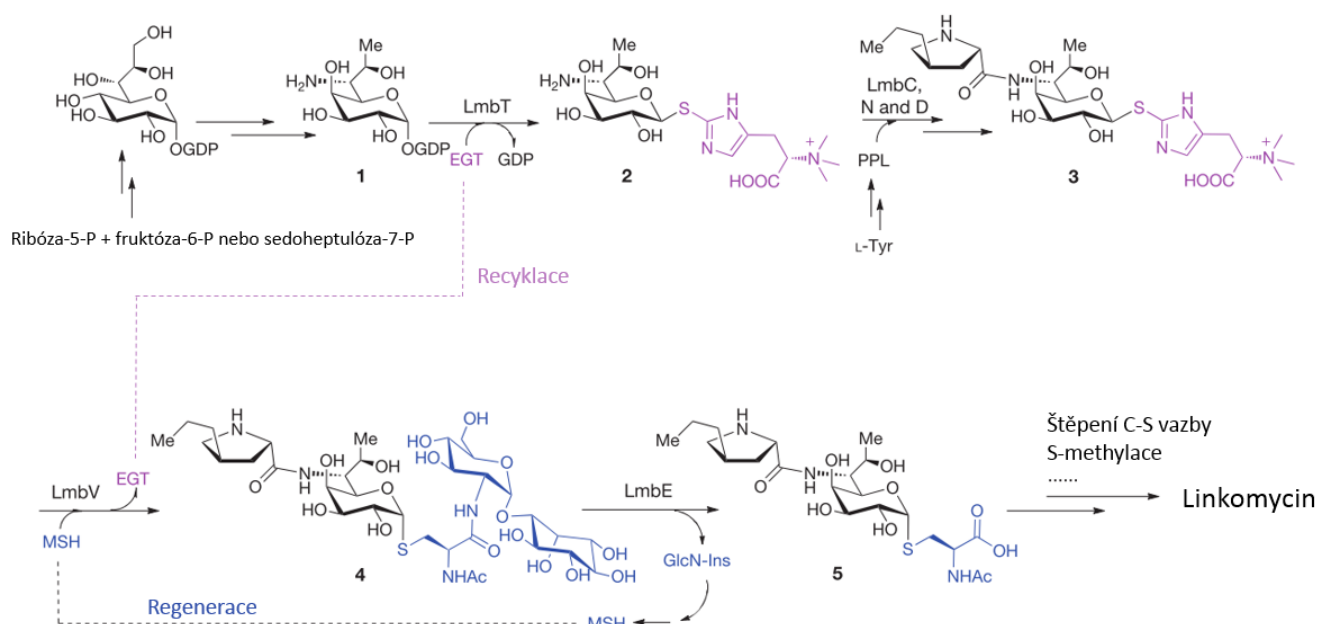
Zbývající proteiny účastníci se kondenzace a reakcí těsně ji předcházejících a následujících již nemají žádnou homologii s NRPS proteiny. Některé z nich jsou ovšem homologní s proteiny mykothiolového metabolismu. Aminocukerná složka linkomycinu je těsně před a po kondenzaci s aminokyselinovou složkou modifikována vazbou nízkomolekulárních thiolů (Zhao *et al.*, 2015). U aktinomycet, mezi které patří i přirozený producent linkomycinu *S. lincolnensis*, je primárním thiolem mykothiol (MSH) (Newton *et al.*, 1996). MSH je ekvivalentem glutathionu, který je primárním thiolem u eukaryot a gramnegativních bakterií (Jothivasan & Hamilton, 2008). Kromě MSH jsou však aktinomycety schopny produkovat i další thiol – ergothionein (EGT) (Genghof & Vandamme, 1964). MSH se v bakteriálních buňkách běžně účastní ochrany proti oxidativnímu stresu a neutralizace elektrofilních toxinů. Detoxikace zprostředkovaná MSH zahrnuje konjugaci MSH a elektrofilního toxinu. Výsledný MSH S-konjugát je poté hydrolyzován amidázou Mca na 1-*O*-glukosamin-*D*-*myo*-inositol (GlcN-Ins) a derivát merkapturové kyseliny. Tento derivát je poté transportován ven z buňky a GlcN-Ins je recyklován a znovu použit při biosyntéze MSH (Jothivasan & Hamilton, 2008).

V biosyntéze linkomycinu ovšem mají MSH a EGT zcela jinou úlohu. EGT slouží jako nosič aminocukerné složky při kondenzaci obou částí linkomycinu a MSH je donorem atomu síry po výměně thiolů. Oba thioly jsou k aminocukerné složce linkomycinu připojeny neobvyklými S-glykosylacemi (Zhao *et al.*, 2015).

Biosyntéza aminocukerné složky linkomycinu končí produkcí GDP-*D*- α -*D*-októzy (Obrázek 2.10, 1) (Lin *et al.*, 2014). Poté následuje první S-glykosylace, kdy dojde k připojení EGT k aminocukerné složce za vzniku EGT S-konjugátu (2) a uvolnění GDP. Tato reakce je katalyzována glykosyltransferázou LmbT. EGT S-konjugát (2) následně vstupuje do kondenzační reakce spolu s aminokyselinovou složkou PPL, která byla nejprve aktivována adenylační doménou LmbC a poté připojena thioesterovou vazbou k přenášejícímu proteinu LmbN. Samotný vznik amidové vazby je katalyzován enzymem LmbD za vzniku dalšího EGT S-konjugátu (3) (Zhao *et al.*, 2015). Protein LmbD je zcela unikátní složkou LS. Kromě jeho vysoké homologie (57%) s proteinem CcbD, katalyzujícím analogický krok v biosyntéze celesticetinu, nebyla nalezena podobnost s žádnou jinou sekvencí. Proteiny LmbD/CcbD se tak pravděpodobně vyvinuly specificky jako součást biosyntézy linkosamidů (Janata *et al.*, 2015).

Následujícím krokem je druhá S-glykosylace katalyzovaná glykosyltransferázou LmbV z rodiny DinB-2 (Zhao *et al.*, 2015). V této rodině je většina proteinů funkčně spojena

s nízkomolekulárními thioley (Newton *et al.*, 2011). Dochází k výměně thiolů navázaných na aminocukerné složce za vzniku MSH S-konjugátu (**4**) a uvolnění EGT, který může být znovu využit. Posledním dosud publikovaným krokem biosyntézy linkomycinu je hydrolytické štěpení MSH S-konjugátu (**4**) enzymem LmbE. Tento protein je homologem amidázy Mca, která štěpí MSH S-konjugáty při detoxikačních procesech. MSH S-konjugát (**4**) je tak rozštěpen na derivát merkapturové kyseliny (**5**) a GlcN-Ins, který vstupuje zpět do biosyntézy MSH jako meziprodukt (Zhao *et al.*, 2015).



Obrázek 2.10: Schéma kondenzace aminocukerné a aminokyselinové složky linkomycinu

Barevně jsou vyznačeny nízkomolekulární thioley EGT a MSH. Recyklace EGT a regenerace GlcN-Ins zpět na MSH jsou vyznačeny přerušovanými čarami. Převzato a upraveno ze Zhao *et al.* (2015).

Pro přeměnu derivátu merkapturové kyseliny (**5**) na linkomycin musí být odstraněna *N'*-acetyl-*S*-cysteinylová skupina a musí dojít k *S*-methylaci sulfhydrylové (SH) skupiny a k methylaci atomu dusíku v aminokyselinové části linkomycinu. To se děje ve čtyřech krocích (Kameník, v přípravě).

Nejprve dojde k deacetylaci meziproduktu (**5**) (Kameník, v přípravě). Na základě předběžných inaktivačních experimentů je tato reakce pravděpodobně katalyzována dvojicí enzymů LmbIH/LmbQ. Tyto enzymy patří do stejné rodiny PmbA_TldD (Janata *et al.*, 2001), i když je jejich vzájemná homologie velmi nízká. Geny kódující proteiny z této rodiny se v bakteriálních genomech vyskytují poměrně často, obvykle jako homologní páry v těsné blízkosti u sebe.

Dalším krokem je N-methylace aminokyselinové části linkomycinu katalyzovaná methyltransferázou LmbJ. Následuje štěpení C-S vazby cysteinylové skupiny enzymem LmbF, patřícím do rodiny enzymů AAT_I, které využívají jako kofaktor pyridoxal-5'-fosfát. Produkt této reakce obsahuje vysoce reaktivní sulfhydrylovou skupinu, která musí být okamžitě methylována. Tuto poslední reakci pravděpodobně katalyzuje hypotetická methyltransferáza LmbG (Kameník, v přípravě).

Kondenzace celesticetinu zřejmě probíhá analogicky s kondenzací linkomycinu až po N-methylaci katalyzovanou enzymem CcbJ, který je homologní s LmbJ. Enzym CcbF totiž v dalším kroku pravděpodobně katalyzuje transaminaci a dekarboxylaci cysteinylové skupiny. V důsledku katalytické funkce CcbF dojde k zachování dvouuhlíkatého zbytku, který ve výsledné molekule celesticetinu připojuje salicylát k aminocukerné složce. Aminoskupina cysteinylové skupiny je v této reakci nahrazena oxoskupinou. Ta může být v další reakci, zřejmě katalyzované hypotetickou dehydrogenázou Ccb5, redukována na hydroxyl. Poté pravděpodobně následuje konjugace s kompletním salicylátem či jeho prekurzorem katalyzovaná hypotetickou acyltransferázou Ccb1 (Kameník, v přípravě).

2.3.4 Adenylační domény LmbC a CcbC

Klíčovým krokem adaptace kondenzačního enzymu na novou substrátovou aminokyselinu PPL byla změna substrátové specifity adenylační domény. Adenylační doména rozpoznává a aktivuje substrátovou aminokyselinu a největší měrou určuje substrátovou specifitu celé LS (Kadlčík *et al.*, 2013).

Gen kódující adenylační doménu adaptovanou na aktivaci nového substrátu PPL se mohl v linkomycinovém biosyntetickém shluku objevit dvěma způsoby. Buď byl přenesen HGT spolu s geny pro biosyntézu PPL, nebo se v původním produkčním kmenu vyvinul z genu kódujícího adenylační doménu aktivující L-prolin. HGT se pravděpodobně uplatnil při strukturální diverzifikaci PBD. Ta byla pravděpodobně umožněna HGT celých biosyntetických shluků, včetně genů kódujících NRPS, a následnými mutacemi genů pro adenylační domény (Kadlčík *et al.*, 2013).

Fylogenetická analýza adenylačních domén aktivujících L-prolin nebo jeho deriváty však prokázala, že v případě linkosamidů probíhal vývoj jinak než u PBD. Analýza jasně oddělila skupiny samostatně stojících adenylačních domén od adenylačních domén, které jsou součástí modulů NRPS (dále označovány jako modulární). Domény CcbC i LmbC jsou součástí skupiny samostatně stojících adenylačních domén, které až na LmbC všechny aktivují

L-prolin. Nejbližším příbuzným domény LmbC je doména CcbC se sekvenční shodou 55,7 %. Žádná jiná adenylační doména s nimi nemá sekvenční shodu vyšší než 40 %. Proto je pravděpodobné, že se domény LmbC i CcbC vyvinuly z jedné adenylační domény (Kadlčík *et al.*, 2013).

Fakt, že žádná samostatně stojící adenylační doména kromě LmbC neaktivuje prolinový derivát, také podporuje předpokládaný směr vývoje substrátové specifity od L-prolinu k PPL. Není však jasné, zda původní adenylační doména aktivovala pouze L-prolin, či zda měla relaxovanou substrátovou specifitu (Kadlčík *et al.*, 2013).

2.3.4.1 Neribozomální kód

Adenylační domény se strukturně skládají z velké N-koncové domény (~ 450 aminokyselinových zbytků) a malé C-koncové domény (~ 100 aminokyselinových zbytků). V místě styku těchto domén se nachází vazebné místo pro substrát a je zde také vázán kofaktor Mg^{2+} (Conti *et al.*, 1997; May *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). A právě ve vazebném místě pro substrát jsou nejpodstatnější rozdíly mezi adenylačními doménami LmbC a CcbC. Vazebná místa jsou tvořena souborem deseti aminokyselinových zbytků, nazývaných neribozomální kód, jejichž postranní řetězce jsou v kontaktu se substrátem. Substrátová specifita celé adenylační domény je určena osmi z těchto deseti aminokyselinových zbytků, kterými se budu dále zabývat. Zbylé dva (lysin a aspartát) jsou vysoce konzervované a jsou v kontaktu s karboxylovou a α -aminoskupinou substrátové aminokyseliny. Konzervovaný lysin je také jediným aminokyselinovým zbytkem neribozomálního kódu ležícím v C-koncové doméně. Zbylých devět se nachází v N-koncové doméně v úseku dlouhém zhruba 100 aminokyselinových zbytků (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000). Sekvence aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu se spolu s 24 dalšími zbytky v blízkosti vazebného místa také využívají pro *in silico* predikce substrátové specifity nově objevených adenylačních domén (Röttig *et al.*, 2011).

Podobně jako u fylogenetické analýzy celých sekvencí se dají adenylační domény rozdělit i podle sekvence neribozomálního kódu. Pro samostatně stojící adenylační domény aktivující L-prolin existuje konsenzuální soubor aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu (Tabulka 2.1). Neribozomální kód domény CcbC se tomuto konsenzu podobá, konkrétně je shodných 6 z 8 aminokyselinových zbytků. Oproti tomu neribozomální kód domény LmbC je odlišný. S konsenzem samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin se shoduje jen ve dvou aminokyselinových zbytcích, což je pravděpodobně důsledek adaptace na

jinou substrátovou aminokyselinu. Neribozomální kód LmbC však není podobný ani neribozomálním kódům modulárních adenylačních domén aktivujících prolinové deriváty. To také naznačuje, že se doména LmbC aktivující PPL vyvinula nezávisle na modulárních adenylačních doménách aktivujících prolinové deriváty (Kadlčík *et al.*, 2013).

Číselné označení aminokyselinových zbytků	204	207	246	274	276	300	308	309	
	202	205	244	272	274	298	306	307	
Adenylační doména	Přirozený substrát	Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu							
LmbC	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C
CcbC	L-prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C
Konsenzus samostatně stojících adenylačních domén	L-prolin	L	L/F	Y	L	A	L	V	C

Tabulka 2.1: Neribozomální kód adenylačních domén LmbC, CcbC a konsenzuální neribozomální kód samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin

Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu shodné s konsenzem samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin jsou vyznačeny červeně. První řádek číselného označení aminokyselinových zbytků odpovídá LmbC, druhý řádek pak CcbC.

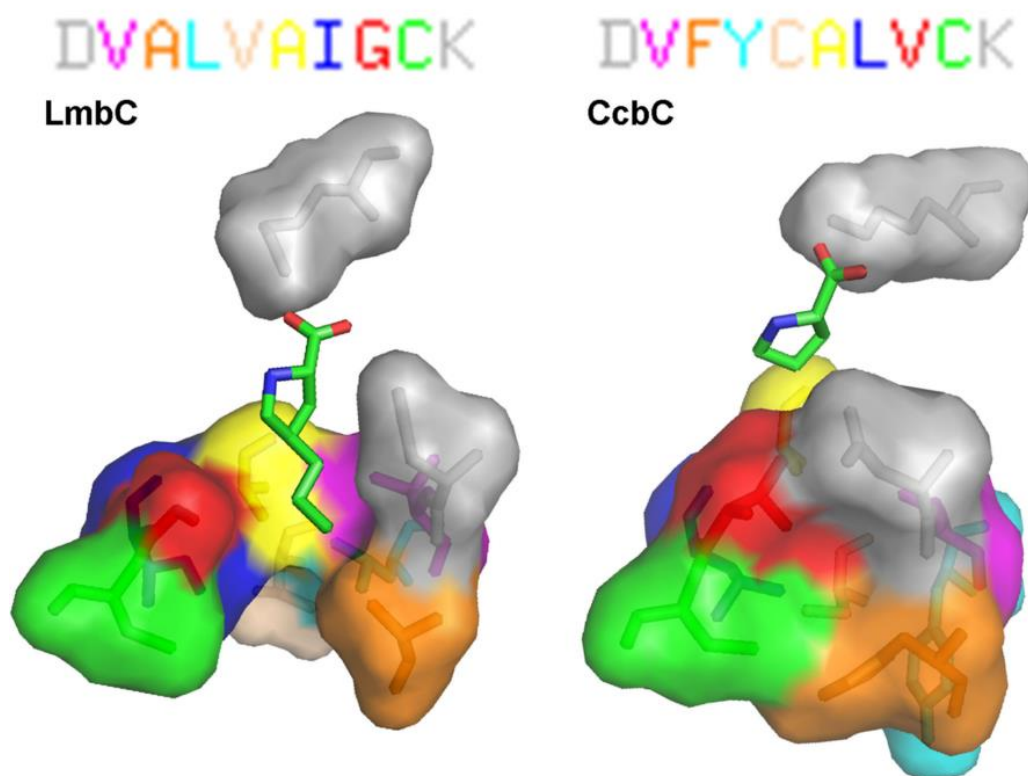
2.3.4.2 Modely vazebných míst pro substrát

Výrazné rozdíly v neribozomálním kódu adenylačních domén LmbC a CcbC se projevují na celkové velikosti, tvaru a hydrofobicitě jejich vazebných míst pro substrát. Byly vytvořeny homologní modely vazebných míst domény CcbC s L-prolinem a domény LmbC s PPL (Obrázek 2.11) na základě struktury adenylační domény GrsA aktivující fenylalanin (Kadlčík *et al.*, 2013).

Konzervované aminokyselinové zbytky D a K interagující s karboxylovou a α -aminoskupinou substrátové aminokyseliny jsou na modelech vyznačeny šedivě (Obrázek 2.11). U vazebného místa CcbC je kromě nich substrát v přímém kontaktu se třemi dalšími zbytky – V202 (Obrázek 2.11, růžově), A274 (Obrázek 2.11, žlutě) a V306 (Obrázek 2.11, červeně). Zbylých pět aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu je stericky odstíněno těmito třemi a pravděpodobně pomáhají udržení tvaru a velikosti vazebného místa. Homologní model vazebného místa CcbC ukazuje, že není možné, aby adenylační doména CcbC aktivovala deriváty L-prolinu s bočními řetězci v pozici 4. Vazebné místo je pro

vazbu takového substrátu příliš malé a nemá vhodný tvar (Kadlčík *et al.*, 2013). Takovéto uspořádání aminokyselinových zbytků ve vazebném místě pro substrát však není ojedinělé. Bylo objeveno několik dalších adenylačních domén, u kterých se vazby substrátu přímo účastní jen několik aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu. Dochází k tomu u domén aktivujících relativně menší substrátové aminokyseliny, jako jsou například právě prolin či alanin (Lautru & Challis, 2004; Yonus *et al.*, 2008). U zbývajících aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu hlouběji ve vazebném místě, které nejsou v kontaktu s malou substrátovou aminokyselinou, se může vyskytovat větší variabilita. Mohou se lišit i v rámci adenylačních domén aktivujících stejný substrát (Challis *et al.*, 2000).

Oproti vazebnému místu CcbC má pět odlišných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu LmbC za následek tvorbu kanálu, do kterého se může při aktivaci zanořit tříuhlíkatý boční řetězec PPL. Jinak u domény LmbC došlo ke změně pouze jednoho aminokyselinového zbytku, který byl ve vazebném místě CcbC v kontaktu se substrátem. Valin (Obrázek 2.11, červeně) byl změněn na glycin. Tato změna je pravděpodobně nejpodstatnější, protože menší postranní řetězec glycinu může oproti většímu postrannímu řetězci valinu umožňovat vstup bočního řetězce PPL do kanálu ve vazebném místě. Postranní řetězce zbylých čtyř odlišných aminokyselinových zbytků pravděpodobně přispívají k tvorbě kanálu o správné velikosti, tvaru a hydrofobicitě. Postranní řetězec alaninu 207 (Obrázek 2.11, oranžově) v LmbC vytváří prostornější kanál oproti postrannímu řetězci fenylalaninu 205 v CcbC. Hydrofobicitu kanálu určují hydrofobní postranní řetězce leucinu 246 (Obrázek 2.11, světle modře) a valinu 274 (Obrázek 2.11, krémově) v LmbC oproti hydrofilním postranním řetězcům tyrosinu 244 a cysteinu 272 v CcbC. To dobře koresponduje s aktivací PPL, který má oproti L-prolinu hydrofobní boční řetězec. Význam posledního odlišného aminokyselinového zbytku isoleucinu 300 (Obrázek 2.11, modře) v LmbC oproti leucinu 298 v CcbC zůstává neznámý (Kadlčík *et al.*, 2013).



Obrázek 2.11: Homologní modely vazebných míst adenylačních domén LmbC s PPL a CcbC s L-prolinem
 Barvy jednopísmenných zkratk aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu odpovídají barvám jednotlivých aminokyselinových zbytků ve strukturách. Převzato z Kadlčík *et al.* (2013).

Analogický evoluční mechanismus se pravděpodobně uplatnil i u modulární adenylační domény HrmP(3)_A z biosyntézy hormaomycinu, která aktivuje (2*S*,4*R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolin. Při porovnání neribozomálního kódu této domény s konsenzuálním kódem modulárních adenylačních domén aktivujících L-prolin obsahuje kód HrmP(3)_A tři odlišné aminokyselinové zbytky. Ve všech případech jde o záměnu většího zbytku za menší. Podobně jako LmbC má i HrmP(3)_A glycin v pozici odpovídající aminokyselinovému zbytku 308 místo konsenzuálního valinu. Tyto změny i u domény HrmP(3)_A pravděpodobně přispívají k tvorbě kanálu, do kterého se při aktivaci zanořuje boční řetězec hormaomycinového prekurzoru (2*S*,4*R*)-4-(*Z*)-propenyl-L-prolinu (Crüsemann *et al.*, 2013; Kadlčík *et al.*, 2013).

2.3.4.3 *Biochemická charakterizace adenylačních domén LmbC a CcbC*

Evoluční adaptace domény LmbC na aktivaci substrátové aminokyseliny PPL byla ověřena biochemickou charakterizací adenylačních domén LmbC a CcbC. Adenylační doména CcbC aktivuje svůj přirozený substrát L-prolin s kinetickými parametry srovnatelnými s ostatními samostatně stojícími adenylačními doménami aktivujícími L-prolin a vykazuje striktní substrátovou specifitu. Nulová aktivita CcbC v přítomnosti PPL či EPL potvrzuje, že je vazebné místo domény CcbC příliš malé a má špatný tvar pro aktivaci prolinového derivátu s bočním řetězcem (Kadlčík *et al.*, 2013).

Oproti doméně CcbC má LmbC relaxovanější substrátovou specifitu (Kadlčík *et al.*, 2013). To odpovídá vlastnostem dalších adenylačních domén aktivujících hydrofobní aminokyseliny, které jsou ve většině případů méně selektivní, než domény aktivující polární aminokyseliny (Challis *et al.*, 2000). Změny neribozomálního kódu domény LmbC vedly ke zvýšení afinity k PPL, ale zároveň také ke snížení afinity k L-prolinu (Kadlčík *et al.*, 2013). To zabraňuje kompetici s L-prolinem, běžně se vyskytujícím v buňkách produkčního kmenu linkomycinu.

Díky relaxované substrátové specifitě může LmbC kromě PPL aktivovat i některé další prolinové deriváty. K EPL s dvouuhlíkatým bočním řetězcem má LmbC nižší afinitu než k PPL. Jinak je tomu ovšem u syntetických derivátů prolinu s delšími bočními řetězci - (2*S*,4*R*)-4-butyl-L-prolinu a (2*S*,4*R*)-4-pentyl-L-prolinu. Kinetické parametry LmbC s těmito substráty jsou dokonce lepší než s PPL (Kadlčík *et al.*, 2013).

Relaxovaná substrátová specifita LmbC byla také využita k mutasyntetické přípravě 4'-butyl-4'-depropyl-linkomycinu (BULIN) a 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycinu (PELIN). V kmeni *S. lincolnensis* ATCC 25466 produkujícím linkomycin byl deletován gen *lmbX*, což vedlo k přerušení syntézy PPL. Následně byl tento kmen kultivován v přítomnosti (2*S*,4*R*)-4-butyl-L-prolinu nebo (2*S*,4*R*)-4-pentyl-L-prolinu. Tyto substrátové aminokyseliny byly díky relaxované substrátové specifitě domény LmbC aktivovány a následně kondenzovány s aminocukernou složkou za vzniku BULINu nebo PELINu. Při následných testech měly obě látky vyšší antibakteriální účinek než linkomycin (Ulanova *et al.*, 2010).

2.3.4.4 Změna substrátové specifity adenylačních domén

Jedním z cílů podrobného studia adenylačních domén je vytvoření modifikovaných proteinů se změněnou či rozšířenou substrátovou specifikou. K tomu se v současnosti nejčastěji používá jeden ze dvou následujících typů modifikací. Prvním jsou cílené mutace jednotlivých aminokyselinových zbytků ve vazebném místě pro substrát na základě znalosti neribozomálního kódu adenylačních domén aktivujících cílový substrát. Druhou metodou je tvorba chimérických proteinů obsahujících okrajové části původní adenylační domény a centrální část (zahrnující většinu aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu) domény s cílovou substrátovou specifikou. Oba způsoby modifikací vychází z přirozených mechanismů adaptace adenylačních domén – bodových mutací (Christiansen *et al.*, 2008) či rekombinační výměny oblasti kódující vazebné místo adenylační domény (Fewer *et al.*, 2007).

Cílenými mutacemi byla například změněna substrátová specifita adenylační domény, která je součástí desátého modulu NRPS syntetizující antibiotika závislá na vápníku. Změna jednoho aminokyselinového zbytku neribozomálního kódu vedla k aktivaci aminokyselin (2*S*,3*R*)-3-methyl glutaminu a glutaminu místo přirozených substrátů (2*S*,3*R*)-3-methyl glutamátu a glutamátu (Thirlway *et al.*, 2012).

Tvorba chimérických proteinů byla využita při změnách substrátové specifity adenylační domény HrmO3_A z hormaomycinové NRPS. Hormaomycinové adenylační domény mají vysokou sekvenční shodu a odlišná substrátová specifita u nich pravděpodobně vznikla DNA duplikací následovanou mutacemi či rekombinační výměnou malého centrálního úseku domén. Byly vytvořeny tři chimerické proteiny obsahující okrajové části HrmO3_A a centrální části tří dalších hormaomycinových adenylačních domén (centrální část vždy zahrnovala všech osm nekonzervovaných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu). Substrátová specifita všech tří chimérických proteinů odpovídala specifikám adenylačních domén, ze kterých pocházely centrální části. Žádný z chimérických proteinů neaktivoval přirozený substrát HrmO3_A - (β -Me) fenylalanin. Jiná situace však nastala u chimérických proteinů obsahujících okrajové části HrmO3_A a centrální části adenylačních domén, které jsou součástí jiných NRPS a mají nižší sekvenční shodu s hormaomycinovými adenylačními doménami. V tomto případě se nepodařilo vytvořit aktivní enzymy. Důvod však zůstává neznámý (Crüsemann *et al.*, 2013).

2.4 Cíle práce

- Produkce a purifikace adenylačních domén LmbC s mutovanými vybranými aminokyselinovými zbytky neribozomálního kódu
- Stanovení vlivu těchto mutací na substrátovou specifitu adenylační domény LmbC pro PPL a L-prolin
- Návrh a příprava mutantních forem adenylačních domén LmbC a CcbC se dvěma změnami aminokyselinovými zbytky neribozomálního kódu
- Testování substrátové specifity těchto mutantních forem adenylačních domén LmbC a CcbC

3 Materiál

3.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli BL21 (DE3) (Stratagene)

Kmen použitý k heterologní přípravě všech proteinů v této práci. Obsahuje gen kódující T7 RNA polymerázu. Expres genů pod kontrolou T7 promotoru je reprimována, dokud není indukována exprese T7 RNA polymerázy pomocí IPTG z lac promotoru.

Genotyp: F⁻, gal, dcm, lon, ompT, hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻), λ(DE3)

Escherichia coli XL⁻¹ blue (Stratagene)

Recipientní kmen pro transformaci plazmidové DNA. Využit pro namnožení vektorů pJAKO, pET28b a pET42b.

Genotyp: endA1, gyrA96(nal^R), thi-1, recA1, relA1, lac glnV44, sdR17(r_K⁻ m_K⁺), F'⁺ [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]

3.2 Kultivační média

LB médium – 5 g kvasničný extrakt, 10 g trypton, 10 g NaCl, dH₂O do 1000 ml, pH media 7,5

LB agar – 1000 ml LB médium, 15 g agar

Antibiotika přidávaná do kultivačních medií

Všechna používaná antibiotika byla 1000× koncentrovaná. Antibiotika byla rozpuštěna v dH₂O a skladována v -20 °C. Výsledné koncentrace antibiotik v kultivačních médiích jsou uvedeny v Tabulce 3.1.

Název antibiotika	Výsledná koncentrace v médiu
Kanamycin	30 µg/ml
Ampicilin	100 µg/ml

Tabulka 3.1: Koncentrace antibiotik v kultivačních médiích

Média pro přípravu kompetentních buněk *E. coli*

Médium A – LB médium, 0,2% glukóza, 10 mM MgSO₄

Médium B – LB médium, 36% glycerol, 12% polyethylenglykol, 12 mM MgSO₄

3.3 Pufry a roztoky

Agarózová elektroforéza

TAE pufr – 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH = 8

10× vzorkový pufr – 100 mM EDTA, 1% SDS, 20% glycerol, 0,25% bromfenolová modř, pH = 8

TE⁻¹ pufr – 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH = 8

Standard molekulových velikostí – 100 µl 1 kb Plus DNA ladder (standard obsahující 20 fragmentů DNA o velikostech 100 – 12 000 bp), 100 µl 10× vzorkový pufr, 800 µl TE⁻¹ pufr

Metalofinitní chromatografie

Sonikační (Tris) pufr - 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH = 7,5

Promývací pufr (pro protein CcbC a jeho mutanty) – 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH = 8

Promývací pufr (pro protein LmbC a jeho mutanty) – 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM imidazol, pH = 8

Eluční pufr – 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH = 8

Dialyzační pufr – 50 mM Tris, pH = 8,7

10× koncentrovaný roztok pro přípravu dialyzační membrány – 50 mM EDTA, 2 M Na₂CO₃

Roztok Ponceau S – 0,2% Ponceau S, 3% trichloroctová kyselina

SDS-PAGE

2× SDS vzorkový pufr – 125 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% merkaptoethanol, 20% glycerol, 0,002% bromfenolová modř, pH = 6,8

Elektrodový pufr – 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS

Standard molekulových velikostí - PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder (standard obsahující 9 proteinů s molekulovou hmotností 10 – 250 kDa)

Roztok pro barvení proteinů – 50% methanol, 0,1% Coomassie brilliant blue R-250, 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok – 10% methanol, 10% kyselina octová

Biochemická charakterizace proteinů

Blokovací roztok – 1,6% aktivní uhlí, 4,5% Na₄P₂O₇, 3,5% kyselina chloristá

Promývací roztok – 4,5% Na₄P₂O₇, 3,5% kyselina chloristá

3.4 Enzymy

Název enzymu	Výrobce
Phusion High-Fidelity DNA polymeráza	New England Biolabs
Restrikční endonukleáza DpnI	New England Biolabs
Restrikční endonukleáza NdeI	New England Biolabs
Restrikční endonukleáza HindIII	New England Biolabs
Restrikční endonukleáza XhoI	New England Biolabs
Calf intestines alkaline phosphatase (CIP)	New England Biolabs
T4 DNA ligáza	Thermo Scientific

3.5 Chemikálie

Název	Zkratka	Výrobce
Adenosin 5'-trifosfát	ATP	Sigma
Agar		Oxoid
Akrylamid		Sigma-Aldrich
Aktivní uhlí práškové		Analytika
Ampicilin		Duchefa Biochemie
Betain		Lachema
Bromfenolová modř		Bio-Rad
Coomassie brilliant blue R-250		Serva
Deoxynukleosid trifosfáty	dNTP	Fermentas
Dimethylsulfoxid	DMSO	New England Biolabs
DL-dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich
Dodecylsulfát sodný	SDS	Sigma
Ethidium bromid	EtBr	Sigma
Ethyl diamintetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát	EDTA	Sigma

Glukóza		Lach-Ner
Glycerol		Lachema
Chlorid hořečnatý		Lach-Ner
Chlorid sodný		Lach-Ner
Chloristá kyselina (60%)		E. Merck AG
Imidazol		Sigma-Aldrich
Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid	IPTG	Sigma-Aldrich
Izopropanol		Macherey-Nagel
Kanamycin		Amresco
Kvasničný extrakt		Oxoid
L-prolin		Sigma-Aldrich
Merkaptoethanol		Serva
Methanol		Lachema
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin	TEMED	Serva
<i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid		ICN Biomedicals
Octová kyselina		Lachema
Peroxodisíran amonný	APS	Sigma
Polyethylenglykol		Sigma
Ponceau S		Sigma
Síran hořečnatý heptahydrát		Merck
Síran nikelnatý hexahydrát		Merck
Tetrasodium pyrofosfát		Riedel-de Haën
Trichloroctová kyselina		Lach-Ner
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Sigma-Aldrich
Trypton		Difco
Uhličitan sodný		Lachema

Deriváty prolinu

Deriváty prolinu (2*S*,4*R*)-4-ethyl-L-prolin (EPL) a (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin (PPL) byly syntetizovány Dr. Radkem Gažákem v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. Postup přípravy EPL je popsán v článku Kadlčík *et al.* (2013) a syntéza PPL je popsána v článku Kameník *et al.* (2009).

Radioaktivně značený pyrofosfát

Roztok radioaktivně značeného $\text{Na}_4^{32}\text{P}_2\text{O}_7$ (Phosphorus-32 radionuclide NEX019, 2 mCi) byl zakoupen od firmy PerkinElmer.

3.6 Komerční standardy, soupravy a materiál

Název	Výrobce
1 kb Plus DNA ladder	Invitrogen
Dialyzační membrána Visking® 20/32	Serva
HiTrap kolonky (objem 1 ml)	Pharmacia Biotech
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel
PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Scintilační roztok Rotiszint® eco plus	Roth
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

3.7 Speciální přístroje

Aparatura pro SDS-PAGE Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad)

Centrifugy

Biofuge pico (Heraeus, Německo)

Nechlazená centrifuga, úhlový rotor $24 \times 1,5$ ml

Jouan BR4i (Thermo Scientific, USA)

Chlazená centrifuga, používán úhlový rotor 6×50 ml

5451R (Eppendorf, Německo)

Chlazená centrifuga, úhlový rotor $24 \times 1,5$ ml

Inkubační třepačka Unitron (Infors, Švýcarsko)

Rotační inkubační třepačka

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)

Přístroj pro stanovení koncentrace DNA a proteinů měřením absorbance při daných vlnových délkách

TGradient Thermocycler 96 (Biometra, Německo)

Přístroj pro PCR reakce, umožňuje gradientové nastavení teplot

Peristaltická pumpa P-1 (Pharmacia Biotech, Švýcarsko)

pH metr MP225 (Mettler Toledo, USA)

Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Palmer, USA)

Ultrazvukový sonikátor

Spektrofotometr Hexios γ (Unicam, Velká Británie)

Vortex MS2 Minishaker IKA (IKA-Works, USA)

3.8 Vektory

pJAKO

Vektor pJAKO (3 kbp) byl připraven v naší laboratoři odvozením od komerčního vektoru pBluescript II SK(+) (Stratagene). Standardní klonovací vektor pBluescript II SK(+) nese gen kódující rezistenci k ampicilinu. Na krajích místa pro vložení cílového genu obsahuje sekvence komplementární k sekvenačním primerům pUC/M13f a pUC/M13r. Vektor pJAKO má navíc vložen polylinker obsahující restrikční místa rozpoznávaná endonukleázami EcoRI, NdeI a NcoI (Kyselková *et al.*, 2010).

pJCCV306G

Vektor pJAKO obsahující vložený gen *ccbC* V306G. Gen *ccbC* byl amplifikován z kosmidu nesoucího fragment celesticetinového genového shluku z kmene *Streptomyces caelestis* ATCC 15084 produkujícího celesticetin. Poté byl gen vložen do vektoru pJAKO za použití restrikčních míst NdeI a HindIII. Bodová mutace genu *ccbC* vloženého ve vektoru pJAKO byla provedena metodou QuikChange za použití mutačních primerů V306Gf a V306Gr. Konstrukt byl připraven v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

pJLCG308V

Vektor pJAKO obsahující vložený gen *lmbC* G308V. Gen *lmbC* byl amplifikován bez stop kodónu z chromozomální DNA kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 produkujícího linkomycin. Následně byl gen vložen do vektoru pJAKO za použití restrikčních míst NdeI a XhoI a mutován metodou QuikChange s mutačními primery G308Vf a G308Vr (Kadlčík *et al.*, 2013).

pET28b(+) (Novagen)

Vektor o velikosti 5,4 kbp byl použit k heterologní produkci proteinů z vloženého genu. Vektor pET28b(+) obsahuje inducibilní T7 promotor a sekvenci kódující N-koncovou histidinovou kotvu. Při vložení genu za tuto sekvenci dojde k produkci proteinu s připojenou N-koncovou histidinovou kotvou. Translace proteinu je ukončena na stop kodónu, který je součástí vloženého genu. Dále vektor nese gen kódující rezistenci ke kanamycinu.

pCC

Vektor pET28b(+) s vloženým genem *ccbC*. Gen byl do vektoru vložen za použití restrikčních míst NdeI a HindIII (Kadlčík *et al.*, 2013).

pET42b(+) (Novagen)

Vektor pET42b(+) s velikostí 5,9 kbp byl také využit pro heterologní produkci proteinů z vloženého genu. Tento expresní vektor obsahuje inducibilní T7 promotor a sekvenci kódující C-koncovou histidinovou kotvu následovanou stop kodónem. Při vložení genu bez stop kodónu mezi sekvenci promotoru a sekvenci histidinové kotvy dojde k produkci proteinu s připojenou C-koncovou histidinovou kotvou. Dále vektor nese gen pro rezistenci ke kanamycinu.

pLCA207F

Vektor pET42b(+) s vloženým mutovaným genem *lmbC* A207F. Gen byl do vektoru vložen za použití restrikčních míst NdeI a XhoI. Připraveno v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

pLCL246Y

Vektor pET42b(+) s vloženým mutovaným genem *lmbC* L246Y. Gen byl do vektoru vložen za použití restrikčních míst NdeI a XhoI. Připraveno v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

pLCV274C

Vektor pET42b(+) s vloženým mutovaným genem *lmbC* V274C. Gen byl do vektoru vložen za použití restrikčních míst NdeI a XhoI. Připraveno v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

pLCI300L

Vektor pET42b(+) s vloženým mutovaným genem *lmbC* I300L. Gen byl do vektoru vložen za použití restrikčních míst NdeI a XhoI. Připraveno v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

3.9 Oligonukleotidy

Primery byly navrženy v programu Geneious Pro 5.5.6. a syntetizovány firmou Macrogen, Inc. Dodané primery byly rozpuštěny v TE⁻¹ pufru na 100 μM koncentraci a skladovány v -20 °C. Před přidáním do reakcí byly primery ředěny dH₂O na 10 μM koncentraci.

Název primeru	Délka	CG páry	Sekvence
G308Vf	41 bp	56 %	CAACATCTACGGTCCGACCGAGACCAACGTCTGTACGTACG
G308Vr	41 bp	56 %	CGTACGTACAGACGTTGGTCTCGGTCCGACCGTAGATGTTG
V306Gf	45 bp	64 %	GAGACGAATGGGTGCACGTTTCGAGCAGGTCTTAGCACCCGGAC
V306Gr	45 bp	64 %	GTCCGGCGGTGCTAGGACCTGCTCGAACGTGCACCCATTCGTCTC
A207Ff	33 bp	70 %	CGACGTGTCCGTCTTCTCGGTGCTCGGCTCCGC
A207Fr	33 bp	70 %	GCGGAGCCGAGCACCGAGAAGACCGACACGTCCG
F205Af	36 bp	64 %	GACGTTTCGGTGGCCAGCCTCTTCGGTGTGCTCTG
F205Ar	36 bp	64 %	CAGAGCAGCACCGAAGAGGCTGGCCACCGAAACGTC

Tabulka 3.2: Primery použité při metodě QuikChange

Název primeru	Délka	CG páry	Sekvence
lmbCseq	19 bp	74 %	AGTGCGTGGCCCACACCGG
ccbCseq	19 bp	79 %	GGCGTGGCCATCAGCCGGG
pUC/M13f	17 bp	53 %	GTTTCCCGAGTCACGAC
pUC/M13r	17 bp	47 %	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabulka 3.3: Primery použité při sekvenování

3.10 Software

Geneious Pro 5.5.6. – program pro práci s DNA i proteinovými sekvencemi

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) – databáze sekvencí

Mendeley 1.12.3. – program pro správu článků a tvorbu citací

Chemsketch 12.01 – program pro tvorbu chemických vzorců

KaleidaGraph 4.5.2 – program pro analýzu dat a tvorbu grafů

4 Metody

4.1 Kultivace *E. coli* na pevných půdách a v tekutých médiích

Kultivace na pevných půdách probíhala na Petriho miskách s LB agarem a příslušným antibiotikem ve 37 °C. Kultivace v tekutých médiích pak probíhala v rotační třepačce v LB médiu s příslušným antibiotikem při 37 °C a 200 RPM (otáčkách za minutu).

4.2 Metody práce s DNA

4.2.1 Příprava kompetentních buněk

Nejprve byly 2 ml LB média zaočkovány kolonií *E. coli* a kultivovány přes noc ve 37 °C při 200 RPM. Druhý den bylo 100 ml média A zaočkováno bakteriální kulturou *E. coli* na OD₆₀₀ zhruba 0,04. Buňky byly dále kultivovány až do OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 (střed exponenciální fáze růstu). Následně bylo médium chlazeno 10 minut na ledu a poté centrifugováno (4000× g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml předchlazeného média A. Poté bylo přidáno 5 ml předchlazeného média B. Alikvóty kompetentních buněk (100 µl) byly uchovávány v -70 °C.

4.2.2 Transformace *E. coli* tepelným šokem

Ke 100 µl kompetentních buněk *E. coli* na ledu byly přidány 2 µl plazmidové DNA (minimálně 100 ng DNA). Směs byla lehce promíchána a inkubována 30 minut na ledu. Následně byly buňky vystaveny tepelnému šoku ve vodní lázni o teplotě 42 °C po dobu 60 sekund. Po ochlazení buněk na ledu (1-2 minuty) se přidal 1 ml LB média předeřhátého na 37 °C. Poté byly buňky kultivovány ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Během této kultivace dochází mimo jiné k expresi genů rezistence, které jsou na vloženém plazmidu a zajišťují selekci. Následně byly buňky vysety na misky s LB agarem a selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc ve 37 °C.

4.2.3 Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk (Midiprep)

Pro izolaci plazmidové DNA z bakteriálních buněk byla využita komerční souprava NucleoBond® Xtra Midi/Maxi. Některé principy této soupravy vychází z metod popsaných v publikaci Birnboim & Doly (1979). Během izolace dochází k lyzi buněk a vazbě negativně

nabité DNA na pozitivně nabitě křemičité kuličky aktivované pomocí methyl-amino-ethanolu a poté k přečištění DNA alkoholovým srážením.

Buňky *E. coli* obsahující plazmid byly zaočkovány do 100 ml LB media se selekčním antibiotikem a poté kultivovány ve 37 °C při 200 RPM přes noc. Následně bylo médium centrifugováno (4000× g, 4 °C, 15 minut) a supernatant odstraněn. Buňky byly dle protokolu výrobce soupravy resuspendovány a lyzovány. Buněčný lyzát byl neutralizován a nanesen na filtr v kolonce. Následovalo promytí, při kterém se DNA zachytila na křemičitých kuličkách na kolonce. Pak byl odstraněn filtr, plazmidová DNA zachycená na křemičitých kuličkách znovu promyta a eluována. Poté byla DNA sražena přidáním izopropanolu a zachycena na další membráně. Pak byla DNA promyta 70% ethanolem a vysušena. Přečištěná DNA byla eluována 600 µl TRIS pufru (5 mM Tris/HCl, pH 8,5). Koncentrace plazmidové DNA byla následně změřena na přístroji NanoDrop 1000 a DNA skladována při -20 °C.

4.2.4 Štěpení plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla štěpena restrikcí endonukleázami rozpoznávajícími specifickou sekvenci na DNA. Reakční směs obsahovala plazmidovou DNA, daný restrikcí enzym (aktivita 5 U na 1 µg DNA), pufr dodaný výrobcem enzymu a dH₂O. Reakce probíhaly ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 1 - 1,5 hodiny. Byly použity restrikcí endonukleázy NdeI, HindIII a XhoI.

4.2.5 Defosforylace linearizovaného vektoru

Defosforylace 5' konců linearizovaného vektoru brání jejich opětovnému spojení a tím cirkularizaci celého vektoru. K tomu byla použita fosfatáza CIP (Calf intestines alkaline phosphatase, 5 U na 3 µg vektoru), která byla přidána přímo k reakční směsi po restrikcí štěpení. Reakce byla inkubována 1 hodinu ve vodní lázni o 37 °C. Poté byl enzym inaktivován teplotou 65 °C po dobu 30 minut.

4.2.6 Ligace

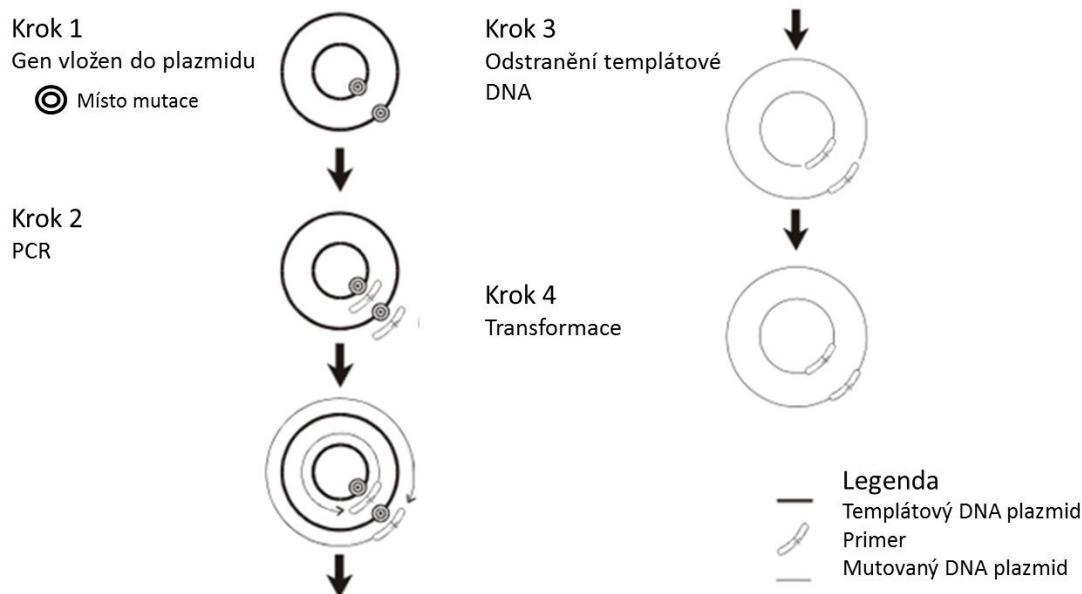
Ligace byla použita ke vložení úseku DNA do linearizovaného vektoru, například naštěpeného restrikcí enzymy. Do ligační reakce bylo vloženo 20 – 100 ng linearizovaného vektoru. Množství vkládaného úseku DNA (inzertu) pak bylo v poměru k vektoru 3:1. Reakce probíhala 10 minut ve 22 °C. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 4.1.

Reakční směs	
Linearizovaný vektor	X μ l
Inzert	Y μ l
10 \times T4 DNA ligační pufr	2 μ l
T4 DNA ligáza (5 000 U/ml)	1 μ l
dH ₂ O	do celkového objemu 20 μ l

Tabulka 4.1: Reakční směs pro ligaci DNA

4.2.7 Cílená mutagenese metodou QuikChange

Cílem této *in vitro* metody je vnést bodovou mutaci do genu obsaženého v dvouvláknovém cirkulárním plazmidu (Obrázek 4.1, Krok 1). Metoda je založena na amplifikaci celé sekvence plazmidu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s použitím dvou navzájem komplementárních primerů (Obrázek 4.1, Krok 2). Oba primery obsahují nepárující nukleotid či nukleotidy v místě požadované mutace. Produktem PCR je plazmid nesoucí mutovaný gen a obsahující nepřekrývající se přerušení v řetězcích DNA. Templátová DNA je poté odstraněna endonukleázou DpnI (Obrázek 4.1, Krok 3). Ta specificky štěpí methylovanou templátovou DNA v sekvenci 5'-Gm6ATC-3'. Tím dojde k naštěpení plazmidů obsahujících nemutovaný gen v PCR směsi a selekci PCR produktů, které nejsou dam methylované. Plazmidy, obsahující mutovaný gen, byly následně vneseny do kompetentních buněk *E. Coli* XL⁻¹ blue metodou tepelného šoku. V buňkách dojde k opravě přerušení v plazmidové DNA, které vznikly při PCR (Obrázek 4.1, Krok 4).



Obrázek 4.1: Schéma cílené mutagenese metodou QuikChange

4.2.7.1 PCR využitá při metodě QuikChange

Při PCR byla použita vysoce přesná Phusion High-Fidelity DNA polymeráza. Složení reakční směsi pro PCR o celkovém objemu 50 μ l je uvedeno v Tabulce 4.2. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce 4.3.

Reakční směs	
Plazmidová DNA	1 μ l (minimálně 400 ng DNA)
Primer přímý (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer zpětný (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
DMSO (100%)	2,5 μ l
5 \times Phusion GC reakční pufr	10 μ l
Betain (2,6 M)	25 μ l
Phusion DNA polymeráza (2000 U/ml)	1 μ l
dH ₂ O	7,5 μ l

Tabulka 4.2: Složení reakční směsi pro QuikChange PCR

Kroky	Teplota [°C]	Čas	
1	95	5 min	Počáteční denaturace
2	65	pauza	Přidání polymerázy
3	95	30 s	18 × Denaturace Nasedání primerů Prodlužování DNA
4	55	1 min	
5	68	5 min	
6	68	7 min	Dokončení syntézy komplementárních řetězců

Tabulka 4.3: Reakční podmínky QuikChange PCR

4.2.7.2 Štěpení restriční endonukleázou DpnI

Při štěpení restriční endonukleázou DpnI se do restriční reakce vkládá přímo reakční směs po PCR. Složení reakční směsi o celkovém objemu 50 μ l je uvedeno v Tabulce 4.4. Reakce následně probíhala ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Poté byl enzym inaktivován v termobloku teplotou 80 °C po 20 minut.

Reakční směs	
PCR směs	35 μ l
DpnI (20 000 U/ml)	1 μ l
NEBuffer 4	5 μ l
dH ₂ O	9 μ l

Tabulka 4.4: Reakční směs pro štěpení endonukleázou DpnI

4.2.8 Elektroforéza v agarózovém gelu

Při elektroforéze se molekuly DNA pohybují v elektrickém poli díky svému zápornému náboji od katody k anodě. Agarózový gel pak tvoří hustou síť, kterou prochází větší molekuly pomaleji než menší a díky tomu se rozdělí podle velikosti.

Elektroforéza byla prováděna v 0,8% agarózovém gelu v TAE pufru. Pro vyhodnocení pod UV lampou byla DNA zviditelněna ethidium bromidem (koncentrace v gelu 0,005%). Vzorek byl před nanesením smíchán s 10× vzorkovým pufrům. Jako standard byl použit 1kb Plus DNA ladder. Napětí během elektroforetického dělení bylo 3 – 5 V/cm.

4.2.9 Izolace DNA z agarózového gelu

Pro izolaci byla použita komerční souprava Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Principem této metody je vazba DNA na křemičitou membránu za vysoké iontové síly, její promytí a následná eluce DNA roztokem o nízké iontové síle.

Část agarózového gelu s fragmentem DNA o požadované velikosti byla vyříznuta, smíchána s roztokem o vysoké iontové síle a inkubována ve vodní lázni o teplotě 50-65 °C. Následně byl rozpuštěný gel obsahující DNA přenesen na kolonku. Zde se DNA zachytila na membráně a byla podle protokolu výrobce promývána. Na konci byla DNA eluována z membrány 50 µl dH₂O a skladována v -20 °C.

4.2.10 Přečištění DNA po enzymatických reakcích

Pro přečištění DNA po skončení enzymatických reakcí byla použita stejná komerční souprava Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System jako pro izolaci DNA z agarózového gelu. Reakční směs byla smíchána s roztokem o vysoké iontové síle v poměru 1:1. Následně byla směs přenesena na kolonku. Na ní došlo k zachycení DNA, která byla poté promývána podle protokolu dodaného výrobcem. Na závěr byla DNA eluována z membrány v kolonce 50 µl dH₂O a skladována v -20 °C.

4.2.11 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA bylo provedeno firmou Macrogen Inc., Republic of South Korea. Sekvenační data byla zpracována s pomocí programu Geneious Pro 5.5.6.

4.3 Metody práce s proteiny

4.3.1 Heterologní produkce proteinů

Pro heterologní produkci proteinů byly použity buňky *E. coli* BL21 (DE3). Do nich byl transformací tepelným šokem vložen expresní vektor pET28b nebo pET42b, nesoucí gen kódující resistenci k antibiotiku a gen, ze kterého bude produkován cílový protein. Buňky pak byly vysety na LB agar s přidaným antibiotikem a kultivovány přes noc ve 37 °C.

Druhý den byly buňky z LB agaru spláchnuty do 100 ml předeřhátého LB média s přidaným antibiotikem. Výchozí koncentrace buněk v médiu byla $OD_{600} = 0,1 - 0,2$. Následně buňky rostly ve 37 °C při 200 RPM do výsledné optické denzity $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ (pozdní exponenciální fáze růstu). Poté byla indukována heterologní exprese genu přidáním 40 μ l 1 M IPTG na 100 ml kultury. Exprese probíhala 20 hodin v 17 °C při 200 RPM. Následně bylo médium centrifugováno (3000 \times g, 4 °C, 11 minut) a supernatant odstraněn. Pelet byl skladován v -20 °C.

4.3.2 Sonikace buněk

Sonikovány byly buňky zmrazené po heterologní produkci proteinů, které byly rozmrazeny a během celé práce udržovány na ledu. Buňky ze 100 ml kultury byly nejprve resuspendovány v 5 ml sonikačního puftru. Poté byly buňky rozděleny do alikvótů po 1 ml. Sonikace probíhala 3 \times 10 sekund, kdy byly buňky mezi každým cyklem sonikace chlazeny nejméně 30 sekund na ledu.

4.3.3 Metaloafinitní chromatografie

Metoda byla využita k oddělení heterologně produkováných proteinů s histidinovou kotvou ze směsi všech proteinů buněčného lyzátu produkční bakterie *E. coli* BL21 (DE3).

Pro to je použita kolonka HiTrap, obsahující ligand (ionty Ni^{2+}) imobilizovaný vazbou na iminoctovou kyselinu, která je navázána na sorbentu. Heterologně produkováný protein obsahuje histidinovou kotvu, která tvoří reverzibilní vazbu s Ni^{2+} ionty. Při použití promývacího puftru s nižší koncentrací imidazolu pak zůstane tento protein navázán na koloně, zatímco jsou ostatní proteiny odmyty. Na závěr je pak purifikovaný protein eluován pufrem s vyšší koncentrací imidazolu.

Při metaloafinitní chromatografii byla použita 1 ml HiTrap kolonka, z které byl nejprve pomocí 5 ml dH₂O odmyt ethanol. Následně byla nabita 0,5 ml 0,1 M $NiSO_4 \times 6 H_2O$, promyta

5 ml dH₂O a ekvilibrována 5 ml sonikačního pufru. Buněčný lyzát byl po sonikaci centrifugován (16 000× g, 4 °C, 15 min.). Supernatant byl nanesen na kolonku, kde se zachytily heterologně produkované proteiny díky histidinové kotvě. Následovalo promytí kolonky 5 ml předchlazeného promývacího pufru (jeho složení se lišilo podle purifikovaného proteinu). Protékající pufr byl po 1 ml frakcích zachytáván do zkumavek na ledu. Z kolonky byl pak protein eluován 5 ml předchlazeného elučního pufru, který byl také jímán po 1 ml frakcích do zkumavek na ledu. Kolonka byla na závěr promyta sonikačním pufrům.

4.3.4 Detekce proteinů roztokem Ponceau S

Barvení roztokem Ponceau S slouží k orientačnímu určení přítomnosti proteinů v roztoku. Na nitrocelulózovou membránu bylo nanášeno 5 µl analyzovaných frakcí z HiTrap kolonky. Po zaschnutí membrány byly proteiny zviditelněny ponořením do roztoku Ponceau S. Po opláchnutí pod tekoucí vodou zůstaly na místě frakcí obsahujících proteiny červené skvrny.

4.3.5 Dialýza

Dialýza byla použita pro odstranění imidazolu z elučního pufru, ve kterém je produkovaný protein rozpuštěn po metaloafinitní chromatografii. Imidazol může na rozdíl od proteinu procházet polopropustnou dialyzační membránou Visking® (průměr pórů zhruba 25 Å). Dojde tak k vyrovnání koncentrace imidazolu na obou stranách polopropustné membrány.

Membrána byla připravena 10 minutovým povařením v roztoku pro přípravu dialyzační membrány a poté v dH₂O. Připravená membrána byla promyta 3 ml sonikačního pufru a z jedné strany uzavřena klipsem. Následně byly do membrány nanášeny frakce elučního pufru obsahující purifikované proteiny. Membrána uzavřená z obou stran byla vložena do kádinky se 2 l dialyzačního pufru. Dialýza probíhala přes noc ve 4 °C za stálého míchání. Po dialýze byl protein uložen v -20 °C.

4.3.6 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je metoda využitá k rozdělení proteinů podle délky polypeptidového řetězce a molekulové hmotnosti. Před nanášením na gel jsou proteiny denaturovány působením SDS (dodecylsulfát sodný), β-merkptoethanolu a zahřátím. β-merkptoethanol také redukuje cysteinové můstky mezi podjednotkami multimerních

proteinů. SDS se naváže na proteiny, čímž jim dodává záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti. Při samotné elektroforéze dochází v zaostřovacím gelu ke koncentraci vzorku do úzkého proužku, což zvyšuje rozlišovací schopnost SDS-PAGE. V separačním gelu pak probíhá dělení proteinů, kdy menší proteiny pronikají póry gelu k anodě rychleji než větší.

Pro SDS-PAGE se musí mezi dvě skla připravit akrylamidový gel. Jeho spodní část tvoří 10% separační gel. V horní části je pak zaostřovací gel. Složení gelů uvedené v Tabulce 4.5 je optimalizované pro použitou aparaturu Mini-PROTEAN® Tetra Cell.

Vzorky pro SDS-PAGE byly smíchány v poměru 1:1 s 2× SDS vzorkovým pufrům. Následně byly zahřáty v termobloku na 80 °C po dobu 15 minut. Na gel byly nanášeny 3 µl standardu PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder a 10 µl každého vzorku. Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru při napětí 100 V po prvních 15-20 minut a poté 170 V až do konce. Po skočení elektroforézy byl gel ponořen na 15-20 minut do roztoku pro barvení proteinů. Následovalo ponoření do odbarvovacího roztoku a odbarvování přes noc.

	Separací gel (10%)	Zaostřovací gel
40% akrylamid + 1,7% bisakrylamid	1,25 ml	112 µl
Tris-Cl, pH = 8,9 (1,875 M)	1 ml	-
Tris-Cl, pH = 6,9 (1 M)	-	126 µl
dH ₂ O	2,625 ml	875 µl
SDS (4%)	125 µl	32 µl
APS (30%)	5 µl	2,5 µl
TEMED	5µl	2,5 µl

Tabulka 4.5: Složení gelů pro SDS PAGE

4.3.7 Měření koncentrace purifikovaných proteinů

Koncentrace proteinů po dialýze byla stanovena spektrofotometrem NanoDrop 1000. Byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm, kde absorbují proteiny, a poměr absorbance při 260 a 280 nm, který vyjadřuje míru znečištění vzorku nukleovými kyselinami.

4.3.8 Biochemická charakterizace adenylačních domén

Pro biochemickou charakterizaci aktivačních reakcí adenylačních domén s jednotlivými substráty byla použita metoda přenosu radioaktivity z [³²P]-značeného PPi na ATP (ATP-[³²P]PPi Exchange Assay).

Při přímé reakci je substrátová aminokyselina aktivována připojením AMP za spotřeby ATP a vzniku PPi. Adenylační doména ovšem katalyzuje i zpětnou reakci, při které vzniká ATP z AMP navázaného na substrátové aminokyselině a PPi, který je součástí reakční směsi. Při této reakci může být do ATP zabudován radioaktivní [³²P]PPi, přidaný do reakční směsi. Po zastavení reakce je ATP izolováno vazbou na aktivní uhlí. Množství vzniklého radioaktivního ATP je přímo úměrné afinitě adenylační domény k danému substrátu (Stachelhaus *et al.*, 1998).

Výchozím materiálem pro biochemickou charakterizaci byly proteiny s histidinovou kotvou purifikované metaloafinitní chromatografií. Substráty byly aminokyseliny L-prolin, (2*S*,4*R*)-4-ethyl-L-prolin (EPL) a (2*S*,4*R*)-4-propyl-L-prolin (PPL).

Kofaktorem adenylačních domén jsou hořčičnaté kationty, které jsou do reakcí přidávány v podobě MgCl₂. Množství ředěného roztoku radioaktivního [³²P]PPi v reakci bylo upravováno podle jeho aktuální aktivity tak, aby aktivita v reakci byla zhruba 150 000 dpm (rozpady za minutu). Množství substrátu a enzymu záviselo na parametrech jednotlivých pokusů. Reakce probíhaly v objemu 100 µl. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 4.6.

Reakční směs		
Zásobní roztok	Cílová koncentrace v reakční směsi	Množství v reakční směsi
Tris-HCl pH = 8,7 (0,5 M)	50 mM	10 µl
MgCl ₂ (100 mM)	2 mM	2 µl
DTT (50 mM)	1 mM	2 µl
ATP (50 mM)	1,2 mM	2 µl
PPi (20 mM)	1 mM	5 µl
[³² P]PPi		X µl
Substrát		Y µl
Enzym		Z µl
dH ₂ O		Doplnění do 100 µl

Tabulka 4.6: Složení reakční směsi pro biochemickou charakterizaci adenylačních domén

Reakce byla spuštěna přidáním čerstvě rozmraženého enzymu a poté probíhala 30 minut ve vodní lázni o teplotě 28 °C. Pak byla zastavena přidáním 0,5 ml blokovacího roztoku a promícháním. Následně byla reakční směs centrifugována (13 000× g, pokojová teplota, 4 min.) a byl odstraněn supernatant. Usazené aktivní uhlí bylo resuspendováno v 0,5 ml promývacího roztoku. Poté byla reakce znovu centrifugována (13 000× g, pokojová teplota, 4 min.) a odstraněn supernatant. Následovalo druhé promytí 0,5 ml promývacího roztoku. Po něm bylo aktivní uhlí resuspendováno v 0,5 ml dH₂O a přeneseno do scintilační zkumavky s 5 ml scintilačního roztoku.

Aktivita byla měřena přístrojem Beckman LS 6500 pracovníky oddělení radiometrie.

4.3.8.1 *Vyhodnocení výsledků biochemické charakterizace*

Pro výpočet kinetických parametrů bylo využito proložení křivky Michaelis-Mentenové naměřenými daty za použití nelineární regrese v programu KaleidaGraph 4.5.2. Byly zjišťovány tyto kinetické parametry – Michaelisova konstanta (K_m), katalytická konstanta (k_{cat}) a katalytická účinnost (k_{cat}/K_m). Michaelisova konstanta je rovna koncentraci substrátu, při níž je dosaženo polovičního nasycení enzymu a tím i poloviny limitní rychlosti. Vysoká K_m tak značí nízkou afinitu enzymu k danému substrátu a naopak. Katalytická konstanta udává počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou enzymu za sekundu. Posledním parametrem je poměr k_{cat}/K_m , označovaný jako katalytická účinnost. Ta popisuje, jak rychle reaguje enzym se substrátem ve chvíli, kdy se s ním střetne. Vysoké katalytické účinnosti je dosaženo v případě vysoké katalytické konstanty (rychlá přeměna molekul substrátu) a nízké Michaelisovy konstanty (vysoká afinita enzymu k substrátu). Dále byl pro každou aktivační reakci vytvořen graf popisující závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu.

5 Výsledky

5.1 Stanovení vlivu aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu na substrátovou specifitu domény LmbC

Tato diplomová práce navazuje na práci Kadlčík *et al.* (2013), ve které je srovnávána substrátová specifita dvou adenylačních domén LmbC a CcbC, které se pravděpodobně vyvinuly z jedné adenylační domény. U domény LmbC se v průběhu evoluce zřejmě vyvinula nová substrátová specifita pro PPL a to především mutacemi pěti aminokyselinových zbytků ve vazebném místě, v tzv. neribozomálním kódu adenylační domény. Byly proto připraveny mutanty domény LmbC, které by umožnily posoudit vliv aminokyselinových zbytků ve vazebném místě LmbC na substrátovou specifitu domény LmbC pro L-prolin a PPL. Bylo jednotlivě změněno všech pět aminokyselinových zbytků, které jsou v neribozomálním kódu LmbC odlišné oproti neribozomálnímu kódu CcbC (Tabulka 5.1). Aminokyselinový zbytek neribozomálního kódu LmbC byl vždy zaměněn za aminokyselinový zbytek, který je ve stejné pozici v neribozomálním kódu CcbC.

Číselné označení		204	207	246	274	276	300	308	309
aminokyselinových zbytků		202	205	244	272	274	298	306	307
Adenylační doména	Přirozený substrát	Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu							
LmbC	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C
CcbC	Prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C

Tabulka 5.1: Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu adenylačních domén LmbC a CcbC

Mutované aminokyselinové zbytky jsou barevně vyznačeny. První řádek číselného označení aminokyselinových zbytků odpovídá LmbC, druhý řádek pak CcbC.

V publikované práci Kadlčík *et al.* (2013) již byly biochemicky charakterizovány obě nemutované adenylační domény LmbC a CcbC a dále pak mutovaná doména LmbC G308V. Tato pozice byla na základě analýzy homologních modelů vazebných míst LmbC a CcbC považována za nejzásadnější pro afinitu LmbC k PPL (viz Přehled literatury, kapitola 2.3.4.2).

V této práci byly produkovány a charakterizovány zbývající čtyři mutované varianty domény LmbC obsahující vždy jednu aminokyselinovou záměnu v neribozomálním kódu – A207F, L246Y, V274C a I300L. Následně byly stanoveny kinetické parametry adenylační

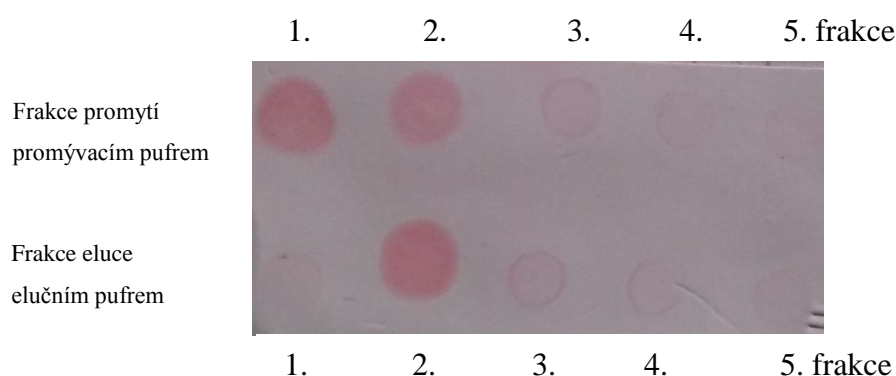
aktivity mutovaných domén se substráty L-prolinem a PPL. Vliv jednotlivých mutací v neribozomálním kódu na substrátovou specifitu LmbC se posuzoval podle změny kinetických parametrů mutovaných domén v porovnání s kinetickými parametry nemutované domény LmbC.

5.1.1 Heterologní produkce a purifikace mutovaných proteinů LmbC

Pro produkci a purifikaci těchto proteinů byly použity stejné pufrы i podmínky, jako jsou popsány pro protein LmbC v publikaci Kadlčík *et al.* (2013). Mutované proteiny LmbC s C-koncovými histidinovými kotvami byly exprimovány z vektorů pLCA207F, pLCL246Y, pLCV274C a pLCI300L. Tyto vektory obsahující mutované geny již byly připraveny v laboratoři v rámci předchozích nepublikovaných experimentů.

Jednotlivé expresní vektory byly vneseny do buněk *E. coli* BL21 (DE3) metodou tepelného šoku. Heterologní produkce všech těchto proteinů probíhala v LB médiu s přidaným kanamycinem. Poté byly proteiny purifikovány pomocí HiTrap kolonky metodou metaloafinitní chromatografie. Kolonka byla nejprve promývána promývacím pufrem (pro protein LmbC a jeho mutanty) se 100 mM imidazolem. Z kolonky byl protein vymýván elučním pufrem s 250 mM imidazolem.

Vzorky jednotlivých frakcí promývacího i elučního pufru byly nejprve orientačně testovány na přítomnost proteinů barvením Ponceau S. Přítomnost proteinu byla ve všech experimentech detekována ve druhé frakci elučního pufru. Jako příklad je na Obrázku 5.1 uvedena detekce proteinu LmbC A207F.



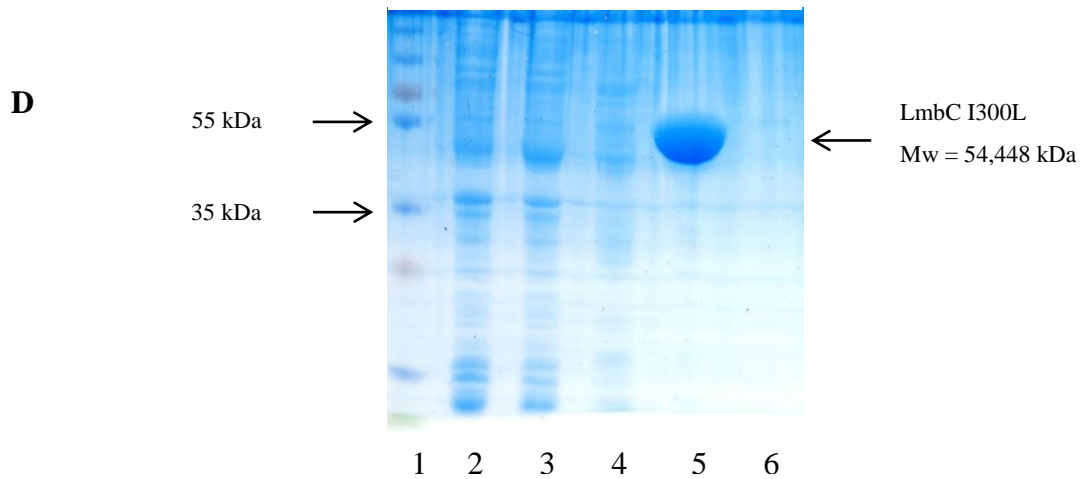
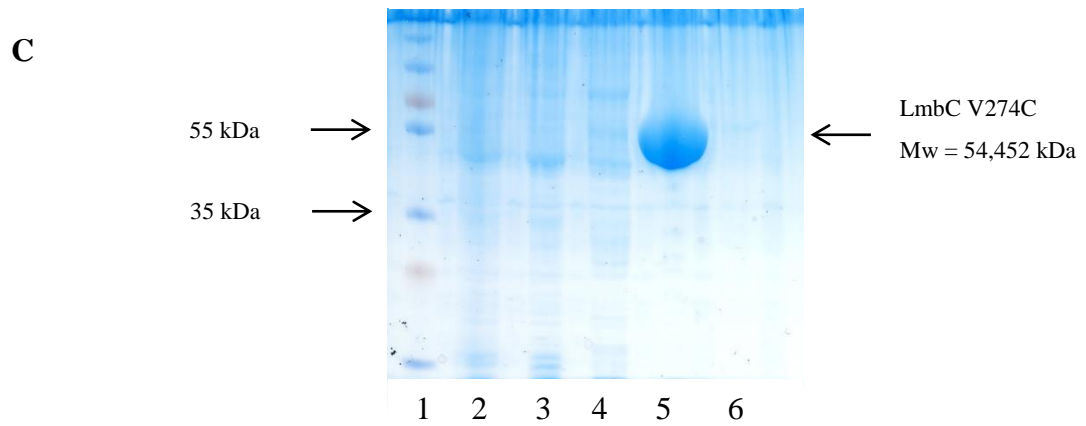
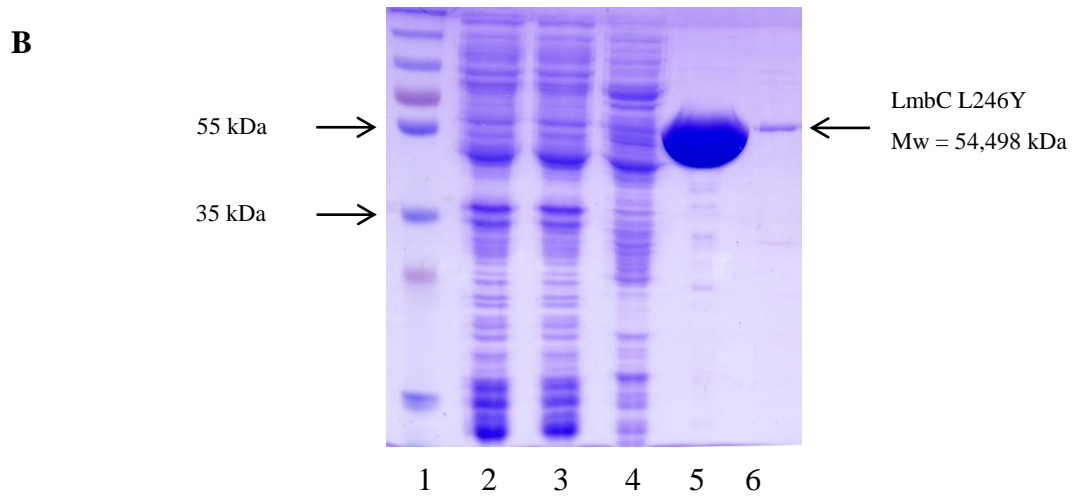
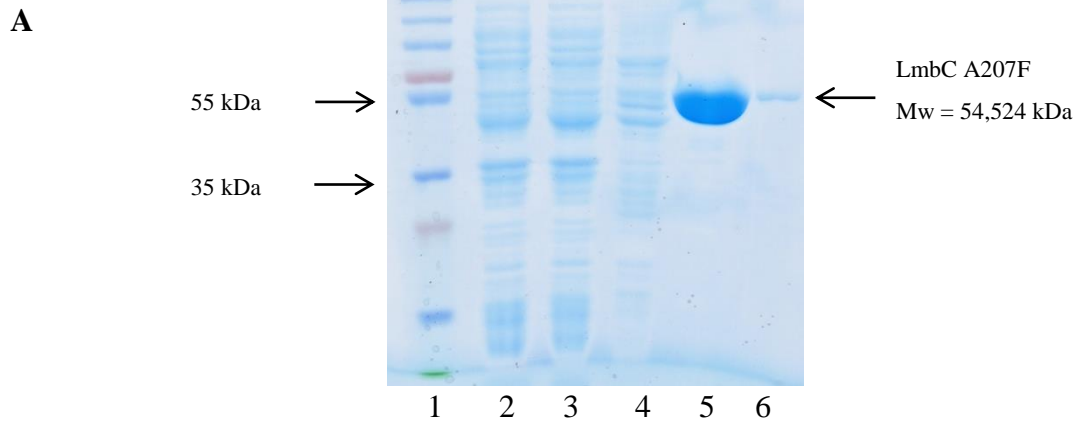
Obrázek 5.1: Detekce proteinu LmbC A207F roztokem Ponceau S

Vzorky jednotlivých frakcí obarvené Ponceau S; horní řada frakce promytí promývacím pufrem (100 mM imidazol); dolní řada frakce eluce elučním pufrem (250 mM imidazol)

Pro další postup po purifikaci proto byla vždy použita druhá frakce elučního pufru. Z této frakce byl nejprve dialýzou odstraněn imidazol a následně byla přístrojem NanoDrop 1000 stanovena koncentrace jednotlivých purifikovaných proteinů (Tabulka 5.2). Uvedené hodnoty odpovídají koncentracím proteinů ve vzorcích použitých pro finální stanovení kinetických parametrů adenylačních domén. Vzorky vybraných frakcí promývacího i elučního pufru byly ve všech případech naneseny na SDS-PAGE (Obrázek 5.2).

Protein	Koncentrace po dialýze
LmbC A207F	2,92 mg/ml
LmbC L246Y	3,42 mg/ml
LmbC V274C	3,87 mg/ml
LmbC I300L	2,98 mg/ml

Tabulka 5.2: Koncentrace proteinů po dialýze



Obrázek 5.2 (předchozí strana): Purifikace proteinů LmbC A207F (A), LmbC L246Y (B), LmbC V274C (C) a LmbC I300L (D)

Vzorokly vybraných frakcí nanosené na SDS-PAGE:

1 – Standard molekulových hmotností, 2 – Frakce proteinů nezachycených při nanášení na kolonku, 3 – První frakce promytí promývacím pufrem (100 mM imidazol), 4 – Druhá frakce promytí promývacím pufrem (100 mM imidazol), 5 – Druhá frakce eluce elučním pufrem (250 mM imidazol), 6 – Třetí frakce eluce elučním pufrem (250 mM imidazol)

5.1.2 Biochemická charakterizace adenylačních domén

Pro biochemickou charakterizaci adenylačních domén byla použita metoda přenosu radioaktivity z [³²P]-značeného PPI na ATP (ATP-[³²P]PPI Exchange Assay). Tato metoda byla použita také při předchozích biochemických charakterizacích adenylačních domén LmbC a CcbC (Kadlčík *et al.*, 2013). Je ovšem standardně využívána i pro charakterizaci jiných samostatně stojících adenylačních domén (Méjean *et al.*, 2010; Kopp *et al.*, 2011). Veškeré biochemicky charakterizované proteiny v této práci byly vždy s připojenou histidinovou kotvou. V této části práce byly zjišťovány kinetické parametry adenylačních domén se dvěma substrátovými aminokyselinami - L-prolinem a PPL. Pro každou dvojici enzym-substrát byla nejprve při předběžných měřeních stanovena optimální koncentrace enzymu i substrátu pro finální měření. Finální měření bylo vždy provedeno ve třech paralelních testech. Na základě naměřených hodnot byly vypočteny následující kinetické parametry – Michaelisova konstanta (K_m), katalytická konstanta (k_{cat}) a katalytická účinnost (k_{cat}/K_m). Pro výpočty a konstrukci grafů byl využit program KaleidaGraph 4.5.2.

Kinetické parametry mutovaných adenylačních domén LmbC jsou srovnávány s nemutovanou doménou LmbC. Její kinetické parametry uvedené v Tabulce 5.3 již byly určeny v publikaci Kadlčík *et al.* (2013).

Kinetické parametry		
Substrát	L-prolin	PPL
Michaelisova konstanta (K_m)	480 mM	0,28 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	20 min ⁻¹	33 min ⁻¹
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	0,042 mM ⁻¹ min ⁻¹	120 mM ⁻¹ min ⁻¹

Tabulka 5.3: Kinetické parametry enzymu LmbC s L-prolinem a PPL

Kinetické parametry LmbC jsou převzaty z práce Kadlčík *et al.* (2013).

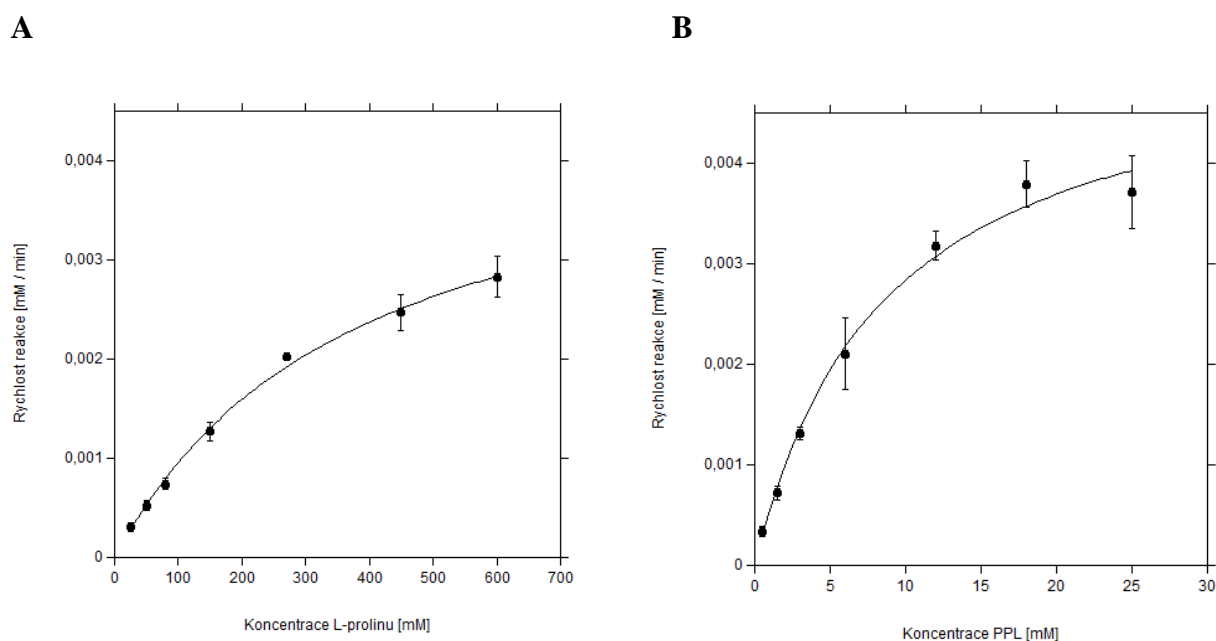
5.1.2.1 Protein LmbC A207F

Adenylační doména LmbC A207F aktivuje oba testované substráty L-prolin i PPL (Tabulka 5.4, Obrázek 5.3). Výrazně vyšší afinitu má ovšem enzym k PPL než k L-prolinu. Hodnota katalytické konstanty je mírně vyšší v reakci s PPL.

Do aktivační reakce s L-prolinem bylo při finálním měření vloženo 11,1 μg enzymu LmbC A207F, což odpovídá koncentraci proteinu $2,04 \times 10^{-3}$ mM. Do reakce se substrátem PPL to bylo 6,6 μg enzymu, což odpovídá koncentraci $1,2 \times 10^{-3}$ mM.

Kinetické parametry		
Substrát	L-prolin	PPL
Michaelisova konstanta (K_m)	384,4 mM	8,6 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	$2,3 \text{ min}^{-1}$	$4,4 \text{ min}^{-1}$
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	$0,006 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$0,51 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Tabulka 5.4: Kinetické parametry enzymu LmbC A207F s L-prolinem a PPL



Obrázek 5.3: Aktivační reakce enzymu LmbC A207F s L-prolinem (A) a s PPL (B)

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

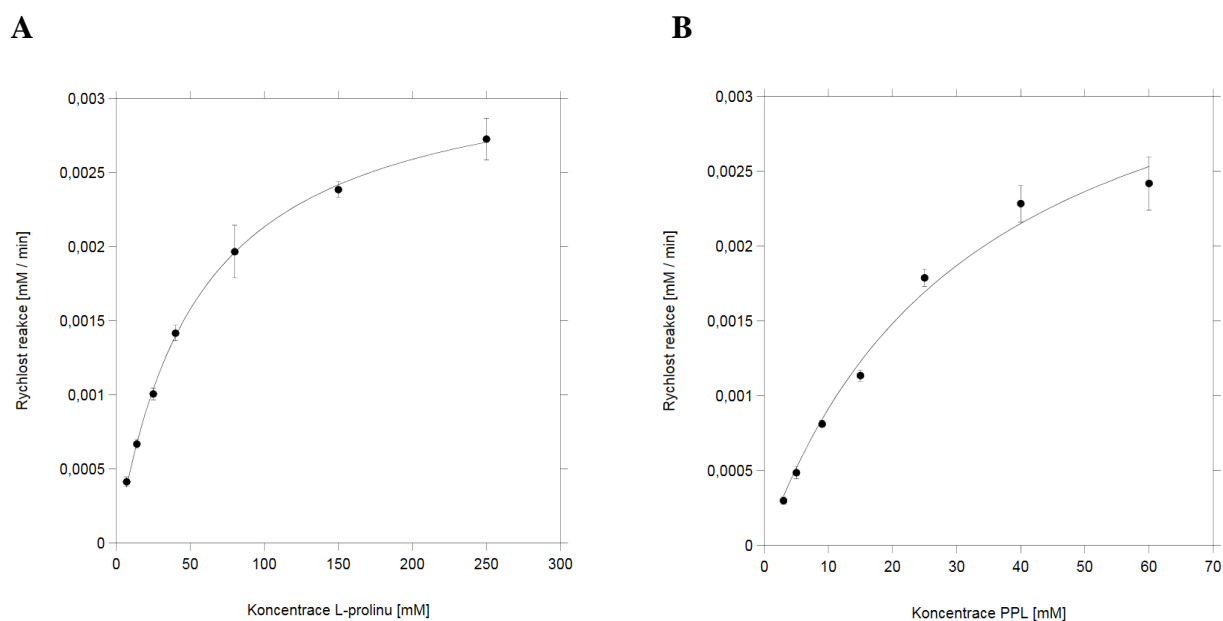
5.1.2.2 Protein LmbC L246Y

Adenylační doména LmbC L246Y má srovnatelnou afinitu k oběma testovaným substrátům L-prolinu i PPL (Tabulka 5.5, Obrázek 5.4). Hodnota katalytické konstanty v reakci s L-prolinem je ovšem více než 35× vyšší než v reakci s PPL.

Do aktivační reakce s L-prolinem bylo při finálním měření vloženo 1,4 μg enzymu LmbC L246Y, což odpovídá koncentraci proteinu $2,5 \times 10^{-4}$ mM. Do reakce s PPL to bylo 58,1 μg enzymu, což odpovídá koncentraci $1,1 \times 10^{-2}$ mM.

Kinetické parametry		
Substrát	L-prolin	PPL
Michaelisova konstanta (K_m)	54,4 mM	32,8 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	13,1 min^{-1}	0,37 min^{-1}
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	0,24 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$	0,011 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$

Tabulka 5.5: Kinetické parametry enzymu LmbC L246Y s L-prolinem a PPL



Obrázek 5.4: Aktivační reakce enzymu LmbC L246Y s L-prolinem (A) a s PPL (B)

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

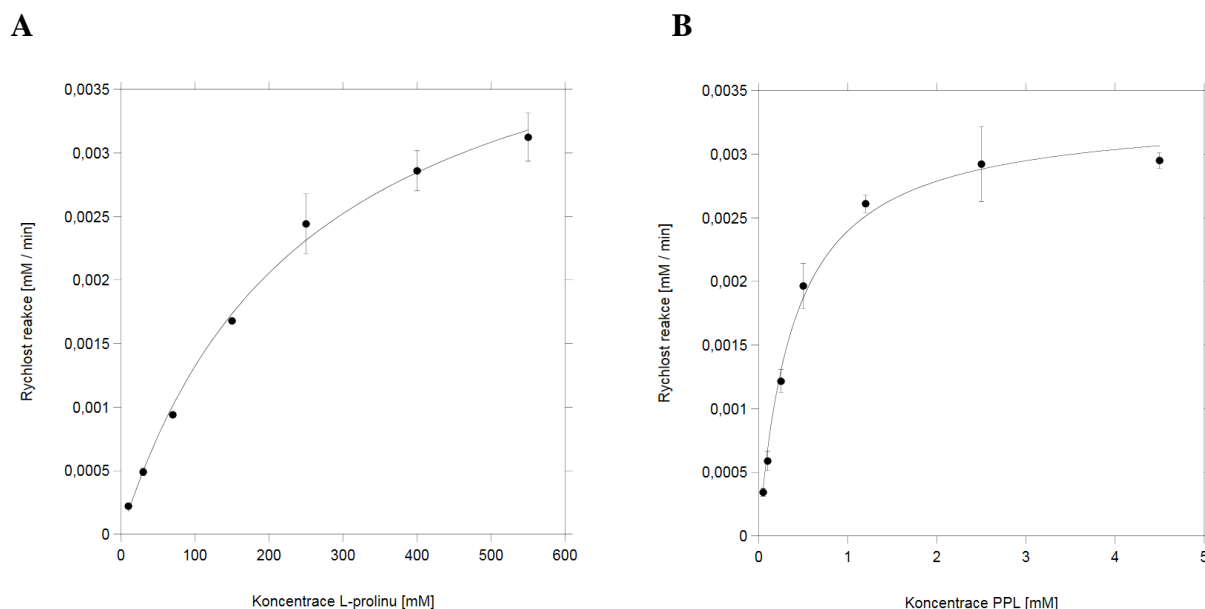
5.1.2.3 Protein LmbC V274C

I u adenylační domény LmbC V274C byla zjištěna aktivita s oběma testovanými substráty (Tabulka 5.6, Obrázek 5.5). Enzym má však o tři řády vyšší afinitu k PPL než k L-prolinu a mírně vyšší hodnotu katalytické konstanty v reakci s PPL. Důsledkem je o tři řády horší katalytická účinnost domény LmbC V274C s L-prolinem než s PPL. Kinetické parametry LmbC V274C jsou tak srovnatelné s LmbC.

Do aktivační reakce s L-prolinem bylo při finálním měření vloženo 1,35 μg enzymu LmbC V274C, což odpovídá koncentraci proteinu $2,48 \times 10^{-4}$ mM. Do reakce s PPL to bylo 0,46 μg enzymu, což odpovídá koncentraci $8,52 \times 10^{-5}$ mM.

Kinetické parametry		
Substrát	L-prolin	PPL
Michaelisova konstanta (K_m)	250 mM	0,39 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	18,6 min^{-1}	39,1 min^{-1}
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	0,07 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$	100 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$

Tabulka 5.6: Kinetické parametry enzymu LmbC V274C s L-prolinem a PPL



Obrázek 5.5: Aktivační reakce enzymu LmbC V274C s L-prolinem (A) a s PPL (B)

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

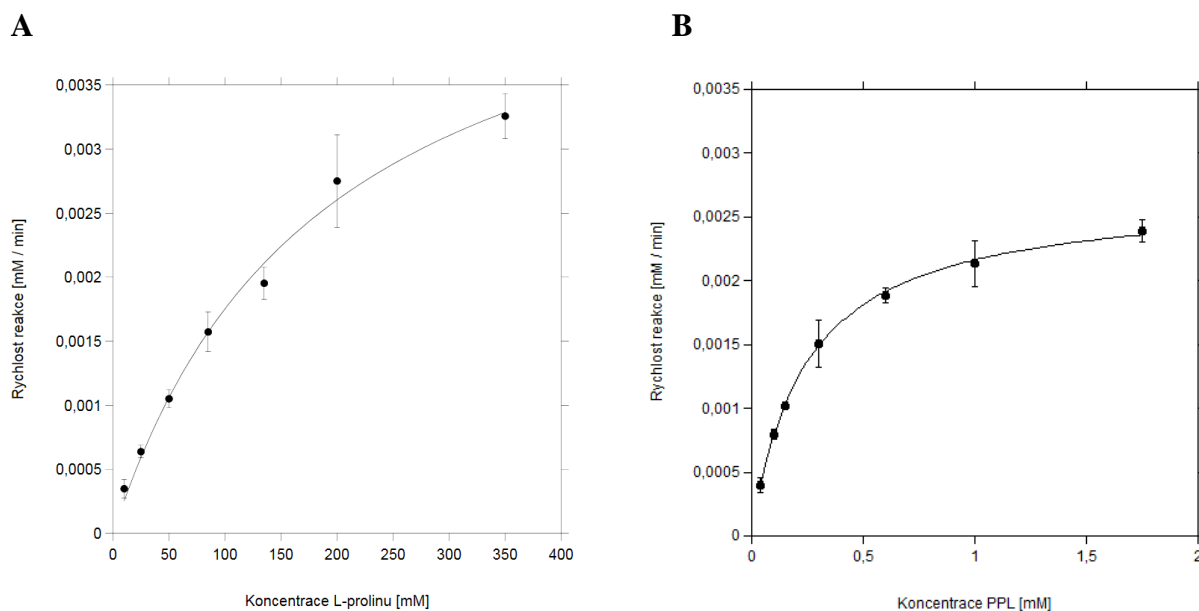
5.1.2.4 Protein LmbC I300L

Adenylační doména LmbC I300L aktivuje oba testované substráty (Tabulka 5.7, Obrázek 5.6). Kinetické parametry enzymu v obou aktivačních reakcích jsou srovnatelné s parametry LmbC V274C a LmbC. Afinita k L-prolinu je i u LmbC I300L o tři řády horší než afinita k PPL. Katalytická konstanta je pak mírně vyšší v reakci s PPL, než v reakci s L-prolinem.

Do aktivační reakce s L-prolinem bylo při finálním měření vloženo 1,2 μg enzymu LmbC I300L, což odpovídá koncentraci proteinu $2,2 \times 10^{-4}$ mM. Do reakce s PPL to bylo 0,3 μg enzymu, což odpovídá koncentraci 6×10^{-5} mM.

Kinetické parametry		
Substrát	L-prolin	PPL
Michaelisova konstanta (K_m)	188,3 mM	0,24 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	23,1 min^{-1}	44,7 min^{-1}
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	0,12 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$	185,4 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$

Tabulka 5.7: Kinetické parametry enzymu LmbC I300L s L-prolinem a PPL



Obrázek 5.6: Aktivační reakce enzymu LmbC I300L s L-prolinem (A) a s PPL (B)

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

5.2 Stanovení vlivu dvou mutací v neribozomálním kódu na substrátovou specifitu LmbC a CcbC

Cílem tohoto bloku experimentů bylo stanovení vlivu dvou mutací v neribozomálním kódu LmbC a CcbC na substrátovou specifitu těchto domén. Dva aminokyselinové zbytky, které byly mutovány, byly vybrány na základě analýzy homologních modelů vazebných míst LmbC a CcbC (viz Přehled literatury, kapitola 2.3.4.2). Postranní řetězce zvolených aminokyselinových zbytků by měly mít vliv na specifitu vazebného místa a tím podíl na afinitě domény LmbC k PPL a CcbC k L-prolinu. Vybranými aminokyselinovými zbytky ve vazebném místě LmbC jsou glycin 308 a alanin 207. V případě vazebného místa CcbC byly vybrány aminokyselinové zbytky v odpovídajících pozicích – valin 306 a fenylalanin 205. Následně byly vybrané aminokyselinové zbytky mutovány a byla testována substrátová specifita mutovaných adenylačních domén LmbC a CcbC. Aminokyselinový zbytek ve vazebném místě domény LmbC byl vždy zaměněn za zbytek nalézající se ve stejné pozici ve vazebném místě domény CcbC a naopak (Tabulka 5.8).

U domény LmbC již byla první mutanta LmbC G308V, u které se předpokládal největší vliv na specifitu vazebného místa, charakterizována v předchozí práci Kadlčík *et al.* (2013). V této doméně byl poté mutován i druhý z vybraných aminokyselinových zbytků, u kterého se předpokládal velký vliv na specifitu vazebného místa, za vzniku domény LmbC G308V + A207F. Analogicky byly připraveny i mutované adenylační domény CcbC V306G a CcbC V306G + F205A.

Číselné označení aminokyselinových zbytků		204	207	246	274	276	300	308	309
		202	205	244	272	274	298	306	307
Adenylační doména	Přirozený substrát	Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu							
LmbC	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C
CcbC	Prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C

Tabulka 5.8: Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu adenylačních domén LmbC a CcbC

Mutované aminokyselinové zbytky jsou barevně vyznačeny. První řádek číselného označení aminokyselinových zbytků odpovídá LmbC, druhý řádek pak CcbC.

5.2.1 Příprava dvojitých mutant

Geny *lmbC* G308V a *ccbC* V306G ve vektorech pJLCG308V resp. pJCCV306G byly mutovány metodou QuikChange. Cílem bylo vytvoření mutovaných genů *lmbC* G308V + A207F a *ccbC* V306G + F205A. Pro mutaci genu *lmbC* G308V byly použity primery A207Ff, A207Fr a pro mutaci genu *ccbC* V306G primery F205Af, F205Ar.

Geny *lmbC* G308V a *ccbC* V306G vložené v plazmidech pJAKO byly nejprve mutovány pomocí mutační PCR. Výsledné plazmidy obsahující geny se dvěma mutacemi byly vneseny do buněk *E. coli* XL⁻¹ blue metodou tepelného šoku. Ty byly následně vysety na LB agar s ampicilinem a kultivovány přes noc ve 37 °C. Pro získání plazmidové DNA byla jedna kolonie inokulována do tekutého LB média s ampicilinem. Dále byly buňky kultivovány přes noc ve 37 °C a plazmidová DNA z nich byla izolována metodou Midiprep. Touto metodou byl připraven gen *lmbC* G308V + A207F vložený ve vektoru pJAKO (dále pJLCG308V+A207F) a gen *ccbC* V306G + F205A vložený ve vektoru pJAKO (dále pJCCV306G+F205A)

Poté byla sekvenováním ověřena přítomnost bodových mutací v genech *lmbC* G308V + A207F a *ccbC* V306G + F205A ve vektorech pJLCG308V+A207F resp. pJCCV306G+F205A. Pro sekvenování obou genů byly použity primery pUC/M13f a pUC/M13r komplementární k sekvenci vektoru pJAKO ve vzdálenosti zhruba 100 bp od vloženého genu. Kromě nich byly využity primery *lmbC*seq pro sekvenování genu *lmbC* G308V + A207F a *ccbC*seq pro sekvenování genu *ccbC* V306G + F205A. Ty jsou komplementární k sekvenci jednotlivých genů ve vzdálenosti přibližně 100 bp od místa nové bodové mutace.

Po vyhodnocení sekvenačních dat v programu Geneious 5.5.6 bylo prokázáno, že oba geny obsahují pouze cílové bodové mutace a neobsahují žádné jiné nežádoucí mutace.

5.2.2 Příprava expresních vektorů

Expresní vektory pET28b a pET42b byly vneseny metodou tepelného šoku a namnoženy v kompetentních buňkách *E. coli* XL⁻¹ blue. Z narostlých buněk byla izolována plazmidová DNA metodou Midiprep.

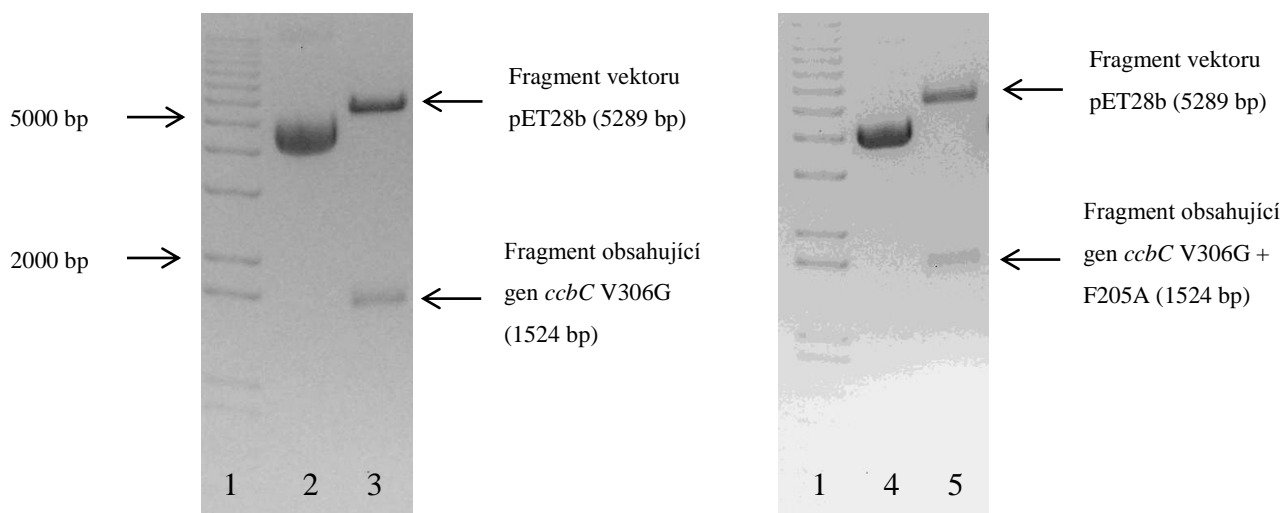
5.2.3 Přenos mutovaných genů *ccbC* do vektoru pET28b

Geny *ccbC* V306G a *ccbC* V306G + F205A byly vyštěpeny z vektorů pJCCV306G a pJCCV306G+F205A za použití restričních enzymů NdeI a HindIII. Produkty restričních reakcí byly následně rozděleny na agarózové elektroforéze. Fragменты DNA obsahující mutované geny *ccbC* byly vyříznuty z gelu a přečištěny.

Expresní vektor pET28b byl naštěpen stejnými restričními enzymy NdeI a HindIII. Poté byla linearizovaná plazmidová DNA defosforylována a přečištěna. Po štěpení vektoru pET28b nebylo třeba rozdělovat fragmenty DNA na elektroforéze a vyřezávat správný fragment z gelu. Fragment vektoru mezi restričními místy NdeI a HindIII měl velikost pouze 79 bp a nedošlo tak k jeho zachycení na membráně při přečišťování DNA.

Fragменты DNA obsahující geny *ccbC* V306G a *ccbC* V306G + F205A byly ligovány s linearizovaným plazmidem pET28b. Poté byly vektory vneseny do buněk *E. coli* XL⁻¹ blue metodou tepelného šoku. Plazmidová DNA byla z buněk izolována komerční soupravou Midiprep. Tím byly získány expresní vektory pET28b s vloženým genem *ccbC* V306G (dále pCCV306G) a pET28b s vloženým genem *ccbC* V306G + F205A (dále pCCV306G+F205A).

Úspěšné vložení genů do expresních vektorů bylo ověřeno štěpením restričními enzymy NdeI a HindIII (Obrázek 5.7).



Obrázek 5.7: Ověření ligace genů do expresního vektoru pET28b

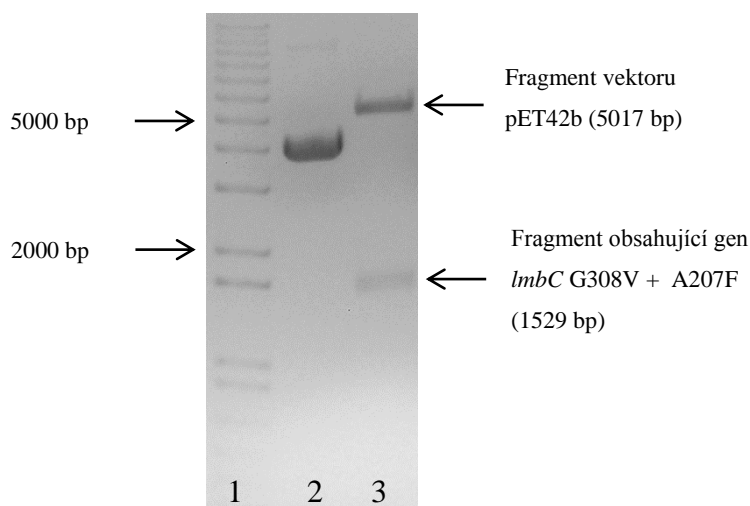
1 – Standard molekulových velikostí, 2 – Cirkulární vektor pCCV306G, 3 – Vektor pCCV306G štěpený enzymy NdeI a HindIII, 4 – Cirkulární vektor pCCV306G+F205A, 5 – Vektor pCCV306G+F205A štěpený enzymy NdeI a HindIII

5.2.4 Přenos genu *lmbC* G308V + F205A do vektoru pET42b

Gen *lmbC* G308V + A207F byl vyštěpen z vektoru pJLCG308V+A207F restrikcími enzymy NdeI a XhoI. Fragmenty DNA byly po restrikci rozděleny na agarózové elektroforéze. Fragment obsahující gen *lmbC* G308V + A207F byl vyříznut z gelu a přečištěn.

Expresní vektor pET42b byl také štěpen restrikcími enzymy NdeI a XhoI. Následovala defosforylace linearizované plazmidové DNA. Defosforylované fragmenty byly elektroforeticky rozděleny a byl vyříznut a přečištěn fragment o velikosti 5017 bp. Tento fragment byl poté ligován s fragmentem obsahujícím gen *lmbC* G308V + A207F a výsledný vektor byl vnesen do buněk *E. coli* XL⁻¹ blue. Plazmidová DNA byla izolována metodou Midiprep. Vznikl tím expresní vektor pET42b s vloženým genem *lmbC* G308V + A207F (dále pLCG308V+A207F).

Úspěšné vložení genu do expresního vektoru bylo ověřeno štěpením vektoru pLCG308V+A207F endonukleázami NdeI a XhoI (Obrázek 5.8).



Obrázek 5.8: Ověření ligace genu do expresního vektoru pET42b.

1 – Standard molekulových velikostí, 2 – Cirkulární vektor pLCG308V+A207F, 3 – Vektor pLCG308V+A207F štěpený enzymy NdeI a XhoI

5.2.5 Heterologní produkce a purifikace proteinů

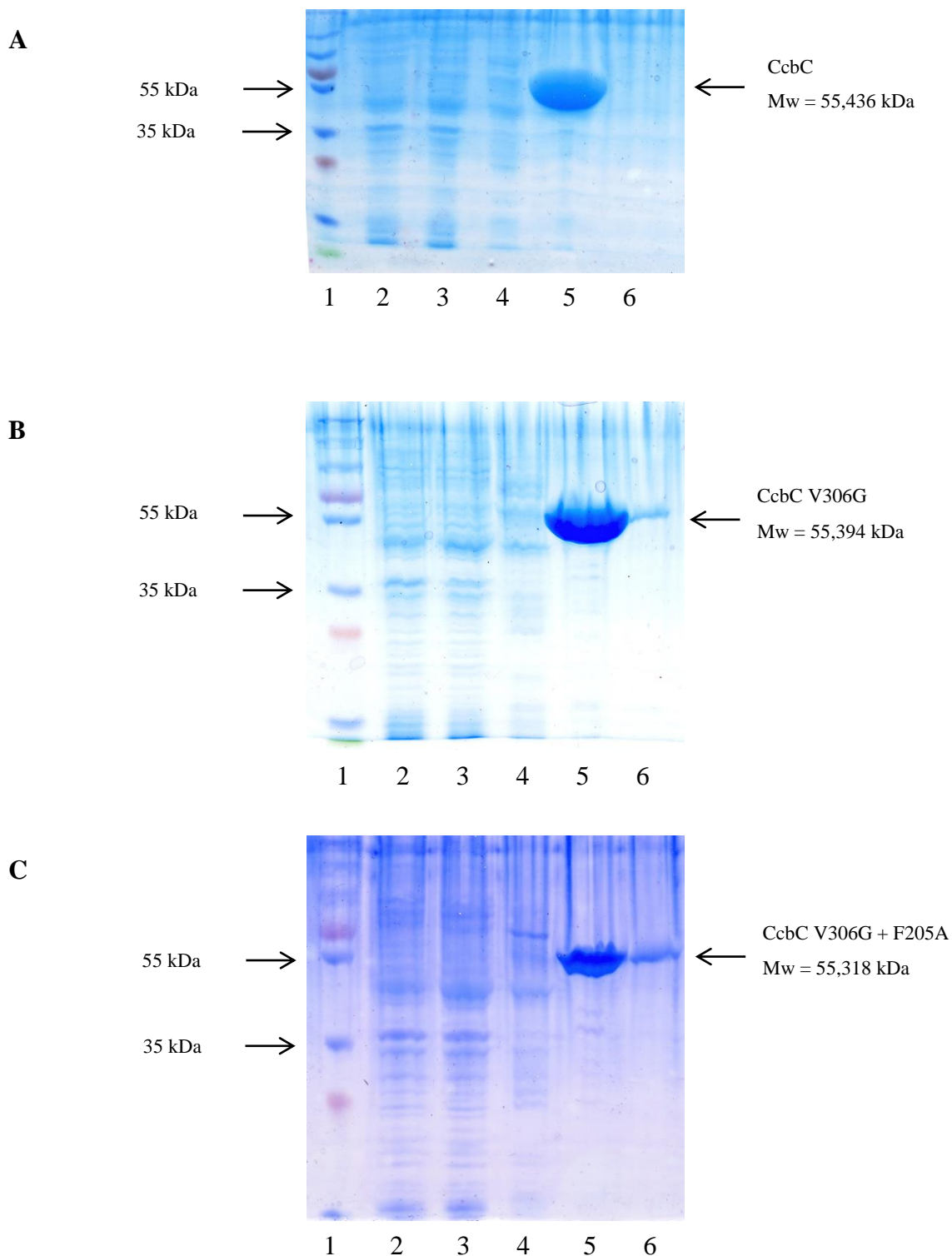
5.2.5.1 Protein CcbC a jeho mutanty

Pro produkci a purifikaci těchto proteinů byly použity stejné pufrы i podmínky, jako jsou publikovány pro protein CcbC v článku Kadlčík *et al.* (2013). Ty jsou shodné s podmínkami produkce a purifikace mutovaných proteinů LmbC popsány v kapitole 5.1.1. Pouze při purifikaci byl použit promývací pufr (pro protein CcbC a jeho mutanty) s 50 mM imidazolem. Eluce byla provedena elučním pufrem s 250 mM imidazolem.

Všechny proteiny CcbC byly produkovány s N-koncovou histidinovou kotvou. Protein CcbC byl exprimován z vektoru pCC, protein CcbC V306G z vektoru pCCV306G a protein CcbC V306G + F205A z vektoru pCCV306G+F205A. Koncentrace jednotlivých proteinů po dialýze je uvedena v Tabulce 5.9. Vzorčky vybraných frakcí promývacího i elučního pufru byly ve všech případech naneseny na SDS-PAGE (Obrázek 5.9).

Protein	Koncentrace po dialýze
CcbC	6,55 mg/ml
CcbC V306G	4,68 mg/ml
CcbC V306G + F205A	2,60 mg/ml

Tabulka 5.9: Koncentrace proteinů po dialýze



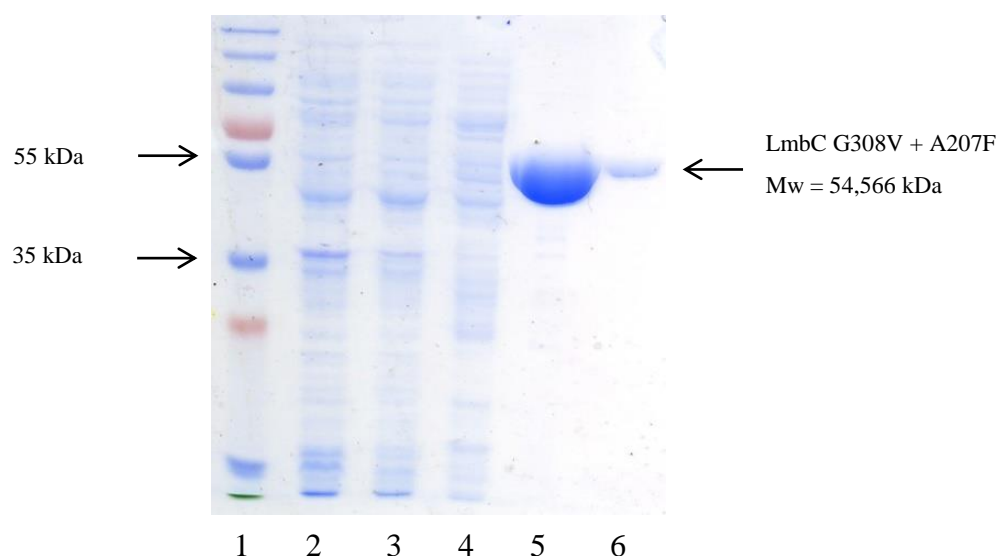
Obrázek 5.9: Purifikace proteinů CcbC (A), CcbC V306G (B) a CcbC V306G + F205A (C)

Vzorky vybraných frakcí nanesené na SDS-PAGE:

1 – Standard molekulových hmotností, 2 – Frakce proteinů nezachycených při nanášení na kolonku, 3 – První frakce promytí promývacím pufrem (50 mM imidazol), 4 – Druhá frakce promytí promývacím pufrem (50 mM imidazol), 5 – Druhá frakce eluce elučním pufrem (250 mM imidazol), 6 – Třetí frakce eluce elučním pufrem (250 mM imidazol)

5.2.5.2 *Protein LmbC G308V + A207F*

Protein LmbC G308V + A207F s C-koncovou histidinovou kotvou byl produkován z vektoru pLCG308V+A207F. Heterologní produkce i purifikace proteinu LmbC G308V + A207F probíhaly za stejných podmínek a se stejnými pufrů, jako jsou popsány pro mutované proteiny LmbC v kapitole 5.1.1. Vzorky vybraných frakcí promývacího i elučního pufru byly nanášeny na SDS-PAGE (Obrázek 5.10). Koncentrace proteinu po dialýze byla 2,97 mg/ml.



Obrázek 5.10: Purifikace proteinu LmbC G308V + A207F

Vzorky vybraných frakcí nanášeny na SDS-PAGE:

1 – Standard molekulových hmotností, 2 – Frakce proteinů nezachycených při nanášení na kolonku, 3 – První frakce promytí promývacím pufrém (100 mM imidazol), 4 – Druhá frakce promytí promývacím pufrém (100 mM imidazol), 5 – Druhá frakce eluce elučním pufrém (250 mM imidazol), 6 – Třetí frakce eluce elučním pufrém (250 mM imidazol)

5.2.6 Biochemická charakterizace adenylačních domén

Biochemická charakterizace mutovaných adenylačních domén LmbC a CcbC i nemutované domény CcbC probíhala opět metodou přenosu radioaktivity z [³²P]-značeného PPI na ATP. Postup měření i vyhodnocení výsledků byl shodný jako v prvním bloku experimentů (viz kapitola 5.1.2). Jako substrátové aminokyseliny v aktivačních reakcích zde byly použity L-prolin, EPL a PPL.

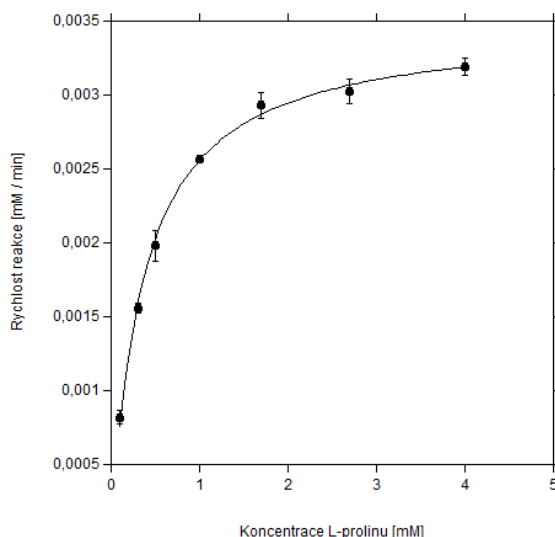
5.2.6.1 Protein CcbC

Kinetické parametry adenylační aktivity enzymu CcbC již byly dříve změřeny pro článek Kadlčík *et al.* (2013). Při těchto měřeních byla detekována úzká substrátová specifita enzymu pro L-prolin. Proto byly u domény CcbC stanovovány pouze kinetické parametry v reakci s L-prolinem. Měření byla zopakována pro ověření porovnatelnosti výsledků této a předchozí práce Kadlčík *et al.* (2013). Do každé reakce bylo při finálním měření vloženo 0,35 μg enzymu CcbC. To odpovídá koncentraci proteinu $6,32 \times 10^{-5}$ mM. Tabulka 5.10 dokazuje porovnatelnost výsledků této práce s výsledky předchozích experimentů. Graf na Obrázku 5.11 ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu.

Kinetické parametry		
	Výsledky této práce	Výsledky předchozí práce
Michaelisova konstanta (K_m)	0,36 mM	0,5 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	55 min^{-1}	45 min^{-1}
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	$153,5 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$91,7 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Tabulka 5.10: Porovnání kinetických parametrů enzymu CcbC s L-prolinem

Porovnání výsledků z této práce a z předchozí publikace Kadlčík *et al.* (2013).



Obrázek 5.11: Aktivační reakce enzymu CcbC s L-prolinem

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

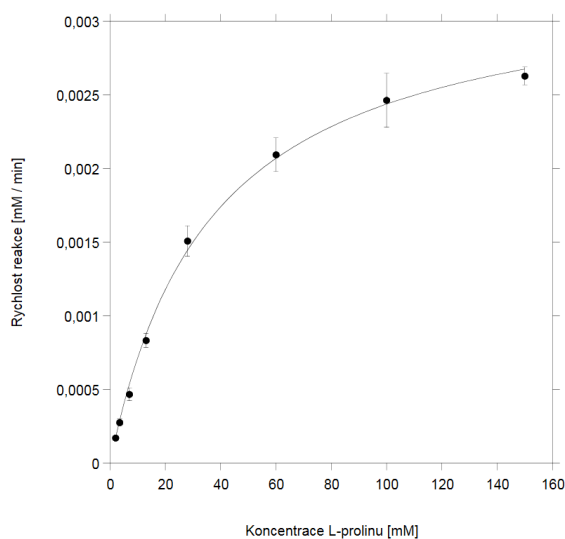
5.2.6.2 Protein CcbC V306G

U adenylační domény CcbC V306G byla také detekována velmi úzká substrátová specifita pro L-prolin. Při použití substrátů s dvouuhlíkatým nebo tříuhlíkatým bočním řetězcem (EPL či PPL) nebyla detekována žádná aktivita.

V Tabulce 5.11 jsou uvedeny kinetické parametry adenylační aktivity enzymu CcbC V306G s L-prolinem. Obrázek 5.12 ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Do každé reakce bylo při finálním měření vloženo 0,47 μg proteinu. To odpovídá molární koncentraci $8,45 \times 10^{-5}$ mM.

Kinetické parametry	
Michaelisova konstanta (K_m)	36,4 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	39,4 min^{-1}
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	1,08 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$

Tabulka 5.11: Kinetické parametry enzymu CcbC V306G s L-prolinem



Obrázek 5.12: Aktivační reakce enzymu CcbC V306G s L-prolinem

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

5.2.6.3 *Protein CcbC V306G + F205A*

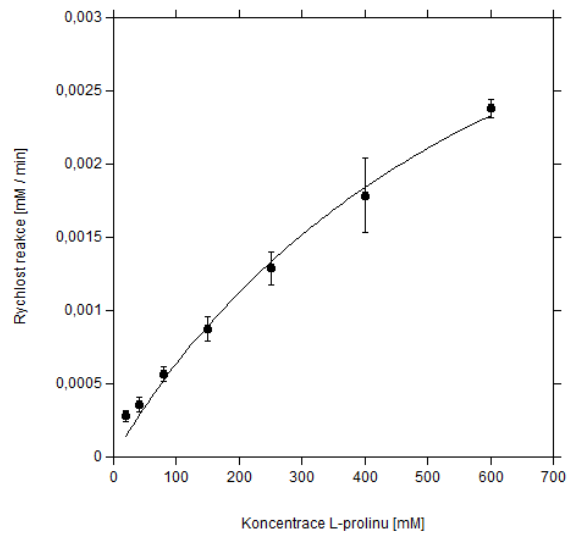
Ani u dvojité mutanty CcbC V306G + F205A nedošlo k rozšíření úzké substrátové specifity pro L-prolin. Při reakcích s EPL nebo PPL opět nebyla detekována žádná aktivita enzymu. Došlo ovšem ke zhoršení aktivace L-prolinu oproti CcbC i jednoduchému mutantu CcbC V306G. Při reakcích CcbC V306G + F205A s L-prolinem byl detekován vznik radioaktivního ATP. Nárůst aktivity oproti pozadí byl však tak malý, že nebylo možné stanovit kinetické parametry reakce a to ani při použití 10× zvýšené koncentrace enzymu v reakcích ve srovnání s reakcemi domény CcbC V306G.

5.2.6.4 *Protein LmbC G308V + A207F*

U reakcí adenylační domény LmbC G308V + A207F s prolinovými deriváty EPL a PPL nebyla detekována žádná aktivita enzymu. Doména však stále aktivuje L-prolin, ovšem s velmi nízkou afinitou k substrátu. Výsledky měření jsou v případě této aktivační reakce ovlivněny právě nízkou afinitou adenylační domény k L-prolinu. Experimentální data dosažitelná metodou přenosu radioaktivity z [³²P]-značeného PPI na ATP neumožňují přesné stanovení kinetických parametrů LmbC G308V + A207F. Údaje uvedené v Tabulce 5.12 i graf na Obrázku 5.13 jsou tak pouze orientační. Do každé reakce bylo při finálním měření vloženo 22,3 μg enzymu LmbC G308V + A207F. To odpovídá koncentraci proteinu $4,08 \times 10^{-3}$ mM.

Kinetické parametry	
Michaelisova konstanta (K_m)	690 mM
Katalytická konstanta (k_{cat})	1,2 min ⁻¹
Katalytická účinnost (k_{cat}/K_m)	0,0018 mM ⁻¹ min ⁻¹

Tabulka 5.12: Kinetické parametry enzymu LmbC G308V + A207F s L-prolinem



Obrázek 5.13: Aktivační reakce enzymu LmbC G308V + A207F s L-prolinem

Graf ukazuje závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Každý bod v grafu odpovídá výsledkům tří paralelních měření. Chybové úsečky zobrazují odhad směrodatné odchylky ze tří měření.

6 Diskuze

Cílem první části práce bylo posoudit význam vybraných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu LmbC pro preferenci PPL substrátu oproti L-prolinu, tedy pro posun v substrátové specifitě, k němuž došlo v průběhu evoluce. Konkrétně jde o aminokyselinové zbytky A207, L246, V274, I300 a G308, které se v neribozomálním kódu LmbC odlišují od kódu CcbC. Význam každého aminokyselinového zbytku byl testován jeho mutací a porovnáním kinetických parametrů adenylační aktivity mutované domény s parametry nemutované domény LmbC. Kinetické parametry LmbC a jedné z mutovaných domén LmbC G308V již byly publikovány v článku Kadlčík *et al.* (2013). Mutované domény, u nichž došlo ke zhoršení kinetických parametrů s PPL oproti LmbC, obsahují pravděpodobně mutovanou aminokyselinu s vlivem na substrátovou specifitu pro PPL.

Rozdíly mezi kinetickými parametry nemutovaných a mutovaných domén však mohou být dány dvěma faktory. Za prvé odlišnou afinitou mutované domény k danému substrátu, která je způsobena změnou tvaru, velikosti či hydrofobicity vazebného místa. Za druhé mohou být rozdíly způsobeny zhoršením celkové katalytické účinnosti mutovaných domén či narušením jejich konformace. To je obecně častým důsledkem umělých změn v adenylačních doménách (Crüsemann *et al.*, 2013).

Všech pět mutovaných variant LmbC (Tabulka 6.1) se dá rozdělit podle afinity k PPL do tří skupin.

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
LmbC	PPL	0,28	33	120
LmbC I300L	PPL	0,24	44,7	185,4
LmbC V274C	PPL	0,39	39,1	100
LmbC G308V	PPL	5,8	0,39	0,07
LmbC A207F	PPL	8,6	4,4	0,51
LmbC L246Y	PPL	32,8	0,37	0,011

Tabulka 6.1: Kinetické parametry domény LmbC a mutovaných domén LmbC s PPL

Mutované adenylační domény jsou seřazeny podle klesající afinity k PPL. Kinetické parametry LmbC a LmbC G308V jsou převzaty z práce Kadlčík *et al.* (2013).

U první skupiny LmbC I300L a LmbC V274C jsou všechny kinetické parametry srovnatelné s parametry LmbC. Isoleucin v pozici 300 a valin 274 tak pravděpodobně nemají velký vliv na substrátovou specifitu domény LmbC pro PPL.

V pozici odpovídající isoleucinu 300 v LmbC se jak v neribozomálním kódu CcbC, tak v konsenzu neribozomálních kódů samostatných adenylačních domén aktivujících L-prolin, vyskytuje leucin (Tabulka 6.2). Dá se tedy předpokládat, že i ve společném předchůdci LmbC a CcbC se v této pozici vyskytoval leucin. Změna na isoleucin v neribozomálním kódu LmbC pak mohla vzniknout pouze náhodou, aniž by výrazněji měnila vlastnosti LmbC při aktivaci PPL.

Číselné označení aminokyselinových zbytků	204	207	246	274	276	300	308	309	
	202	205	244	272	274	298	306	307	
Adenylační doména	Přirozený substrát	Aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu							
LmbC	PPL	V	A	L	V	A	I	G	C
CcbC	L-prolin	V	F	Y	C	A	L	V	C
Konsenzus samostatně stojících adenylačních domén	L-prolin	L	L/F	Y	L	A	L	V	C

Tabulka 6.2: Neribozomální kód adenylačních domén LmbC, CcbC a konsenzuální neribozomální kód samostatně stojících adenylačních domén aktivujících L-prolin

Aminokyselinové zbytky v pozici odpovídající isoleucinu 300 v LmbC jsou vyznačeny červeně. Aminokyselinové zbytky v pozici odpovídající valinu 274 v LmbC jsou vyznačeny modře. První řádek číselného označení aminokyselinových zbytků odpovídá LmbC, druhý řádek pak CcbC.

Naproti tomu v pozici odpovídající valinu 274 v LmbC se v neribozomálním kódu CcbC vyskytuje cystein, ovšem v konsenzu neribozomálních kódů samostatných adenylačních domén aktivujících L-prolin je v této pozici leucin (Tabulka 6.2). Nedá se tak říci, která z aminokyselin pravděpodobně byla v této pozici ve společném předchůdci LmbC a CcbC. Na kinetické parametry adenylační aktivity LmbC s PPL však nemá vliv, zda se v pozici 274 nachází valin či cystein.

Ve druhé skupině jsou domény LmbC G308V a LmbC A207F. Kinetické parametry LmbC A207F naměřené v této práci jsou srovnatelné s parametry LmbC G308V, které byly publikovány v článku Kadlčík *et al.* (2013). Afinita obou těchto mutovaných domén k PPL je o řád horší než afinita přirozené formy LmbC, hodnota katalytické konstanty je pak horší až o

dva řády. Postranní řetězce aminokyselinových zbytků v pozicích 308 a 207 tak pravděpodobně mají vliv na substrátovou specifitu LmbC pro PPL.

Samostatnou skupinu tvoří doména LmbC L246Y, u které došlo k nejvýraznějšímu zhoršení kinetických parametrů pro PPL oproti LmbC. Záměna leucinu 246 s hydrofobním postranním řetězcem za tyrosin s hydrofilním postranním řetězcem ukazuje význam polaritu kanálu ve vazebném místě LmbC pro aktivaci PPL s hydrofobním bočním řetězcem. To je spolu s homologním modelem vazebného místa LmbC dalším důkazem pro existenci tohoto hydrofobního kanálu. Pokud navíc srovnáme neribozomální kódy domény LmbC aktivující PPL a samostatných adenylačních domén aktivujících L-prolin, tak LmbC je jedinou doménou, která v pozici odpovídající leucinu 246 neobsahuje tyrosin. To by také mohlo naznačovat neslučitelnost postranního hydrofilního řetězce tyrosinu s aktivací PPL.

U všech čtyř nově připravených forem adenylačních domén LmbC obsahujících mutace A207F, L246Y, V274C nebo I300L byly zjišťovány i kinetické parametry v reakcích s L-prolinem (Tabulka 6.3).

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
LmbC	L-prolin	480	20	0,042
LmbC A207F	L-prolin	384,4	2,3	0,006
LmbC V274C	L-prolin	250	18,6	0,07
LmbC G308V	L-prolin	240	4,9	0,02
LmbC I300L	L-prolin	188,3	23,1	0,12
LmbC L246Y	L-prolin	54,4	13,1	0,24

Tabulka 6.3: Kinetické parametry domény LmbC a mutovaných domén LmbC s L-prolinem

Mutované adenylační domény jsou seřazeny podle vzrůstající afinity k L-prolinu. Kinetické parametry LmbC a LmbC G308V jsou převzaty z práce Kadlčík *et al.* (2013).

Zde je zajímavé, že nejnižší afinitu k L-prolinu má právě nemutovaná adenylační doména LmbC. U všech mutantů došlo ke zvýšení afinity k L-prolinu a to až o jeden řád, jako v případě LmbC L246Y. To je důkazem evoluční adaptace LmbC, kdy mutacemi došlo nejen k umožnění aktivace PPL, ale současně i k znevýhodnění L-prolinu jako substrátu, což brání kompetici s touto proteinogenní aminokyselinou, běžně se vyskytující v buňkách produkčního kmenu linkomycinu.

V druhé části práce byl posuzován vliv dvojitých mutací v neribozomálních kódech LmbC a CcbC na substrátovou specifitu těchto domén. Mutované aminokyselinové zbytky neribozomálních kódů LmbC a CcbC byly zvoleny na základě analýzy homologních modelů vazebných míst obou adenylačních domén. Předpokládalo se, že postranní řetězce zbytků ve dvou vybraných pozicích ovlivňují specifitu vazebného místa a mají významný podíl na afinitě adenylační domény LmbC k PPL a CcbC k L-prolinu. Vybrané aminokyselinové zbytky ve vazebném místě domény LmbC (G308 a A207) byly zaměněny za zbytky nalézající se v odpovídajících pozicích ve vazebném místě domény CcbC. Analogicky byly zaměněny i zbytky v odpovídajících pozicích ve vazebném místě CcbC (V306 a F205). Kinetické parametry mutovaných adenylačních domén naměřené v této části práce jsou srovnávány s kinetickými parametry CcbC, LmbC a LmbC G308V, které byly publikovány v předchozí práci Kadlčík *et al.* (2013).

V případě mutací ve vazebném místě LmbC (Tabulka 6.4) bylo předpokládaným důsledkem změn zhoršení afinity k přirozenému substrátu PPL a k EPL, případně i zlepšení afinity k L-prolinu.

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
LmbC	L-prolin	480	20	0,042
LmbC G308V	L-prolin	240	4,9	0,02
LmbC G308V + A207F	L-prolin	690	1,2	0,0018

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
LmbC	EPL	7	23	3,3
LmbC G308V	EPL	25	0,25	0,01
LmbC G308V + A207F	EPL	-	-	-

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
LmbC	PPL	0,28	33	120
LmbC G308V	PPL	5,8	0,39	0,07
LmbC G308V + A207F	PPL	-	-	-

Tabulka 6.4: Kinetické parametry LmbC, LmbC G308V a LmbC G308V + A207F s L-prolinem, EPL a PPL

Kinetické parametry LmbC a LmbC G308V jsou převzaty z práce Kadlčík *et al.* (2013).

U dříve testované mutanty LmbC G308V došlo podle očekávání ke snížení schopnosti aktivovat PPL a EPL a k mírnému zvýšení afinity k L-prolinu oproti LmbC (Kadlčík *et al.*, 2013). U dvojité mutované domény LmbC G308V + A207F však nebylo zjištěno další zlepšení substrátové specifity pro L-prolin. LmbC G308V + A207F má dokonce nižší afinitu k L-prolinu než nemutovaná doména LmbC. Možným vysvětlením je zhoršení celkové katalytické účinnosti domény či narušení její konformace, způsobené dvěma mutacemi ve vazebném místě. Zjištěné kinetické parametry LmbC G308V + A207F s L-prolinem jsou ovšem ovlivněny právě velmi nízkou afinitou k substrátu. Data dosažitelná použitou metodou totiž neumožňovala přesné stanovení kinetických parametrů.

Při reakcích s EPL či PPL pak nebyla detekována vůbec žádná aktivita LmbC G308V + A207F. I tato data však poskytují další důkaz pro platnost homologního modelu vazebného místa LmbC. Současnou záměnou glycinu 308 za valin a alaninu 207 za fenylalanin došlo k úplnému zrušení schopnosti domény aktivovat EPL a PPL. Při záměně aminokyselinových zbytků s malými postranními řetězci za zbytky s většími postranními řetězci byl pravděpodobně prostorově zcela zablokován kanál, do kterého se při aktivaci zanořuje boční řetězec EPL a PPL.

U mutací ve vazebném místě CcbC se předpokládalo, že by záměna aminokyseliny valin 306 za glycin mohla vést k uvolnění přístupu do kanálu ve vazebném místě. Nahrazení fenylalaninu 205 alaninem by navíc mohlo mít za následek vytvoření prostornějšího kanálu pro zanoření bočního řetězce EPL či PPL. U domén CcbC V306G i CcbC V306G + F205A však byla detekována úzká substrátová specifita pro L-prolin, stejně jako u CcbC (Tabulka 6.5).

Adenylační doména	Substrát	K_m [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$]
CcbC	L-prolin	0,36	55	153,5
CcbC V306G	L-prolin	36,4	39,4	1,08
CcbC V306G + F205A	L-prolin	pod mezí detekce	pod mezí detekce	pod mezí detekce

Tabulka 6.5: Kinetické parametry CcbC, CcbC V306G a CcbC V306G + F205A s L-prolinem

Aminokyseliny EPL a PPL nebyly těmito adenylačními doménami aktivovány.

Ani současné mutace V306G a F205A pravděpodobně nejsou dostatečné pro vytvoření kanálu ve vazebném místě CcbC V306G + F205A, který by měl správnou velikost, tvar a hydrofobicitu pro zanoření bočního řetězce EPL či PPL. Jedním z možných vysvětlení je nedocnění významu hydrofobicity kanálu při návrhu dvojitéch mutantů na základě

homologních modelů vazebných míst LmbC a CcbC. Přestože pravděpodobně došlo k vytvoření kanálu o správné velikosti ve vazebném místě CcbC V306G + F205A, tak hydrofilní postranní řetězec tyrosinu 244 (v jehož pozici je ve vazebném místě LmbC leucin) zřejmě znemožňuje zanoření hydrofobního bočního řetězce EPL či PPL do kanálu.

Jedním z možných vysvětlení zhoršování substrátové specifity těchto mutant pro L-prolin (v pořadí CcbC > CcbC V306G > CcbC V306G + F205A) je horší uzpůsobení mutovaných vazebných míst. Vazebné místo původně adaptované na relativně malou aminokyselinu L-prolin by mohlo být mutacemi zvětšováno, což by mohlo vést k horší vazbě L-prolinu. Dalším možným vysvětlením je zhoršení celkové katalytické účinnosti enzymu či narušení jeho konformace při narůstajícím počtu mutací ve vazebném místě.

S ohledem na možnou budoucí přípravu hybridních linkosamidů je jedním z dalších cílů vytvoření mutované adenylační domény se změněnou substrátovou specifitou – například domény CcbC aktivující PPL či LmbC se zvýšenou afinitou k L-prolinu.

Jedním ze způsobů, jak by mohla být v budoucnu vytvořena doména CcbC se substrátovou specifitou pro PPL, je příprava dalších vícenásobných mutant v neribozomálním kódu. Mohla by být připravena doména CcbC G308V + Y244L, v jejímž vazebném místě by měl být umožněn vstup bočního řetězce PPL do kanálu a také by měl mít tento kanál správnou hydrofobicitu. Otázkou ovšem zůstává, zda nebude kanál ve vazebném místě CcbC G308V + Y244L příliš malý. Tento problém by mohla vyřešit příprava domény CcbC, v níž jsou nahrazeny všechny tři aminokyselinové zbytky s předpokládaným vlivem na velikost, tvar a hydrofobicitu kanálu – G308, F205 i Y244. U výsledné domény CcbC se třemi mutacemi ve vazebném místě by však mohlo dojít ke zhoršení celkové katalytické účinnosti či narušení konformace mutovaného proteinu. Pokud by tedy tato doména opravdu aktivovala PPL, tak pravděpodobně s výrazně horšími kinetickými parametry, než má LmbC v reakci s PPL.

Další možností, jak by mohla být připravena adenylační doména CcbC aktivující PPL je tvorba chimérického proteinu. Tato metoda byla úspěšně využita při změně substrátové specifity adenylační domény HrmO3_A z hormaomycinové NRPS. Byl vytvořen chimerický protein obsahující okrajové části domény HrmO3_A a centrální část adenylačních domén s cílovou substrátovou specifitou (obsahující všech 8 nekonzervovaných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu). V tomto případě byla jako místa fúze zvolena přirozená místa rekombinace genu *hrmO3_A* (Crüsemann *et al.*, 2013). V případě domén LmbC a CcbC však evoluce substrátové specifity pomocí rekombinace neproběhla (Kadlčík *et al.*, 2013). Při záměně středové části genu *ccbC* za středovou část genu *lmbC* by tedy zřejmě musela být místa

fúze zvolena jinak. Jako nejlepší se v současné době jeví možnost zvolit pokud možno co nejkratší úsek genu *lmbC*, který by ovšem kódoval všech 8 nekonzervovaných aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu LmbC.

Chimerické adenylační domény odvozené od HrmO3_A dosahovaly až 87,8 % aktivace substrátu v porovnání s adenylačními doménami ze kterých pocházely středové části chimérických proteinů (Crüsemann *et al.*, 2013). Pokud by tedy výsledná chimérická mutanta CcbC aktivovala PPL, tak by mohlo dojít k menšímu zhoršení kinetických parametrů tohoto enzymu v porovnání s LmbC, než v případě trojitého mutanta domény CcbC.

Pokud by byla tato metoda úspěšná, mohlo by být reálné připravit i další chimerické adenylační domény. Středové části adenylačních domén LmbC či CcbC by mohly být nahrazeny částmi adenylačních domén z NRPS některých PBD látek. Takováto chimérická adenylační doména by mohla aktivovat deriváty prolinu s modifikovaným bočním řetězcem a zároveň by mohla být schopná interakce s ostatními podjednotkami LS. To by umožnilo biosyntetickou přípravu linkosamidů s jinak modifikovaným bočním řetězcem aminokyselinové složky, než je v molekule linkomycinu. Tímto způsobem by mohla být připravena hybridní antibiotika s lepšími vlastnostmi, než mají současné linkosamidy.

7 Souhrn

- V první části práce byl posuzován význam aminokyselinových zbytků neribozomálního kódu LmbC, odlišných od kódu CcbC, pro preferenci PPL substrátu oproti L-prolinu. Za tímto účelem byly produkovány a purifikovány mutované adenylační domény LmbC A207F, LmbC L246Y, LmbC V274C a LmbC I300L. Na základě jejich biochemické charakterizace se substrátovými aminokyselinami PPL a L-prolinem a porovnání výsledků s již publikovanými kinetickými parametry adenylačních domén LmbC a LmbC G308V byly určeny tři aminokyselinové zbytky neribozomálního kódu LmbC, které mají pravděpodobně vliv na substrátovou specifitu LmbC pro PPL. Jsou to glycin v pozici 308, alanin 207 a leucin 246
- Výsledky první části práce také podporují teorii evoluční adaptace substrátové specifity domény LmbC mutacemi ve vazebném místě pro substrát. Během evoluce došlo nejen k umožnění aktivace PPL, ale také k výraznému snížení afinity k původnímu substrátu L-prolinu
- Ve druhé části práce byly pomocí mutagenese metodou QuikChange připraveny geny kódující adenylační domény se dvěma mutacemi v neribozomálním kódu – LmbC G308V + A207F a CcbC V306G + F205A. Tyto domény byly následně produkovány, purifikovány a biochemicky charakterizovány
- Biochemické charakterizace adenylačních domén s jednou i dvěma mutacemi poskytly další důkazy pro platnost homologních modelů vazebných míst domén LmbC a CcbC. Především poskytly důkazy pro existenci hydrofobního kanálu ve vazebném místě LmbC, do kterého se při aktivaci zanořuje boční řetězec substrátové aminokyseliny PPL. Hydrofobicita tohoto kanálu je dána předně přítomností leucinu v pozici 246 ve vazebném místě LmbC

8 Seznam literatury

- Aparicio, J.F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Staunton, J. & Leadlay, P.F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: Analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169, 9–16.
- Argoudelis, A.D., Fox, J.A. & Eble, T.E. (1965). U-21,669: a new linkomycin-related antibiotic. *Biochemistry* 4, 698–703.
- Baraldi, P.G., Bovero, A., Fruttarolo, F., Preti, D., Tabrizi, M.A., Pavani, M.G. & Romagnoli, R. (2004). DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med. Res. Rev.* 24, 475–528.
- Bentley, S.D., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Woodward, J., Barrell, B.G. & Parkhill, J. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147.
- Bergy, M. & Herr, R. (1963). Antibiotic lincolnensis and method of production. US patent 3086912.
- Birkenmeyer, R. & Kagan, F. (1970). Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin, a potent antibacterial agent. *J. Med. Chem.* 13, 616–619.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- De Boer, C. & Dietz, A. (1960). Celesticetin, its salts and method of preparation. US patent 2928844.
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. R. society Biol. Sci.* 227, 819–827.
- Cai, X., Teta, R., Kohlhaas, C., Crüsemann, M., Ueoka, R., Mangoni, A., Freeman, M.F. & Piel, J. (2013). Manipulation of regulatory genes reveals complexity and fidelity in hormaomycin biosynthesis. *Chem. Biol.* 20, 839–846.
- Cane, D.E. & Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, 319–325.
- Clardy, J., Fischbach, M. & Walsh, C.T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotechnol.* 24, 1541–1550.

- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. a & Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J.* 16, 4174–4183.
- Crüsemann, M., Kohlhaas, C. & Piel, J. (2013). Evolution-guided engineering of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Sci.* 4, 1041–1045.
- Dangel, V., Eustáquio, A.S., Gust, B. & Heide, L. (2008). *novE* and *novG* act as positive regulators of novobiocin biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 190, 509–519.
- Dayem, L.C., Carney, J.R., Santi, D. V., Pfeifer, B. a., Khosla, C. & Kealey, J.T. (2002). Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 41, 5193–5201.
- Demain, L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.* 1, 259–264.
- Donadio, S., Sosio, M., Stegmann, E., Weber, T. & Wohlleben, W. (2005). Comparative analysis and insights into the evolution of gene clusters for glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Mol. Genet. Genomics* 274, 40–50.
- Donadio, S., Staver, M.J., Mcalpine, J.B. & Swanson, S.J. (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252, 675–679.
- Douthwaite, S. (1992). Interaction of the antibiotics clindamycin. *Nucleic Acids Res.* 20, 4717–4720.
- Eustáquio, A.S., Luft, T., Wang, Z.X., Gust, B., Chater, K.F., Li, S.M. & Heide, L. (2003). Novobiocin biosynthesis: Inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch. Microbiol.* 180, 25–32.
- Fewer, D.P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H. & Sivonen, K. (2007). Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evol. Biol.* 7, 1–11.
- Fischbach, M. a & Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468–3496.
- Fischbach, M. a, Walsh, C.T. & Clardy, J. (2008). The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4601–4608.
- Flatt, P.M. & Mahmud, T. (2007). Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 24, 358–392.
- Gaballa, A., Newton, G.L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R.C. & Helmann, J.D. (2010). Biosynthesis and functions of

- bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6482–6486.
- Gehring, A.M., Bradley, K. a. & Walsh, C.T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: Isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* 36, 8495–8503.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T. (1998). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* 37, 11637–11650.
- Genghof, D.S. & Vandamme, O. (1964). Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J. Bacteriol.* 87, 852–862.
- Gerratana, B. (2012). Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Med. Res. Rev.* 32, 254–293.
- Grammel, N., Pankevych, K., Demydchuk, J., Lambrecht, K., Saluz, H.P., Keller, U. & Krügel, H. (2002). A β -lysine adenylating enzyme and a β -lysine binding protein involved in poly β -lysine chain assembly in nourseothricin synthesis in *Streptomyces noursei*. *Eur. J. Biochem.* 269, 347–357.
- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. & Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368, 874–885.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C., Grandi, G. & Sapienza, I.G. (1998). Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. *J. Biol. Chem.* 273, 32857–32863.
- Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A. & Piel, J. (2011). Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem. Biol.* 18, 381–391.
- Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C.M., Zazopoulos, E. & Bachmann, B.O. (2007). Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem. Biol.* 14, 691–701.
- Hur, G.H., Vickery, C.R. & Burkart, M.D. (2012). Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1074–1098.
- Challis, G.L. & Hopwood, D. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14555–14561.
- Challis, G.L., Ravel, J. & Townsend, C. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* 7, 211–224.

- Chan, C.X., Beiko, R.G., Darling, A.E. & Ragan, M. (2009). Lateral transfer of genes and gene fragments in prokaryotes. *Genome Biol. Evol.* 1, 429–438.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260.
- Christiansen, G., Yoshida, W.Y., Blom, J.F., Portmann, C., Gademann, K., Hemscheidt, T. & Kurmayer, R. (2008). Isolation and structure determination of two microcystins and sequence comparison of the McyABC adenylation domains in *Planktothrix* species. *J. Nat. Prod.* 71, 1881–1886.
- Chung, S.T. (1997). Fermentation, biosynthesis, and molecular genetics of lincomycin. In *Biotechnology of Antibiotics* (ed. Strohl, W.R.), Marcel Dekker, New York, 165–187.
- Igarashi, N., Harada, J., Nagashima, S., Matsuura, K., Shimada, K. & Nagashima, K. V. (2001). Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J. Mol. Evol.* 52, 333–341.
- Jain, R., Rivera, M.C., Moore, J.E. & Lake, J. a. (2003). Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1598–602.
- Janata, J., Kadlčík, S., Koběrská, M., Ulanová, D., Kameník, Z., Novák, P., Kopecký, J., Novotná, J., Radojevic, B., Plháčková, K., Gažák, R. & Najmanová, L. (2015). Lincosamide synthetase - a unique condensation system combining elements of nonribosomal peptide synthetase and mycothiol metabolism. *PLoS One* 10, 1–27.
- Janata, J., Najmanová, L., Novotná, J., Holá, K., Felsberg, J. & Spížek, J. (2001). Putative *lmbI* and *lmbH* genes form a single *lmbIH* ORF in *Streptomyces lincolnensis* type strain ATCC 25466. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 79, 277–284.
- Jirakkakul, J., Punya, J., Pongpattanakitsote, S., Paungmoung, P., Vorapreeda, N., Tachaleat, A., Klomnara, C., Tanticharoen, M. & Cheevadhanarak, S. (2008). Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067. *Microbiology* 154, 995–1006.
- Jothivasan, V.K. & Hamilton, C.J. (2008). Mycothiol: synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* 25, 1091–1117.
- Kadlčík, S., Kučera, T., Chalupská, D., Gažák, R., Koběrská, M., Ulanová, D., Kopecký, J., Kutějová, E., Najmanová, L. & Janata, J. (2013). Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLoS One* 8, 1–16.
- Kameník, Z. (v přípravě). Lincosamide biosynthesis: Deacetylation of mycothiol-dependent detoxification “waste product” switches the machinery towards completion of antibiotic biosynthesis.

- Kameník, Z., Kopecký, J., Marečková, M., Ulanová, D., Novotná, J., Pospíšil, S. & Olšovská, J. (2009). HPLC-fluorescence detection method for determination of key intermediates of the lincomycin biosynthesis in fermentation broth. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1779–1787.
- Keating, T. a., Marshall, C.G. & Walsh, C.T. (2000). Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* 39, 15522–15530.
- Kinashi, H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64, 19–25.
- Kinashi, H. & Shimaji-Murayama, M. (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 173, 1523–1529.
- Koběrská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelínková, M., Ulanová, D., Man, P., Flieger, M. & Janata, J. (2008). Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol.* 53, 395–401.
- Konz, D., Doekel, S. & Marahiel, M. a. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J. Bacteriol.* 181, 133–140.
- Konz, D., Klens, a, Schörgendorfer, K. & Marahiel, M. a. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.* 4, 927–937.
- Kopp, M., Irschik, H., Gemperlein, K., Buntin, K., Meiser, P., Weissman, K.J., Bode, H.B. & Müller, R. (2011). Insights into the complex biosynthesis of the leupyrrins in *Sorangium cellulosum* So ce690. *Mol. Biosyst.* 7, 1549–1563.
- Kyselková, M., Janata, J., Ságová-Marečková, M. & Kopecký, J. (2010). Subunit-subunit interactions are weakened in mutant forms of acetohydroxy acid synthase insensitive to valine inhibition. *Arch. Microbiol.* 192, 195–200.
- Lautru, S. & Challis, G.L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* 150, 1629–1636.
- Lee, T.V., Johnson, L.J., Johnson, R.D., Koulman, A., Lane, G. a., Lott, J.S. & Arcus, V.L. (2010). Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285, 2415–2427.
- Lell, B. & Kremsner, P.G. (2002). Clindamycin as an antimalarial drug: Review of clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2315–2320.
- Li, J. & Jensen, S.E. (2008). Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. *Chem. Biol.* 15, 118–127.

- Li, W., Chou, S., Khullar, A. & Gerratana, B. (2009a). Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2958–2963.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A. & Gerratana, B. (2009b). Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2869–2878.
- Lin, C., Sasaki, E., Zhong, A. & Liu, H. (2014). In vitro characterization of LmbK and LmbO: identification of GDP-D-erythro- α -D-gluco-octose as a key intermediate in lincomycin A biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 906–909.
- Losey, H.C., Peczuh, M.W., Chen, Z., Eggert, U.S., Dong, S.D., Pelczer, I., Kahne, D. & Walsh, C.T. (2001). Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: Novel glycopeptides. *Biochemistry* 40, 4745–4755.
- Magerlein, B.J. (1971). Modification of lincomycin. *Adv. Appl. Microbiol.* 14, 185–229.
- Martín, J.F. (1998). New aspects of genes and enzymes for β -lactam antibiotic biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 1–15.
- Maruyama, C., Toyoda, J., Kato, Y., Izumikawa, M., Takagi, M., Shin-ya, K., Katano, H., Utagawa, T. & Hamano, Y. (2012). A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 8, 791–797.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M. a & Stubbs, M.T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12120–12125.
- Méjean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D. & Ploux, O. (2010). In vitro reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: From free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. *Biochemistry* 49, 103–113.
- Moore, B.S. & Hertweck, C. (2002). Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.* 19, 70–99.
- Myronovskyi, M., Tokovenko, B., Manderscheid, N., Petzke, L. & Luzhetskyy, A. (2013). Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. *J. Biotechnol.* 168, 117–118.
- Najmanová, L., Kutějová, E., Kadlec, J., Polan, M., Olšovská, J., Benada, O., Novotná, J., Kameník, Z., Halada, P., Bauer, J. & Janata, J. (2013). Characterization of N-demethylincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ. *ChemBioChem* 14, 2259–2262.
- Najmanová, L., Ulanová, D., Jelínková, M., Kameník, Z., Kettnerová, E. & Koběřská, M. (2014). Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiol.* 59, 543–552.
- Newton, G.L., Arnold, K., Price, M.S., Sherrill, C., Delcardayre, S.B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R.C. & Davis, C. (1996). Distribution of thiols in

- microorganisms: Mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.* 178, 1990–1995.
- Newton, G.L., Buchmeier, N. & Fahey, R.C. (2008). Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 471–494.
- Newton, G.L., Leung, S.S., Wakabayashi, J.I., Rawat, M. & Fahey, R.C. (2011). The DinB superfamily includes novel mycothiol, bacillithiol, and glutathione S-transferases. *Biochemistry* 50, 10751–10760.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- Olendzenski, L., Liu, L., Zhaxybayeva, O., Murphey, R., Shin, D.G. & Gogarten, J.P. (2000). Horizontal transfer of archaeal genes into the Deinococcaceae: detection by molecular and computer-based approaches. *J. Mol. Evol.* 51, 587–599.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12215–12220.
- Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.* 26, 449–457.
- Park, S.S.R., Park, J.J.W., Ban, Y.H.Y., Sohng, J.K. & Yoon, Y.J. (2013). 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 30, 11–20.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z. & Piepersberg, W. (1995). Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 16, 1137–1156.
- Röttig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011). NRSPredictor2 - A web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* 39, 362–367.
- Rückert, C., Szczepanowski, R., Albersmeier, A., Goesmann, A., Iftime, D., Musiol, E.M., Blin, K., Wohlleben, W., Pühler, A., Kalinowski, J. & Weber, T. (2013). Complete genome sequence of the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tü 365 consisting of a linear chromosome and two linear plasmids. *J. Biotechnol.* 168, 739–740.
- Sareen, D., Steffek, M., Newton, G.L. & Fahey, R.C. (2002). ATP-dependent L-cysteine: 1D-myo-inosityl 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranoside ligase, mycothiol biosynthesis enzyme MshC, is related to class I cysteinyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* 41, 6885–6890.

- Sasaki, E., Lin, C.I., Lin, K.Y. & Liu, H.W. (2012). Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: Characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 17432–17435.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. & Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814–821.
- Smith, J.L. & Sherman, D.H. (2008). An enzyme assembly line. *Science* 321, 1304–1305.
- Solenberg, P.J., Matsushima, P., Stack, D.R., Wilkie, S.C., Thompson, R.C. & Baltz, R.H. (1997). Production of hybrid glycopeptide antibiotics in vitro and in *Streptomyces toyocaensis*. *Chem. Biol.* 4, 195–202.
- Stachelhaus, T., Mootz, D. & Marahiel, A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, 493–505.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. & Marahiel, M. a. (1998). Peptide Bond Formation in Nonribosomal Peptide Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 273, 22773–22781.
- Thirlway, J., Lewis, R., Nunns, L., Al Nakeeb, M., Styles, M., Struck, A.W., Smith, C.P. & Micklefield, J. (2012). Introduction of a non-natural amino acid into a nonribosomal peptide antibiotic by modification of adenylation domain specificity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51, 7181–7184.
- Trefzer, A., Pelzer, S., Schimana, J., Stockert, S., Bihlmaier, C., Fiedler, H., Welzel, K., Vente, A. & Bechthold, A. (2002). Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1174–1182.
- Tsui, W., Yim, G., Wang, H., McClure, J., Surette, M. & Davies, J. (2004). Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem. Biol.* 11, 1307–1316.
- Ulanová, D., Novotná, J., Smutná, Y., Kameník, Z., Gažák, R., Šulc, M., Sedmera, P., Kadlčík, S., Plháčková, K. & Janata, J. (2010). Mutasyntesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 927–930.
- Walsh, C.T. & Fischbach, M. a. (2010). Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2469–2493.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. & Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176, 386–390.
- Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M. a. & Stubbs, M.T. (2008). Crystal structure of DltA: Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J. Biol. Chem.* 283, 32484–32491.
- Zhao, Q., Wang, M., Xu, D., Zhang, Q. & Liu, W. (2015). Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature* 518, 115–119.

Zlatopolskiy, B.D. & De Meijere, A. (2004). First total synthesis of hormaomycin, a naturally occurring depsipeptide with interesting biological activities. *Chem. - A Eur. J.* 10, 4718–4727.