

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE



Přírodovědecká fakulta  
Katedra organické chemie

ANALÝZA GENU *lmbX* ZAHRNUTÉHO  
V BIOSYNTÉZE PROPYLPROLINU

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**studijního oboru Klinická a toxikologická analýza**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury a uváděné výsledky nejsou součástí jiné dříve vydané práce.

Yvona Smutná

Smutná Yvona

1) Praha 3.5.2007

Doc. Jindřichu Jindřichovi, svému školiteli, děkuji přátelský přístup při vedení této práce. Dále velký dík patří mé konzultantce Mgr. Jitce Novotné, která mě s laskavostí a odbornými radami dovedla k cíli, vypracování diplomové práce. Taktéž bych chtěla poděkovat konzultantce RNDr. Janě Olšovské a Zdeňkovi Kameníkovi, a to za pomoc při řešení analytických úloh. Za zázemí v laboratoři genetiky a sekundárního metabolismu děkuji Ing. Jiřímu Janatovi Csc. Za časté rady i pomoc a za vytváření milého pracovního prostředí děkuji a Mgr. Daně Ulanové i všem ostatním kolegům z laboratoře, Markétě Marečkové PhD., Mgr.Lád'ovi Čermákovi, Mgr.Gábině Novotné, Ing.Anně Matuškové a všem ostatním.

Za pochopení a podporu děkuji především své rodině, manželovi, dětem i svým rodičům.

**Předmětová hesla:** Linkosamides, *Streptomyces lincolnensis*, UPLC, lincomycin

**Klíčová hesla:** Phenazine, propylproline, secondary metabolism

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>STREPTOMYCETY– hlavní producenti antibiotik</b>	<b>9</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Genom streptomycet</b>	<b>9</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Uspořádání genů pro produkci antibiotik</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>SEKUNDÁRNÍ METABOLISMUS</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Fenaziny</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>PŘÍPRAVA NOVÝCH ANTIBIOTIK</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Biosyntéza polyketidových antibiotik</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Cílené genetické manipulace v biosyntéze polyketidů</b>	<b>12</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Cílené genetické manipulace v biosyntéze antibiotik</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>LINKOMYCIN</b>	<b>13</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Chemická struktura a producenti</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Modifikace linkozamidů</b>	<b>14</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Mechanismus účinku a využití v klinické praxi</b>	<b>14</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Biosyntéza linkomycinu</b>	<b>15</b>
<b>2.4.4.1</b>	<b>Biosyntéza propylprolinu</b>	<b>15</b>
<b>2.4.4.2</b>	<b>Biosyntéza methylthiolinkosamidu</b>	<b>16</b>
<b>2.4.4.3</b>	<b>Kondenzace PPL a MTL</b>	<b>17</b>
<b>2.4.4.4</b>	<b><i>N</i>-methylace mění <i>N</i>-demethyllinkomycin na linkomycin</b>	<b>17</b>
<b>2.4.4.5</b>	<b>Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu</b>	<b>18</b>
<b>2.4.4.6</b>	<b>Biosyntéza příbuzných látek</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIÁL</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Bakteriální kmeny</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Plazmidy</b>	<b>21</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Kultivační média</b>	<b>22</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Roztoky a pufry</b>	<b>23</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Komerční soupravy</b>	<b>24</b>

3.1.6	Enzymy a chemikálie	24
3.2	<b>METODY</b>	<b>25</b>
3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	25
3.2.1.1	Kultivace <i>E. coli</i>	25
3.2.1.2	Příprava kompetentních buněk	25
3.2.1.3	Transformace buněk <i>E. coli</i> plazmidovou DNA elektroporací	25
3.2.2	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	25
3.2.2.1	Kultivace <i>Streptomyces lincolnensis</i>	25
3.2.2.2	Příprava spor <i>Streptomyces lincolnensis</i>	26
3.2.2.3	Kultivace <i>Streptomyces lincolnensis</i> pro sledování produkce linkomycinu	26
3.2.2.4	Příprava protoplastů <i>Streptomyces lincolnensis</i>	26
3.2.2.5	Transformace protoplastů <i>Streptomyces lincolnensis</i>	26
3.2.2.6	Transformace <i>S. lincolnensis</i> plasmidovou DNA mezidruhovou konjugací s <i>E. coli</i>	27
3.2.2.7	Test obnovení produkce linkomycinu v inaktivantech <i>S. lincolnensis</i> přidavkem PPL/MTL do kultivační půdy	27
3.2.3	<i>Kocuria rhizophila</i>	28
3.2.3.1	Kultivace <i>Kocuria rhizophila</i>	28
3.2.4	Práce s DNA	28
3.2.4.1	Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> alkalickou lyzí	28
3.2.4.2	Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí komerční soupravy Wizard	29
3.2.4.3	Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz	29
3.2.4.4	Izolace genomové DNA ze streptomycetových kmenů fenolovou extrakcí	29
3.2.4.5	DNA elektroforéza	30
3.2.4.6	Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu	30
3.2.4.7	PCR	30
3.2.5	Stanovení linkomycinu ve fermentačním médiu	30
3.2.5.1	Příprava vzorku SPE	30
3.2.5.2	Stanovení metodou UPLC	31
3.2.6	Metoda inaktivace genů lokalizovaných na chromozómu streptomycet	31

<b>3.3</b>	<b>SOFTWARE</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>34</b>
	<b>CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>INAKTIVACE GENU <i>lmbX</i></b>	<b>34</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Příprava kazety</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Návrh primerů pro zavedení oblastní homologie</b>	<b>35</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Vnesení oblastní homologie do inaktivační kazety</b>	<b>37</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za <i>lmbX</i></b>	<b>38</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Ověření integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za <i>lmbX</i></b>	<b>38</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Integrace inaktivační kazety do chromozómu <i>S. lincolnensis</i> DSM 40355 výměnou za <i>lmbX</i></b>	<b>40</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Ověření integrace inaktivační kazety do chromozómu <i>S. lincolnensis</i> DSM 40355 výměnou za <i>lmbX</i></b>	<b>40</b>
<b>4.1.8</b>	<b>Vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX</b>	<b>41</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX</b>	<b>42</b>
<b>4.1.10</b>	<b>Vyštěpení inaktivační kazety z chromozómu <i>S. lincolnensis</i></b>	<b>43</b>
<b>4.1.11</b>	<b>Ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX zchromozómu <i>S. lincolnensis</i> DSM</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>ANALÝZA PRODUKČNÍCH VLASTNOSTÍ <i>S. lincolnensis</i> DSM40355 <i>lmbX</i></b>	<b>45</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Stanovení produkce linkomycinu metodou UPLC</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Biologický test obnovení produkce linkomycinu po obohacení média PPL nebo MTL</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY</b>	<b>54</b>

## ZKRATKY

<b>L-DOPA</b>	<b>L-3,4-dihydroxyfenylalanin</b>
<b>LM</b>	<b>linkomycin</b>
<b>MTL</b>	<b>(methylthiolinkozamid)methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro-<math>\alpha</math>-D-galaktopyranosid</b>
<b>NDL</b>	<b><i>N</i>-demethyllinkomycin</b>
<b>PPL</b>	<b>trans-<i>N</i>-methyl-4-n-propyl-L-prolin (propylprolin)</b>
<b>SAM</b>	<b><i>S</i>-adenozylmetionin</b>
<b>Cfu</b>	<b>z angl. Colony forming units, jednotka vyjadřující množství životaschopných bakteriálních kolonií</b>
<b>ORF</b>	<b>otevřený čtecí rámeček</b>
<b>SDS</b>	<b>dodecylsulfát sodný</b>
<b>EDTA</b>	<b>etylen- diamin- tetraoctová kyselina</b>
<b>DMSO</b>	<b>dimetylsulfoxid</b>
<b>dNTP mix</b>	<b>směs 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfátů (ATP,CTP,GTP,TTP)</b>
<b>RPM</b>	<b>otáčky za minutu</b>
<b>OD</b>	<b>optická denzita</b>
<b>nt</b>	<b>nukleotid</b>
<b>kp</b>	<b>kilobáze</b>
<b><i>lmb</i></b>	<b>lincomycin biosynthesis gene</b>
<b><i>lmr</i></b>	<b>lincomycin resistance gene</b>
<b>PEP</b>	<b>fosfoenolpyruvát</b>
<b>PCR</b>	<b>z angl.polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce</b>
<b>UPLC</b>	<b>Ultra-performance liquid chromatography</b>
<b>SPE</b>	<b>z angl. Solid phase extraction</b>
<b>PDA</b>	<b>photodiode array detection</b>



## 1 ÚVOD

Antibiotika jsou organické molekuly různé chemické struktury produkované mikroorganismy, rostlinami i živočichy, které vykazují specifický inhibiční účinek na určitý životní děj některých mikroorganismů [1]. V současnosti je známo více než 12 000 antibiotik, z nichž asi 60% je produkováno aktinomycetami, zejména příslušníky rodu *Streptomyces*. Z přirozeně produkovaných biocidních látek vychází více než 100 000 semisyntetických a syntetických derivátů, z nichž se v praxi používá pouze asi 160 [2]. Použití mnoha potenciálně důležitých antibiotik je např. omezeno pro jejich toxicitu (např. gentamycin a jiné aminoglykosidy vykazují ototoxicitu a nefrotoxicitu).

Přestože jsou objevována a do klinického použití uváděna stále nová antibiotika, poptávka po nových antimikrobiálních látkách neklesá. Důvodem je nejen to, že se objevují nová infekční onemocnění, ale především to, že roste počet rezistentních patogenů. Jsou dokonce známy patogeny, např. některé kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* či *Mycobacterium tuberculosis*, rezistentní ke všem, nebo téměř ke všem, antibiotikům používaným v humánní medicíně.

Jedním ze způsobů, jak rozšířit spektrum antimikrobiálně účinných látek, jsou cílené zásahy do biosyntetických drah antibiotik pomocí metod molekulární biologie. Takto je možné vytvářet kombinace genů z rozlišných genových shluků *in vivo*, které vedou k produkci hybridních látek s novými biologickými aktivitami. Úspěšné použití této strategie podmiňuje detailní znalost biosyntetických drah antibiotik a také enzymů, které katalyzují jejich jednotlivé reakce [3].

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci projektu výzkumu biosyntézy linkosamidových a pyrrolo[1,4]benzodiazepinových antibiotik, potenciálních zdrojů hybridních látek s antibakteriálními, antimalarickými nebo protinádorovými účinky. Má přispět k detailnímu poznání aminokyselinové větve biosyntetické dráhy linkomycinu. Jejím cílem bylo inaktivovat jeden z vytypovaných genů linkomycinového biosyntetického shluku a na základě analýzy fenotypového projevu mutace chromatografickými a biologickými metodami potvrdit správnost jeho předběžného přiřazení k reakcím aminokyselinové větve dráhy.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 STREPTOMYCETY

Taxonomické zařazení [4]



nadříše: *Prokaryota*  
říše: *Eubacteria*  
třída: *Firmicutes*  
podtřída: *Actinobacteridae*  
řád: *Actinomycetales*  
podřád: *Streptomycineae*  
čeleď: *Streptomycetaceae*

Obr 2.1. *Streptomyces lincolnensis* Kolonie na BG agaru ve zvětšení 25x

Rod *Streptomyces* je, co do počtu druhů, největším bakteriálním rodem. Zástupci jsou do tohoto rodu řazeni především na základě sekvenční analýzy 16S rRNA, analýzy buněčné stěny, zastoupení mastných kyselin a dalších fenotypových projevů [5,6].

Streptomycety jsou Gram-pozitivní vláknité striktně aerobní organizmy. V přírodě se vyskytují především v půdě, kde hrají důležitou roli při degradaci biologického materiálu [7]. Jedná se tedy převážně o saprofytické bakterie, je však mezi nimi možno nalézt i patogenní kmeny (*S. somalensis*, *S. ipomoea*) [6].

Úspěšnou kolonizaci nových biotopů usnadňuje streptomycetám jejich životní cyklus. Cyklus začíná jednobuněčnou sporou, která klíčí ve vegetativní substrátové mycelium, tvořené vícejadernými nepravidelně přehrádkovanými hyfami. Vlivem stresu (např. limitace živinami) dochází k morfologické diferenciaci a tvorbě vzdušného mycelia rozpadajícího se na odolné spory, které slouží k přežití nepříznivých podmínek a k šíření organismu v prostředí [8,9]. Proces diferenciaci je řízen mnohostupňovým regulačním systémem, souvisejícím s tvorbou sekundárních metabolitů, protože u mutant neschopných tvorby vzdušného mycelia nebyla pozorována tvorba antibiotik [10,3].

#### 2.1.1 Genom streptomycet

Složité životní cyklus, velká fyziologická přizpůsobivost a schopnost streptomycet produkovat široké spektrum sekundárních metabolitů se odráží ve velikosti jejich genomu, např. genom *Streptomyces coelicolor* má velikost 8,67 Mb a obsahuje 7 825 otevřených čtecích rámců, což je dvakrát více než *E. coli* [11]. Centrální oblast tohoto lineárního chromozómu nese

geny zahrnuté v primárním metabolismu a v koncových oblastech jsou převážně lokalizovány geny kódující neesenciální proteiny a biosyntézu sekundárních metabolitů [12].

DNA streptomycet se vyznačuje vysokým obsahem G + C párů (61-80%) [13].

### **2.1.2 Uspořádání genů pro produkci antibiotik**

Geny pro biosyntézu antibiotik jsou u streptomycet obvykle lokalizovány na chromozomu, někdy však je nesou i velké lineární plazmidy [14,15]. Geny tvoří, na rozdíl od genů primárního metabolismu, shluky (od 15 do více než 120 kb), které jsou obvykle organizované do několika transkripčních jednotek a obsahují biosyntetické a regulační geny a také geny kódující rezistenci k produkovanému antibiotiku. Exprese genů celého shluku bývá řízena nadřazenými regulačními geny mimo shluk. [16,17,18].

## **2.2 SEKUNDÁRNÍ METABOLIZMUS**

Charakteristickou vlastností streptomycet je tvorba velkého množství sekundárních metabolitů s antibakteriálními, antifungálními, antiparazitickými a protinádorovými nebo imunosupresivními účinky.

Sekundární metabolity, metabolity pro organismus postradatelné, jsou tvořeny z metabolitů primárních a jsou produkovány až poté, co se růst zastavil. Pro produkční organismus mohou mít sekundární metabolity různý význam. Mohou se uplatňovat jako prostředky mezidruhového boje, endogenní signální molekuly, signály mezidruhové komunikace, jako metabolický ventil, který neutralizuje nadbytečné či toxické metabolity vzniklé při částečné limitaci substrátem, případně jako zdroj rezervních látek, které mohou být opět metabolizovány.

Sekundární metabolity jsou specifické pro určitý druh a jsou tvořeny jen v nepatrných množstvích. Patří mezi ně antibiotika, pigmenty, fenaziny, atd.

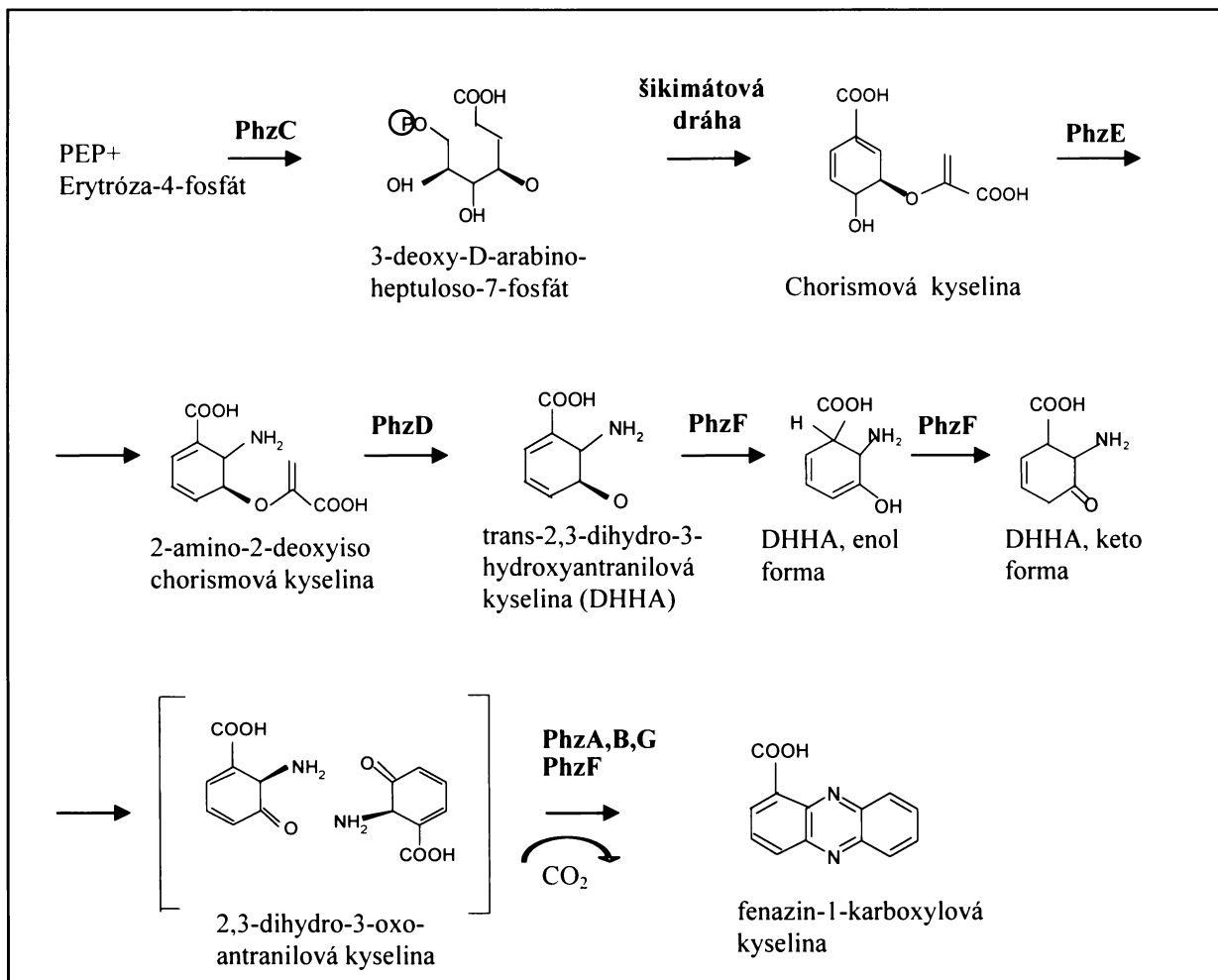
### **2.2.1 Fenaziny**

Jsou to dusíkaté heterocyklické látky syntetizované především rody *Streptomyces* a *Pseudomonas*. Většina z nich má široké spektrum antibiotické aktivity proti bakteriím, houbám, rostlinným a živočišným tkáním [19].

Biosyntéza fenazínů vychází ze šikimátové dráhy a jejich bližším prekurzorem pak je kyselina chorismová. Klíčové reakce jsou stále známy pouze v hrubých rysech (obr.2.2 ) [20,19].

Podle sekvenačních dat vyžaduje biosyntéza tricyklického základního skeletu fenazinů minimálně 5 genů, homologních genům shluku pro biosyntézu fenazin-1-karboxylové kyseliny (PCA) *P. fluorescens* (*phzA*, *D*, *E*, *F* a *G* s genem *phzA* duplikovaným jako gen *phzB*). Mnoho shluků také nese gen *phzC*, homologní genu kódujícímu první enzym šikimátové dráhy, který přeměňuje intermediáty z primárního do sekundárního metabolismu, a dále geny regulační a geny kódující enzymy modifikující základní skelet.

**Obr.2.2. Biosyntéza PCA u *Pseudomonas fluorescens* [20]**



Kyselina chorismová je konvertována na kyselinu 2-amino-4-deoxyizochorismovou (ADIC), která je transformována na 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilovou kyselinu (DHHA). Konverze běží přes 1,5-prototrofičtý posun k enolu, který pak tautomerizuje na keton (nestabilní intermediát). Bylo přesvědčivě demonstrováno, že PhzF je zodpovědný za další transformaci DHHA. Volný 3-ketonový intermediát by spontánně aromatizoval na stabilnější, ale neinkorporovanou kyselinu 3-hydroxyanthranilovou. Předpokládá se, že PhzF drží tento ketonový intermediát v orientaci upřednostňující dimerizaci před enolizací. Dimerní struktura PhzF naznačuje, že dimerizace zahrnuje setkání 2 ketonových molekul v kavitě, kde by se mohla uskutečnit tvorba dvojité Schiffovy báze (nestabilní intermediát) bez další katalýzy. Je pravděpodobné, že PhzA, PhzB a PhzG vylučují neproduktivní dekompozice nestabilních intermediátů. Zůstává otázkou, jak je generován aromatický systém fenazinů. To vyžaduje odstranění celkem 6 elektronů ze 2 molekul, které jsou vstupem do fenazinu. Studie naznačují, že oxidační krok je spojen s dekarboxylací. Poslední oxidační krok vedoucí k PCA bude energeticky upřednostňován, neboť vede k velkému delokalizovanému systému elektronů. Tento krok probíhá pravděpodobně bez katalýzy pod přímým vlivem kyslíku.

## 2.3 PŘÍPRAVA NOVÝCH ANTIBIOTIK

Již zmiňovaná stálá snaha získat nové účinné látky vedla k tomu, že se vedle tradičních postupů v současnosti hledají i postupy nové, mezi něž patří získávání nových látek cílenými zásahy do biosyntézy látek pomocí známých metod molekulární biologie. Tento postup je podmíněn detailní znalostí příslušných biosyntetických drah [2].

### 2.3.1 Biosyntéza polyketidových antibiotik

Mezi nejlépe prostudované biosyntetické dráhy antibiotik patří biosyntéza polyketidů. Polyketidy jsou syntetizovány (obr. 2.3.) spojováním monomerních jednotek (jednoduché karboxylové kyseliny). Vzniká struktura, která je pak dále modifikována enzymy typu glykosyltransferáz, metyltransferáz, oxygenáz, halogenáz, atd [2,21].

Kondenzační reakci katalyzují extrémně velké polyfunkční enzymy polyketidsyntázy (PKS), a to několika typů. PKS typu I se skládají z opakujících se funkčních jednotek nazývaných moduly. Každý modul obsahuje dvě domény s katalytickou a jednu doménu s vazebnou funkcí, které katalyzují tvorbu základního řetězce a dále domény katalyzující modifikace případně ukončení syntézy. Každé aktivní místo na všech modulech pracuje během syntézy jen jedenkrát. PKS typu I produkují makrolidy erytromycin, tylozin, spiramycin a rapamycin.

### 2.3.2 Cílené genetické manipulace v biosyntéze polyketidů

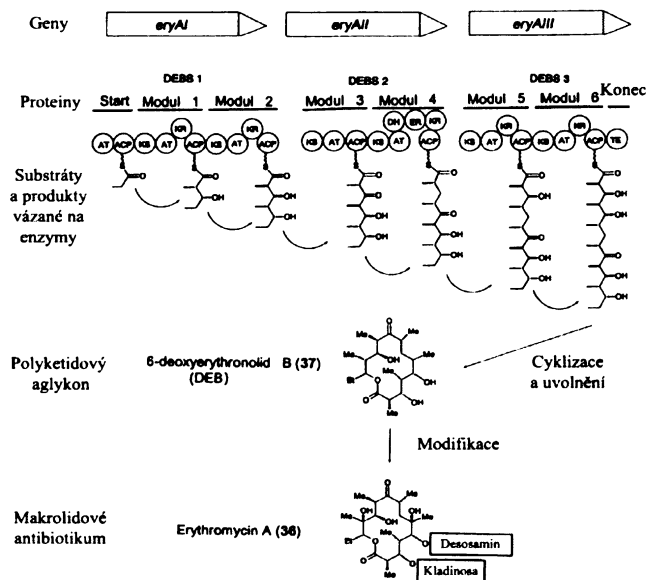
Protože počet, druh a pořadí stavebních jednotek syntetizovaného polyketidu je dán počtem, druhem a pořadím modulů v PKS typu I, lze modifikací, odstraněním nebo přemístováním jednotlivých modulů dosáhnout produkce modifikovaných nebo i zcela odlišných látek. Například delece v genu pro ketoreduktázu modulu 5 u 6-deoxyerythronolid B syntázy, operující v biosyntéze erythromycinu, vedla k produkci derivátů stabilnějších v kyselém prostředí [22].

### 2.3.3 Cílené genetické manipulace v biosyntéze antibiotik

Kombinací biosyntetických genů z různých kmenů a drah lze dosáhnout produkce nových tzv. hybridních antibiotik [23]. U producenta spiramycinu *S. ambofaciens* vedlo nahrazení jednoho modulu podobným modulem z PKS I, operující v biosyntéze tylozinu, k zabudování tříuhlíkové jednotky místo dvouuhlíkové [2]. Nadprodukční kmeny mohou být připraveny

manipulací regulačních genů nebo zvýšením genové dóze genů, kódujících tzv. „úzká hrdla“ biosyntézy.

Nové deriváty lze získat i změnami v genech pro enzymy katalyzující reakce vedoucí k modifikaci základní struktury.



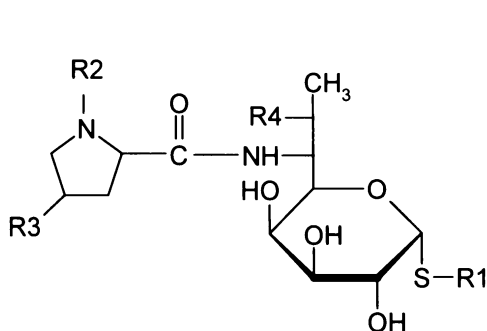
**Obr. 2.3.** Schema biosyntézy polyketidového antibiotika erythromycinu A, katalyzované PKS typu I. Každý modul obsahuje tři základní domény: ketosyntetázu (KS), acyltransferázu (AT) a „acyl carrier protein“ (ACP) a některé moduly i další domény: ketoreduktázu (KR), dehydratázu (DH), enoylreduktázu (ER) nebo thioesterázu (TE)[18].

## 2.4 LINKOMYCIN

### 2.4.1 Chemická struktura a producenti

Molekula linkomycinu (linkomycin A, methyl 6,8-dideoxy-6[1-methyl-4-propyl-2-pyrolidin karboxyamido]-1-thio-D-erythro- $\alpha$ -D-galaktopyranosid, obr. 2.4) se skládá z cukerné a aminokyselinové subjednotky, které jsou spojeny peptidovou vazbou [24]. Cukernou složku, která dala název celé skupině linkozamidových antibiotik, představuje methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- $\alpha$ -D-galaktopyranosid (methylthiolinkosamid, MTL) [25] a aminokyselinovou složku trans-N-methyl-4-n-propyl-L-prolin (kyselina propylhygrová) [26].

**Obr.2.4.** Linkomycin A a jeho deriváty



	R1	R2	R3	R4
Linkomycin A	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
Linkomycin B	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
Linkomycin C	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
Linkomycin D	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
Linkomycin S	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH

Jako první producent linkomycinu byl objeven v roce 1962 kmen *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* NRRL 2936 [27]. Později byl z této kultury izolován i balastní linkomycin B (4'-depropyl-4'-ethyllinkomycin) [28]. Ten vykazuje přibližně 25% antibakteriální aktivity linkomycinu. V závislosti na složení média a po přidání některých inhibitorů mohou být syntetizovány linkomyciny C,D a S [29,30].

Produkce linkomycinu byla objevena i u *Streptomyces umbrinosus* var. *nova* [31], *Streptomyces espinosus* Dietz, sp. *nova* [32], *Streptomyces pseudogriseolus* chemovar. *linmyceticus* Dietz var. *nova* [33], *Actinomyces roseolus* strain 1147 [34] a *Streptomyces vallosus* sp. *nova* [35] a *Micromonospora lipolytica* [36].

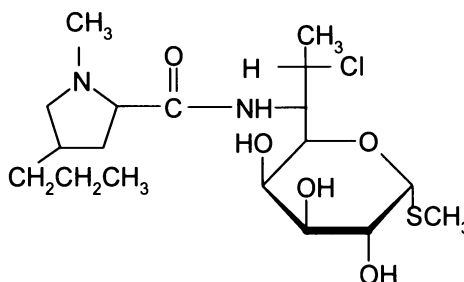
#### 2.4.2 Modifikace linkozamidů

Stejně jako v případě jiných člověkem využívaných antibiotik, je vyvíjena snaha získat deriváty linkomycinu s lepšími vlastnostmi (širší spektrum antibakteriálního účinku, lepší farmaceutické vlastnosti, atd).

Dodnes jediným klinicky používaným derivátem linkomycinu je klindamycin (Obr. 2.5), připravený nahrazením hydroxyskupiny atomem chloru v pozici 7 cukerné složky [37].

V literatuře jsou popsány i další deriváty odvozené od linkomycinu a klindamycinu, připravené derivatizací jeho aminokyselinové subjednotky. Nahrazením methylové skupiny vodíkem a/nebo nahrazením propylového řetězce v poloze 4' za delší alkylový řetězec. Zvláště deriváty s 5-6 členným alkylovým řetězcem odvozené od *N*-demethylklindamycinu jsou výrazně účinnější [38]. Bohužel, jejich rozšíření v klinické praxi brání jejich náročná syntéza. Problém by mohla vyřešit cílená modifikace genomu producenta.

Obr. 2.5. Klindamycin



#### 2.4.3 Mechanismus účinku a využití v klinické praxi

Linkomycin i klindamycin se vážou na 50S podjednotku ribozómu, přesněji na její 23S rRNA, a blokují v citlivých bakteriálních kmenech proteosyntézu (zasahují A a P místo ribozomu, blokují navázání aminoacyl-tRNA, peptidytransferázovou reakci a zároveň stericky brání prodlužování nascentního peptidového řetězce [39]). Tomu odpovídá i jeden ze způsobů

rezistence k linkozamidům – modifikace zásahového místa methylocí jednoho z adeninových zbytků 23S RNA [40].

Organismy citlivé vůči účinkům linkozamidů jsou: většina Gram-pozitivních bakterií (hl. rody *Staphylococcus* a *Streptococcus*). Dále anaerobní bakterie, některé mykoplazmy a prvoci. Linkozamidy jsou neúčinné proti Gram-negativním bakteriím [41].

Linkozamidy jsou účinné u pneumokokové, stafylokokové i anaerobní pneumonie, v léčbě faryngitidy, sinusitidy a otitidy, proto je jejich použití výhodné při intoleranci základních antibiotik [42].

Klindamycin vykazuje v porovnání s linkomycinem širší spektrum účinku a výhodnější vlastnosti. Je používán při akutních formách toxoplazmózy a pneumocystózy u pacientů nemocných AIDS, zpravidla v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky. Velmi nadějná je aktivita klindamycinu a jeho derivátů v případě malárie, je-li původcem *Plasmodium falciparum*, a to i tehdy, je-li původce rezistentní k chlorochinu, sulfonamidům a pyrimetaminu [41,42].

### 2.4.4 Biosyntéza linkomycinu

Biosyntetická dráha linkomycinu není dosud prostudována detailně, je však pochopena alespoň v hrubých rysech. Dva základní prekurzory, propylprolin a methylthiolinkozamid, jsou syntetizovány nezávislými drahami. Po jejich kondenzaci na *N*-demethyllinkomycin následuje methylocace na linkomycin.

#### 2.4.4.1 Biosyntéza propylprolinu (PPL)

Aminokyselinová větev biosyntetické dráhy linkomycinu, biosyntéza PPL, vychází z L-tyrosinu. Z něj pochází 7 z devíti uhlíků obsažených v PPL [43]. Další dva uhlíky pochází z *S*-adenosylmethioninu [44].

L-tyrosin je hydroxylován na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Jeho aromatický kruh je poté přerušen 2,3 extradiolovým štěpením. Následuje zacyklení produktu štěpení a vzniká 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina [45,46,47].

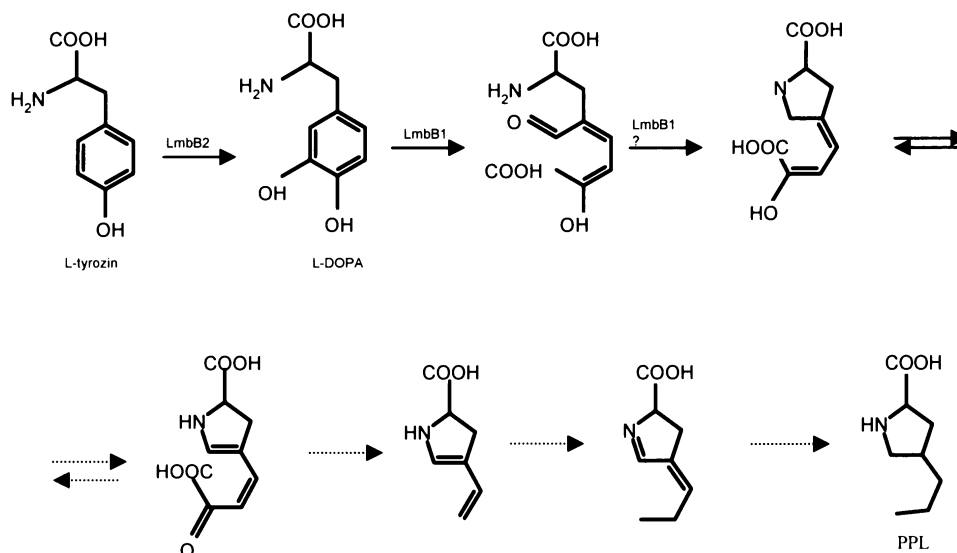
Poté následuje několik neověřených kroků, z nichž poslední jsou methylocace a dehydrogenace.

V závěrečných krocích biosyntézy PPL u *S. lincolnensis* se uplatňuje redoxní kofaktor, zvaný linkomycinový kosyntetický faktor (LCF) [48,49], 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-



deazariboflavin. V mutantě *S. lincolnensis* neprodukující LCF se hromadí další intermediát syntézy PPL, 3-propyliden- $\Delta^1$ -pyrrolin-5-karboxylová kyselina [48].

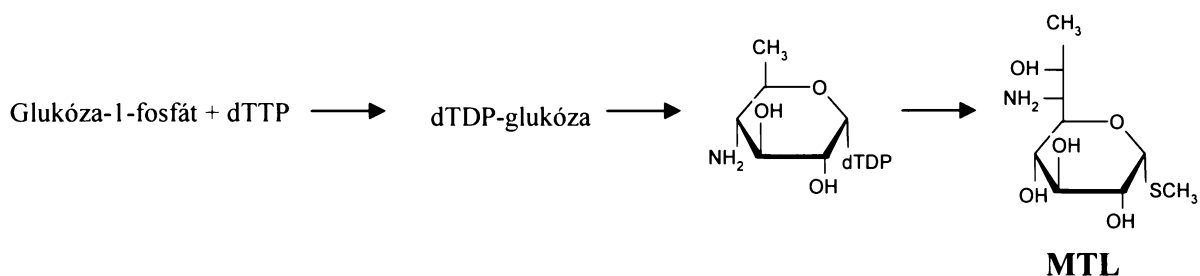
**Obr.2.6. Schema pravděpodobného průběhu biosyntézy PPL**



#### 2.4.4.2 Biosyntéza methylthiolinkosamidu (MTL)

Cukerná větev biosyntetické dráhy linkomycinu, biosyntéza MTL, je prozkoumána velmi málo. Dosud nebyl izolován jediný její intermediát. Recentní představy o průběhu syntézy MTL jsou následující: dochází ke vzniku dTDP-aktivované hexózy (nejspíše glukózy), která je následně konvertována na dTDP-deoxyamino intermediát a dále na osmiuhlíkatý cukr (obr. 2.7) [50,51]. S-methylová skupina na  $\text{C}_1$  MTL pochází z S-adenosylmethioninu [52].

**Obr.2.7. Schema pravděpodobného průběhu biosyntézy MTL**



### 2.4.4.3 Kondenzace PPL a MTL

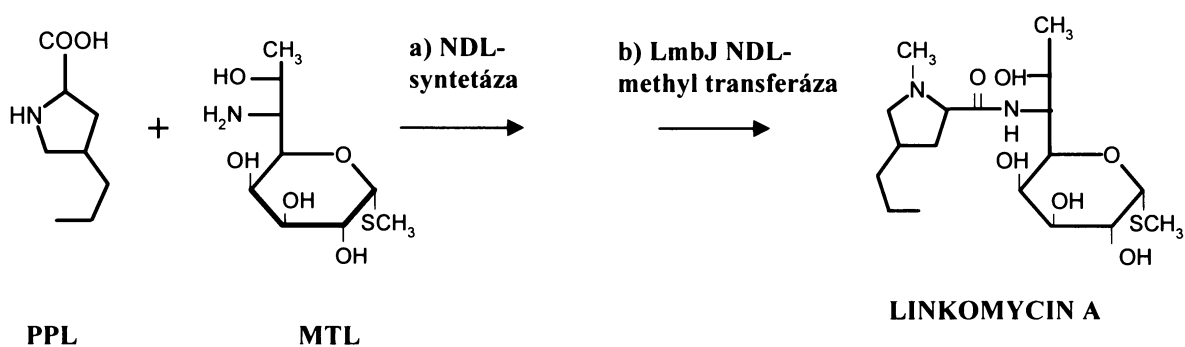
Předposledním krokem biosyntézy linkomycinu je vytvoření peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou PPL a aminoskupinou MTL. Tuto kondenzační reakci katalyzuje ATP dependentní termolabilní *N*-demethyllinkomycinsyntetáza a vzniká *N*-demethyllinkomycin (NDL) [53].

Při pokusu o izolaci NDL-syntetázy gelovou filtrací nebyla aktivita enzymu nalezena v žádné z frakcí, avšak spojením určitých frakcí se jí podařilo obnovit [54]. To podporuje hypotézu, že jde o enzymový komplex snadno disociovatelných neidentických podjednotek. Tento komplex nebyl dosud izolován a proteiny, které ho tvoří nejsou doposud známy.

### 2.4.4.4 *N*-methylace mění *N*-demethyllinkomycin na linkomycin

Závěrečným krokem biosyntézy linkomycinu je methylace *N*-demethyllinkomycinu (obr.2.8b). Tuto reakci katalyzuje *N*-demethyllinkomycin-methyltransferáza LmbJ [55]. Zdrojem CH<sub>3</sub> skupiny v této reakci je *S*-adenosylmethionin (SAM) [44].

**Obr.2.8. Kondenzační (a) a metylační (b) krok v biosyntéze linkomycinu.**



#### 2.4.4.5 Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu.



Obr. 2.9. Uspořádání genového shluku pro biosyntézu linkomycinu (*lmb* geny- červené šipky, *lmr* geny- modré šipky).

Geny kódující biosyntézu linkomycinu a rezistenci k němu jsou usprádané ve shluku, který byl u kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 osekvenován [50]. Jeho velikost je přibližně 35 kbp a obsahuje 29 hypotetických otevřených čtecích rámců (ORF) [50,56], (obr. 2.9). Předpokládá se, že shluk je rozčleněn na 12 samostatných transkripčních jednotek, z nichž největší tvoří pravděpodobně geny pro syntézu cukerné subjednotky (*lmb*VTQRSOPZNM) [50].

Ve shluku jsou začleněny 3 geny kódující rezistenci k linkomycinu: gen *lmrA*, podobný 23S RNA methyltransferázám a geny *lmrB* a *lmrC*, kódující proteiny pravděpodobně zahrnuté v transportu linkomycinu ven z buňky [50,57].

Z biosyntetických genů byla experimentálně prokázána pouze funkce následujících: *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbC* a *lmbJ*. *LmbB1* je DOPA extradiol 2,3-dioxygenáza [47]. *LmbB2* katalyzuje hydroxylaci tyrozinu [58]. *LmbC* hraje roli v aktivaci PPL před kondenzační reakcí [59]. *LmbJ* je NDL-methyltransferáza [55]. Funkce dalších genů lze jen odhadovat na základě analýzy jejich sekvence a na základě inaktivačních pokusů. [52], které přiřadily funkci jednotlivým oblastem linkomycinového genového shluku jen velmi zhruba.

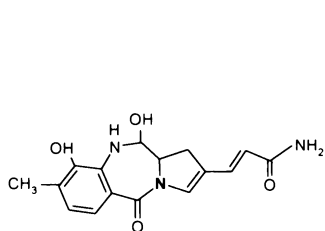
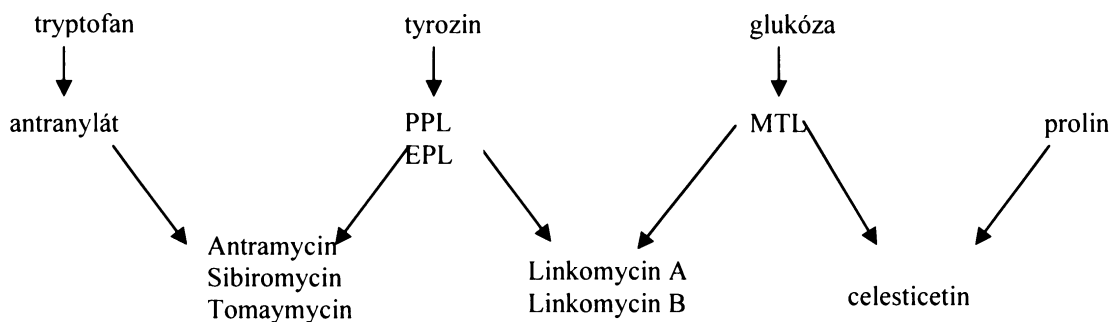
#### 2.4.4.6 Biosyntéza příbuzných látek

Pro přiřazování funkcí genům pro biosyntézu antibiotik slouží porovnávání genových shluků pro biosynteticky příbuzná antibiotika [66].

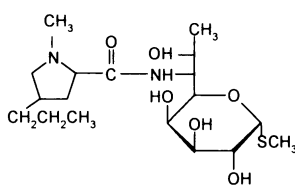
Mezi linkomycinu biosynteticky příbuzná antibiotika patří celesticetin, produkováný kmenem *Streptomyces caelestis* sp. nova NRRL 2418 [61] a propyrrolo-[1,4]-benzodiazepinová antibiotika (anthramycin, tomayamycin, sibiromycin, atd). Výše zmíněné látky velmi pravděpodobně sdílí s linkomycinem části svých biosyntetických drah (obr.2.10).

V roce 2003 byl genový biosyntetický shluk anthramycinu osekvenován a byly v něm nalezeny homology *lmb* genů A, B1, B2, W, X a Y [68].

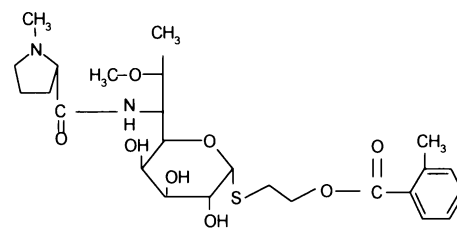
Obr.2.10. Schema biosyntézy pyrrolo-[1,4]-benzodiazepinových a linkozamidových antibiotik.



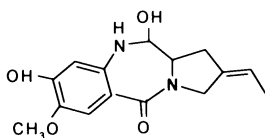
**anthramycin**



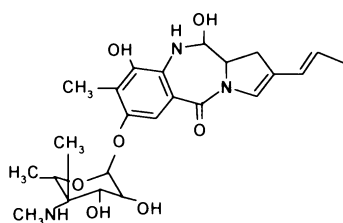
**linkomycin A**



**celesticetin**



**sibiromycin**



**tomaymycin**

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1.1 Bakteriální kmeny

***Streptomyces lincolnensis* DSM40355** je typový kmen produkující linkomycin. Kmen byl získán ze sbírky Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$** . Kmen s genotypem: F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Takara).

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pIJ773**. Kmen s genotypem: F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, nesoucí plazmid pIJ773. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* BW25113/pIJ790**. Kmen s genotypem: ( $\Delta$ (*araD-araB*)567,  $\Delta$ lacZ4787(::*rrnB-4*), *lacI*<sub>p-4000</sub>(lacI<sup>Q</sup>),  $\lambda^-$ , *rpoS369*(Am), *rph-1*,  $\Delta$  (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*), nesoucí plazmid pIJ790. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* ET12567/pUZ8002** Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Escherichia coli* GM2929**: *dam13:Tn9*(Cam<sup>r</sup>) *dcm-6* *mcrB1* *hsdR2*(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *mcrA* *recF143* – nemetylující kmen (zachována jen protektivní metylace) (New England Biolabs).

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pBT340**. Kmen s genotypem: F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, nesoucí plazmid pBT340. Kmen byl získán z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie.

***Kocuria rhizophila* CCM552** Organismus senzitivní k linkomycinu. Kmen byl získán ze sbírky Czech Collection of Microorganisms.

### 3.1.2 Plazmidy

**pIJ773** – konstrukt, který slouží k udržování a amplifikaci inaktivační kazety. Konstrukt je odvozen od vektoru pBluescriptKS(+) (Stratagene). Kazeta je součástí *EcoRI/HindIII* fragmentu pIJ773 o délce 1396 pb obsahujícího kazetu (1382 pb) a její krátké okolí (14 pb). Součástí inaktivační kazety jsou: gen kódující rezistenci k apramycinu (*aac(3)IV*), počátek replikace plazmidu pRP4 (*oriT*), a cílová místa rozpoznávaná FLP rekombinázou (FRT).

**pIJ790** – konstrukt s teplotně senzitivním počátkem replikace (*repA101ts*), nesoucí gen kódující rezistenci ke chloramfenikolu (*cat*). Konstrukt dále nese geny (*gam*, *bet* a *exo*), jejichž proteinové produkty napomáhají homologní rekombinaci mezi okolím inaktivovaného genu a jeho homologní sekvencí vloženou do inaktivační kazety. Geny *gam*, *bet* a *exo* jsou pod kontrolou arabinozou indukovatelného promotoru P *araBAD*. Plazmid se replikuje ve 30 °C, jeho ztráta je navozena ve 37 °C.

**pUZ8002** – konstrukt, který slouží k „*in trans*“ mobilizaci kosmidu, nesoucího inaktivační kazetu s *oriT*. PUZ8002 sám postrádá „*in cis*“ fungující lokus pro vlastní transfer. Konstrukt nese gen pro rezistenci ke kanamycinu.

**pBT340** – konstrukt s teplotně senzitivním počátkem replikace, nesoucí geny kódující rezistenci ke chloramfenikolu a ampicilinu a gen kódující FLP rekombinázu, která rozpoznává FRT sekvenci disruptivní kazety. FLP rekombináza odstraní centrální část inaktivační kazety a na jejím místě zanechá 81 pb dlouhý úsek DNA, označovaný jako *jizva*. Plazmid se replikuje ve 30 °C. Syntéza FLP rekombinázy je indukována ve 42 °C a zároveň je navozena ztráta pBT340.

**pLK6** – kosmid odvozený od vektoru SuperCos 1. Konstrukt nese cca 40 000 pb dlouhý fragment chromozomální DNA *S. lincolnensis* DSM40355, který obsahuje úplnou sekvenci linkomycinového biosyntetického shluku. Kosmid byl získán darem od Mgr. Markéty Koběrské (MBÚ AV ČR, Praha).

## 3.1.3 Kultivační média

**LB médium**

trypton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 000 ml, pH 7,5

**SOC médium:**

yeast extract	5,5 g
trypton	20 g
NaCl 1 M	10 ml
KCL 1 M	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	970 ml, pH 7,0

*po sterilizaci přidat*

2 M MgCl <sub>2</sub>	10 ml
2 M glukóza	10 ml

**YEME :**

yeast extract	3 g
pepton	5 g
malt extract	3 g
sacharóza	340 g
glukóza	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 000 ml, pH 7,2

*po sterilizaci přidat:*

2,5 M MgCl <sub>2</sub>	2 ml
-------------------------	------

**AVM médium:**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
yeast extract	2 g
NaCl	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg
CaCO <sub>3</sub>	5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	50 mg
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	50 mg
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	100 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 880 ml, pH 7,4

*po sterilizaci přidat:*

25% glukóza	120 ml
-------------	--------

**2 x YT médium:**

Difco Bacto tryptone	16 g
Difco Bacto yeast extract	10 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 000 ml

**LB agar**

LB médium	1 litr
agar	15 g

**MS agar:**

agar	20 g
manitol	20 g
sójová mouka	20 g
vodovodní H <sub>2</sub> O	ad 1 000 ml

**BG agar:**

yeast extract	4 g
malt extract	10 g
glukóza	4 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
agar	12 g
dH <sub>2</sub> O	do 1 000 ml, pH 7,2

**DNA agar:**

agar	10g
trypton	10g
NaCl	5g
glukóza	1g
dH <sub>2</sub> O	do 1 000 ml

**B1 agar:**

Beef extract	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml, pH 7,2

## Materiál a metody

<b>R2YE agar:</b>		<b>Stopové prvky:</b>	
Sacharóza	103 g	ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g	FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	200 mg
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10,12 g	CuCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	10 mg
Glukóza	10 g	MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	10 mg
casamino acids	0,1 g	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> . 10 H <sub>2</sub> O	10 mg
Agar	20 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	10 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 800 ml, pH 7,2	dH <sub>2</sub> O	ad 1 000 ml
<i>Po sterilizaci přidat:</i>			
yeast extract (10%)	50 ml		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5%)	10 ml		
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (3,68 %)	80 ml		
L-prolin (20%)	15 ml		
TES (5,73%, pH 7,2)	100 ml		
stopové prvky	2 ml		
1M NaOH	5 ml		

### 3.1.4 Roztoky a pufry

**TE pufr:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

**TE<sup>-1</sup> pufr:** 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0

**TE<sup>-1</sup> RNAsa A:** TE<sup>-1</sup>; 20 µg/ml ribonukleáza A

**TAE pufr:** 40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,0

**10 x DNA vzorkový pufr:** 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 20 % glycerol; 0,002 % Bromphenol Blu; pH 8,0

**TES pufr:** 20 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA; 75 mM NaCl; pH 7,5

<b>T pufr:</b>		<b>P pufr :</b>	
sacharóza	25 ml	sacharóza	103 g
H <sub>2</sub> O	75 ml	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
stopové prvky (kap. 3.1.3.)	0,2 ml	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	2,02g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,5%)	1 ml	stopové prvky (kap. 3.1.3.)	2 ml
K 9,3 ml směsi přidat:		Doplňit H <sub>2</sub> O na 800ml	
CaCl <sub>2</sub>	0,2 ml	<i>Po sterilizaci k 50 ml přidat:</i>	
1M Tris/kyselina maleinová, pH 8,0	0,5 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5%)	1 ml
		CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (3,68%)	10 ml
		TES pufr (5,73%, pH 7,2)	10 ml



## Roztoky pro UPLC

**Roztok A:** 1 mM mravenčan amonný, upraveno NH<sub>3</sub> na pH 9,0.

**Roztok B:** acetonitril

## Izolace plazmidové DNA (miniprep)

**Roztok I:** 25 mM Tris.Cl; 50 mM glukóza; 10 mM EDTA; pH 8,0

**Roztok II:** 0,2 M NaOH; 1 %(w/v) SDS (připravovat vždy čerstvý)

**Roztok III:** 3M CH<sub>3</sub>COOK pH 4,8 (pH upraven ledovou kyselinou octovou)

### 3.1.5 Komerční soupravy

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

**Izolace DNA z agarózového gelu a PCR reakční směsi** - Wizard®SV Gel and PCR Clean –Up System (Promega)

**Standard molekulových hmotností pro DNA elektroforézu v agarózovém gelu:**

1kb PLUS DNA ladder (Gibco). Standard obsahuje 20 fragmentů od 100 bp do 12000 bp.

### 3.1.6 Enzymy a chemikálie

Enzym	Výrobce
Restrikční endonukleázy	New England Biolabs
DyNAzyme II DNA polymerase	Finnzymes
LA DNA Polymerases Mix	Top Bio

Použité chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty. Chemikálie pro UPLC byly kvality UPLC grade.

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 *E. coli***

#### **3.2.1.1 Kultivace *E. coli***

Buňky *E. coli* byly kultivovány v tekutých nebo na pevných médiích (LB, SOC) při 37 °C, nebo se kultivační teplota řídila vektorem, který buňky nesly. Tekuté kultury byly inkubovány na rotační třepačce při 200 RPM. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

#### **3.2.1.2 Příprava kompetentních buněk**

250 ml SOC média bylo zaočkováno na  $OD_{550}=0,01$  přes noc narostlou kulturou. Kultivace probíhala na rotační třepačce do dosažení  $OD_{550} = 0,4 - 0,6$ . Poté byla kultura chlazená 10 min v ledové lázni a buňky byly sklizeny centrifugací (10 min, 4 °C, 1500 g), promyty 10 % glycerolem za týchž podmínek a resuspendovány ve 100  $\mu$ l 10 % glycerolu. Suspenze buněk byla rozdělena na alikvoty a zamrazena při -70 °C, nebo přímo použita k transformaci.

#### **3.2.1.3 Transformace *E. coli* plazmidovou DNA elektroporací**

K 50  $\mu$ l čerstvě připravené suspenze kompetentních buněk bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA v objemu 2  $\mu$ l. Suspenze byla promíchána a inkubována 20 min v ledu. Poté byly buňky vystaveny pulzu elektrického napětí v ledově vychlazených 0,2 cm elektroporačních kyvetách v eletroporátoru BioRadGenePulser II nastaveném na 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F and 2,5 kV. Po něm byly ihned resuspendovány v 500  $\mu$ l LB média, 10 min chlazeny v ledu a poté kultivovány. Po ukončení kultivace byla kultura v různých ředěních vyseta na misky se selekční půdou obsahující příslušné antibiotikum.

### **3.2.2 *Streptomyces lincolnensis***

#### **3.2.2.1 Kultivace *Streptomyces lincolnensis***

Buňky *Streptomyces lincolnensis* byly kultivovány v tekutých nebo na pevných médiích (R2YE, MS, DNA, YT) při 28 – 30 °C. Tekuté kultury byly inkubovány na rotační třepačce při 230 RPM a byly zakládány v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml, které byly opatřeny vlisy pro zabránění tvorby shluků mycelia. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

### **3.2.2.2 Příprava spor *Streptomyces lincolnensis* [6]**

Přes noc narostlá kultura *Streptomyces lincolnensis* byla (á 1 ml) vyseta na misky s MS agarem o průměru 8 cm. Po pěti dnech byly spory sklizeny, a pomocí homogenizeru a vortexu resuspendovány v odpovídajícím množství sterilní destilované vody a suspenze byla zfiltrována přes sterilní vatový filtr. Spory byly ze suspenze odděleny centrifugací (4 000 g, 10 min, 20 °C) a resuspendovány ve 20 % glycerolu. Suspenze byla rozdělena na alikvoty, zmrazena v tekutém dusíku a uchována při – 70 °C.

### **3.2.2.3 Kultivace *Streptomyces lincolnensis* pro sledování produkce linkomycinu [6]**

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média spory ze šikmého agaru a kultivací na třepače po cca 30 hodin. 25 ml AVM média bylo zaočkováno 1 ml inokula. Kultivace probíhala na rotační třepače při 28°C a po pěti dnech byla kultura sklizena.

### **3.2.2.4 Příprava protoplastů *S. lincolnensis* [62]**

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média s 10 % sacharózou a 5 mM MgCl<sub>2</sub> spory ze šikmého agaru a inkubací na třepače ve 30 °C po 24 h. Poté byl 1 ml inokula přeočkován do čerstvého YEME média s 10 % sacharózou, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,5 % glycinem a kultura byla inkubována na třepače ve 28 °C po 16-17 hod. Buňky byly sklizeny centrifugací (10 min, 12 °C, 6000 g), dvakrát promyty 15-ti ml P pufru (3.1.4) za týchž podmínek a resuspendovány v 10 ml P pufru s lyzozymem (2 mg/ml). Suspenze buněk byla inkubována ve 30 °C s občasným promícháním. Tvorba protoplastů byla sledována mikroskopicky. Zbytky mycelia byly odstraněny centrifugací (10 min, 20 °C, 1 000 g). Protoplasty byly přefiltrovány přes sterilní vatový filtr, centrifugovány (10 min, 20 °C, 3000 g) a dvakrát promyty P pufrem za týchž podmínek. Nakonec byly sedimentované protoplasty resuspendovány ve 200 µl P pufru (3.1.4) a ihned použity pro transformaci.

### **3.2.2.5 Transformace protoplastů *S. lincolnensis* [6]**

500 ng v objemu 5 µl plazmidové DNA bylo smícháno s 5 µl 50 % sacharózy a ke směsi bylo přidáno 100 µl suspenze protoplastů. Po promíchání bylo k suspenzi přidáno 200 µl T pufru (3.1.4), suspenze protoplastů byla opět promíchána a ihned vyseta na R2YE agar. Po 16ti hodinách inkubace ve 30 °C byla na každá miska přelita 2 ml vodného roztoku odpovídajícího

antibiotika (zde kanamycinu o koncentraci 200 µg/ml R2YE agaru) a inkubována ve 30 °C po dalších 7-10 dnů.

### **3.2.2.6 Transformace *S. lincolnensis* plasmidovou DNA mezidruhovou konjugací s *E. coli***

Je známo, že řada druhů rodu *Streptomyces* má velmi účinné restriktivně modifikační systémy, a je proto nutné vnášený plazmid pasážovat přes nemethylující kmen *E. coli*. V případě *Streptomyces lincolnensis* se v literatuře nepodařilo najít informace o přítomnosti takových ochranných systémů, a proto bylo postupováno tak, jako by byly přítomny.

Kompetentní buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 (3.1.1) byly elektroporací transformovány kosmidem pLK-6 s genem *lmbX* zaměněným za inaktivační kazetu a selektovány na LB médiu s apramycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100 µg/ml). Jedna kolonie byla zaočkována do 10 ml LB média obsahujícího apramycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml) a kultivována přes noc. 100 µl přes noc narostlé kultury bylo přeočkováno do 10 ml čerstvého LB média obsahujícího apramycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml) a inkubováno na třepačce do dosažení  $OD_{600} = 0,4$  (cca 4 h). Antibiotika byla z kultury odstraněna dvojnásobným promytím buněk 10-ti ml LB média centrifugací (1000 g, 10 min, 20°C) a buňky byly poté resuspendovány v 1 ml LB média. K 10 µl sporové suspenze *Streptomyces lincolnensis* ( $10^8$  cfu) bylo přidáno 500 µl 2 × YT média (3.1.3) a spory byly podrobeny tepelnému šoku v 50 °C po dobu 10-ti min a ochlazeny na laboratorní teplotu. 0,5 ml suspenze buněk *E. coli* bylo smícháno s 0,5 ml sporové suspenze *Streptomyces lincolnensis* a centrifugováno (10 000 g, 5 s, 20 °C). Sediment byl resuspendován v 50 µl reziduálního média. Ze suspenze byla připravena ředící řada od  $10^{-1}$  to  $10^{-4}$  (suspenze byla ředěna sterilní destilovanou H<sub>2</sub>O). 100 µl každého ředění bylo vyseto na MS agar s 10 mM MgCl<sub>2</sub> bez selekce a inkubováno ve 30 °C. Po 16-20 h byla každá miska o průměru 8 cm rovnoměrně přelita 1 ml sterilní destilované H<sub>2</sub>O obsahující 0,5 mg kyseliny nalidixové a 1,25 mg apramycinu a dále inkubována ve 30 °C 3-5 dnů.

### **3.2.2.7 Test obnovení produkce linkomycinu v inaktivantech *Streptomyces lincolnensis* přidavkem PPL/MTL do kultivační půdy**

Obnovení produkce linkomycinu přidavkem meziproductů jeho biosyntézy bylo ověřováno biologickým testem. Linkomycin, produkováný po přidání chybějícího intermediátu, difunduje z agarového bločku, zabíjí citlivý organizmus (*Kocuria rhizophila*) a na misce je patrná inhibiční

## Materiál a metody

zóna. Bloček BG agaru (obsahující 200 µg/ml a 800 µg/ml PPL nebo MTL) o objemu 200 µl, vyrobený nalitím agaru do jamky mikrotitrační destičky, byl zaočkován sporama inaktivanta nebo typového kmene *Streptomyces lincolnensis*, který byl používán jako kontrolní. Destička byla inkubována ve 30 °C po deset dnů. Na misku o průměru 14,5 cm s B1 agarem bylo naneseno 1,6 ml suspenze buněk *Kocuria rhizophila* ve sterilním 150 mM NaCl (zákal mezi 0,5-1 McFarlandovy stupnice). Suspenze byla rozetřena po povrchu misky a zbytek odebrán pipetou. Agarový bloček s kulturou inaktivanta *S. lincolnensis* byl vyjmut z mikrotitrační destičky a přenesen na misku zaočkovanou *Kocuria rhizophila*. Miska byla inkubována ve 30 °C přes noc a inhibiční zóny byly dokumentovány naskenováním.

### 3.2.3 *Kocuria rhizophila*

#### 3.2.3.1 Kultivace *Kocuria rhizophila*

Buňky *Kocuria rhizophila* byly kultivovány na B1 agaru při 37 °C.

### 3.2.4 Práce s DNA

#### 3.2.4.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* alkalickou lyzí [63,64]

1 kolonie *E. coli* byla zaočkována do 5 ml LB média a inkubována na třepačce přes noc. Poté byly buňky sklizeny centrifugací (2 000 g, 4 °C, 10 min) a sediment byl resuspendován ve 100 µl Roztoku I.(3.1.4) Buňky byly lyzovány (a DNA a proteiny denaturovány) přidáním Roztoku II.(3.1.4) a suspenze byla promíchána převrácením. Směs byla ihned neutralizována přidáním 150 µl Roztoku III.(3.1.4) a promíchána převrácením. Při této rychlé neutralizaci ccc-forma plazmidové DNA rychle denaturuje a je dobře oddělitelná od chromozomální DNA, která precipituje spolu s proteiny a detergentem. Sraženina byla odstraněna centrifugací (5 min, 13 000 g, 20 °C). K supernatantu bylo přidáno 400 µl směsi chloroform/fenol (1:1) a po promíchání a 2 min inkubaci v laboratorní teplotě byla směs centrifugována (5 min, 13 000 g, 20 °C). Vodná fáze, která obsahovala plazmidovou DNA, byla přenesena do čisté mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 600 µl 2-propanolu a směs byla ponechána na ledu 10 min. Precipitovaná plazmidová DNA byla oddělena centrifugací (5 min, 13 000 g, 4 °C) a sediment byl promyt 200 µl 70% ethanolu za týchž podmínek. Sediment byl poté vysušen při laboratorní teplotě a resuspendován v 50 µl sterilní destilované vody.

### **3.2.4.2 Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli* pomocí komerční soupravy Wizard**

Pro přípravu plazmidové DNA určené pro skladování byla použita komerční souprava Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Princip metody je obdobný jako v předchozím případě, DNA však není po renaturaci precipitována alkoholem, nýbrž přečištěna vazbou na aktivované sklo v kolonce. Při používání soupravy bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

### **3.2.4.3 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz**

Při opracování DNA restrikčními endonukleázami bylo vždy postupováno podle pokynů výrobce. Pro přípravu inaktivační kazety byl celkový objem reakční směsi 300  $\mu$ l. Restrikční enzymy byly inaktivovány zahřátím reakční směsi na 65 °C .

### **3.2.4.4 Izolace genomové DNA ze streptomycétových kmenů fenolovou extrakcí [23]**

Buňky z 50 ml kultury byly sklizeny centrifugací (10 min, 4 °C, 2 600 g) a promyty 50 ml TE pufrem (3.1.4) za týchž podmínek. Sediment byl zvážen, 0,3 g buněk byly resuspendovány v 0,5 ml TES pufru a k suspenzi bylo přidán 25  $\mu$ l zásobního roztoku lyzozymu o koncentraci 20 mg/ml. Suspenze byla promíchána a inkubována ve 37 °C do začátku lyze (30-40 min), což se projevilo zvýšením hustoty suspenze. K lyzátu bylo přidáno 14  $\mu$ l zásobního roztoku proteinázy K o koncentraci 0,5 mg/ml a 60  $\mu$ l 10 % SDS a lyzát byl inkubován 2 h v 55 °C. Lyzát byl pak protřepán se stejným objemem směsi fenolu/chloroformu a izoamylalkoholu (24/24/1, pH 8,0), centrifugován (13 000 g, 5 min, 20 °C) a DNA, přítomná ve vodné fázi, byla převedena do čisté zkumavky. Tento krok byl jednou opakován. Poté byl k roztoku DNA přidán stejný objem chloroformu, směs byla protřepána, centrifugována (13 000 g, 5 min, 20 °C) a DNA, přítomná ve vodné fázi, byla převedena do čisté zkumavky. DNA byla pak precipitována přidáním 0,6 objemu 2-propanolu a 0,1 objemu 3 M octanu sodného, jehož pH bylo upraveno kyselinou octovou na 4,7. Precipitovaná DNA byla natočena na skleněné tyčinky, opláchnuta ethanolem, vysušena a rozpuštěna v TE pufru (3.1.4) při 4 °C.

### **3.2.4.5 DNA elektroforéza**

Elektroforetická separace DNA je založena na rozdílné pohyblivosti molekul DNA v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti, tvaru a flexibilitě. Elektroforetická separace DNA byla, podle velikosti analyzovaných molekul, prováděna v 1,0 % – 1,5 % agarózovém gelu v TAE pufru (3.1.4). Pro zviditelnění DNA pod UV lampou byla DNA barvena ethidiumbromidem, který byl přidáván do agarózy v konečné koncentraci 0,005 %. Před nanesením DNA byl ke vzorkům přidáván DNA vzorkový pufr (3.1.5) v poměru 1:9. Molekuly DNA byly separovány při konstantním napětí 3 - 5 V/cm.

### **3.2.4.6 Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu**

Po elektroforetické separaci byl proužek gelu obsahující požadovaný DNA fragment vyříznut a DNA byla izolována z agarózového gelu pomocí komerční soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (3.1.5) podle pokynů výrobce. Při izolaci je agaróza rozložena působením chloristanu sodného a uvolněná DNA je zachycena na kolonce obsahující aktivované sklo, promyta a následně eluována roztokem o nízké iontové síle nebo sterilní destilovanou H<sub>2</sub>O.

### **3.2.4.7 Polymerázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) byla prováděna v přístrojích T1 Thermocycler 96 (Biometra) a T GRADIENT Thermocycler (Biometra) v objemu 50 µl. Hybridizační teploty primerů ( $T_{ann}$ ) byly navrženy podle  $T_m$  vypočítané ze vzorce  $4*(G + C) + 2*(A + T)$  a ověřovány.

## **3.2.5 Stanovení linkomycinu ve fermentačním mediu**

### **3.2.5.1 Příprava vzorku – SPE**

Linkomycin je produkován do média, proto bylo médium od mycelia odděleno před vlastním stanovením centrifugací (4 000 g, 15 min, 4 °C). Poté bylo 10 ml média nanášeno na předem kondiciovanou (3 ml methanolu) a promytou (3 ml vody) SPE kolonu (SPE Oasis HLB, Waters). Soli a polární látky byly odstraněny promytím 3 ml vody a 3ml 10 % methanolu. Linkomycin byl eluován 80 % methanolem, vysušen a před analýzou rozpuštěn ve 100 µl methanolu.

### 3.2.5.2 Stanovení metodou UPLC

Linkomycin byl v produkčním médiu stanovován metodou UPLC, na kapalinovém chromatografu UPLC, systém Acquity s PDA detektorem 2996 (Waters). Data byla procesována softwarem Empower 2 (Waters).

Na analytickou kolonu BEH C<sub>18</sub> (50 × 2,1 mm I.D., průměr částic 1,7 μm) (Waters) temperovanou při teplotě 35 °C bylo dávkováno 5 μl vzorku. Analyt byl eluován dvousložkovou mobilní fází 1mM mravenčan amonný, pH 9 : acetonitril, 76:24 (v/v), při průtokové rychlosti 0,5 ml/min a detekován při vlnové délce  $\lambda = 194$  nm. Po každé analýze (2,5 min) byla kolona 1 min promývána 100 % acetonitrem a 1 min ekvilibrována mobilní fází.

K identifikaci linkomycinu byla použita metoda srovnávání retenčních časů se standardy a pro kvantifikaci linkomycinu byla sestrojena kalibrační křivka.

### 3.2.6 Metoda inaktivace genů lokalizovaných na chromozómu streptomycet (PCR targeting)

Pro inaktivaci genu *lmbX* byl použit systém **REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)** [65].

Metody inaktivace genů u streptomycet jsou často založeny na homologní rekombinaci, tj. výměně homogních úseků v procesu nazývaném dvojitý crossing-over, při které je gen, nebo jeho část, nahrazena inaktivační kazetou.

V systému REDIRECT je součástí inaktivační kazety (obr 3.1. I) gen kódující rezitenci k apramycinu, *oriT*, který umožňuje mobilizaci konstruktů, FRT sekvence, které jsou cílovým místem pro FLP rekombinázu a sekvence homologní k okolí inaktivovaného genu, které jsou vneseny do kazety v PCR reakci tak, že jsou součástí primerů (obr 3.1. I).

Strategií je v první fázi rekombinační výměna (obr 3.1. III) chromozomálního genu, klonovaného v kosmidu SuperCos1, za inaktivační kazetu. Rekombinace je usnadněna přítomností plazmidu pIJ790, nesoucímu geny (*gam*, *bet* a *exo*), jejichž proteinové produkty napomáhají homologní rekombinaci mezi okolím inaktivovaného genu a jeho homologní sekvencí vložené do inaktivační kazety. Tak vzniká kosmid s mutací v definované oblasti, v němž je inaktivovaný gen nahrazen inaktivační kazetou. Přítomnost *oriT* v inaktivační kazetě umožňuje přenos mutovaného kosmidu do streptomycet konjugací, za pomoci proteinových produktů genů, kódovaných plazmidem pUZ8002, který sám postrádá „*in cis*“ fungující lokus pro vlastní transfer. V buňce streptomycet pak dojde k homologní rekombinaci mezi okolím



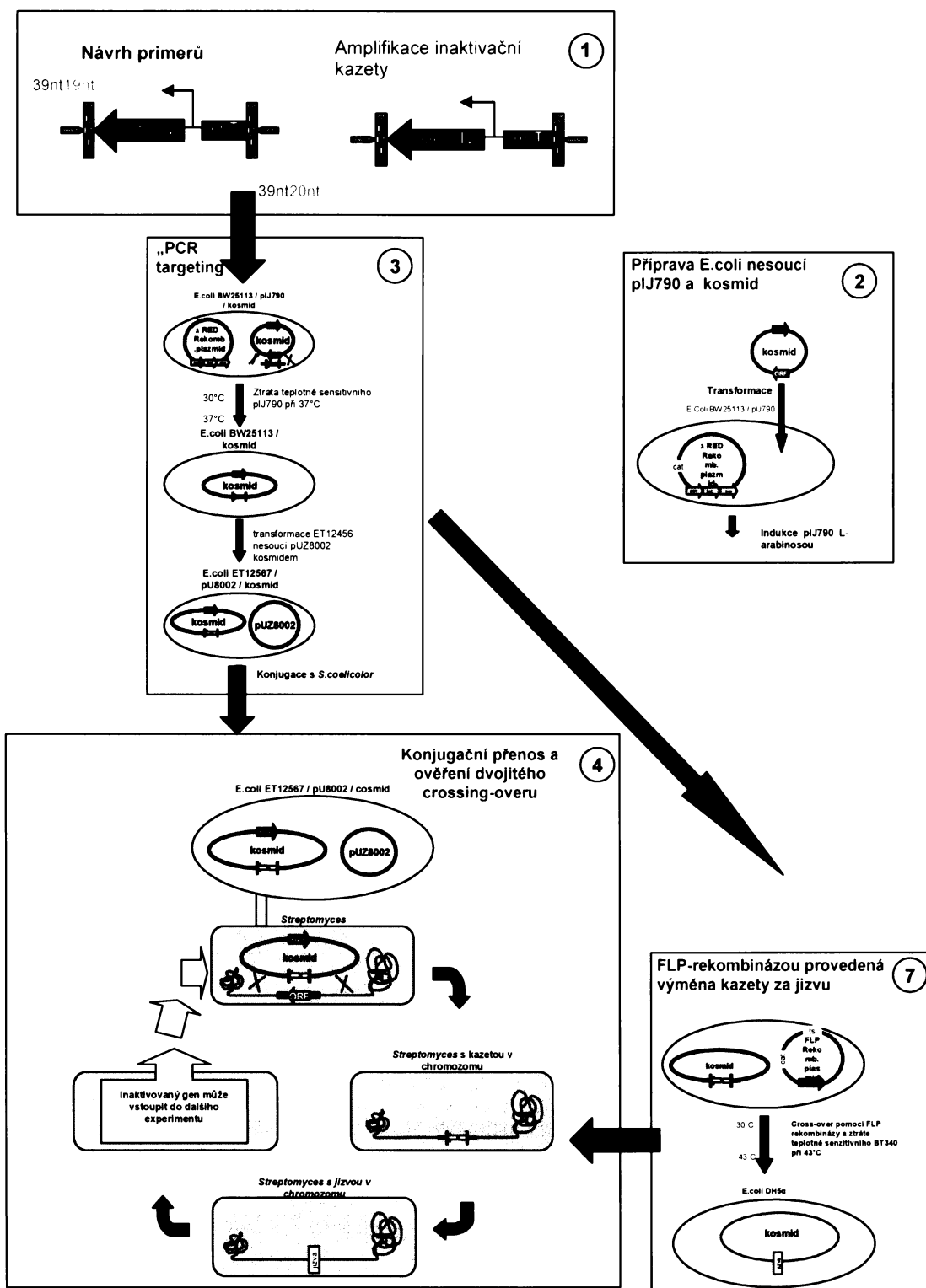
chromozomálního genu, který má být inaktivován, a homologní sekvencí, která je součástí inaktivační kazety. Takto je chromozomální gen nahrazen inaktivační kazetou (obr 3.1.. IV).

Ve druhé fázi je v mutovaném kosmidu kazeta nahrazena krátkou „in frame“ sekvencí, které nenese STOP kodon a označuje se jako „jizva“ (obr 3.1. V). K výměně kazety za „jizvu“ dochází činností FLP rekombinázy, kódované genem neseným na plazmidu pBT340. FLP rekombináza rozpoznává FRT sekvenci v inaktivační kazetě a odstraní centrální část inaktivační kazety. Na jejím místě zanechá 81 pb dlouhý úsek DNA – „jizvu“. Mutovaný kosmid s jizvou je pak vnesen do buněk streptomycetového kmene, který má již inaktivovaný gen nahrazen za inaktivační kazetu. Homologní rekombinací je inaktivační kazeta vyměněna za jizvu (obr 3.1. IV).

### 3.3 SOFTWARE

Sekvence shluku genů pro biosyntézu linkomycinu *S.lincolnensis* 78-11, uložená v databázi GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) pod přístupovým číslem X79146, byla analyzována pomocí programu BLAST – Basic Local Alignment Search Tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

Obr.3.1 Schema postupu inaktivace genů lokalizovaných na chromozomu streptomycet.



## 4 VÝSLEDKY

### CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jedním ze základních předpokladů přípravy hybridních antibiotik na bázi linkozamidů je detailní znalost příslušných biosyntetických drah. Znalost aminokyselinové větve biosyntetické dráhy linkomycinu je však dosud spíše útržkovitá. Cílem diplomové práce proto bylo :

1. inaktivovat jeden z vytypovaných genů linkomycinového biosyntetického shluku
2. chromatografickými a biologickými metodami analyzovat fenotypový projev mutace a potvrdit správnost předběžného přiřazení inaktivovaného genu k reakcím aminokyselinové větve dráhy

#### 4.1 INAKTIVACE GENU *lmbX*

K inaktivaci genu *lmbX* byl použit systém REDIRECT (kapitola 3.2.6) vyvinutý v John Innes Centre (Norwich, Velká Británie) pro inaktivaci genů lokalizovaných na chromozómu streptomycet.

##### 4.1.1 Příprava kazety

Inaktivační kazeta je v systému REDIRECT dodávána jako součást pIJ773. Použití pIJ773 jako templátu v PCR se nedoporučuje, protože stopy ccc formy pIJ773 soutěží při následné transformaci *E.coli*BW25113 s lineárním PCR produktem a zvyšuje se tak počet falešně pozitivních transformantů. Proto byla prvním krokem amplifikace pIJ773 v *E. coli* DH5 $\alpha$  a jeho izolace, přičemž se vycházelo z 30 ml kultury a podařilo se získat přibližně 4  $\mu$ g plazmidové DNA. Štěpením pIJ773 (4 334 bp) restrikčními enzymy *Eco*RI a *Hind*III byl získán fragment (2 938pb) představující zbytek vektoru a fragment (1 396 pb) obsahující kazetu (1 382 pb) a její krátké okolí (14 pb). Ten byl pak separován preparativní DNA elektroforézou v agarózovém gelu, z gelu izolován a uchován v TE<sup>-1</sup> pufru při -20 °C. Absence intaktního pIJ773 byla ověřena transformací 100 ng purifikovaného fragmentu do kompetentních buněk *E. coli*DH5 $\alpha$ . Na LB agaru s carbenicilinem (100  $\mu$ g/ml) nebyl zaznamenán nárůst transformant.

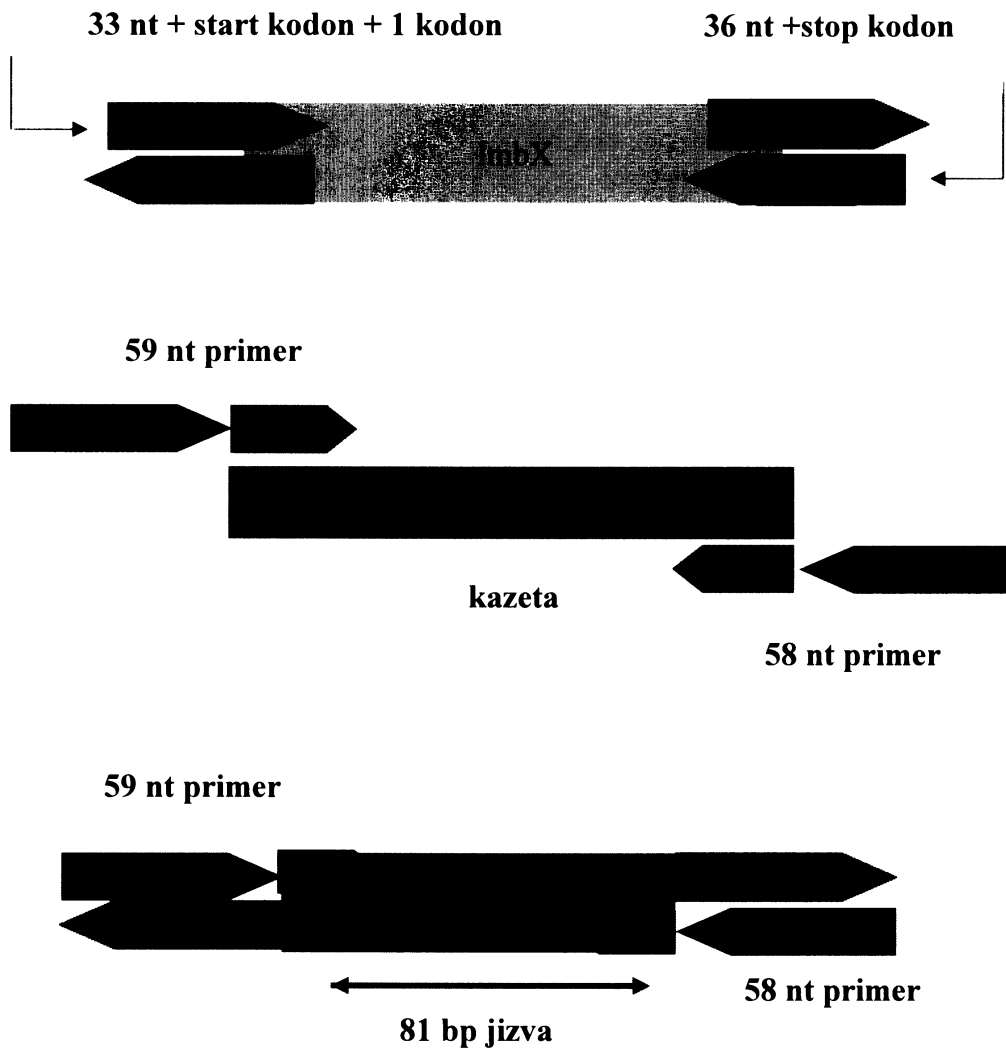
#### 4.1.2 Návrh primerů pro zavedení oblastní homologie

K zavedení oblastí homologie okolí genu *lmbX* do purifikované inaktivační kazety byla navržena dvojice primerů (obr.4.1, tab 4.3).

- **iXfor** má na svém 5'-konci 39 nt homologních k sekvenci okolí genu *lmbX* (z kódujícího řetězce) a na 3'-konci 20 nt homologní k levé části disruptční kazety. Start kodon genu *lmbX* se překrývá se stop kodonem genu *lmbY*. Sekvence primeru homologní k okolí genu *lmbX* nemá na 3'-konci start kodon *lmbX*, ale až kodon následující za ním. Tak při FLP rekombinázou indukované excizi rezistenčního markeru zůstane stop signál genu *lmbY* zachován.
- **iXrev** má na svém 5'-konci 39 nt homologních k sekvenci okolí genu *lmbX* (z antikódujícího řetězce) a na 3'-konci 19 nt homologní k pravé části disruptční kazety.

Aby se zabránilo rekombinaci v jiných než žádoucích částech kosmidu pLK6, byly sekvence 39 nt z okolí genu *lmbX* pomocí algoritmu BLAST porovnány se sekvencí linkomycinového genového shluku, vloženého v kosmidu pLK-6. Kromě perfektní shody s žádoucí sekvencí nebyla nalezena žádná shoda delší než 30 nt.

Obr.4.1. Návrh primerů pro zavedení oblastní homologie okolí genu *lmbX* do inaktivační kazety.



Tab 4.3. : Sekvence inaktivačních primerů. Červenou barvou jsou označeny start a stop kodony, zelenou barvou jsou označeny sekvence FRT včleněné do disruptční kazety a černou barvou oblast, jež je plně homologí s templátovou DNA

<b>Primer</b> <i>iXf</i>	5'-CGCGCCCATCCTGCACAGCGCACCCGGAGGAAGCATGATC ATTCCGGGGATCCGTTCGACC-3'
<b>Primer</b> <i>iXr</i>	3'-GAGAAAAGAGCCGCTGACGCAAGGGGCCCTCGGCGACT ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-5'

### 4.1.3 Vnesení oblastní homologie do inaktivační kazety

Inaktivační kazeta byla PCR amplifikována s použitím primerů pro vnesení oblastní homologie (iXf a iXr) a pLK6, nesoucího linkomycinový genový shluk, jako templátu. Optimální podmínky PCR reakce byly následující:

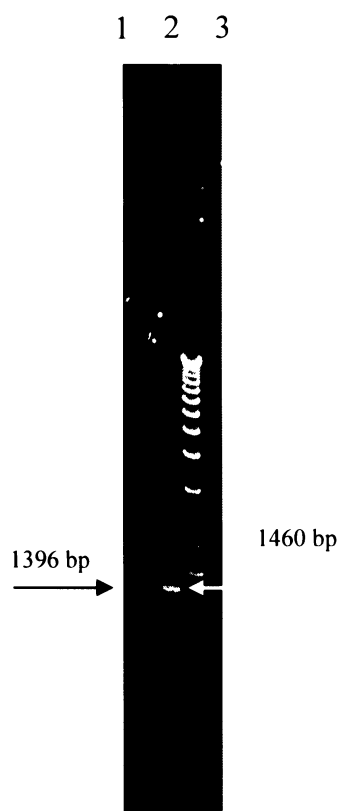
**Tab.4.4a. Složení PCR reakční směs pro amplifikaci**

DNA (50 ng)	8,6 $\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l iXf	0,5 $\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l iXr	0,5 $\mu$ l
10 x Dynazyme II buffer	5 $\mu$ l
10 mM dNTP	1 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
Dynazyme II (2U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	30,9 $\mu$ l
celkový objem reakce	50 $\mu$ l

**Tab.4.4b. Podmínky PCR reakce**

denaturace	94 °C	2 min	} 10 cyklů
„horký start“	68 °C		
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	50°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	55°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	55°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	} 15 cyklů
závěrečná syntéza	72 °C	5 min	

Výsledek PCR byl analyzován DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Produktem reakce byl jediný DNA fragment o délce 1 460 bp, což odpovídá délce inaktivační kazety prodloužené o délku sekvence homologní s okolím genu *lmbX*, která byla vnesena jako součást primerů (tab. 4.3). Produkt PCR byl po separaci vyříznut z gelu a purifikován pomocí kitu WIZARD SW GEL AND PCR Clean-Up System ( Promega).



**Obr.4.2. Ověření prodloužení inaktivační kazety pomocí PCR.**  
DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Naneseno 4  $\mu$ l PCR reakční směsi.

- 1) kontrola: EcoRI/HindII fragment pIJ773 nesoucí kazetu
- 2) PCR produkt, kazeta s okolím *lmbX*
- 3) standard molekulové váhy

#### 4.1.4 Integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za *lmbX*.

K integraci inaktivační kazety do pLK6 výměnou za inaktivovaný gen dochází v buňkách *E. coli* BW25113 za pomoci proteinových produktů genů nesených pIJ790. Proto byly buňky *E. coli* BW25113/pIJ790 nejprve transformovány intaktním pLK6. Pro transformaci zvolena metoda elektroporace, která svou účinností nejlépe vyhovovala potřebě vnést kosmid této velikosti do recipientních buněk. Transformanty *E. coli* BW 25113/pIJ790/pLK6 byly selektovány na LB agaru s chloramfenikolem (25 µg/ml), kanamycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100µg/ml).

Transformanty *E. coli* BW 25113/pIJ790/pLK6, byly připraveny ve stavu kompetence, elektroporací transformovány inaktivační kazetou (purifikovaný produkt PCR z kap. 4.2.3) a selektovány na LB agaru s apramycinem (50 µg/ml), kanamycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100 µg/ml). Po 16 hodinách inkubace ve 37 °C bylo takto získáno 15 transformant *E. coli* BW 25113/pIJ790/pLK6ΔX, jejichž kolonie se lišily velikostí. Pro další testování byly vybrány 4 transformanty, jejichž kolonie byly největší. Při používání systému REDIRECT totiž obecně platí, že čím větší je kolonie, tím více kopií mutovaného kosmidu s inaktivovaným genem vyměněným za inaktivační kazetu nese. Nejmenší kolonie bývají obvykle falešně pozitivní. Z těchto transformantů byla izolována plazmidová DNA metodou alkalické lyze.

#### 4.1.5 Ověření integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za *lmbX*

Pro ověření integrace kazety do pLK6 výměnou za *lmbX* byla navržena dvojice primerů.

Primery (tab.4.5) byly navrženy na základě sekvence nacházející se ve vzdálenosti cca 100 pb od oblasti ovlivněné homologii rekombinací.

Tab.4.5. Sekvence ověřovacích primerů

Primer	Sekvence
chX f	3'-TCCTGCCGGCTGCCGTATCG- 5'
chX r	5'-TTCGTCGTCCACTGGCCCCG- 3'

Tab.4.6. Teoretická délka PCR produktů pro testování přítomnosti intaktního *lmbX*, kazety a jizvy v pLK6 a chromozómu

Útvar přítomný v příslušném genoforu	Délka [pb]
<i>lmbX</i>	1 088
kazeta	1 572
jizva	278

## Výsledky

Ověření bylo provedeno pomocí PCR, jejíž optimální podmínky jsou uvedeny v tab. 4.7.b a teoretické délky očekávaných PCR produktů jsou uvedeny v tab.4.6.

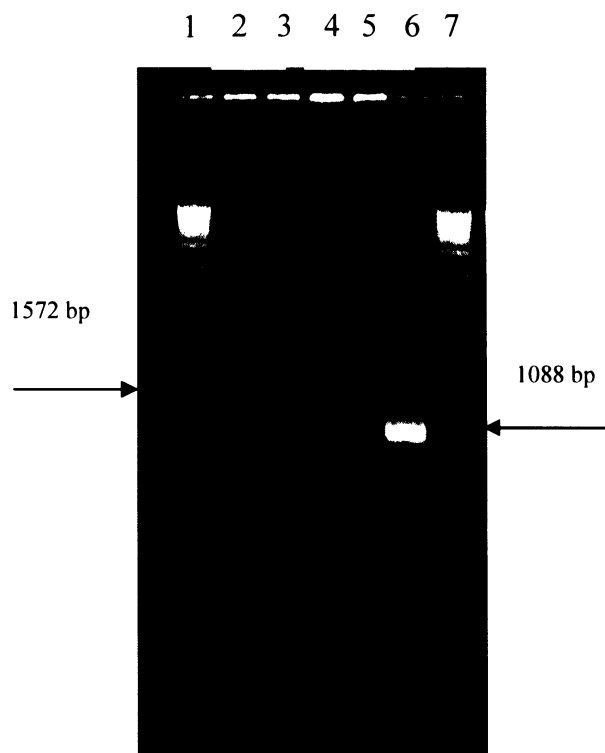
**Tab. 4.7a. Složení PCR reakční směsi pro ověření integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za *lmbX***

DNA (50 ng)	2µl
10 pmol/µl chXf	5µl
10 pmol/µl chXr	5µl
10 x Dynazyme II buffer	5µl
10 mM dNTP	1µl
DMSO	2.5µl
Dynazyme II (2U/µl)	1µl
dH <sub>2</sub> O	28,5µ
celkový objem reakce	50µl

**Tab.4.7b. Podmínky PCR reakce**

denaturace	94 °C	2 min	} 30 cyklů
„horký start“	65 °C		
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	58°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
závěrečná syntéza	72 °C	5 min	

Výsledek PCR byl analyzován DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Produktem reakce byl, v případě všech 4 testovaných kosmidových klonů, DNA fragment o délce 1572 bp (tab.4.6), což odpovídá situaci po integraci inaktivační kazety do pLK6 výměnou za *lmbX* (obr 4.3). Klony byly označeny pLK6ΔX2,4,6,8. Produktem kontrolní PCR, provedené s použitím intaktního pLK6 jako templátu, byl fragment o délce 1 088 pb (tab.4.6).



**Obr.4.3. Ověření integrace inaktivační kazety do pLK6 výměnou za *lmbX*. DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Naneseno 5µl PCR reakční směsi.**

- 1) standard molekulové váhy
- 2) pLK6ΔX- klon 2
- 3) pLK6ΔX- klon 4
- 4) pLK6ΔX- klon 6
- 5) pLK6ΔX- klon 8
- 6) pLK6
- 7) standard molekulové váhy



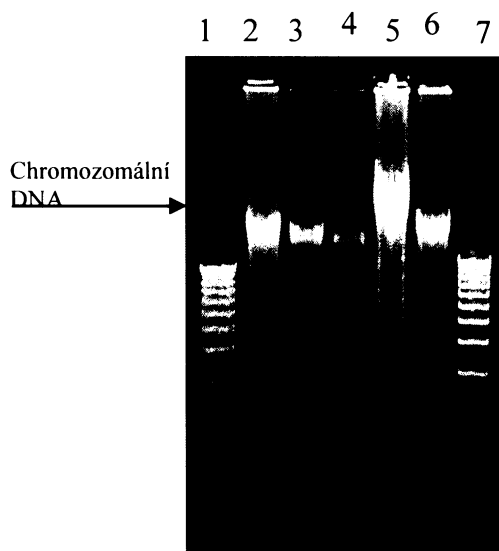
#### 4.1.7 Integrace inaktivační kazety do chromozómu *S. lincolnensis* DSM 40355 výměnou za *lmbX*

pLK6ΔX byl elektoporací vnesen do *E. coli* ET12567/pUZ8002 a transformanty *E. coli*ET12567/pUZ8002/pLK6ΔX byly selektovány na LB agaru s apramycinem (50 μg/ml) a karbenicilinem (100μg/ml).

Poté byl pLK6ΔX mezidruhovou konjugací přenesen do *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 a transkonjuganty *Streptomyces lincolnensis* DSM40355/pLK6ΔX byly selektovány přelítím MS agaru 1 ml sterilního vodného roztoku kyseliny nalidixové (500 μg/ml) a apramycinu (1 250 μg/ml). Po 6 dnech inkubace bylo získáno 30 transkonjugant *Streptomyces lincolnensis* DSM40355/ pLK6ΔX. Ty byly přeočkovány na DNA agar s kyselinou nalidixovou (25 μg/ml), apramycinem (50 μg/ml) a s/bez kanamycinu (50 μg/ml). 4 z těchto 30 klonů byly apramycin rezistentní a kanamycin senzitivní; v nich došlo k výměně chromozomálního genu *lmbX* za inaktivační kazetu. Klony byly označeny *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX 3,17,18 a 25.

#### 4.1.8 Ověření integrace inaktivační kazety do chromozómu *S. lincolnensis* DSM 40355 výměnou za *lmbX*

Pro ověření přítomnosti mutace v chromozómu byla z apramycin rezistentních a kanamycin senzitivních transkonjugant *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX 3,17,18 a 25 izolována chromozomální DNA (obr 4.4) a použita jako templát v PCR provedené s ověřovacími primery chXf a chXr (tab.4.5 ).



**Obr.4.4. Ověření kvality izolované chromozomální DNA elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu.**

1. standard molekulové váhy
2. *S. lincolnensis* DSM 40355
3. *S. lincolnensis* DSM 40355 ΔX3
4. *S. lincolnensis* DSM 40355 ΔX17
5. *S. lincolnensis* DSM 40355 ΔX18
6. *S. lincolnensis* DSM 40355 ΔX25
7. standard molekulové váhy

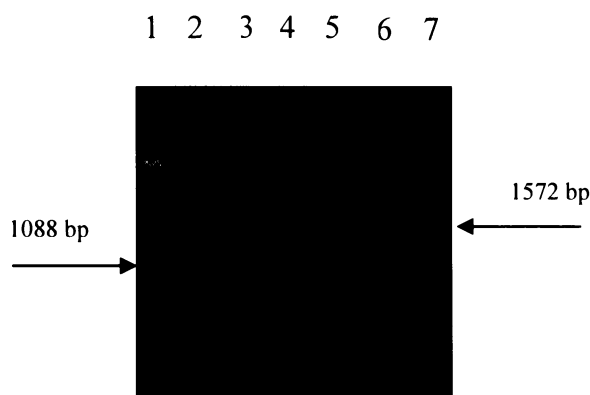
**Tab. 4.8a. Složení PCR směsi pro ověření integrace inaktivační kazety do chromozómu výměnou za *lmbX***

DNA (cca 200 ng)	2µl
10 pmol/µl chXf	5µl
10 pmol/µl chXr	5µl
10 x Dynazyme II Buffer	5µl
10 mM dNTP	1µl
DMSO	2.5µl
Dynazyme II 2U/µl	1µl
dH <sub>2</sub> O	28,5µl
celkový objem reakce	50µl

**Tab. 4.8b. Podmínky PCR:**

denaturace	94 °C	2 min	} 30 cyklů
„horký start“	65 °C		
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	58°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
závěrečná syntéza	72 °C	5 min	

Výsledek PCR byl analyzován DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Produktem reakce byl, v případě všech testovaných klonů, jediný DNA fragment o délce 1 572 bp, což odpovídá situaci po integraci inaktivační kazety do chromozomální DNA výměnou za *lmbX* (obr 4.5). Produktem kontrolní PCR, provedené s použitím chromozomální DNA typového kmene *S. lincolnsis* DSM40355 jako templátu, byl jediný fragment o délce 1 088 pb (tab.4.6).



**Obr. 4.5. Ověření integrace inaktivační kazety do chromozómu *S. lincolnsis*. výměnou za *lmbX*. DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Naneseno 5µl PCR reakční směsi.**

1. Standard molekulové váhy
2. *S. lincolnsis* DSM 40355
3. *S. lincolnsis* DSM 40355
4. *S. lincolnsis* DSM 40355 ΔX3
5. *S. lincolnsis* DSM 40355 ΔX17
6. *S. lincolnsis* DSM 40355 ΔX18
7. *S. lincolnsis* DSM 40355 ΔX25

#### 4.1.9 Vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX

pLK6ΔX byl elektroporací vnesen do *E.coli*DH5α/pBT340 a transformanty byly selektovány na LB agaru s apramycinem (50 µg/ml) a chloramfenikolem (25 µg/ml). Takto bylo získáno 20 transformant.

Po roztěru LB agar a eliminaci pBT340 kultivací ve 42°C byly transformanty *E.coli*DH5α/pBT340/pLK6ΔX testovány na senzitivitu k apramycinu (50µg/ml) a kanamycinu

## Výsledky

(50 µg/ml). Byly získány 4 klony senzitivní k apramycinu a rezistentní ke kanamycinu a odpovídající kosmidy byly označeny jako pLK6jΔX2,4,7a 10.

### 4.1.10 Ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX

U klonů senzitivních k apramycinu a rezistentních ke kanamycinu (pLK6jΔX2,4,7 a 10 z kap 4.1.9), došlo činností FLP rekombinázy k vystřížení střední části kazety, ležící mezi FRT rozpoznávacími místy a z původní inaktivační kazety, zbývá úsek 81 bp, tzv. jizva. Ověření tohoto procesu bylo provedeno pomocí PCR. Kosmidová DNA nebyla z buněk izolována, ale PCR byla provedena přímo na koloniích *E.coli*DH5α/pLK6jΔX2,4,7a10 a její optimální podmínky byly následující:

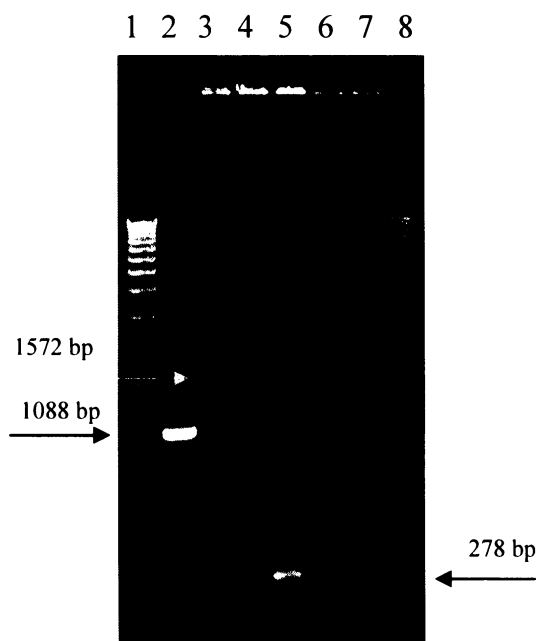
**Tab. 4.9a. Složení PCR reakční směs pro ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX**

templát	1 kolonie
10 pmol/µl chXf	5 µl
10 pmol/µl chXr	5 µl
10 x Dynazyme II buffer	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
DMSO	2.5 µl
Dynazyme II (2U/µl)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	28,5 µl
celkový objem reakce	50 µl

**Tab. 4.9b. Podmínky PCR**

denaturace	94 °C	2 min	} 30 cyklů
„horký start“	65 °C		
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	58°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
závěrečná syntéza	72 °C	5 min	

Výsledek PCR byl analyzován DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Produktem reakce byl, v případě všech 4 testovaných klonů, jediný DNA fragment o délce 278 bp, což odpovídá situaci po vystřížení střední části inaktivační kazety (obr 4.5).



**Obr. 4.5. Ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX. DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Naneseno 5 µl PCR reakční směsi.**

1. standard molekulové váhy
2. pLK6
3. pLK6ΔX
4. pLK6jΔX- klon 2
5. pLK6jΔX- klon 4
6. pLK6jΔX- klon 7
7. pLK6jΔX- klon 10
8. standard molekulové váhy

#### 4.1.11 Vyštěpení inaktivační kazety z chromozómu *S. lincolnensis* DSM 40355ΔX

Protoplasty *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX byly transformovány kosmidem pLK6jΔX a transformanty byly selektovány přelilitím R2YE agaru 1 ml vodného roztoku kanamycinu (200 μg/ml). Bylo získáno 10 klonů *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX /pLK6jΔX.

Transformanty *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX/pLK6jΔX byly po roztěru na jednotlivé kolonie (na MS agaru) testovány na senzitivitu k apramycinu (50μg/ml) a kanamycinu (50μg/ml) a byly získány 4 klony senzitivní k apramycinu i ke kanamycinu. Klony byly označeny *Streptomyces lincolnensis* DSM40355jΔX1,2,3,4.

#### 4.1.12 Ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX z chromozomu *S. lincolnensis* DSM 40355

U klonů senzitivních k apramycinu i kanamycinu (*Streptomyces lincolnensis* DSM40355jΔX1,2,3,4, kap. 4.1.11), homologní rekombinací došlo k výměně chromozomální kopie inaktivační kazety za úsek zkrácený činností FLP rekombinázy z pLK6jΔX.

Ověření tohoto procesu bylo provedeno pomocí PCR. Chromozomální DNA nebyla z buněk izolována, ale PCR byla provedena přímo na sporách *Streptomyces lincolnensis* DSM40355jΔX, setřených z povrchu kolonií vatovým tamponem a její optimální podmínky byly následující:

**Tab. 4.10a. Složení PCR reakční směs pro ověření vyštěpení inaktivační kazety z pLK6ΔX:**

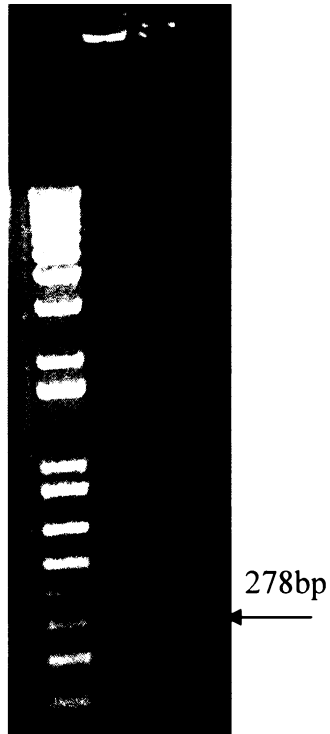
templát	spory
10 pmol/μl chXf	5μl
10 pmol/μl chXr	5μl
10 x Dynazyme II buffer	5μl
10 mM dNTP	1μl
DMSO	2.5μl
Dynazyme II( 2U/μl)	1μl
dH <sub>2</sub> O	28,5μ
elkový objem reakce	50μl

**Tab. 4.10b. Podmínky PCR**

denaturace	94 °C	2 min	} 30 cyklů
„horký start“	65 °C		
denaturace	94°C	45 s	
hybridizace	58°C	45 s	
syntéza	72 °C	90 s	
závěrečná syntéza	72 °C	5 min	

## Výsledky

Výsledek PCR byl analyzován elektroforézou v agarózovém gelu. Produktem reakce byl, u dvou testovaných klonů jediný DNA fragment o délce 278 bp (tab.4.6), což odpovídá situaci po vystřížení střední části inaktivační kazety (obr 4.1). Byly tedy získány 2 pozitivní klony, mající gen *lmbX* nahrazen jizvou o délce 81 pb, u ostatních se PCR nezdařila (obr 4.6).



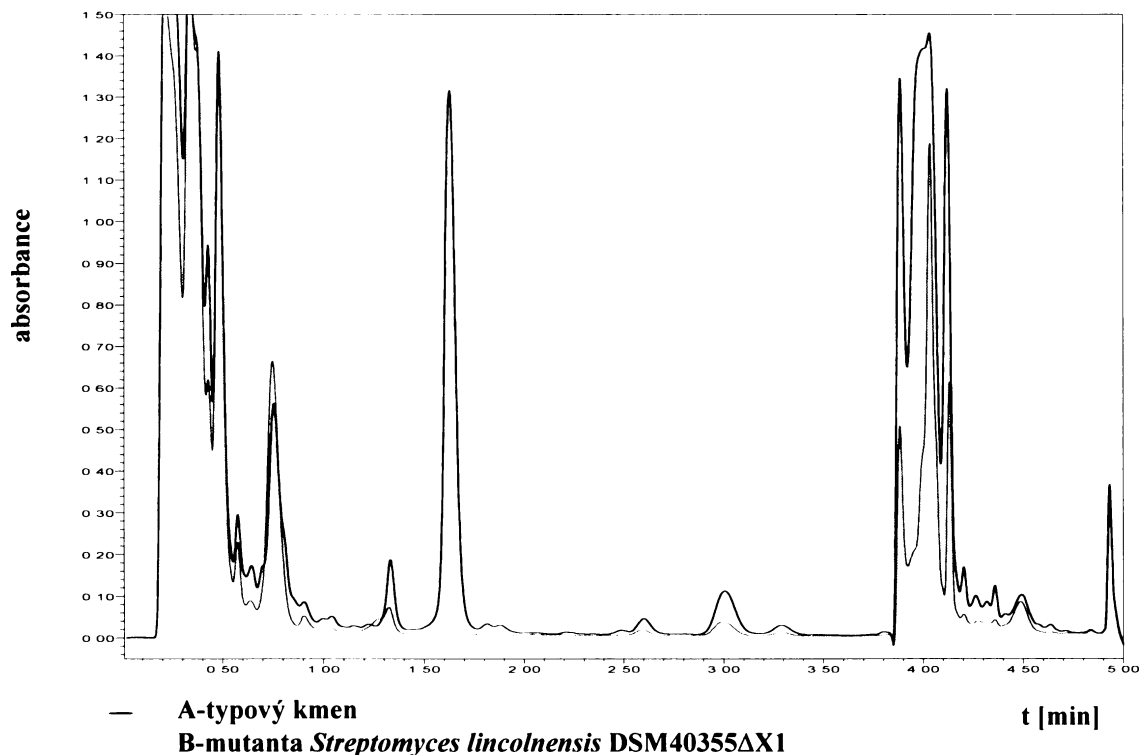
**Obr.4.6. Ověření vyštěpení inaktivační kazety z chromozomu *S.lincolnensis* DSM 40355. DNA elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Naneseno 5 $\mu$ l PCR reakční směsi.**

1. standard molekulové váhy
2. pLK6j $\Delta$ X- klon 1
3. pLK6j $\Delta$ X- klon 2

## 4.2 ANALÝZA PRODUKČNÍCH VLASTNOSTÍ PRODUKČNÍHO KMENE *S. lincolnensis* DSM 40355 *lmbX*

### 4.2.1 Stanovení produkce linkomycinu metodou UPLC

Linkomycin byl stanovován ve fermentačních médiích kultur *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 a *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X1 metodou UPLC s UV detekcí po předchozím přečištění a zakoncentrování extrakcí na pevné fázi (SPE). Měření bylo prováděno v triplicátech. Při analýze frakce média z kultury *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 byl v chromatogramu (obr.4.7A) přítomen pík s retenčním časem 1,6 min, který odpovídal retenčnímu času standardu linkomycinu za daných podmínek. UV spektrum daného píku bylo porovnáno s knihovnou spekter a rovněž odpovídá spektru standardu linkomycinu. Koncentrace linkomycinu byla stanovena 50  $\mu$ g/ml fermentačního média, což je hodnota, které je v případě tohoto typového kmene za stejných kultivačních podmínek obvykle dosahováno. Při analýze frakce média z kultury *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X1 nebyl linkomycin nalezen (obr.4.7B). Protože růst obou kultur, měřený stanovením sušiny, byl přibližně stejný, lze konstatovat, že mutnatní kmen linkomycin neprodukoval.



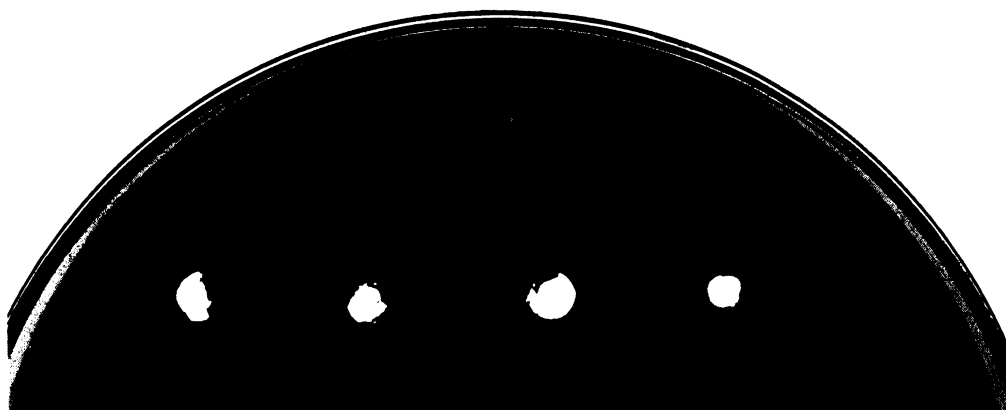
**Obr 4.7 A,B. Srovnání produkce linkomycinu v kulturách typového kmene a kmene s inaktivovaným genem *lmbX*. Chromatografická kolona BEH  $C_{18}$  (50 x 2,1 mm, I.D., 1,7  $\mu$ m) (Waters), 35 °C, dávkováno 5  $\mu$ l vzorku. Mobilní fáze 1 mM mravenčan amonný, pH 9: acetonitril, 76:24 (v/v), 0,5 ml/min, detekce 194 nm.**

#### 4.2.2 Biologický test obnovení produkce linkomycinu po obohacení média PPL nebo MTL

Obnovení produkce linkomycinu u neprodukujícího kmene *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X1 obohacením média o PPL nebo MTL bylo zjišťováno biologickým testem. Jako linkomycin senzitivní organizmus byl používán kmen *Kocuria rhizophila*CCM552.

Bločky BG agaru a bločky BG agaru s přídavkem PPL nebo MTL, na nichž byl kultivován *Streptomyces lincolnensis*, byly po 8 dnech inkubace ve 28°C přeneseny na misky s B1 agarem, na němž byl zaočkován linkomycin senzitivní organizmus a dále inkubovány ve 30°C přes noc. Produkce linkomycinu, který difundoval z bloček do B1 agaru, se projevila jako inhibiční zóny v nárůstu senzitivního organismu. Bločky byly testovány vždy v pěticích.

V okolí 4 bloček BG agaru s přídavkem PPL byly pozorovány výrazné inhibiční zóny o průměru 1,8; 2,1; 1,5 a 2,5 cm (obr.4.8). V okolí pátého bločku inhibiční zóna patrna nebyla, nejspíše proto, že růst *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X1 byl zde minimální. Zdá se tedy, že obohacení BG agaru PPL vedlo k obnovení produkce linkomycinu v neprodukčním mutantním kmeni *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X1.

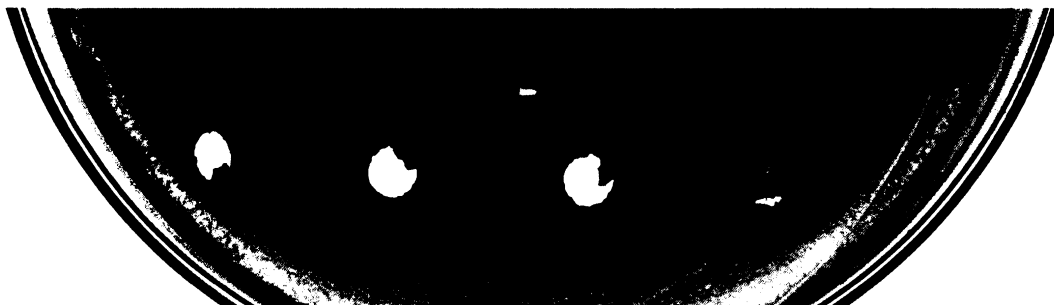


**Obr.4.8. Inhibiční zóny *Kocuria rhizophila* v okolí bloček BG agaru s přídavkem PPL(200  $\mu$ g/ml) na nichž byl kultivován *S. lincolnensis*  $\Delta$ X1.**

V okolí všech 5 testovaných bloček BG agaru s přídavkem MTL inhibiční zóny pozorovány nebyly. Zdá se tedy, že obohacení BG agaru MTL k obnovení produkce

## Výsledky

linkomycinu v neprodukčním mutantním kmeni *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX1 nevedlo (obr 4.9).



**Obr.4.9. Inhibiční zóny *Kocuria rhizophila* v okolí bločků BG agaru s MTL(200 µg/ml) na nichž byl kultivován *S. lincolnensis*ΔX1.**

V okolí všech 5 testovaných bločků BG agaru, které sloužily jako negativní kontrola, inhibiční zóny pozorovány nebyly (obr 4.10).

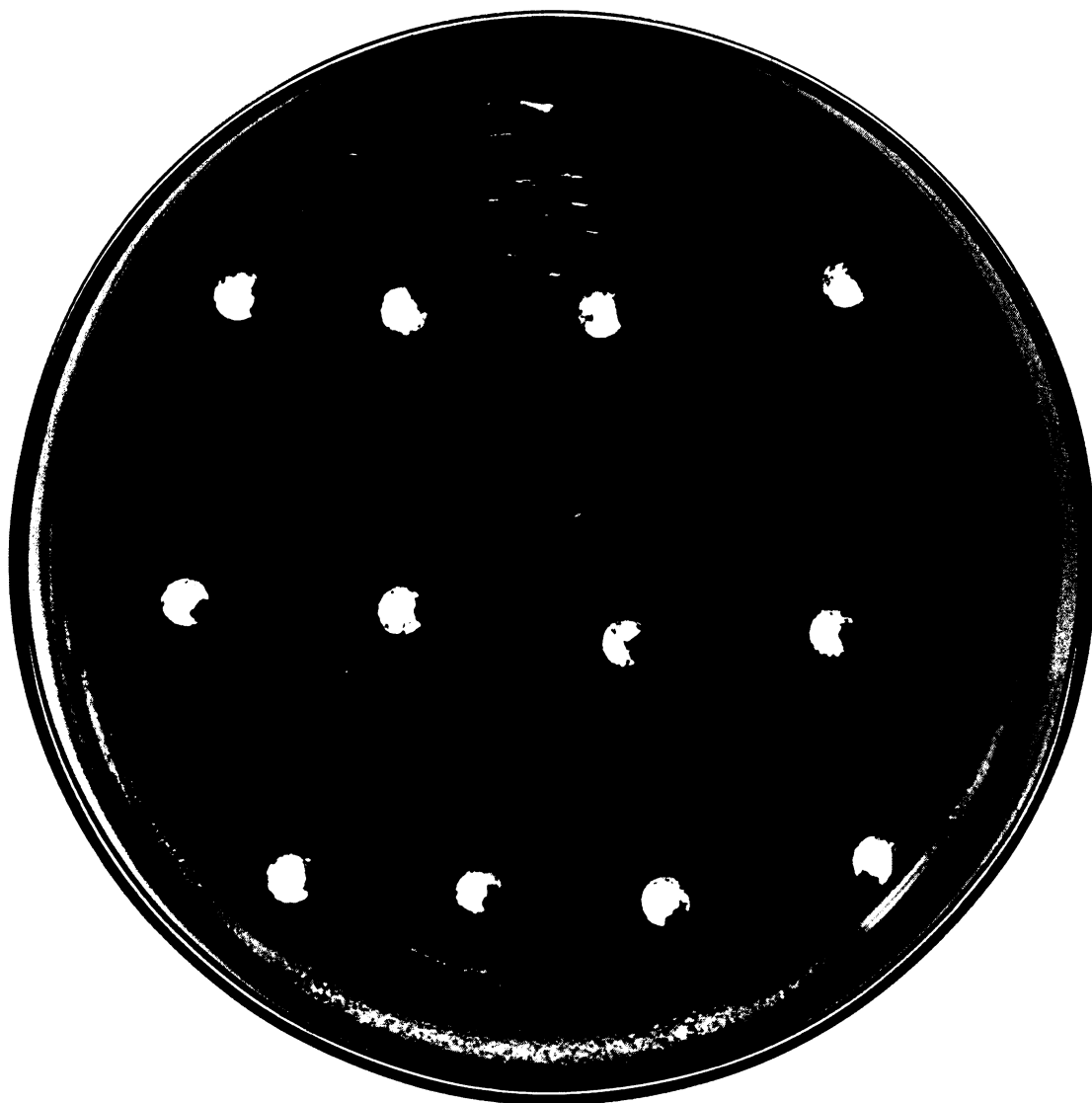


**Obr.4.10. Inhibiční zóny *Kocuria rhizophila* v okolí bločků BG agar, u na nichž byl kultivován *S. lincolnensis*ΔX1.**



## Výsledky

Jako pozitivní kontrola byl užíván typový kmen *Streptomyces lincolnensis* DSM40355. Inhibiční zóny (průměr 2 cm) (obr 4.11.II) *Kocuria rhizophila* byly pozorovány v okolí všech bloček BG agarů s rostoucím kontrolním kmenem. Průměr inhibičních zón v okolí všech bloček BG agarů s přidavkem PPL (2,4; 2,6; 2,5; 2,3). Obr. 4.11.I nebo MTL (2,3; 2; 2,3; 2,1), obr.4.11. III byl větší. Zdá se, že přidavek PPL nebo MTL mírně zvyšuje produkci linkomycinu u kontrolního kmene.



**Obr.4.11. Inhibiční zóny *Kocuria rhizophila* v okolí bloček BG agarů s PPL(200 µg/ml),řada I.,MTL(200 µg/ml), řada III av okolí BG agarů,řada II., na nichž byl kultivován kontrolní typový kmen *S. lincolnensis* DSM40355.**

## 5 DISKUZE

V posledních desetiletích se infekční choroby opět stávají závažným problémem. Nejenže se objevují infekční choroby nové, ale díky nadměrnému a často nesprávnému používání antibiotik v klinické praxi se rychle šíří odolnost patogenů vůči těmto látkám. Objevují se dokonce multirezistentní patogenní kmeny, proti nimž v současnosti účinná látka neexistuje. U některých pacientů byla navíc pozorována vůči určitým antibiotikům nesnášenlivost. Poptávka po nových účinných látkách proto neklesá.

Linkozamidy jsou potenciálním zdrojem nových látek s antibakteriálními a antimalarickými účinky. Například deriváty odvozené od linkomycinu, klindamycinu a *N*-demethylklindamycinu nahrazením propylového řetězce v poloze 4' jeho aminokyselinové subjednotky za delší, jsou výrazně účinnější než původní látky [19]. Používání derivátů linkozamidů však značně omezuje nákladnost jejich chemické syntézy. Jinou cestou jak připravit nové deriváty jsou cílené zásahy genomu producenta, případně kombinace linkozamidových biosyntetických genů s geny jiných drah. Tento postup však vyžaduje detailní znalost odpovídající biosyntetické dráhy a znalost biosyntetické dráhy linkomycinu je dosud spíše útržkovitá. Tato diplomová práce byla součástí výzkumného projektu, jež byl zacílen na detailní poznání biosyntetické dráhy linkozamidů a pyrrolo[1,4]benzodiazepinových antibiotik a měla přispět k pochopení aminokyselinové větve biosyntetické dráhy linkomycinu.

Podle studie založené na základě značení stabilními izotopy [69,45], by větev linkomycinové biosyntetické dráhy vedoucí k PPL, (obr.2.6) mohla zahrnovat následující sekvenci reakcí: hydroxylaci tyrosinu na DOPA, extradiolové štěpení aromatického kruhu DOPA a cyklizaci produktu štěpení, odštěpení dvou uhlíkových atomů z postranního alifatického řetězce produktu cyklizace, methylaci postranního alifatického řetězce a dvojnásobnou redukci na konečný produkt.

Ačkoli byl genový shluk řídící biosyntézu linkomycinu osekvenován [50], přiřazení jednotlivých genů shluku k odpovídajícím reakcím biosyntézy PPL nebylo snadným úkolem. Zatímco řada genů shluku vykazuje podobnost ke známým proteinovým rodinám metabolismu cukrů, a je tedy poměrně snadno začlenitelná do navrženého schématu biosyntézy MTL, geny operující v aminokyselinové části biosyntézy linkomycinu z velké většiny žádnou statisticky významnou podobnost ke známým proteinovým rodinám

nevykazují. Proto byly doposud na základě experimentálních dat úplně, gen enzym, substrát, popsány pouze první dvě reakce [47,58], katalyzované proteinovými produkty genů *lmbB1* a *lmbB2*. Více informací přineslo až osekvenování genového shluku pro biosyntézu anthramycinu, který s linkomycinem sdílí část biosyntetické dráhy vedoucí k PPL. Srovnávací sekvenční analýza obou biosyntetických shluků odhalila skupinu genů, která má vzájemně homologní zástupce v obou zmíněných genových shlucích. V případě linkomycinového genového shluku jde o geny *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbW*, *lmbX* a *lmbY*, což je vzhledem k jejich umístění ve shluku v rozporu s Chungovou představou, že geny řídící biosyntézu PPL jsou lokalizovány pouze v části shluku proximálně od genu *lmrA* [52]. Geny *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2* tuto podmínku splňují, geny *lmbW*, *lmbX* a *lmbY* nikoli. Tato skupina genů však nemá své homology mezi geny genového shluku pro biosyntézu celesticetinu (ústní sdělení Markéty Koběrské), který sdílí s linkomycinem část biosyntetické dráhy pro biosyntézu MTL. Navíc, inaktivační experimenty prováděné Chungovou skupinou přiřazovaly geny linkomycinového biosyntetického shluku k jednotlivým částem biosyntetické dráhy jen velmi zhruba, spíše v rámci větších celků, a proto tyto geny mohly minout.

Gen *lmbW*, vykazující podobnost k methylázám, byl na základě výše uvedené srovnávací analýzy shluků přiřazen k methylačnímu kroku, gen *lmbY*, vykazující podobnost k redoxním enzymům byl přiřazen k finální redukci a o genu *lmbA*, vykazujícím podobnost ke glutamyltransferázám se předpokládá, že je zahrnut v biosyntéze kofaktoru LmbY. Gen *lmbX*, vykazující podobnost k proteinové rodině neznámé funkce, byl zřejmě vylučovací metodou přiřazen ke kroku, v němž dochází k odštěpení dvou uhlíků z molekuly budoucího PPL.

Gen *lmbX* byl vybrán pro další zkoumání proto, že jeho proteinový produkt je na základě výše uvedených dat kandidátním genem katalyzujícím odštěpení dvou uhlíků z molekuly 4-(3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1-*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny. Předchozí reakce je známa a je tedy k dispozici substrát reakce pro další zkoumání.

Nejprve však bylo třeba ověřit hypotézu, že proteinový produkt genu *lmbX* se skutečně účastní biosyntézy PPL. Pro tento účel byla zvolena metoda inaktivace genu. S použitím systému Redirect [65] byl gen *lmbX* inaktivován. Průběh a výsledek inaktivace byly ověřovány metodou PCR. Produktem PCR, prováděné s DNA mutantního kmene *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX1 jako templátem, byl fragment o velikosti 278 pb, což odpovídá situaci po vystřížení střední části inaktivační kazety, kdy je gen *lmbX* nahrazen jizvou o délce 81 pb.

Mutantní kmen *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX1 s inaktivovaným genem *lmbX* byl testován na produkci linkomycinu. Produkce linkomycinu byla zjišťována jednak biologickým testem s pomocí linkomycin senzitivního organismu *Kocuria rhizophila*, jednak UPLC analýzou fermentačního média mutantního kmene. Kmen *Kocuria rhizophila* nevykazoval inhibiční zóny v okolí bločků BG agaru, na nichž byl kultivován mutantní kmen *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX1, na rozdíl od kontrolního experimentu prováděného s typovým kmenem. To bylo v souladu s faktem, že ve fermentačním médiu mutantního kmene nebyl linkomycin nalezen. Inaktivace genu *lmbX* vedla tedy u mutantního kmene ke zrušení produkce linkomycinu a dá se konstatovat, že gen *lmbX* je skutečně funkčním genem biosyntetické dráhy linkomycinu.

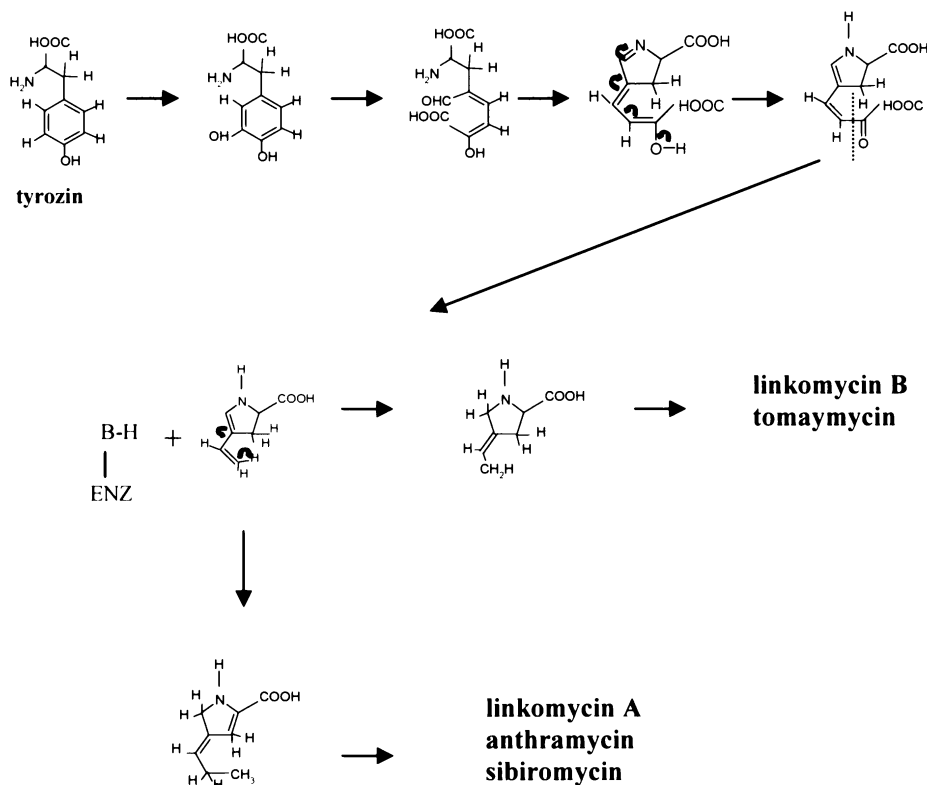
Na otázku, zda byl gen *lmbX* správně funkčně přiřazen k aminokyselinové větvi dráhy, měly odpovědět obohacovací experimenty. Bločky BG agaru, v nichž byl agar obohacen finálním produktem aminokyselinové (PPL) (obr.2.6) nebo cukerné (MTL) (obr.2.7) větve biosyntetické dráhy linkomycinu, byly umístěny na B1 agar, zaočkovaný linkomycin senzitivním kmenem *Kocuria rhizophila*. V okolí bločků, v nichž byl agar obohacen PPL a na nichž byl zaznamenán nárůst mutantního kmene *Streptomyces lincolnensis* DSM40355ΔX1, byly patrné výrazné inhibiční zóny. V okolí bločků, v nichž nebyl agar obohacen nebo byl obohacen MTL, nebyly inhibiční zóny pozorovány. Dá se tedy konstatovat, že části linkomycinové biosyntetické dráhy související s produkcí MTL nebo s kondenzačním či finálním methylačním krokem mutací zasaženy nebyly a že gen *lmbX* je funkčně spojen s produkcí PPL. To je sice v rozporu s výše uvedenou Chungovou představou o lokalizaci genů ve shluku [52], ale v dokonalém souladu s výsledky srovnávací sekvenční analýzy genových shluků pro biosyntetizu antibiotik linkomycinu a anthramycinu [68]. Inaktivační experimenty prováděné Chungovou skupinou nejspíše gen *lmbX* opravdu minuly.

Gen *lmbX* byl, jak zmíněno výše, předběžně přiřazen k reakčnímu kroku, v němž budoucí molekula PPL ztrácí dva uhlíkové atomy a dochází v ní k izomerním posunům [68]. Toto přiřazení ale nemělo oporu v podobnosti proteinového produktu genu *lmbX* ke známým proteinovým rodinám. Gen vykazuje statisticky významnou podobnost k velké rodině proteinů označované jako „PhzF - like proteins“, jejichž funkce nebyla dodnes plně objasněna. V poslední době byla provedena strukturní analýza proteinu PhzF [70], která nasvědčuje tomu, že protein PhzF je bifunkční protein, který jednak v rámci své struktury

poskytuje chráněnou kavitu pro dimerizaci ketonů přes Schiffovy báze, jednak provádí izomerizaci substrátu před jeho dimerizací.

Pozoruhodné je, že všechny tři dosud publikované modely biosyntetické dráhy vedoucí k PPL [69,45,48] postulují enzymaticky katalyzované izomerní posuny v molekule těsně následující za krokem odštěpení dvou uhlíkových atomů z budoucí molekuly PPL, k němuž byl funkčně přiřazen proteinový produkt genu *lmbX*, vykazující podobnost k PhzF rodině. Zdá se, že v základě podobnosti proteinů LmbX a PhzF by mohly stát izomerní posuny prováděné těmito enzymy v molekulách příslušných substrátů. Přiřazení genu *lmbX* k výše zmiňovanému kroku aminokyselinové větve biosyntézy linkomycinu je patrně správné, nicméně musí být ověřeno dalšími experimenty, pro něž byl položen základ právě v této diplomové práci.

Experimentální výsledky diplomové práce umožnily přiřadit gen *lmbX* k aminokyselinové větvi biosyntetické dráhy linkomycinu a mutantní kmen *Streptomyces lincolnsis* DSM40355ΔX1, připravený v rámci práce, bude dále využit k detailnímu zkoumání reakce katalyzované genem *lmbX*.



**Obr 5.1. Schema společných kroků biosyntézy prolinových derivátů přítomných v molekulách linkomycinu a pyrrolo[1,4] benzodiazepinových antibiotik**

## 6 ZÁVĚR

- Pomocí systému Redirect se podařilo inaktivovat gen *lmbX* u mutantního kmene *Streptomyces lincolnensis* DSM40355.
- Gen *lmbX* byl přiřazen k aminokyselinové dráze biosyntézy linkomycinu.
- Získaný mutantní *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 $\Delta$ X bude předmětem dalšího studia.

---

**SEZNAM LITERATUREY**

- [1] **Kaprálek F.:** Základy bakteriologie. Karolinum 1999. (1999)
  - [2] **Baltz R.H.:** Genetic manipulation on antibiotic producing *Streptomyces*, in Trends Microbiol. 6,78-83. (1998)
  - [3] **Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W.:** Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. Journal of biotechnology. 106, 221-232. (2003)
  - [4] **Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A.:** Approved lists of bacterial names., in J. Syst. Bacteriol. 30,225. (1980)
  - [5] **Wellington E. M. H., Cresswell N., Herron P. R.:** Gene transfer between streptomycetes in soil. *Gene* 115, 193-198. (1992)
  - [6] **Kieser T., Bibb M.J., Bittner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. :** Practical Streptomyces genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, England. (2000)
  - [7] **McCarthy A. J.:** Lignocellulose-degrading actinomycetes, *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 145-163. (1987)
  - [8] **Karagouni A. D., Vionis A. P., Baker P. Wellington E. M. H.:** The effect of soil moisture content on spore germination , mycelium development and survival of a seeded streptomycete in soil. *Microbiol. Releases* 2, 47-51. (1993)
  - [9] **Mayfield C. I., Williams S. T., Ruddick S. M., Hatfield H. L.:** Studies of the ecology of actinomycetes in soil. IV Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 79-91. (1972)
  - [10] **Chater K.F., Bibb M.J.:** Regulation of bacterial antibiotic production, in Kleinkauf H., Dohren H.V. (eds) Biotechnology vol.7: Products of secondary metabolism, VCH Press, Weinheim, Germany, 57-105. (1997)
  - [11] **Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-taraga, A.M., Chalis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.V., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Tazlor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A.:** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885), 141-147. (2002)
  - [12] **Hopwood, D.A.:** Forty years of genetics with *Streptomyces* from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* 145, 2183-2202. (1999)
  - [13] **Wright F., Bibb M. J.:** Codon usage in the G+C - rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113, 55-65. (1992)
  - [14] **Hopwood, D.A.:** Extrachromosomally determined antibiotic production. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 373-392. (1978)
  - [15] **Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Zamada, K., Kinashi, H.:** The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an
-

- 
- unusually condensed gene organisation for secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* 48, 1501-1510. (2003)
- [16] **Martín, J.F., Liras, P.:** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 173-206. (1989)
- [17] **Spížek, J., a Tichý, P.:** Some aspects of Overproduction of Secondary Metabolites. *Folia Microbiol.* 40(1), 43-50. (1995)
- [18] **Spížek, J., Adamec, J., Janata, J., Lichá, I.:** Genetic control of antibiotic biosynthesis and antibiotic resistance. *Chem. papers* 52, 258. (1998)
- [19] **Mavrodi D.V., Blankenfeldt W., Thomashow L.S.:** Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 417-445. (2006)
- [20] **McDonald M., Marodi D.V., Thomashow L.S., Floss H.G.:** Phenazine Biosynthesis in *P. fluorescens* from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9459-9460. (2001)
- [21] **Rix, U., Fisher, C., Remsing, L.L., Rohr., J.:** Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 19, 542-580. (2002)
- [22] **Khosla, C., Zawada, R.J.:** Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 14, 335-341. (1996)
- [23] **Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A., Floss, H.G., Omura, S.:** Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature* 314(6012), 642-644. (1985)
- [24] **Hoeksema H., Bannister B., Birkenmayer R.D., Kagan F., Magerlein B.J., MacKellar F.A., Schroeder W., Slomp G. a Herr R.R.:** Chemical studies on lincomycin. I. The structure of lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4223-4224. (1964)
- [25] **Schroeder, W., Bannister, B. a Hoeksema, H.:** Lincomycin. III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2448-2453. (1967)
- [26] **Magerlein, B. J., Birkenmayer, R. D., Herr, R. R., Kagan, F.:** Lincomycin. V. Amino acid fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2459-2464. (1967)
- [27] **Mason D.J, Dietz A. a DeBoer C.:** Lincomycin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *In: Antimicrob. Agents Chemother.* 1962. Sylvester J.C. (Eds.), American Society for Microbiology, Ann. Arbor, Michigan, USA: 554-559. (1963)
- [28] **Argoudelis, A.D., Fox, J.A., Eble, T.E.:** A new linkomycin related antibiotic. *Biochemistry* 4, 698-703. (1965a)
- [29] **Argoudelis, A.D., Eble, T.E., Mason, D.J.:** Studies on the biosynthesis of lincomycin. V. Effect of ethionine on fermentation of *S. lincolnensis*. *J. Antibiot. Tokyo.* 23, 1-8. (1970)
- [30] **Argoudelis A.D. a Coats J.H.:** Process for producing lincomycin. US Patent 3 726 766. (1973)
-



- 
- [31] **Patterson E.L., Andres W.W., Hartman R.E.:** The microbiological oxidation of conessine, in *Experientia* 15;20(5), 256-7. (1964)
- [32] **Argoudelis A.D., Coats J.H., Mason D.J., Sebek O.K.:** Microbial transformation of antibiotics III, Conversion of clindamycin to 1'-demethylclindamycin and clindamycin sulfoxide by *Streptomyces sp.*, in *J. Antibiot.* 22, 309-314. (1969)
- [33] **Argoudelis A.D., Coats J.H.:** Process for producing lincomycin U. S. Patent 3,812,014. (1974)
- [34] **Gause G. F., Lapchinskaya O. A., Sveshnikova M. A., Preobrazhenskaya T. P., Ukholina R. S., Nechaeva N. P., Pogozheva V. V., Korobkova T.P., Trenina G. A.:** USSR Patent 287 743. (1975)
- [35] **Bergy M.E., Coats J.H., Malik V.S.:** Belgium Patent 830 068. (1975)
- [36] **Bibikova M.V., Singal E.M., Ivanitskaia L.P., Zhdanovich IuV.:** Production of lincomycin by *Micromonospora halophytica* culture, in *Antibiot Khimioter Oct;* 34(10), 723-6. (1989)
- [37] **Birkenmayer, R. D., Magerlein, B. J. a Kagan, F.:** Abstr. 5th Intersci. Conf. Antimicrob. Ag. Chemother. str. 17. (1965)
- [38] **Magerlein, B. J.:** Modification of lincomycin. Structure-activity Relationships among the Semisynthetic antibiotics. Perlman, D. (ed.): Academic press, New York, 600-651. (1977)
- [39] **Schlünzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F.:** Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814-21. . (2001)
- [40] **Skinner R., Cundliffe E., Schmidt F.J.:** Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics, in *J. Biol. Chem.* 258, 12702-12706. (1983)
- [41] **Wright J.L.C.:** *In: Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics.* Vining, L.C. (Eds.) Addison-Wesley, London: 311-328. (1983)
- [42] **Vacek V.:** Lincosamide antibiotics. *Cas. Lek Cesk.* 130 (26), 715-722. (1991)
- [43] **Witz, D.F., Hessler, E.J., Miller, T.L.:** Bioconversion of tyroline into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry.* 10, 1128-33. (1971)
- [44] **Argoudelis, A.D., Eble, T.E., Fox, J.A., Mason, D.J.:** Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry* 8, 3408-3411. (1969)
- [45] **Brahme, N.M., Gonzales, J.E., Rolls, J.P., Hessler, E.J., Mizensak, S. a Hurley, L.H.:** Biosynthesis of the linkomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7873-7878. (1984b)
- [46] **Neusser, D., Schmidt, H., Spížek, J., Novotná, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichý, P., Piepersberg, W.:** The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyroline to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch. Microbiol.* 169, 322-332. (1998)
-

- 
- [47] **Novotná, J., Honzátko, A., Bednář, P., Kopecký, J., Janata, J., Spížek, J.:** L-DOPA 2,3-extradiol cleavage is followed by the pyrrolo ring formation in the lincomycin biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3678-3683. (2004)
- [48] **Kuo M.S., Yurek D.A., Coats J.H., Chung S.T. and Li G.P.:** Isolation and identification of 3-propylidene- $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot. Tokyo* 45, 1773-1777. (1992)
- [49] **Kuo M. S., Yurek D. A., Coats J. H., Li G. P.:** Isolation and identification of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, an unusual cosynthetic factor in streptomycetes, from *Streptomyces lincolnensis*. *J. Antibiot. Tokyo* 42, 475-478. (1989)
- [50] **Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z. a Piepersberg, W.:** Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 16, 1137-1156. (1995)
- [51] **Spížek J., Řezanka T.:** Linkomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 510-519. (2004)
- [52] **Chung, S.T., Manis, J.J., McWethy, S.J., Patt, T.E., Witz, D.F., Wolf, H.J., Wovcha, M.G.:** Fermentation, biosynthesis and molecular genetics of linkomycin. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Strohl, W.R. (ed.), 2nd edn., Dekker, New York, 165 – 186. (1997)
- [53] **Argoudelis, A.D., Fox, J.A., Mason, D.J.:** Studies on biosynthesis of lincomycin. II. Antibiotic U-11973, N-demethylincomycin. *Biochemistry* 4, 710-713. (1965b)
- [54] **Hausknecht, E.C., Wolf, H. J.:** Radiometric assay for N-demethylincomycin synthetase. American Society of Microbiology, Annual Meeting. (1986b)
- [55] **Kadlec, J.:** Závěrečný krok biosyntézy linkomycinu. Diplomová práce. Př.f. UK Praha. (2000)
- [56] **Janata, J., Najmanová, L., Novotná, J., Holá, K., Felsberg, J., Spížek, J.:** Putative lmbI and lmbH genes form a single lmbIH ORF in *Streptomyces lincolnensis* type strain ATCC 25466. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4), 277-284. (2001)
- [57] **Zhang, H.Z., Schmidt, H., Piepersberg, W.:** Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, lmrA and lmrB, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 6, 2147-2157. (1992)
- [58] **Novotná J., Olšovská J., Honzátko A., Bednář P., Novák P., Kopecký J., Janata J., Spížek J.:** The initial steps in the lincomycin biosynthesis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52 Suppl., 113. (2005).
- [59] **Kadlčík S., Chalupská D., Koběrská M., Kopecký J., Janata J.:** Comparison of adenylation activities of LmbC and CcbC participating in biosynthesis of lincomycin and celesticetin. P040 10<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, Czech Republic, June 24–28. (2006).
- [60] **Hoeksema H., Crum G.F., DeVries W.H.:** Isolation and purification of celesticetin. *Antibiot. Ann.* 2, 837-41. (1955)
- [61] **DeBoer C., Dietz A., Wilkins J.R., Lewis C., Savage G.M.:** Celesticetin - a new crystalline antibiotic. I. Biological studies of celesticetine. *Antibiotics Ann.* 2, 831-6. (1955)
-

- 
- [62] **Jandová Z., Tichý P.:** Transformation of *Streptomyces lincolnensis* protoplasts with plasmid vectors, in *Folia Microbiol (Praha)*,37(3),181-7.(1992)
- [63] **Birnboim HC, Doly J.A :** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, in *Nucleic Acids Res Nov* 24;7(6):1513-23. (1979)
- [64] **Ish-Horowicz D, Burke JF.:**Rapid and efficient cosmid cloning, in *Nucleic Acids Res Jul* 10;9(13), 2989-98. (1981)
- [65] **REDIRECT (PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)). Gust B., Keiser T., Chater K., Centre J.I.:** Norwich Research Park, Colney, Norwich NR47UH, UK.(2001)
- [66] **Pojer F., Li S.-M., Heide L.:** Molecular cloning and sequence analysis of the chlorobioicin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**, 3901–3911 (2002).
- [67] BLAST, Altschul et al., Basic Local Alignment Search Tools: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>, (1990)
- [68] **Farnet C.J., Staffa A.:** Genes and proteins for the biosynthesis of anthramycin. *US Patent 20030077767*. (2003)
- [69] **Hurley L.H., Chandler C., Garner T., Petrusek R., Zimmer S.:** DNA binding, induction of unscheduled DNA synthesis, and excision of anthramycin from DNA in normal and repair-deficient human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254, 605-8. (1979)
- [70] **Blankenfeldt, W; Kuzin, AP; Skarina, T; Korniyenko, Y; Tong, L; Bayer, P; Janning, P; Thomashow, LS; Mavrodi, D.V.** Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 16431-16436. (2004)
-