

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

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Petra Jiráčková

Příprava a charakterizace proteinu LmbX zúčastněného v biosyntéze antibiotika linkomycinu

Preparation and characterization of LmbX protein involved in lincomycin biosynthesis

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 7. 5. 2012

Petra Jiráčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli Jiřímu Janatovi za vedení diplomové práce, Standovi Kadlčíkovi za pomoc a cenné rady při realizaci diplomové práci v laboratoři, Zdeňkovi Kameníkovi za provedení chromatografických analýz a spolu s ním i Radkovi Gažákovi za chemický přístup a návrhy biosyntetické dráhy linkomycinu. Dále bych chtěla poděkovat Bojaně Radojevič, Kamile Plháčkové a Tomáši Bakalovi za vhléd do světa streptomycet. Také děkuji ostatním členům laboratoře za perfektní atmosféru a přátelské prostředí – Daně, Elišce, Luce, Lence, Tomovi, Aničce, Janě, Mílovi, Kubovi a Evě.

Poděkování patří také mým rodičům, sestře Radce, příteli Pavlovi, kteří mě podporovali, měli se mnou trpělivost a pochopení.

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2010-2012 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu a je součástí grantového projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy 2B08064 „Životní prostředí jako zdroj bioaktivních látek pro lidské zdraví“ a grantového projektu Akademie věd České republiky IAA500200810 „Geny určující kritické kroky přípravy producentů hybridních antibiotik na bázi linkosamidů“.

Abstrakt

Linkomycin je antibiotikum využívané v klinické praxi. Jeho producentem je *Streptomyces lincolnensis*. Linkomycin se skládá z aminocukerné a aminokyselinové složky, které jsou spojeny amidovou vazbou. Aminokyselinovým prekurzorem je propylprolin (PPL), jehož biosyntéza probíhá dráhou vycházející z tyrosinu. Modifikovaná PPL dráha byla také objevena u pyrrolbenzodiazepinů (PBD) a hormaomycinu. V biosyntéze PBD je PPL prekuzor dále modifikován reakcemi katalyzovanými specifickými enzymy nepřítomnými v biosyntéze linkomycinu. Geny kódující tyto enzymy by mohly být přeneseny do genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. Tímto způsobem bychom mohli získat producenty hybridních antibiotik s lepšími vlastnostmi, a dokonce antimalarickými účinky.

PPL dráhy se účastní šest enzymů, které jsou kódovány v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu. První dvě reakce biosyntézy PPL byly již prokázány, proto se tato práce zaměřuje na reakci třetí, kterou by měl podle literatury katalyzovat protein LmbX. Jeho předpokládaná funkce v biosyntéze PPL je hydrolýza C-C vazby. Podle sekvenční homologie však protein LmbX patří do rodiny isomeras.

V této práci byl nadprodukován protein LmbX a byla testována jeho aktivita v přítomnosti předpokládaného substrátu. Produkty byly měřeny na kapalinovém chromatografu (UHPLC). Nepodařilo se prokázat hydrolytickou funkci. Dále byly analyzovány produkty připravených delečních mutantních kmenů genů PPL dráhy pomocí UHPLC. Výsledky v souhrnu indikují, že LmbX je pravděpodobně isomerasa, která katalyzuje přesun dvojně vazby mezi produktu PPL dráhy a že dosud předpokládané schéma biosyntézy PPL bude nutno revidovat. V této práci je navrženo nové schéma odpovídající získaným výsledkům.

Klíčová slova: LmbX, linkomycin, linkosamidy, pyrrolbenzodiazepiny, hormaomycin, biosyntéza linkomycinu, propylprolinová dráha, proteinová rodina PhzC-PhzF

Abstract

Lincomycin is an antibiotic used in clinical praxis. It is produced by *Streptomyces lincolnensis*. Lincomycin is composed of an amino-sugar and an amino-acid moiety linked by an amide bond. The amino-acid precursor is propylproline (PPL), whose biosynthesis undergoes the pathway derived from tyrosine. The modified PPL biosynthesis pathway was also discovered in pyrrolobenzodiazepines (PBD) and hormaomycin. In the biosynthesis of PBD the PPL precursor is further modified by reactions catalysed by specific enzymes missing in the biosynthesis of lincomycin. The genes encoding these enzymes could be transferred to the lincomycin biosynthetic gene cluster. In this way we could get producers of hybrid antibiotics with better properties and even antimalaric effects.

Six enzymes participate in PPL biosynthesis, which are encoded in the lincomycin biosynthetic gene cluster. The first two reactions of PPL biosynthesis pathway are proven, therefore, this work focuses on the third reaction that is supposed to be catalysed by protein LmbX according to literature. The proposed function of LmbX is a hydrolysis of C-C bond. However, LmbX belongs to the protein family of isomerases by sequence homology.

The protein LmbX was overproduced in this work and its activity was tested in the presence of the expected substrate. The products were measured on the liquid chromatography (UHPLC). The hydrolytic function failed to prove. Furthermore, the products of the prepared deletion mutants of genes of PPL pathway were analysed using UHPLC. The results indicate that LmbX is probably an isomerase that catalyzes the transfer of the double bond of the intermediate of PPL biosynthesis pathway and that the previously supposed scheme should be revid. In this work the new scheme corresponding with obtained results is proposed.

Key words: LmbX, lincomycin, lincosamides, pyrrolobenzodiazepines, hormaomycin, lincomycin biosynthesis, propylproline pathway, PhzC-PhzF protein family

Seznam zkratek

A doména	adenylační doména
AMP	adenosin monofosfát
AU	jednotka absorbance, odpovídá relativnímu množství látky
BN-PAGE	nativní polyakrylamidová elektroforéza – blue native
bp	páry bází (base pair)
ccb	gen pro biosyntézu celesticetinu
CoA	koenzym A
Da	dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DAP	diaminopimelát
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
DOPAC	3,4-dihydroxyfenylactová kyselina
FLP	rekombinasa (flippase recombination enzyme)
FRT	místa rozpoznávaná rekombinasou (flippase recognition target sites)
g	tíhové zrychlení
HOPDA	2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienová kyselina
HPD	2-hydroxy-2,4-pentadienová kyselina
HGT	horizontální genový přenos
hrm	gen pro biosyntézu hormaomycinu
lmb	gen pro biosyntézu linkomycinu
lmr	gen pro rezistenci k linkomycinu
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
mRNA	mediátorová RNA
MS	hmotnostní spektrometrie
MTL	methylthiolinkosamid
NDCS	N-demethylcelesticetinsynthetasa
NDLS	N-demethyllinkomycinsynthetasa
NRP	neribozomální peptidy
NRPS	neribozomální peptidová synthetasa
OD	optická denzita
orf	otevřený čtecí rámec, zde použito pro geny biosyntézy anthramycinu
PBD	pyrrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepiny
PCP	peptidyl přenášečící protein (peptidyl carrier protein)
PCR	polymerasová řetězová reakce
PK	polyketidy
PKS	polyketidsynthetasa
PPL	4-propyl-L-prolin
RFP	2-hydroxy-6-keto-nona-2,4-dien-1,9-diová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu
rRNA	ribozomální RNA
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
sib	gen pro biosyntézu sibiromycinu
tRNA	transferová RNA
tom	gen pro biosyntézu tomamycinu
UHPLC	kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)

Zkratky pro použité materiály jsou uvedeny v kapitole 3. Materiál a metody.

Obsah

1 ÚVOD	9
2 PŘEHLED LITERATURY	11
2.1 Antibiotika	11
2.1.1 Biosyntéza antibiotik.....	11
2.1.1.1 Modulární enzymy	11
2.1.2 Producenti antibiotik.....	13
2.1.3 Horizontální genový přenos.....	14
2.1.4 Evoluce biosyntézy antibiotik	15
2.1.5 Prolinový motiv ve strukturách sekundárních metabolitů	16
2.2 Evoluční propojení linkosamidů, pyrrolobenzodiazepinů a hormaomycinu	18
2.2.1 Linkosamidy.....	18
2.2.2 Pyrrolobenzodiazepiny.....	20
2.2.3 Hormaomycin	21
2.2.4 Genové shluky pro biosyntézu linkosamidů, pyrrolobenzodiazepinů a hormaomycinu.....	22
2.2.5 Evoluční propojení	24
2.3 Propylprolinová dráha	27
2.3.1 LmbX	31
2.3.1.1 Obecné informace.....	31
2.3.1.2 Proteiny s hydrolytickou funkcí.....	32
2.3.1.3 Proteiny podobné LmbX.....	33
2.3.1.3.1 PhzF	33
2.3.1.3.2 Proteinová rodina PhzC-PhzF	34
3 MATERIÁL A METODY	39
3.1 Materiál	39
3.1.1 Bakteriální kmeny	39
3.1.2 Vektory.....	40
3.1.3 Kultivační média.....	42
3.1.4 Speciální kultivační média	43
3.1.5 Enzymy	44
3.1.6 Puřry a roztoky.....	44
3.1.7 Komerční soupravy, standardy a nástroje	45
3.1.8 Chemikálie	46
3.1.9 Oligonukleotidy.....	48
3.1.10 Software a internetové aplikace.....	49
3.1.11 Speciální přístroje a zařízení	50
3.2 Metody	52
3.2.1 Kultivace bakterií	52
3.2.1.1 Kultivace <i>E. coli</i>	52
3.2.1.2 Kultivace <i>Streptomyces lincolnensis</i> na pevných půdách	52
3.2.1.3 Kultivace <i>S. lincolnensis</i> – pro izolaci chromozomální DNA	52
3.2.1.4 Kultivace <i>S. lincolnensis</i> – pro analýzu produktů pomocí UHPLC	52
3.2.1.5 Příprava spor <i>S. lincolnensis</i>	52
3.2.2 Metody práce s DNA	53
3.2.2.1 Transformace bakterií cizorodou DNA	53
3.2.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	54
3.2.2.3 TA klonování	56
3.2.2.4 Ligace DNA.....	57
3.2.2.5 DNA elektroforéza v agarosovém gelu	57
3.2.2.6 Izolace fragmentu DNA z agarosového gelu	57
3.2.2.7 Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas	57
3.2.2.8 Defosforylace molekul DNA.....	58
3.2.2.9 Minipreparace plazmidové DNA alkalickou lyzí	58
3.2.2.10 Minipreparace plazmidové DNA vazbou na aktivované sklo	58
3.2.2.11 Preparace plazmidové a kosmidové DNA vazbou na aktivované sklo.....	59
3.2.2.12 Izolace chromozomální DNA <i>S. lincolnensis</i>	59

3.2.2.13 DNA sekvenování	59
3.2.3 Metody práce s proteiny	60
3.2.3.1 Heterologní produkce proteinů	60
3.2.3.2 Sonikace po heterologní expresi <i>lmbX</i>	60
3.2.3.3 Metaloafinitní chromatografie HiTrap.....	60
3.2.3.4 Dialýza	61
3.2.3.5 Detekce proteinu roztokem Ponceau S	61
3.2.3.6 SDS-PAGE	61
3.2.3.7 BN-PAGE	62
3.2.3.8 Barvení proteinů po SDS-PAGE a BN-PAGE.....	63
3.2.3.9 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové	63
3.2.4 Testování funkce <i>LmbX</i>	63
3.2.4.1 Testování funkce <i>LmbX in vitro</i>	63
3.2.4.2 Testování funkce <i>LmbX in vivo</i>	64
3.2.4.3 Extrakce a měření YT a podobných látek.....	64
3.2.4.4 Extrakce a měření linkomycinových derivátů	65
3.2.4.5 Testování biologické aktivity linkomycinových derivátů.....	66
3.2.5 Metoda inaktivace genů u streptomycet	66
4 VÝSLEDKY	70
4.1 Příprava konstruktů pro heterologní expresi <i>lmbX</i>.....	70
4.2 Protein <i>LmbX</i>	71
4.2.1 Optimalizace podmínek pro heterologní produkci <i>LmbX</i>	71
4.2.2 Purifikace <i>LmbX</i>	73
4.2.3 Zjištění kvartérní struktury a stability <i>LmbX</i>	73
4.3 Testování funkce <i>LmbX</i>	76
4.3.1 Testování funkce <i>LmbX in vitro</i>	76
4.3.2 Hledání optimálních podmínek aktivity <i>LmbX</i>	77
4.3.2.1 Testování funkce <i>LmbX in vitro</i> (vliv iontů).....	77
4.3.2.2 Testování funkce <i>LmbX in vivo</i>	80
4.4 Ověření mutantních kmenů <i>S. lincolnensis</i> s deletovanými geny pro PPL dráhu.....	81
4.5 Produkce linkomycinových derivátů mutantními kmeny PPL dráhy	82
4.6 Inaktivace genů chromozomální DNA <i>S. lincolnensis</i>.....	87
4.6.1 Inaktivace <i>lmbY</i>	87
4.6.2 Inaktivace <i>lmbX</i> v mutantním kmenu <i>jΔlmbW</i>	89
5 DISKUZE	92
6 SOUHRN.....	101
7 SEZNAM LITERATURY	102

1 Úvod

Antibiotika jsou biologicky aktivní látky používané k léčbě infekčních nemocí způsobených mikroorganismy. Jsou jedním z největších objevů moderní medicíny, avšak jejich nesprávné a nadměrné užívání vede k rychlému šíření genů kódujících různé mechanismy rezistence. Rezistence k antimikrobiálním látkám je dnes už celosvětový problém. Největším nebezpečím je pak vznik a rozšíření multirezistentních patogenních kmenů bakterií, které jsou odolné vůči všem používaným antibiotikům. Hlavním centrem vzniku těchto nebezpečných rezistentních kmenů jsou klinická zařízení, kde dochází k velké spotřebě antibiotik a ke snadnému přenosu bakterií mezi oslabenými pacienty. Tzv. nosokomiální infekce jsou proto velmi těžko léčitelné (DEEGE a PATERSON 2011).

Používaná antibiotika tak v současné době pomalu přestávají být účinným lékem. Proto je velmi důležité vyvíjet a objevovat nové látky, které by byly v léčbě infekčních onemocnění efektivní. Ačkoliv je toto zřejmé, farmaceutické firmy mají o vývoj nových látek malý zájem z ekonomických důvodů. Antibiotika jsou totiž užívána jen po krátkou dobu infekční nemocí, a proto se farmaceutické firmy raději orientují na vývoj a výrobu léků proti onemocněním chronickým (SPELLBERG *et al.* 2004).

Pro řešení problému antibiotické rezistence je možné využít několik přístupů, jako je hledání nových přirozených antibiotik, objevování nových mechanismů inhibice mikroorganismů nebo příprava derivátů charakterizovaných antibiotik, které by vykazovaly lepší vlastnosti než antibiotika původní. Příprava takových derivátů může vést několika cestami – chemickými úpravami, pomocí metod genového inženýrství nebo kombinací obou metod. Typickým příkladem chemických úprav antibiotik mohou být β -laktamy, kdy z přirozeného penicilinu a cefalosporinu bylo vytvořeno mnoho jejich derivátů využívaných v medicíně (ELANDER 2003). Velkým příslibem je kombinatorní syntéza antibiotik. Tím se rozumí zkombinování genových shluků, jejich částí nebo genů různých producentů antibiotik za účelem vytvoření antibiotika nového, hybridního. Nově vytvořený kmen by pak stabilně produkoval nové antibiotikum. Kandidáty pro takovéto manipulace jsou zvláště polyketidy a neribozomální peptidy (WALSH 2002).

Předpokládáme, že vytvoření hybridního antibiotika bychom mohli realizovat i v naší laboratoři přenosem genů z genového shluku pro biosyntézu pyrrolobenzodiazepinů (PBD) do genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. Modifikovali bychom tak propylprolinovou (PPL) část linkomycinu, což by mohlo přinést nové a lepší vlastnosti produkovaného derivátu linkomycinu, zvláště pak antimalarické účinky. Mutasyntéza linkomycinových derivátů byla již vyzkoušena (ULANOVÁ *et al.* 2010). Biosyntetická dráha PPL se v přírodě vyskytuje i u PBD a hormaomycinu, je však v trochu modifikované podobě. Charakterizované genové shluky

biosyntézy těchto látek obsahují šest ortologních genů (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a). U tomamymycinu (PBD) a hormaomycinu pouze pět (LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). V této práci se zabývám právě PPL dráhou, protože dosud není jasné, jak přesně tato dráha probíhá. Moje práce navazuje na dosavadní práci naší laboratoře. Doposud byly prokázány první dva kroky biosyntézy PPL. Mým cílem je tedy charakterizovat protein LmbX, který by měl pokračovat v biosyntéze PPL a katalyzovat reakci třetí. Konkrétně mým úkolem je připravit expresní vektor s genem *lmbX*, nadprodukovat protein a potvrdit jeho předpokládanou hydrolytickou funkci.

2 Přehled literatury

2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky různorodé chemické struktury, které inhibují růst mikroorganismů. Působí na různá místa v buňce, a tím blokují její životní funkce. Jsou to sekundární metabolity, které mikroorganismy produkují až ve stacionární fázi růstu, kdy již nemají dostatek některého zdroje živin (SPÍŽEK a TICHÝ 1995).

Jejich funkce je ve větších dávkách antimikrobiální, v přirozeném prostředí však fungují jako regulátory metabolismu, virulence, diferenciacie a dalších buněčných procesů. Mechanismus regulace spočívá v ovlivnění transkripce odpovídajících genů (YIM *et al.* 2006).

Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů vykazují určité společné vlastnosti. Na chromozomech jsou obvykle organizovány do genových shluků, které se skládají z několika transkripčních jednotek. Alespoň některé z nich jsou regulovány regulátory, jejichž geny jsou umístěné blízko biosyntetických genů. Produkce sekundárních metabolitů je kontrolována hlavně na transkripční úrovni. V genovém shluku jsou zpravidla kódovány minimálně dva typy rezistence k danému metabolitu (SPÍŽEK a TICHÝ 1995).

Antibiotika se dají klasifikovat podle chemické struktury. Velkými skupinami jsou např. peptidová nebo polyketidová antibiotika. V této diplomové práci se zabývám zvláště linkosamidy, které představují velmi malou skupinu antibiotik, a PBD, což jsou látky zejména s protinádorovými účinky, které se řadí mezi větší skupiny.

2.1.1 Biosyntéza antibiotik

Biosyntéza antibiotik vychází z jednoduchých prekurzorů vyskytujících se v primárním metabolismu. Tyto prekurzory jsou aktivní samy o sobě nebo fungují jako stavební kameny, které jsou kondenzovány do velkých molekul. To zajišťují kondenzační enzymy různé úrovně. Typicky to jsou komplexy enzymů modulárního charakteru. Tuto skupinu představují polyketidsynthasy a neribozomální peptidové synthetasy.

2.1.1.1 Modulární enzymy

Polyketidsynthasy (PKS) a neribozomální peptidové synthetasy (NRPS) vytváří polyketidy (PK) a neribozomální peptidy (NRP) hojně se vyskytující v přírodě. Typickými zástupci antibiotik, která patří mezi PK, jsou např. erythromycin a tetracyklin, typickými NRP s antibiotickými účinky jsou penicilin nebo vankomycin.

PKS a NRPS vykazují společné vlastnosti. Jsou to multimodulární enzymy (Obr. 2.1), které inkorporují monomerní jednotky do lineárního oligomeru opakující se kondenzací.

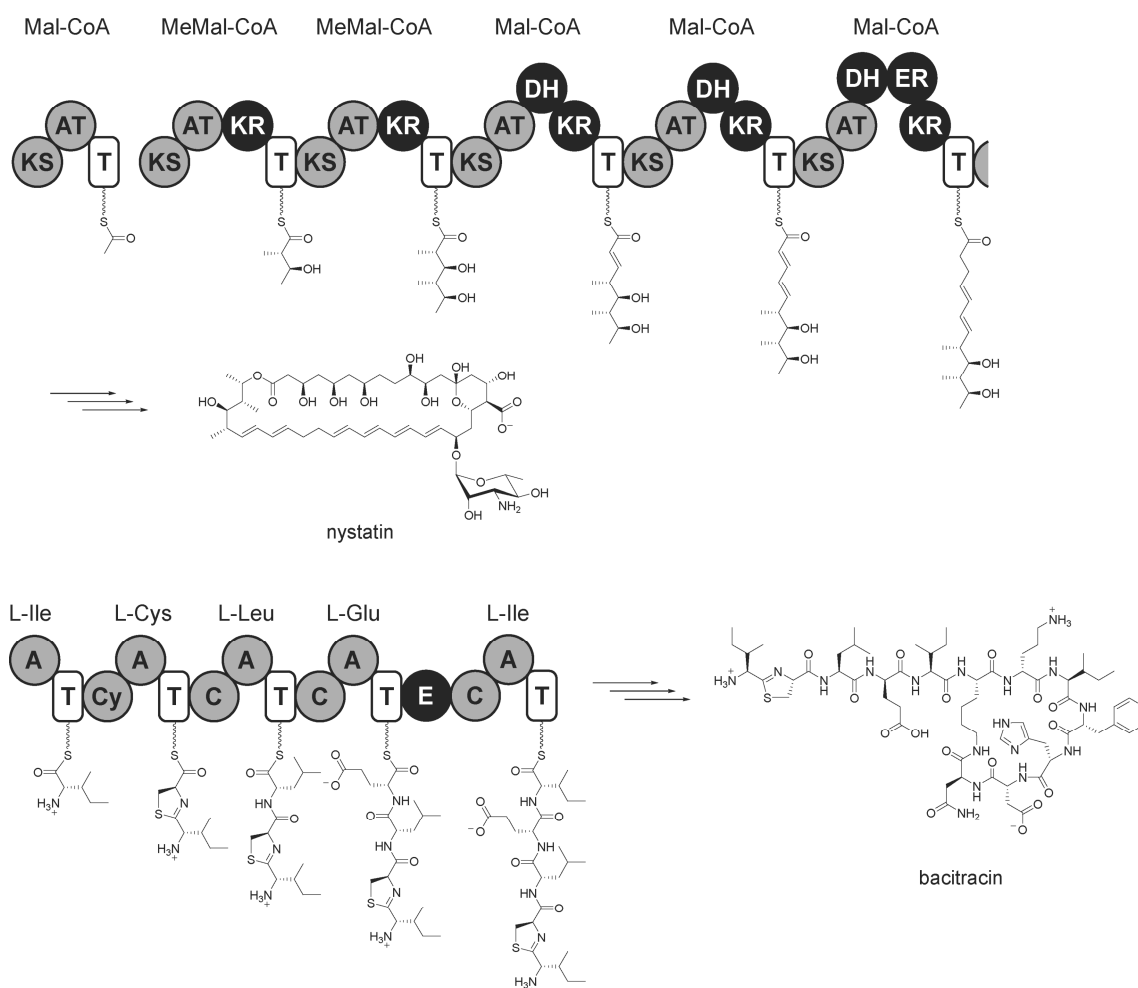
Mechanismus kondenzace pomocí PKS a NRPS je analogický. Liší se zejména v inkorporaci jiných stavebních jednotek. Počet a pořadí modulů určuje stavební jednotky, které jsou inkorporovány, a pořadí, ve kterém jsou kondenzovány (FISCHBACH a WALSH 2006). Každý elongační modul se skládá alespoň ze tří domén, dvě jsou katalytické a jedna funguje jako přenašeč. Další domény v modulu mohou modifikovat nově rozšířený PK nebo NRP. Jiné uspořádání má první a poslední modul. V iniciačním modulu chybí kondenzační doména. Terminační modul je zakončen thioesterasovou doménou (TE), která uvolňuje molekulu z PKS nebo NRPS. U PKS je produkt uvolněn obvykle makrolaktonizací, u NRPS to může být makrocyclizace nebo jednoduchá hydrolyza (CANE a WALSH 1999).

Substráty PKS jsou obvykle acetyl-CoA, malonyl-CoA nebo methylmalonyl-CoA. PKS se rozděluje do tří typů, z nichž pouze typ I je složen z více modulů, které nepůsobí opakovaně a jsou analogické k NRPS. Elongační modul PKS se skládá vždy nejméně ze tří domén. Acyltransferasová doména (AT) rozpoznává prekurzory, které jsou pak přeneseny na fosfopantetheinové rameno acyl přenášející domény (ACP, neboli thiolační doména T; Obr. 2.1). Při tomto přenosu dochází k tvorbě thioesterové vazby mezi acylovou skupinou a fosfopantetheinovým ramenem. Polyketidový řetězec je přenesen z ACP domény prvního modulu ketosynthasovou doménou (KS) na cysteinový zbytek v aktivním místě KS, kde následuje vznik C-C vazby s prekurzorem vázaným na dalším ACP. Kondenzace je spojena s dekarboxylací připojovaného prekurzoru. Výsledkem každého katalytického cyklu je přidání dvou nebo tří uhlíků. Moduly mohou obsahovat ještě další domény modifikující vznikající PK. Jsou to ketoreduktasové (KR), dehydratasové (DH) nebo enoylreduktasové (ER) domény (FISCHBACH a WALSH 2006).

NRP jsou složeny jak z proteinogenních, tak i neproteinogenních aminokyselin, mezi kterými vzniká amidová vazba. Stavba NRPS (Obr. 2.1) je analogická k PKS I. Tři nezbytné domény elongačních modulů jsou kondenzační (C), adenylační (A) a thiolační (T). Thiolační doménou (T) NRPS je peptidyl přenášející protein (PCP). Stejně jako ACP u PKS nese fosfopantetheinové rameno. Přes něj je připojen thioesterovou vazbou prodlužovaný peptidyl (FISCHBACH a WALSH 2006). U NRPS jsou pro rozpoznání prekurzorů antibiotik nejdůležitější první domény každého modulu. Jsou to adenylační domény (A), které adenylací za spotřeby ATP aktivují prekurzor a předávají ho sousednímu PCP. Specifita rozpoznávaných substrátů je závislá na složení osmi nesousedících aminokyselinových zbytků, které jsou součástí aktivního místa A domény (STACHELHAUS *et al.* 1999). Peptidovou vazbu mezi rostoucím peptidem připojeným na PCP první domény a aktivovaným prekurzorem na PCP druhé domény zprostředkuje C doména. Některé moduly mohou být rozšířeny i o další domény modifikující vznikající peptid. Jsou to např. epimerasová doména (E), oxidasová doména, methyltransferasová doména nebo cyclizační doména (Cy), která vytváří pětičlenný heterocyklus (FISCHBACH a WALSH 2006). Části NRPS jako je A a PCP doména mohou

fungovat samostatně, bez toho aniž by byly součástí modulu. Tyto volné domény se vyskytují např. u aminokumarinových antibiotik (GARNEAU *et al.* 2005) nebo linkosamidů (KOBĚRSKÁ 2010). Do NRP patří i dále popisované PBD (HU *et al.* 2007) a hormaomycin (HÖFER *et al.* 2011).

Existují také hybridy NRP-PK jako je např. bleomycin nebo rapamycin. Syntéza může přejít z kondenzace aminokyselin (tvorby N-C vazby) na kondenzaci (methyl)malonyl-CoA (tvorbu C-C vazby) a naopak (FISCHBACH a WALSH 2006).



Obr. 2.1: Schéma biosyntézy nystatinu, představitele polyketidů (nahore). Schéma biosyntézy bacitracinu, zástupce neribozomálních peptidů. Převzato z FISCHBACH a WALSH 2006.

2.1.2 Producenti antibiotik

Nejvýznamnějšími producenty antibiotik jsou streptomycety. Jsou to Gram pozitivní půdní bakterie. Mají složitý životní cyklus, kdy ze spor vyrůstají mnohoaderná vlákna, která tvoří vegetativní mycelium. Jak kolonie stárne, začínají se tvořit vzdušná vlákna nad myceliem. V nich pak dozrávají spory, které po uvolnění dávají vzniknout novým vláknům.

Streptomycety jsou charakterizovány velkým genomem obvykle o velikosti 6-10 Mbp a vysokým obsahem GC párů chromozomální DNA (kolem 70 % z celkového počtu páru bází). Na rozdíl od většiny bakterií vlastní lineární chromozom (LIN *et al.* 1993). V roce 2002 byla publikována sekvence genomu *Streptomyces coelicolor* A3(2), který je velký 8,7 Mbp. Bylo v něm nalezeno téměř 8000 genů a více než dvacet genových shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů. Centrální část chromozomu obsahuje geny, které jsou pro bakterii nezbytné. Na centrální část navazují po obou stranách ramena, která obsahují zejména geny neesenciální, jako jsou např. geny pro biosyntézu antibiotik (BENTLEY *et al.* 2002). Ramena vykazují značnou variabilitu a jsou nestabilní, což je způsobeno zejména přítomností velkého množství mobilních genetických elementů, které podněcují chromozomové přestavby (CHEN *et al.* 2002). Dnes je osekvenováno více než deset dalších genomů streptomycet.

Pro streptomycety jsou charakteristické časté genové výměny. Ty jsou dané především homologní rekombinací uvnitř jednoho druhu. Genový přenos mezi různými druhy streptomycet však hraje také významnou roli. Evoluci streptomycet znázorní lépe síť, kde jsou geny přenášeny horizontálně (DOROGHAZI a BUCKLEY 2010).

2.1.3 Horizontální genový přenos

Genová informace může přecházet z jednoho organismu do druhého, aniž by byla děděna, tzv. horizontálním genovým přenosem (HGT). Uplatňuje se zejména u prokaryot. Zřejmě platí, že čím příbuznější organismy, tím je větší pravděpodobnost HGT. Díky HGT mohou organismy získat nové vlastnosti, které jim přinesou selekční výhodu, a mohou se tak adaptovat na nové ekologické podmínky. V evoluci je tomuto přenosu připisován velký význam, neboť jen bakterie, které mění svou genovou informaci, mohou odolat selekčnímu tlaku. Geny získané HGT mohou být pro organismus nové, nebo mohou nahradit homologní geny, které organismus už vlastní (ANDAM *et al.* 2011).

Jsou známy tři základní mechanismy HGT. Konjugaci zprostředkovává konjugativní plazmid donorové bakterie, který kóduje proteiny umožňující přímý přenos genetické informace z jedné bakterie do druhé. Druhým typem HGT je transformace, ke které dochází, když se bakterie dostane do stavu kompetence. Pak dokáže přijmout cizorodou DNA z okolí buňky. Posledním typem HGT je přenos genů pomocí virů (bakteriofágy), tzv. transdukce. Geny se mohou také přenášet mobilními genetickými elementy, jako jsou plazmidy, transposony, inzerční sekvence, integrony nebo tzv. genomové ostrovy.

U streptomycet jsou rozšířené obří lineární plazmidy, které mohou nést celé genové shluky pro biosyntézu antibiotik. Zdá se, že tyto plazmidy hrají zásadní roli v evoluci genomu streptomycet a v horizontálním přenosu sekundárního metabolismu. Shluk genů z obřího plazmidu se může integrovat do chromozomu a naopak i shluk genů z chromozomu se může

přenést na lineární plazmid. Velikost obřích plazmidů je velmi rozmanitá, průměrně se pohybuje okolo 500 kbp (KINASHI 2011). Jedním z nejvíce prozkoumaných lineárních plazmidů je SCP1 u *Streptomyces coelicolor* A3(2), který nese celý genový shluk pro biosyntézu methylenomycinu (KIRBY a HOPWOOD 1977).

2.1.4 Evoluce biosyntézy antibiotik

Jak již bylo zmíněno dříve, geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů jsou organizovány do genových shluků. Tyto genové oblasti se rychle vyvíjejí, což je dáno rychlým množením producentů a možností horizontálního přenosu. Shluky jsou přenášeny mobilními elementy, jako jsou ostrovy patogenicity a plazmidy (FISCHBACH *et al.* 2008). Ovšem evoluce biosyntetických genových shluků může být dána také pouze vertikálním přenosem, což bylo dokumentováno u genového shluku pro biosyntézu valinomycinu u osmi druhů streptomycet, které byly izolovány z různých geografických oblastí (MATTER *et al.* 2009).

Změny jednotlivých genů genového shluku mohou být způsobeny mutacemi. To je pozorováno zvláště u modulárních enzymů (PKS a NRPS). V jednotlivých doménách PKS dochází k bodovým mutacím, které mají za následek inaktivaci domény. Tím se pak změní i struktura produkovaného antibiotika. U NRPS jsou pro rozpoznání prekurzorů antibiotik nejdůležitější A domény každého modulu. Změna aminokyselinových zbytků vazebného místa A domény vede k modifikaci její substrátové specifity, a do NRP jsou tak inkorporovány jiné prekurzory. Výsledkem je pak i změna struktury konečného produktu. Geny pro modulární enzymy mohou být v průběhu evoluce přeskupovány, duplikovány nebo ztraceny. Duplikace genů i celých genových shluků může vést k divergenci biosyntetických drah (FISCHBACH *et al.* 2008).

Kromě změn v jednotlivých genech může docházet i k přesunu skupiny genů, které jsou uspořádány do tzv. podshluků. Ty pak mohou být nezávisle horizontálně přenášeny. Mohou se spojit s dalšími podshluky a vytvořit genové shluky nové, komplexní. Začleněné genové podshluky mohou kódovat látku, která je nově zakomponována do molekuly původního antibiotika. Jestli bude mít nový podshluk funkční využití, záleží zvláště na kondenzačním enzymu, který musí nový prekurzor rozpoznat a připojit ke stávajícímu produktu (FISCHBACH *et al.* 2008). Tyto procesy byly pozorovány i u dále diskutovaných látek – linkomycinu, celesticetinu, PBD a hormaomycinu (kapitola 2.2.5).

V rámci evoluce dochází také ke konvergenci genových shluků, což znamená, že nepříbuzné genové shluky tvoří podobný fenotypový projev. Může se jednat o konvergenci na cíl, kdy např. antibiotika různé chemické struktury inhibují stejnou buněčnou funkci, nebo to může být konvergence, z které plyne vytvoření stejné molekulové kostry (FISCHBACH 2009).

Genové shluky přítomné v jednom genomu mohou splynout do tzv. supershluků, které se pak už chovají jako jedna funkční jednotka a jsou přenášeny jako celek. V supershlucích může dojít i k funkčnímu propojení fúzovaných genových shluků a může se tvořit jedna komplexní látka (FISCHBACH 2009).

Porovnáním genových shluků různých producentů antibiotik můžeme zjistit, které geny jsou homologní, a dokonce můžeme i naznačit jejich evoluční vývoj (KOBĚRSKÁ 2010).

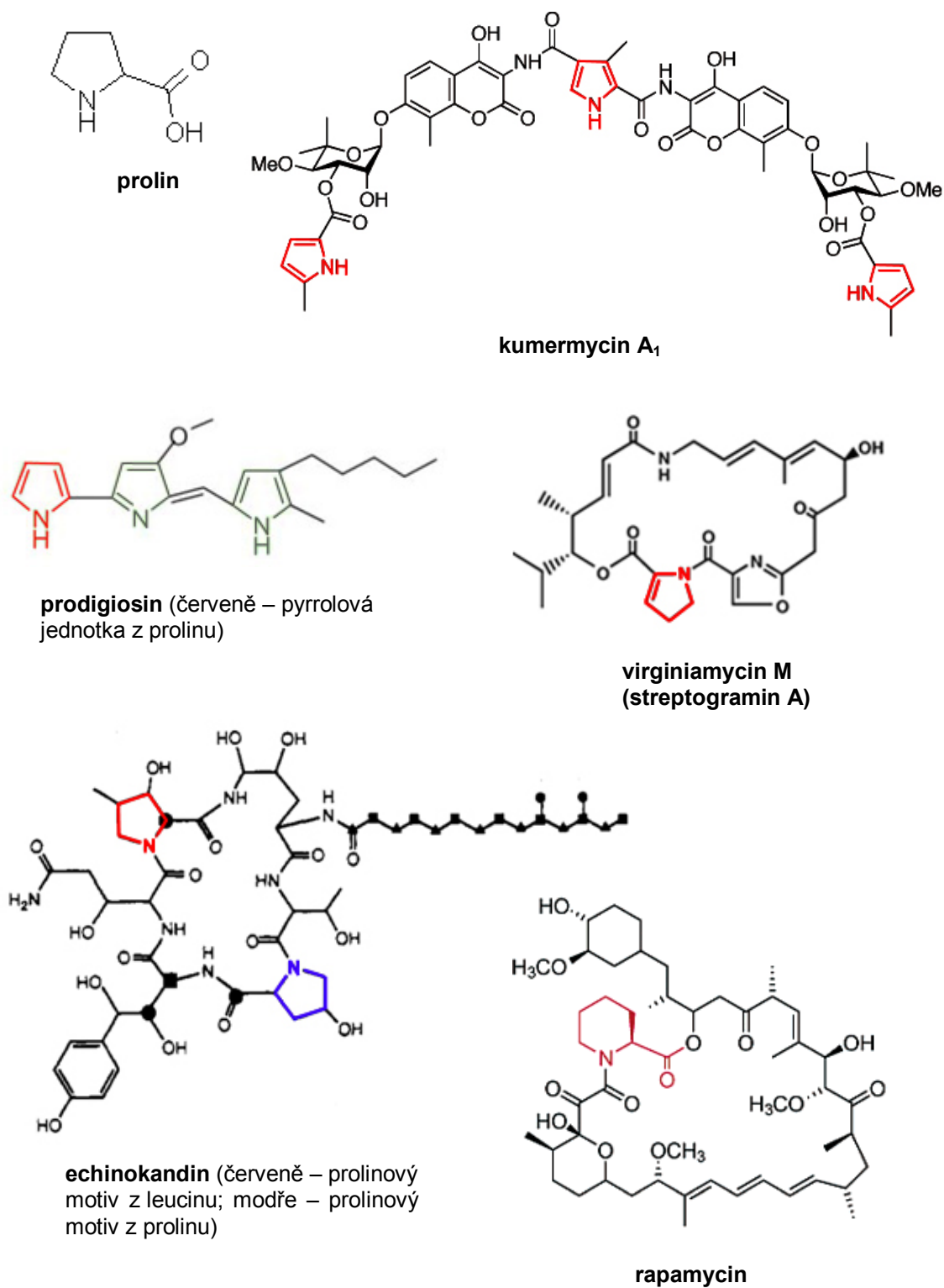
2.1.5 Prolinový motiv ve strukturách sekundárních metabolitů

Prolin jako jedna ze základních aminokyselin se samozřejmě vyskytuje v peptidových antibiotikách syntetizovaných klasicky na ribozomu. Takovým příkladem mohou být munumbiciny, relativně nově objevená antibiotika streptomycet s širokým spektrem účinků (CASTILLO *et al.* 2002). Bezobratlí a obratlovci produkují antibakteriální peptidy bohaté na prolin, které působí zvláště proti Gram negativním bakteriím (OTVOS 2002).

Motiv prolinu se nachází v široké škále sekundárních metabolitů (Obr. 2.2). Deriváty prolinu mohou vznikat jak z prolinu, tak i z jiných aminokyselin, které ve výsledku připomínají prolin svou strukturou. Příkladem látek, u kterých je prolin stavební jednotkou, mohou být aminokumarinová antibiotika. Chlorobiocin a kumermycin A₁ obsahují ve struktuře pyrrolovou složku (kumermycin A₁ dokonce tři) vznikající z prolinu (GARNEAU *et al.* 2005). Takto vznikající pyrrol se vyskytuje i u dalších látek, jako je antifungální látka pyoluteorin nebo prodigiosiny, červené pigmenty (THOMAS *et al.* 2002). Zabudování prolinu do struktury antibiotika je závěrečná fáze biosyntézy streptograminů A (PULSAWAT *et al.* 2007). Derivát prolinu, jehož biosyntéza vychází z prolinu, nemusí být součástí velkých molekul, ale může se vyskytovat i v menších molekulách, jako je celesticetin, zástupce linkosamidů (KOBĚRSKÁ 2010) nebo PBD neothramycin (MIYAMOTO *et al.* 1978).

Příkladem látek obsahující motiv prolinu, který je biosynteticky odvozený od jiné aminokyseliny, mohou být echinokandiny. U nich je struktura připomínající prolin vytvářena zřejmě cyklizací leucinu. Kromě tohoto motivu však obsahují i přirozený prolin (ADEFARATI *et al.* 1991). Rapamycin obsahuje ve struktuře pipekolovou kyselinu, což je šestičlenný homolog prolinu vznikající cyklizací lysinu (GATTO *et al.* 2006). U polyoxypeptinu A se vyskytují dokonce dvě struktury podobné prolinu. Piperazát, jehož prekurzorem je glutamát, a 3-hydroxy-3-methylprolin vznikající z isoleucinu (UMEZAWA *et al.* 2001).

Derivát prolinu, jehož biosyntéza vychází z tyrosinu, se vyskytuje u linkomycinu (WITZ *et al.* 1971), PBD (HURLEY *et al.* 1975) a hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011).



Obr. 2.2: Struktury vybraných látek obsahujících prolinový motiv. Vlevo nahoře je prolin. Červeně (modře) jsou označeny motivy prolinu. Převzato a upraveno z ADEFARATI *et al.* 1991, THOMAS *et al.* 2002, GARNEAU *et al.* 2005, GATTO *et al.* 2006, PULSAWAT *et al.* 2007.

2.2 Evoluční propojení linkosamidů, pyrrolobenzodiazepinů a hormaomycinu

Linkosamidy, pyrrolobenzodiazepiny a hormaomycin jsou přírodní látky produkované různými druhy streptomycet. Mají odlišnou strukturu, a tedy i rozdílné účinky. Tyto tři skupiny látek obsahují ve své struktuře modifikovaný prolinový motiv, většinou derivát propylprolinu. Součástí genových shluků těchto látek jsou proto geny kódující biosyntetickou dráhu této neobvyklé aminokyseliny.

2.2.1 Linkosamidy

Již v padesátých letech 20. století bylo objeveno první linkosamidové antibiotikum. Bylo pojmenováno celesticetin a bakterie, která ho produkuje *Streptomyces caelestis* (DE BOER *et al.* 1960). O pár let později byl objeven linkomycin A (dále linkomycin) produkovaný *Streptomyces lincolnensis* (BERGY *et al.* 1963). Do této skupiny látek patří také polosyntetický derivát linkomycinu, klindamycin, hojně využívaný v klinické praxi. Klindamycin má nejen vyšší antibiotickou aktivitu, ale působí i na širší spektrum organismů, a dokonce má i antimalarické účinky (BIRKENMEYER a KAGAN 1970).

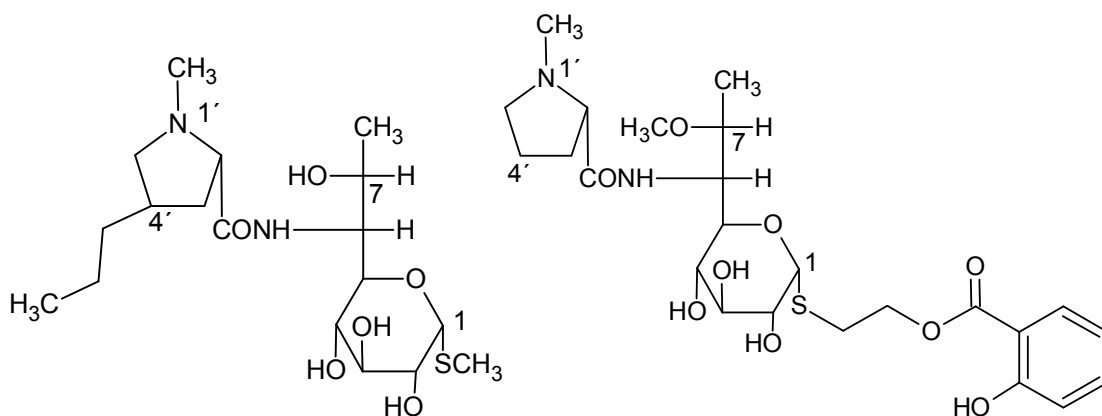
Linkosamidy inhibují proteosyntézu u citlivých bakterií. Váží se na 23S rRNA do peptidyltransferasové smyčky, do A a P místa ribozomu, kde zabráňují nasedání aminoacyl-tRNA a vzniku peptidové vazby mezi aminokyselinami (DOUTHWAITE 1992).

Linkosamidy se skládají z aminokyselinové a aminocukerné části, které jsou spojeny amidovou vazbou (Obr. 2.3). Struktura linkomycinu byla publikována již v roce 1964 (HOEKSEMA *et al.* 1964). Skládá se z propylhygrové kyseliny (*trans-N*-methyl-4-n-propyl-L-prolin) (MAGERLEIN *et al.* 1967) a aminocukernou část představuje methylthiolinkosamid – methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-galaktotapyranosid (SCHROEDER *et al.* 1967). Při fermentaci producenta linkomycinu, *S. lincolnensis*, dochází k minoritní produkci linkomycinu B. Strukturu má velmi podobnou linkomycinu, liší se pouze v délce bočního řetězce na C4' prolinu, kde je navázán ethyl místo propylu (ARGOUDELIS *et al.* 1965). Struktura celesticetinu (Obr. 2.3) se od struktury linkomycinu liší mnohem více. Nejvíce nápadný je salicylát připojený na C1 cukerné části, dále je to methoxy skupina na C7 a chybějící propyl v aminokyselinové části (HOEKSEMA 1964). Genové shluky pro biosyntézu obou linkosamidů jsou popsány a jejich porovnáním můžeme získat povědomí o biosyntéze obou antibiotik (kapitola 2.2.4).

Biosyntéza linkomycinu probíhá v několika krocích. Nejprve jsou samostatně syntetizovány stavební jednotky antibiotika – propylprolin (PPL) a methylthiolinkosamid (MTL). Ty jsou působením enzymu N-demethyllinkomycinsynthetasy (NDLS) kondenzovány

dohromady a vzniká N-demethylinkomycin. Posledním krokem je methylace dusíku PPL motivu.

NDLS je oligomerní enzym, který se skládá z několika podjednotek. Zatím jich předpokládáme pět (KOBĚRSKÁ 2010). NDLS sdílí některé rysy s NRPS. Obsahuje podjednotky analogické k A a PCP doméně. A doména NDLS (aminoacyl-AMP-ligasa) je jediná funkčně prokázaná podjednotka NDLS. Adenylací aktivuje PPL (KADLČÍK v tisku). Podjednotka analogická k PCP doméně pak přenáší aktivovaný PPL na další podjednotky NDLS, které už nejsou analogické k NRPS. PPL je totiž kondenzován s cukerným prekurzorem nikoliv s další aminokyselinou, jako je tomu u NRPS. Dále NDLS obsahuje katalytickou podjednotku, která vytváří amidovou vazbu mezi prekurzory, aminotransferasovou podjednotku a podjednotku neznámé funkce (KOBĚRSKÁ 2010).



Obr. 2.3: Struktura linkomycinu (vlevo) a celesticetinu (vpravo).

Po objevení linkomycinu se začaly připravovat a testovat jeho různé deriváty. Jediným derivátem linkomycinu, který se využívá v praxi, je klindamycin. Je to polosyntetický derivát, který vzniká chlorací linkomycinu na uhlíku C7 v aminocukerné části (BIRKENMEYER a KAGAN 1970).

Byly připraveny i účinnější látky než je klindamycin, ovšem z hlediska jejich složité chemické přípravy se tyto látky průmyslově nevyrobí. Bylo zjištěno, že pro vznik účinnějších derivátů jsou kritická tři místa ve struktuře linkosamidů. Prvním takovým místem je C7 cukerné části. Jeho chlorací (v S konfiguraci) vznikl již zmíněný klindamycin. Druhým důležitým místem je C4' aminokyselinové části linkosamidů. V této pozici byl přirozený propyl nahrazen řadou různých alkylů. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazuje pentyl a hexyl v *trans* pozici. Tyto alkylační modifikace mohou být různě účinné v kombinaci s přítomností či nepřítomností N1' methylové skupiny (třetí kritické místo modifikací). Zatímco u série derivátů odvozených od linkomycinu jsou alkylové deriváty s methylovou skupinou účinnější než nemethylované,

série derivátů klindamycinu vykazuje naopak větší účinky bez této methylové skupiny. Nejúčinnějším derivátem linkomycinu popsáným v literatuře je 1'-demethyl-4'-depropyl-4'-pentylinklindamycin. Působí výrazně na široké spektrum Gram pozitivních i Gram negativních bakterií a na některé prvoky, jako jsou plazmodia způsobující malárii (MAGERLEIN 1971).

V současné době se studují možnosti přenosu genů z jiných bakterií do genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, které by zajistily stabilní a méně náročnou produkci účinnějších derivátů cestou přímé biosyntézy. Konkrétně se uvažuje o přesunu genů z producentů PBD, které by mohly modifikovat délku a větvení bočního řetězce prolinového motivu. Znalost biosyntetické dráhy PPL je tedy důležitá také z tohoto důvodu.

2.2.2 Pyrrolbenzodiazepiny

Celým názvem pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepiny (PBD) jsou látky silně se vážící k dvouřetězcové DNA. Váží se kovalentně do malého žlábků, takže blokují replikaci a transkripci genetické informace. Způsobují nepatrnou distorzi DNA, a tudíž vazba PBD je špatně detekovatelná komplexu excizní opravy (PETRUSEK *et al.* 1981).

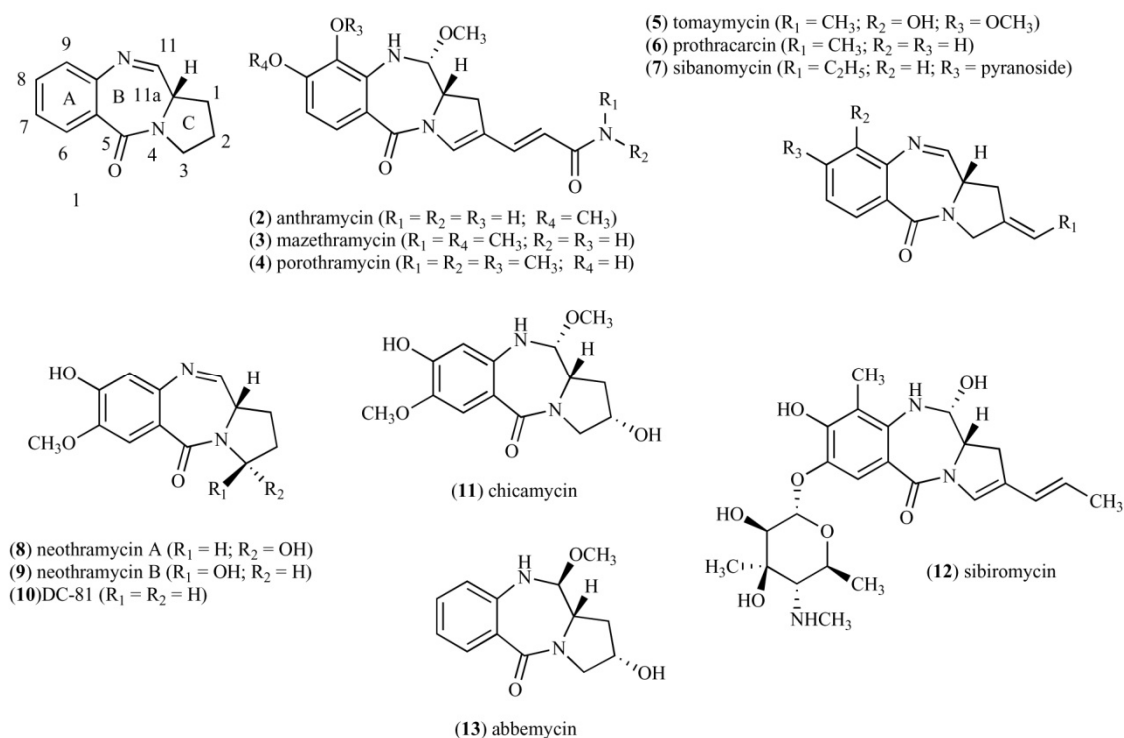
PBD vykazují nejen antibiotickou, ale hlavně cytotoxickou aktivitu, která by mohla být využita pro protinádorovou léčbu. Ovšem charakterizované PBD jsou také toxické pro organismus, a proto se vyvíjí nové PBD s lepšími vlastnostmi. Synteticky připravený PBD dimer SJG-136 je v první fázi klinických testů (CIPOLLA *et al.* 2009).

Struktura anthramycinu, prvního popsáného PBD, byla určena již v roce 1965 (LEIMGRUBER *et al.* 1965). PBD (Obr. 2.4) se skládají z anthranilátové (A) a dihydropyrrolové složky (C), které spolu vytvářejí benzodiazepinové jádro (B). Tato kostra je modifikovaná různými substituenty. Dihydropyrrolová část u většiny PBD je analogická k PPL u linkomycinu a vzniká analogickým způsobem. Ovšem je odlišně inkorporována do molekuly PBD. Kondenzaci anthranilátové a dihydropyrrolové složky PBD katalyzuje NRPS se dvěma moduly, které jsou kódovány dvěma geny (HU *et al.* 2007).

Doposud byly publikovány tři sekvence genových shluků pro biosyntézu PBD. Konkrétně jsou to shluky pro biosyntézu anthramycinu (HU *et al.* 2007), sibiromycinu (LI *et al.* 2009a) a tomaymycinu (LI *et al.* 2009b). Proto se dále zaměřuji pouze na tyto tři PBD. Kromě těchto publikovaných genových shluků se v naší laboratoři osekvenoval genový shluk pro biosyntézu porothramycinu, PBD s nejstrukturovanějším bočním řetězcem na dihydropyrrolovém jádru (Obr. 2.4). Všechny tyto látky obsahují geny pro biosyntézu dihydropyrrolové složky analogické k PPL a ve svých shlucích nesou tomu odpovídající ortologní geny.

Z Obr. 2.4 je patrné, že nejvíce modifikovaný boční řetězec dihydropyrrolové složky obsahují anthramycin, mazethramycin a porothramycin. Geny kódující proteiny, které katalyzují

tyto modifikace, by mohly být přeneseny do shluku genů pro biosyntézu linkomycinu, a tak by se dalo dosáhnout tvorby nového hybridního antibiotika s vylepšenými vlastnostmi.

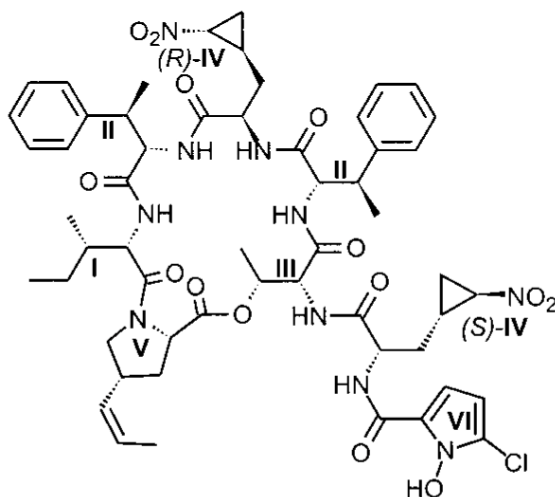


Obr. 2.4: Struktury vybraných přirozených pyrrolobenzodiazepinů. Anthranilátová jednotka (A), benzodiazepinové jádro (B), dihydropyrrolová jednotka (C). Převzato z CIPOLLA *et al.* 2009.

2.2.3 Hormaomycin

Hormaomycin je hormon streptomycet, který iniciuje diferenciaci vzdušného mycelia, stimuluje produkci antibiotik a inhibuje růst koryneformních bakterií (ANDRES *et al.* 1990). Avšak mechanismus jeho působení není doposud popsán.

Je to strukturně složitá látka (Obr. 2.5) skládající se z několika stavebních jednotek. Jde o tzv. depsi-peptid (peptid, kde je jedna nebo více peptidových vazeb nahrazena esterovými vazbami). Ve struktuře hormaomycinu se nachází propenylprolin (V ve struktuře Obr. 2.5), unikátní prolinový derivát vyskytující se v přírodě (ZLATOPOLSKIY a DE MEIJERE 2004). Je to derivát prolinu s dvojnou vazbou v bočním řetězci v *cis* pozici (ZLATOPOLSKIY *et al.* 2004). Propenylprolin vzniká analogickou PPL dráhou, společnou s biosyntézou linkomycinu, ale následně je zařazen do peptidového řetězce pomocí NRPS (HÖFER *et al.* 2011).



Obr. 2.5: Struktura hormamycinu. Jednotlivé jednotky jsou označeny římskými čísly. I – (S)-isoleucin, II – 3-methylfenylalanin, III – (2R)-*allo*-threonin, IV – 3(*trans*-2-nitrocyclopropyl)alanin, V – 4(*Z*)-propenylprolin, VI – 5-chloro-1-hydroxypyrrol-2-karboxylová kyselina. Převzato ze ZLATOPOLSKIY a DE MEIJERE 2004.

2.2.4 Genové shluky pro biosyntézu linkosamidů, pyrrolobenzodiazepinů a hormamycinu

Sekvence genového shluku pro biosyntézu linkomycinu je již známa. Poprvé byla publikována v roce 1995 u průmyslového kmenu *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Bylo identifikováno 30 hypotetických genů (PESCHKE *et al.* 1995). Posléze byla sekvence revidována analýzou genového shluku typového kmenu *S. lincolnensis* ATCC 25466. Bylo určeno 29 hypotetických genů, z toho tři geny rezistenční a 26 genů biosyntézy a regulace. Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu je velký 32 kbp (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008).

Nyní máme k dispozici i sekvenci genového shluku pro biosyntézu celesticetinu. Porovnáním shluků pro biosyntézu celesticetinu a linkomycinu můžeme navrhnout, jaké geny se podílejí na syntéze odpovídající složky. Genový shluk pro biosyntézu celesticetinu s genovým shlukem pro biosyntézu linkomycinu (Obr. 2.6) sdílejí homologní geny pro aminocukernou část (MTL, modře) a geny pro kondenzační enzym (NDLS, červeně). Zajímavý je gen *lmbN*, který se uplatňuje v biosyntéze MTL a zároveň jeho 5'-terminální část kóduje PCP, součást NDLS. Sekvence kódující ortologní PCP je přítomna i v genovém shluku pro biosyntézu celesticetinu, je však součástí jiného genu, 3'-terminální části *ccbZ*. Genový shluk pro biosyntézu celesticetinu obsahuje navíc geny pro biosyntézu salicylátu (hnědě), které chybějí v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu. Rozdíl je také v biogenezi aminokyselinového prekurzoru. Do struktury celesticetinu je zabudován přímo proteinogenní prolin, nejsou tedy nutné žádné speciální geny pro vznik této stavební jednotky. Na rozdíl od toho biosyntéza PPL, prekurzoru









linkomycinu, je kódována šesti geny (žlutě pruhované), které nejsou přítomny v genomovém shluku biosyntézy celesticetinu (KOBĚRSKÁ 2010).

Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu



Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu



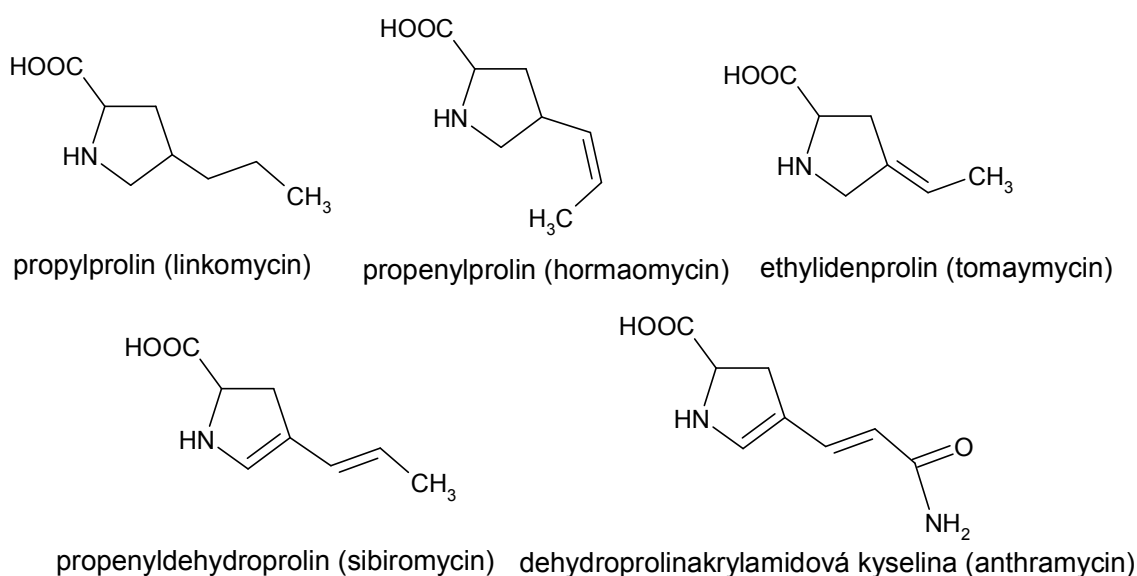
-  Geny pravděpodobně kódující podjednotky NDLS
-  Sekvence kódující PCP
-  Geny, které se pravděpodobně účastní biosyntézy aminocukerné části linkosamidů
-  Geny s neznámou funkcí
-  Geny specifické pro celesticetin
-  Geny specifické pro linkomycin, čárkovanou výplň mají geny, které se vyskytují i u PBD antibiotik
-  *lmbJ/ccbJ* kódují závěrečný krok biosyntézy, methylaci ND/LNDC
-  Rezistenční geny

Obr. 2.6: Genové shluky biosyntézy linkomycinu a celesticetinu. Převzato z KOBĚRSKÁ 2010.

Funkce naprosté většiny proteinů byly navrženy na základě sekvenčních srovnávacích analýz se známými proteiny a na základě výsledků inaktivací většiny genů linkomycinového genomového shluku. Přímou funkčním testováním proteinů však byla prokázána funkce jen u několika z nich. Jsou to proteiny LmbB2 a LmbB1, které katalyzují první dva kroky biosyntézy PPL (NOVOTNÁ *et al.* 2004, NOVOTNÁ 2008). Dále je to protein LmbC, který je součástí NDLS. Jedná se o aminoacyl-AMP-ligasu, fungující na stejném principu jako A doména NRPS. LmbC aktivuje adenylaci PPL (KADLČÍK v tisku). Dalším funkčně prokázaným enzymem je LmbJ, který katalyzuje poslední krok biosyntézy linkomycinu – methylaci N-demethyllinkomycinu (KADLEC 2000).

Nedávno byly publikovány i genové shluky pro biosyntézu tří PBD (anthramycin, sibiromycin, tomaymycin) (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b) a hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011). Ve všech se podle očekávání našly ortologní geny pro biosyntézu modifikovaného prolinu (Obr. 2.7). Genové shluky pro biosyntézu anthramycinu a sibiromycinu obsahují ortology všech šesti genů pro biosyntézu PPL linkomycinu, ale navíc obsahují další geny, které kódují enzymy pokračující v biosyntéze jejich dihydropyrrolových prekurzorů (HU

et al. 2007, LI *et al.* 2009a). Ve shluku genů pro biosyntézu tomaymycinu chybí ortolog proteinu LmbW, který zřejmě katalyzuje metylaci bočního řetězce prolinu, a proto tomaymycin má jen dvouuhlíkatý zbytek na prolinovém motivu (Obr. 2.7) namísto tříuhlíkatého (LI *et al.* 2009b). V genovém shluku pro biosyntézu hormaomycinu chybí ortolog LmbX. Důsledkem absence tohoto genu je přítomnost dvojné vazby v bočním řetězci prolinového derivátu (HÖFER *et al.* 2011).



Obr. 2.7: Prolinové deriváty vznikající různě modifikovanou PPL dráhou.

2.2.5 Evoluční propojení

Porovnání genových shluků linkosamidů, PBD a hormaomycinu (Obr. 2.8) naznačuje společné momenty molekulární evoluce těchto látek, což se odráží v evolučním propojení genových shluků. Při porovnání biosyntetických genových shluků linkosamidů lze pozorovat přenosy genetických elementů na třech úrovních – přenos bloků genů (modulární přenos), přenos jednotlivých genů i posun subgenových segmentů mezi sousedícími geny v genovém shluku. Genové shluky pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu sdílejí geny pro aminocukerný prekurzor a kondenzační enzym. Tyto geny jsou organizovány do kompaktních podshluků.

Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu vznikl zřejmě fúzí dvou genových shluků. Jedním byl shluk pro biosyntézu původního linkosamidu, který inkorporoval do struktury prolin, jako je tomu v biosyntéze celesticetinu, druhým byl zřejmě shluk pro biosyntézu PBD, inkorporující do své struktury PPL. Tento názor o směru přenosu genů podporuje to, že shluk genů pro PBD obsahuje kompaktnější uspořádání genů pro analog PPL. U charakterizovaných

genových shluků pro biosyntézu PBD tvoří ortology *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX* a *lmbY* řadu překrývajících se genů, pouze dvojice *lmbA* a *lmbW* ortologů je lokalizována na jiném místě shluku. Rozdělením původně konzervované čtveřice genů *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX*, *lmbY* na dvě dvojice i oddělení genů *lmbA* a *lmbW* je nepřímým důkazem, že geny pro dnešní PPL dráhu byly do genomu producenta linkomycinu přeneseny z nějakého původního genového shluku pro biosyntézu PBD (KOBĚRSKÁ 2010). Hypotézu o přenosu genů z producenta PBD do linkomycinového genového shluku také naznačuje odlišný stupeň diverzity PBD a linkosamidů. Přirozené linkosamidy jsou pouze dva a jen jeden z nich (linkomycin) kóduje ve svém shluku biosyntetickou dráhu pro PPL. Zato PBD tvoří širší skupinu biologicky aktivních látek, kdy většina z nich zřejmě kóduje modifikovanou PPL dráhu. Z identifikovaných struktur látek skupiny PBD je zřejmé, že u nich v PPL dráze došlo k delšímu vývoji, což se odráží v bohatším spektru modifikací PPL motivu. Je tedy pravděpodobné, že geny pro biosyntézu PPL byly přeneseny z producentů PBD, kde je tato dráha rozšířená, do producenta linkosamidu inkorporujícího do své struktury prolin.

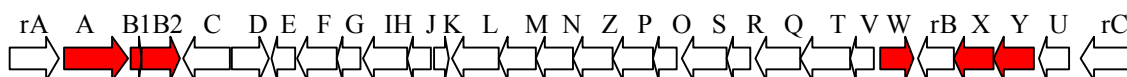
Aby mohly být nově přijaté geny pro biosyntézu PPL zařazeny do biosyntézy linkosamidu i funkčně, bylo zároveň nutné, aby nově vznikající PPL prekurzor mohl být kondenzačně spojen s aminocukernou částí. To se mohlo teoreticky stát dvěma způsoby. První způsob je ten, že s geny pro biosyntézu PPL byl producentem linkosamidu současně přijat i gen pro specifickou A doménu NRPS rozpoznávající PPL. To by bylo elegantní řešení, které by okamžitě s fúzí shluků zajistilo syntézu linkomycinu. Druhým způsobem je následná postupná změna substrátové specifity prolinové A domény kondenzačního enzymu z biosyntézy původního linkosamidu. I když je tento způsob vícestupňový, a tedy hůře představitelný, právě ten se v evoluci uplatnil. Byly charakterizovány A domény kondenzačních enzymů NDLS a N-demethylcelesticetinsynthetasy (NDCS), kondenzačního enzymu spojujícího prekurzory celesticetinu. NDCS si lze představit jako původní kondenzační enzym. A doména NDCS rozpoznává pouze prolinovou stavební jednotku, zatímco s PPL má nulovou aktivitu zřejmě kvůli sterickým nárokům tohoto atypického substrátu. Aby byla schopná rozpoznat větší substrát, jakým je PPL, muselo dojít ke změně substrátové specifity. Bylo prokázáno, že několika bodovými mutacemi v aktivním místě došlo ke zvětšení prostoru v dutině aktivního místa. Konkrétně A doména NDCS tvoří aktivní místo, jehož součástí jsou aminokyselinové zbytky VFYCALVC, zatímco aktivní místo NDLS obsahuje aminokyselinové zbytky VALVAIGC. Rozdíl je v pěti aminokyselinových zbytcích, z nichž ALG A domény NDLS mají menší boční řetězce než FYV A domény NDCS (KADLČÍK v tisku).

Recentní článek o biosyntéze hormaomycinu a jeho genovém shluku ukázal, že hormaomycin obsahuje také PPL motiv. Oproti genovému shluku pro biosyntézu linkomycinu obsahuje jen pět ortologních genů pro modifikovanou PPL dráhu. Chybí mu ortolog *LmbX* (HÖFER *et al.* 2011). Evoluční propojení hormaomycinu s PBD a linkosamidy nebylo zatím

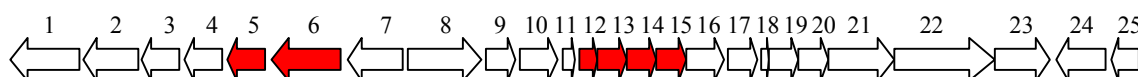
naznačeno, ale zřejmě genový shluk pro biosyntézu hormaomycinu přijal také geny od producenta PBD.

Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu se od shluku pro biosyntézu celesticetinu liší také přítomností genu *lmbU* (KOBĚRSKÁ 2010). Jeho ortolog *hrmB* je obsažen ve shluku pro biosyntézu hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011). Další ortology jsou obsaženy v genových shlucích pro aminokumarinová antibiotika – *cloE* chlorobiocinu, *novE* novobiocinu a *couE* kumermycinu A (EUSTAQUIO *et al.* 2003). Proteinu NovE byla prokázána funkce. Funguje jako pozitivní regulátor biosyntézy novobiocinu (DANGEL *et al.* 2008). Ortologem je také *rubC4*, gen z genového shluku pro biosyntézu rubradirinu. Je to složité antibiotikum obsahující také aminokumarinovou složku (KIM *et al.* 2008). Je zajímavé, že producent rubradirinu je varieta producenta tomaymycinu. U této variety však produkce tomaymycinu nebyla stanovována. Syntéza všech těchto látek vychází z tyrosinu, ale u aminokumarinů prochází jinou biosyntetickou dráhou. Původ genu *lmbU* ve shluku pro biosyntézu linkomycinu je otázkou. Je možné, že tento gen byl přenesen spolu s geny pro biosyntézu PPL z nějakého necharakterizovaného producenta PBD nebo s geny ze shluku pro biosyntézu hormaomycinu. Jak již bylo zmíněno, v tomto genovém shluku však chybí ortolog *lmbX*. Kdyby se podařilo charakterizovat nějaký genový shluk, kde by byly přítomné všechny geny pro biosyntézu PPL i gen *lmbU*, pak by se zřejmě jednalo o shluk genů, z kterého pocházejí ortologní geny genového shluku pro biosyntézu linkomycinu.

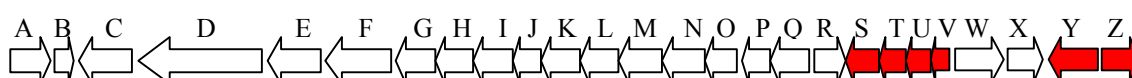
Linkomycin – lmb (biosyntéza), lmr (rezistence)



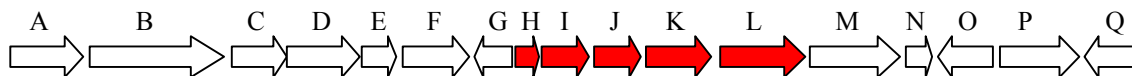
Anthramycin – orf



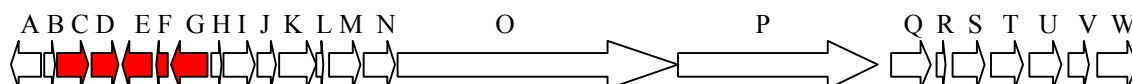
Sibiromycin – sib



Tomaymycin – tom



Hormaomycin – hrm



Obr. 2.8: Genové shluky pro biosyntézu linkomycinu (EU124663.1 – číslo v databázi GenBank), anthramycinu (EU195114.1), sibiromycinu (FJ768674.1), tomaymycinu (FJ768957.1) a hormaomycinu (HQ542230.1). Červeně jsou znázorněny ortologní geny účastníci se biosyntézy prolinových derivátů.

2.3 Propylprolinová dráha

Dráha pro biosyntézu PPL byla identifikována zatím u tří skupin látek – u linkomycinu, některých PBD a hormaomycinu. Ortologní geny a jejich funkce shrnuje Tab. 2.1. Tato kapitola se zaměřuje na konkrétní sled reakcí vedoucích k PPL v biosyntéze linkomycinu (Obr. 2.9) a k jeho derivátům u PBD a hormaomycinu. První ucelený návrh biosyntézy PPL byl představen v roce 1984 (BRAHME *et al.* 1984).

Výchozí látkou této dráhy je L-tyrosin. Pomocí radioaktivně značeného tyrosinu bylo zjištěno, že dusík a sedm z devíti uhlíků tyrosinu zůstávají v molekule PPL (WITZ *et al.* 1971). Poté byl potvrzen stejný prekurzor i u PBD (HURLEY *et al.* 1975). Tyrosin vzniká klasickou cestou přes šikimátovou dráhu (BRAHME *et al.* 1984).

První dvě reakce PPL dráhy jsou funkčně prokázány. Nejprve je aromatické jádro tyrosinu hydroxylováno na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA). Tuto reakci katalyzuje protein LmbB2/ORF13/SibU/TomI/HrmE (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). Funkce byla prokázána nezávisle hned dvakrát na ortolozích LmbB2 a ORF13. Podle obou prací obsahuje enzym Fe-protoporfyrin IX (hem b). Enzym LmbB2 byl charakterizován jako tyrosinhydroxylasa, která používá jako donor redoxních ekvivalentů tetrahydrobiopterin.

LmbB2 tvoří samovolně peroxid vodíku (NOVOTNÁ 2008). ORF13 byl identifikován jako peroxidasa, která vyžaduje pro svou aktivitu peroxid vodíku. V této práci však nebyl testován možný vliv kofaktorů (CONNOR *et al.* 2011).

Následuje 2,3-extradiolové štěpení, při kterém se nejprve rozštěpí aromatické jádro a vzniká 5-alanyl-2-hydroxymukonát-6-semialdehyd (COLABROY *et al.* 2008). Následně dochází k cyklizaci do pyrrolového kruhu. Vzniká žlutá látka, kyselina 4-(3-karboxy-3-oxopropenyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-2-karboxylová. Tuto druhou funkčně prokázanou reakci katalyzuje LmbB1 (NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNÁ *et al.* 2004). Je to L-DOPA-2,3-dioxygenasa, která pro svou aktivitu potřebuje železnaté ionty, které jsou připojeny na dva histidinové zbytky enzymu (COLABROY *et al.* 2008). Ortologní proteiny LmbB1 jsou – ORF12/SibV/TomH/HrmF (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011).

Další kroky biosyntézy PPL jsou jen předpokládáné. Funkce ostatních enzymů PPL dráhy byly navrženy dle srovnávací analýzy jejich sekvencí. Funkce proteinů v biosyntéze PPL navržené v publikacích analyzujících jednotlivé biosyntetické shluky genů nejsou vždy doložitelné sekvenční analýzou vzhledem k unikátnosti dráhy i stupni jejího poznání, někdy jsou i poněkud v nesouladu. Týká se to především proteinů LmbX a LmbA.

Předpokládá se, že LmbX katalyzuje třetí reakci PPL dráhy. V publikované literatuře je navrženo, že tento protein a jeho ortology ORF15/SibS/TomK katalyzují hydrolýzu C-C vazby a odštěpení dvouuhlíkatého řetězce (LI *et al.* 2009a). Tato funkce nevyplývá ze sekvenčních analýz, ale byla tomuto proteinu přisouzena, protože byl nejméně charakterizovaný a bylo zřejmé, že v biosyntéze PPL dochází ke štěpení bočního řetězce prolinu. Z této představy vycházela i tato diplomová práce, která je zaměřena na potvrzení funkce proteinu LmbX, který by měl dále přeměňovat výsledný produkt reakcí katalyzovaných proteiny LmbB2 a LmbB1. V průběhu práce však byl publikován článek o biosyntéze hormaomycinu, jehož genový shluk ortolog LmbX neobsahuje. Zajímavé je, že produkovaný PPL derivát (Obr. 2.7) nemá takovou strukturu, jakou by měl mít, kdyby LmbX řídil hydrolýzu C-C vazby (HÖFER *et al.* 2011). Teoreticky by se měl produkovat derivát PPL, který má v bočním řetězci o jeden uhlík méně (jeden uhlík je kompenzován následnou methylací). Nicméně prekurzor hormaomycinu je propenyprolin – struktura s dvojnou vazbou na bočním tříuhlíkatém řetězci (HÖFER *et al.* 2011). Může se zdát, že LmbX tedy katalyzuje redukci dvojných vazeb. Funkce reduktasy však vůbec nevyplývá z proteinové sekvence LmbX. LmbX je podobný isomerasám. Proteinu LmbX a jemu podobným proteinům se věnuje kapitola 2.3.1.

Dle literatury by po hydrolytickém štěpení bočního řetězce měla následovat methylace katalyzovaná methyltransferasou LmbW/ORF5/SibZ/HrmC. Tato methylace je spojená s tautomerizací, kdy dochází k přesunu dvojných vazeb (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). Donorem methylové skupiny je S-adenosylmethionin

(ARGOUEDELIS *et al.* 1969). Methytransferasa však zjevně nepřeměňuje veškerý svůj substrát, neboť při fermentaci *S. lincolnensis* dochází k minoritní produkci linkomycinu B, což je linkosamid, který se liší od linkomycinu právě přítomností této methylové skupiny na bočním řetězci prolinu (BRAHME *et al.* 1984). V genovém shluku pro biosyntézu tomaymycinu ortolog této methytransferasy chybí, což má za následek pouze dvouuhlíkatý boční řetězec ve struktuře tomaymycinu (Obr. 2.7). Protože i u prekursoru tomaymycinu dochází k přesunu dvojných vazeb, kóduje ve svém shluku na rozdíl od ostatních látek tautomerasu TomN. Nedávno byla charakterizována, ale nemohla být dokázána její funkce, protože není dostupný její předpokládaný substrát. Zdá se ale, že funguje jinak. Je možné, že katalyzuje přesun dvojných vazeb u okamžitého produktu extradiolového štěpení katalyzované ortologem LmbB1 a až následně dochází k hydrolýze řetězce (BURKS *et al.* 2011).

Dále musí dojít k redukci dvojných vazeb. Ty redukuje zřejmě F420 dependentní reduktasa LmbY/ORF14/SibT/TomJ/HrmD (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). Na konci 80. let byl objeven kosyntetický faktor linkomycinu, který je nutný pro biosyntézu PPL. Pokud ho bakterie neprodukuje, pak se linkomycin nesyntetizuje (COATS *et al.* 1989). Jeho struktura byla určena jako 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin a odpovídá fragmentu koenzymu F420 (KUO *et al.* 1989). Byl určen i intermediát PPL dráhy, který vzniká bez přítomnosti tohoto koenzymu. Jedná se o 4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylovou kyselinu (KUO *et al.* 1992). Obecně aby byl koenzym F420 kompletní, musí být k fragmentu F420 připojen fosfolaktát (GRAUPNER *et al.* 2002) a dále jsou ke koenzymu připojeny glutamátové zbytky, po jejichž navázání se stává enzym aktivním (LI *et al.* 2003). V literatuře o biosyntéze PPL derivátů je uvedeno, že připojení glutamátových zbytků katalyzuje γ -glutamyltransferasa LmbA/ORF6/SibY/TomL/HrmG, která je kódována všemi charakterizovanými biosyntetickými shluky (PESCHKE *et al.* 1995, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). Tento předpoklad je ale zřejmě chybný. Obecně připojení glutamátových zbytků k F420 katalyzuje glutamátligasa (LI *et al.* 2003), která nemá žádnou podobnost s ortology LmbA. Ve skutečnosti γ -glutamyltransferasa katalyzuje štěpení γ -glutamylu (C-N vazby) z různých látek obsahujících γ -glutamyl, např. z glutathionu, a jeho uvolnění nebo přenos na další aminokyseliny nebo peptidy. Jsou to Ntn-hydrolasy (N-terminální nukleofil). Účastní se transportu a metabolismu aminokyselin. N-konec γ -glutamyltransferas funguje jako signální peptid a zajišťuje export do periplazmatického prostoru (OKADA *et al.* 2006). Ovšem LmbA tento N-terminální signální peptid postrádá, což napovídá funkci vnitrobuněčné (PESCHKE *et al.* 1995). Zdá se, že přenos γ -glutamátu do PPL dráhy nezapadá, ale zřejmě má v biosyntéze PPL důležitou roli (součást diskuze).

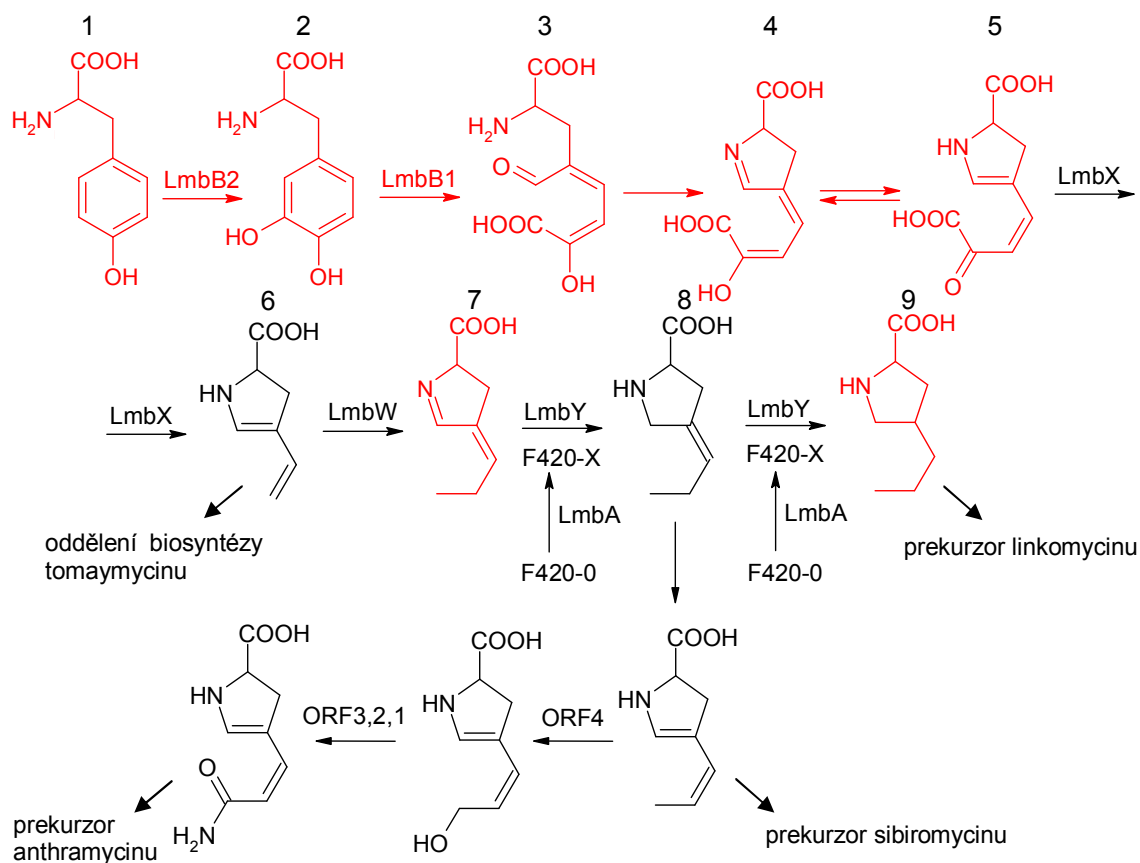
Po redukci jedné dvojných vazby se biosyntézy zmiňovaných látek rozcházejí. Biosyntéza prekursoru tomaymycinu a hormaomycinu touto částečnou redukcí bočního řetězce prolinového derivátu končí (LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011). U linkomycinu dochází zřejmě ještě

k jedné redukci katalyzované LmbY a vzniká PPL. Biosyntéza prekurzorů anthramycinu a sibiromycinu pokračuje oxidací, vytváří se dvojná vazba a vzniká propenyldehydroprolin, což je prekurzor sibiromycinu. Tuto oxidaci katalyzuje ORF7/SibW, FAD dependentní oxidoreduktasa (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a).

Syntéza dehydroprolinakrylamidové složky anthramycinu (Obr. 2.9) pokračuje tautomerizací nesaturovaného iminu na dienamin, který prochází hydroxylací na koncové methylové skupině. Tuto reakci katalyzuje zřejmě cytochrom P450 hydroxylasa ORF4. Dále dochází k oxidaci na aldehyd a následně na karboxylovou kyselinu. Enzymy pro tuto reakci (ORF3, ORF2) jsou podobné alkoholdehydrogenase a aldehyddehydrogenase. Posledním krokem je amidace amidotransferasou ORF1 (HU *et al.* 2007). Shluk genů pro biosyntézu anthramycinu tedy obsahuje oproti linkomycinu pět dalších genů, které by mohly být využity k přípravě hybridních látek.

gen	přístupové číslo v databázi GenBank	předpokládaná funkce proteinu	homology (% podobnosti s geny linkomycinu)
<i>lmbA</i>	ABX00597.1	γ -glutamyltransferasa	<i>orf6</i> (75 %), <i>tomL</i> (60 %), <i>sibY</i> (58 %), <i>hrmG</i> (65 %)
<i>lmbB1</i>	ABX00598.1	L-DOPA-2,3-dioxygenasa	<i>orf12</i> (49 %), <i>tomH</i> (59 %), <i>sibV</i> (57 %), <i>hrmF</i> (56 %)
<i>lmbB2</i>	ABX00599.1	L-tyrosin-3-hydroxylasa	<i>orf13</i> (41 %), <i>tomI</i> (42 %), <i>sibU</i> (45 %), <i>hrmE</i> (48 %)
<i>lmbW</i>	ABX00619.1	metyltransferasa	<i>orf5</i> (78 %), <i>sibZ</i> (62 %), <i>hrmC</i> (56 %)
<i>lmbX</i>	ABX00621.1	neznámá funkce	<i>orf15</i> (35 %), <i>tomK</i> (48 %), <i>sibS</i> (45 %)
<i>lmbY</i>	ABX00622.1	F420 dependentní reduktasa	<i>orf14</i> (52 %), <i>sibT</i> (56 %), <i>tomJ</i> (55 %), <i>hrmD</i> (48 %)

Tab. 2.1: Přehled genů, které kódují enzymy katalyzující reakce PPL dráhy linkomycinu, a jejich ortologů v genových shlucích anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu a hormaomycinu. Prokázané funkce enzymů jsou znázorněny tučně. Analýza proteinových sekvencí pomocí aplikace pBLAST.



Obr. 2.9: Schéma propylprolinové dráhy. 1 – tyrosin; 2 – DOPA; 3 – 5-alanyl-2-hydroxymukonát-6-semialdehyd; 4 – enol forma látky 5; 5 – 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina; 6 – 4-vinyl-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina; 7 – 4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylová kyselina; 8 – 4-propyliden-tetrahydropyrrol-2-karboxylová kyselina; 9 – propylprolin. Červeně jsou znázorněny látky, které byly identifikovány jako intermediáty biosyntézy PPL, a enzymy, jejichž funkce byla prokázána. Na posledním řádku je schéma dokončení biosyntézy dehydroprolinakrylamidu, prolinového derivátu anthramycinu. Schéma vytvořeno dle HU *et al.* 2007, COLABROY *et al.* 2008, LI *et al.* 2009a.

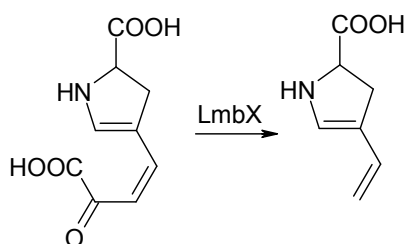
2.3.1 LmbX

2.3.1.1 Obecné informace

LmbX je protein účastnící se biosyntézy PPL – prekurzoru a stavební jednotky linkomycinu. Tato funkce byla prokázána inaktivací genu *lmbX*, která vedla k zastavení produkce linkomycinu. Po přidání PPL nebo jeho derivátů do média byla produkce linkomycinu nebo jeho derivátů obnovena (ULANOVÁ *et al.* 2010). Gen *lmbX* je ve společném operonu s *lmbY* a jeho transkripce se zahajuje z promotoru umístěného před *lmbY*. Oba geny se přepisují z mínus vlákna a překrývají se ve čtyřech nukleotidech. Gen *lmbX* je velký 891 bp, které jsou překládány do 296 aminokyselinových zbytků. Vypočtená molekulová hmotnost proteinu LmbX je 30727 Da.

V době, kdy byla zadána diplomová práce, se předpokládalo, že LmbX katalyzuje hydrolyzu C-C vazby bočního řetězce produktu reakce řízené LmbB1 (Obr. 2.10) (LI *et al.*

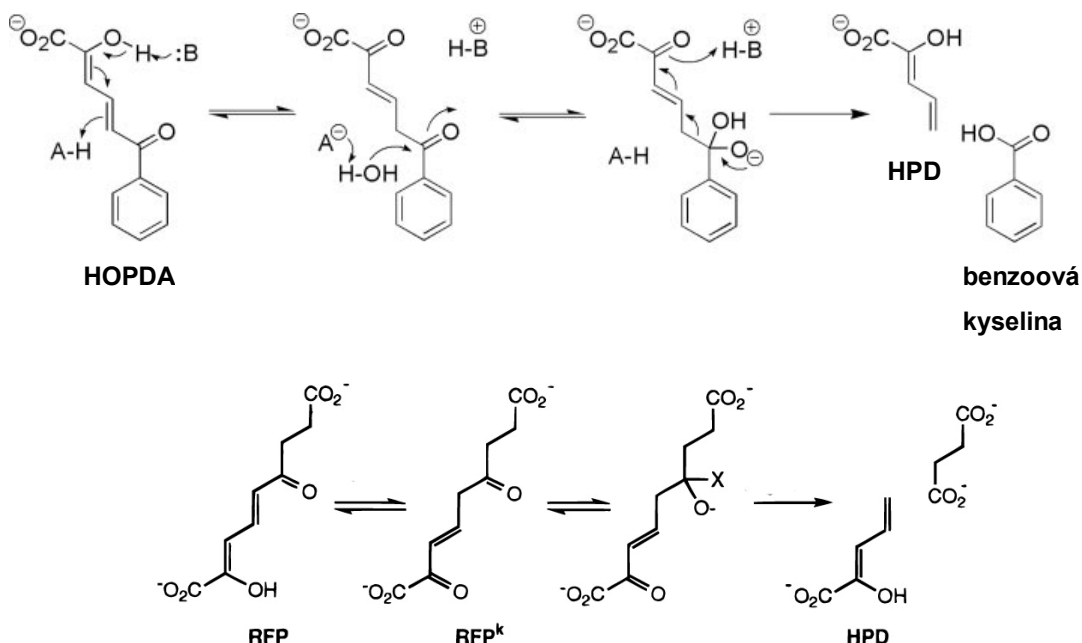
2009a). Tato hypotéza byla v souladu s dosavadními poznatky. Ovšem v průběhu práce byly zjištěny nové skutečnosti. Byl popsán genový shluk pro biosyntézu hormaomycinu, kterému chybí ortolog LmbX (HÖFER *et al.* 2011) a byla revidována funkce PhzF (AHUJA *et al.* 2008), což je protein podobný LmbX (kapitola 2.3.1.3.1). Tyto nové poznatky naznačují, že funkce LmbX může být jiná. Ovšem hydrolytickou funkci proteinu LmbX zatím vyloučit nelze. Hydrolytická funkce však nevyplývá ani ze srovnávací analýzy proteinů (pBLAST), kdy nebyl nalezen žádný podobný protein s odpovídající funkcí. LmbX patří do proteinové rodiny PhzC-PhzF, rodiny proteinů podobných proteinům biosyntézy fenazinu (phenazine biosynthesis-like protein; pfam02567).



Obr. 2.10: Navržená reakce katalyzovaná LmbX. Schéma vytvořeno dle LI *et al.* 2009a.

2.3.1.2 Proteiny s hydrolytickou funkcí

Proteiny BphD a MhpC byly označeny v literatuře jako funkčně podobné LmbX (LI *et al.* 2009a, BURKS *et al.* 2011). Nicméně žádnou strukturní podobnost s ním nesdílejí. BphD i MhpC jsou hydrolasy C-C vazby a jsou si navzájem velmi podobné. BphD štěpí 2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienovou kyselinu (HOPDA) na kyselinu benzoovou a 2-hydroxy-2,4-pentadienovou (HPD; Obr. 2.11). Tato reakce je zahrnuta v degradaci aromatických uhlovodíků, bifenyliů. BphD je ve formě tetrameru (HORSMAN *et al.* 2007). MhpC katalyzuje štěpení 2-hydroxy-6-keto-nona-2,4-dien-1,9-diové kyseliny (RFP) na HPD a sukcinát (Obr. 2.11) (HENDERSON a BUGG 1997). Z analýzy proteinových sekvencí těchto hydrolas a LmbX (pBLAST) vyplývá, že se tyto proteiny vůbec nepodobají LmbX.



Obr. 2.11: Enol-keto tautomerizace a hydrolýza katalyzovaná BphD (nahore) a MhpC (dole). Převzato a upraveno z HORSMAN *et al.* 2007, HENDERSON a BUGG 1997.

2.3.1.3 Proteiny podobné LmbX

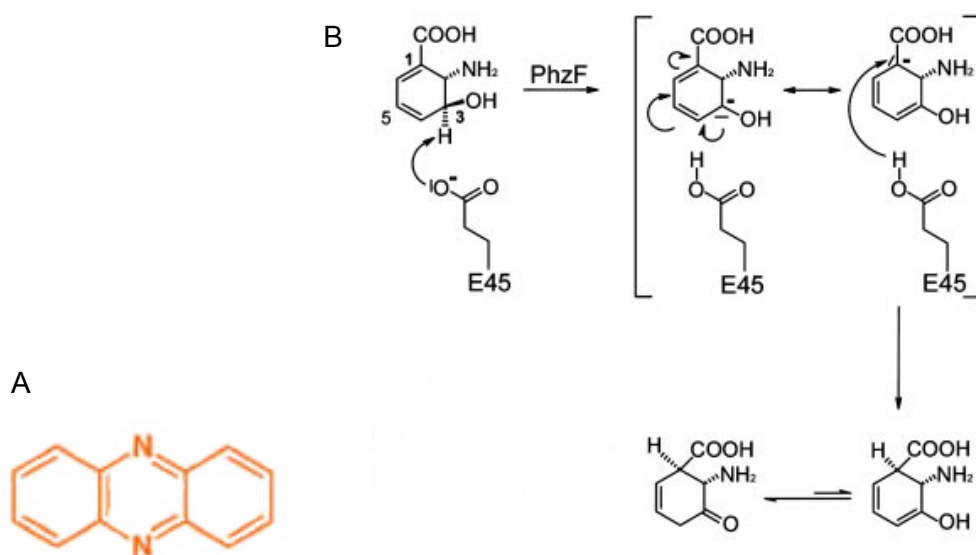
LmbX patří do proteinové rodiny PhzC-PhzF, kam patří proteiny podobné proteinům, které se účastní biosyntézy fenazinu. Tato rodina je odvozena od PhzF *Pseudomonas fluorescens*. (Poznámka: Část názvu PhzC je zřejmě odvozena od PhzC *Pseudomonas aureofaciens*, což je ortologní protein PhzF (MAVRODI *et al.* 1998).) Těmto proteinům se věnuje kapitola 2.3.1.3.2. Členové PhzC-PhzF rodiny jsou vzdáleně příbuzní s DapF – epimerasou diaminopimelátu (DAP).

2.3.1.3.1 PhzF

PhzF *Pseudomonas fluorescens* je enzym, od kterého je odvozena proteinová rodina, do které patří i LmbX. PhzF se účastní biosyntézy fenazinů, což jsou biologicky aktivní látky s širokým spektrem účinků. Účastní se oxidačně redukčních reakcí, podílejí se na tvorbě biofilmu, regulují genovou expresi, působí jako faktory virulence, atd. Jedná se o heterocyklické dusíkaté sloučeniny, které jsou různě modifikované. Producenty fenazinů jsou Gram pozitivní i Gram negativní bakterie. Nejvíce je biosyntéza fenazinů zkoumána u pseudomonád, ale fenaziny se vyskytují i u streptomycet (PIERSON a PIERSON 2010). Funkce a trojrozměrná struktura PhzF *Pseudomonas fluorescens* je již známa. PhzF je dimer, který obsahuje katalytické místo na každém monomeru mezi N-koncovou a C-koncovou doménou. Při vazbě substrátu se k sobě monomery přiblíží. Nejprve se myslelo, že PhzF katalyzuje vznik tricyklické látky, fenazinové kostry (Obr. 2.12A), který následuje po izomeraci (BLANKENFELDT *et al.*

2004). Následně se však ukázalo, že řídí pouze izomeraci (Obr. 2.12B), zatímco kondenzaci katalyzují enzymy PhzA/B (AHUJA *et al.* 2008). Substrátem PhzF je *trans*-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilová kyselina. Na katalytický zbytek glutamátu E45 je navázán vodík z C3 substrátu, dojde k přesunu dvojných vazeb a odebraný vodík je vrácen na C1. S tím je spojena oxidace alkoholu na keton. Další významné aminokyselinové zbytky účastníci se hlavně vazby substrátu a vytvářející aktivní místo jsou zbytky histidinu H74 a aspartátu D208 (BLANKENFELDT *et al.* 2004).

Zástupcem streptomycet produkujících fenaziny je *Streptomyces cinnamomensis*, která produkuje isoprenylované fenaziny nazývané endofenaziny. Obsahuje tedy i ortolog PhzF (SEEGER *et al.* 2011). LmbX je logicky více podobný EpzF ze *Streptomyces cinnamomensis* než PhzF z *Pseudomonas fluorescens*, protože producenti linkomycinu a endofenazinů jsou taxonomicky více příbuzní, respektive jsou jednoho rodu. LmbX obsahuje protějšky všech klíčových aminokyselinových zbytků PhzF *Pseudomonas fluorescens* – E45, H74 i D208.

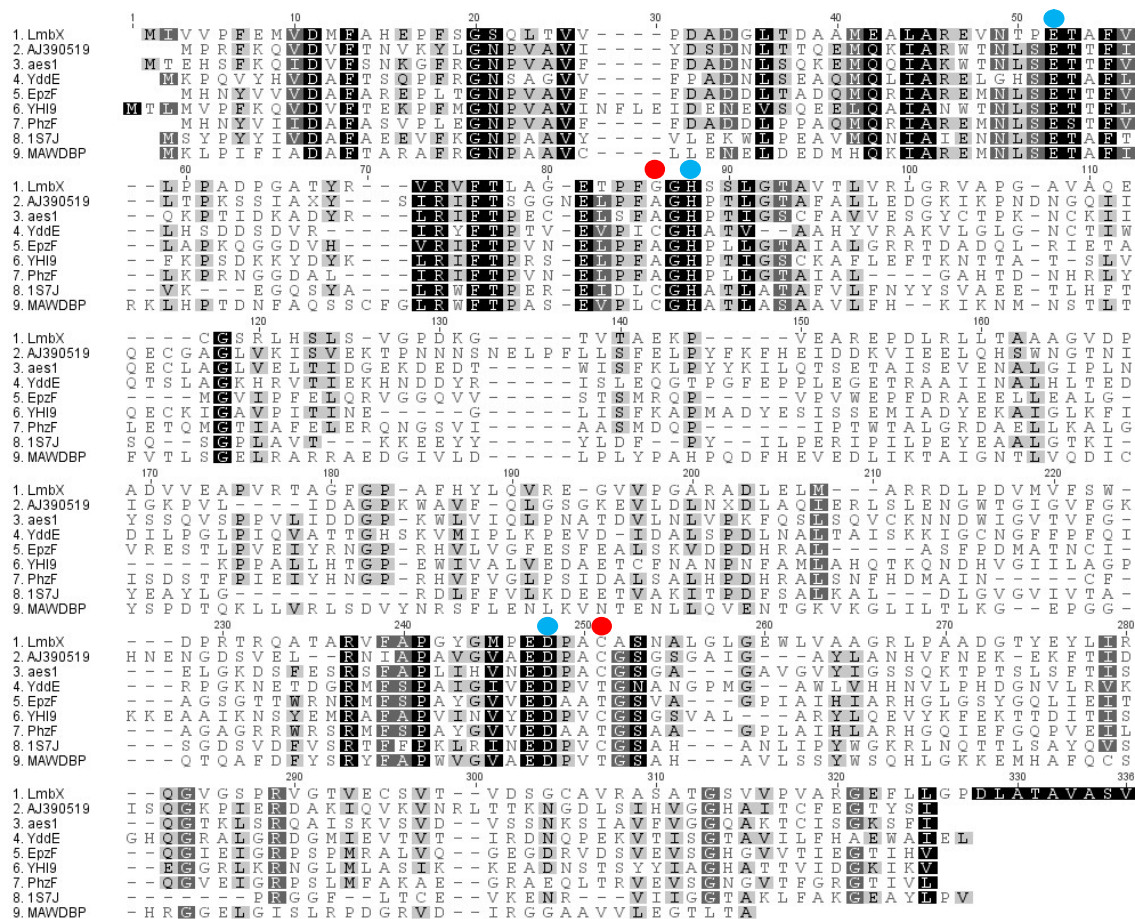


Obr. 2.12: Fenazinová kostra (A), reakce katalyzovaná PhzF (B) Převzato a upraveno z BLANKENFELDT *et al.* 2004 a AHUJA *et al.* 2008.

2.3.1.3.2 Proteinová rodina PhzC-PhzF

Proteiny rodiny PhzC-PhzF tvoří velkou skupinu, která má přes tisíc členů (dle databáze GenBank). Patří sem proteiny vyskytující se jak u prokaryot, tak eukaryot. Jsou to především hypotetické proteiny, ovšem některé byly i charakterizovány a byla u nich určena kvartérní struktura. Ovšem u žádného nebyla prokázána funkce. Na Obr. 2.13 je znázorněno porovnání aminokyselinových sekvencí některých proteinů patřících do PhzC-PhzF rodiny, PhzF a EpzF. Je patrné, že všechny tyto proteiny obsahují dvě oblasti s vyšší mírou homologie. Je to oblast pokrývající zhruba prvních sto aminokyselinových zbytků a oblast nacházející se zhruba

70 aminokyselinových zbytků od C-konce proteinů. Tyto dvě homologní oblasti naznačují, že aktivní místo proteinů bude stejně jako u PhzF mezi N-koncovou a C-koncovou doménou. Navíc tyto oblasti mají konzervovány všechny důležité aminokyselinové zbytky PhzF (E45, H74, D208; označeno modrým kolečkem).

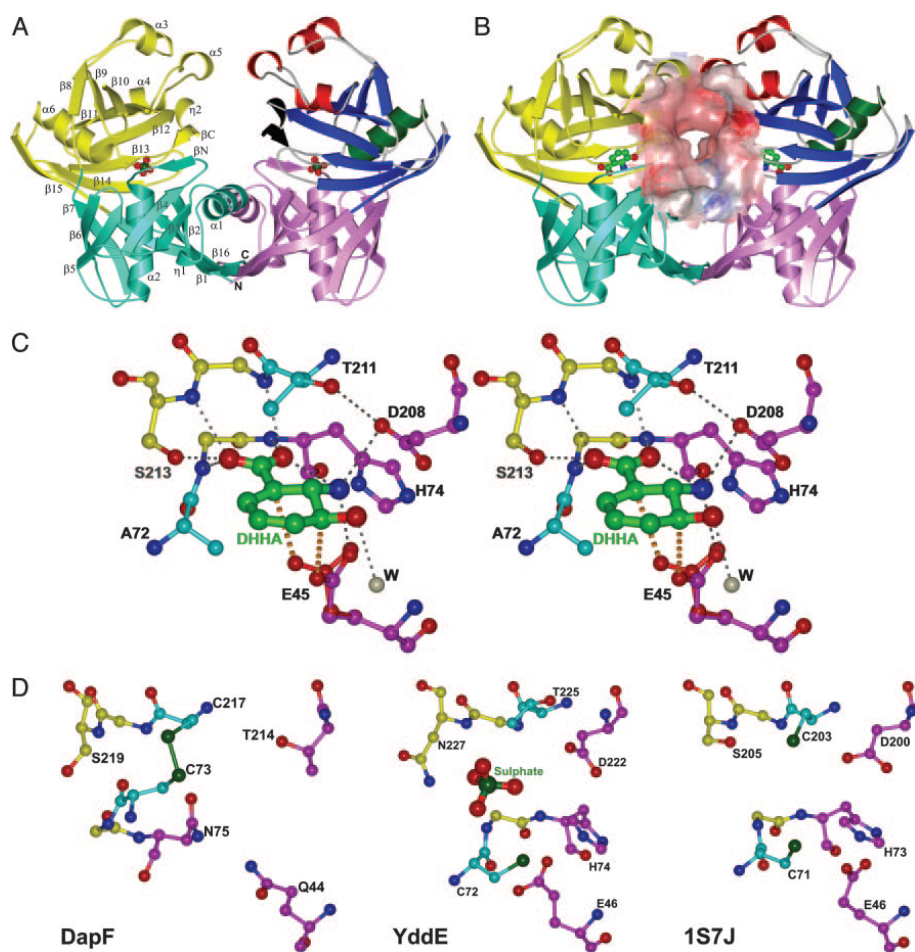


Obr. 2.13: Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinů, které jsou členy PhzF proteinové rodiny. Stupně šedi označují míru konzervace. Černě podbarveny jsou aminokyseliny, které se vyskytují u všech porovnávaných proteinů. Od tmavě šedé postupuje menší konzervovanost aminokyselin. Modrými kolečky jsou označeny aminokyselinové zbytky odpovídající důležitým aminokyselinovým zbytkům PhzF. Červenými kolečky jsou označeny aminokyseliny odpovídající cysteinovým zbytkům DapF.

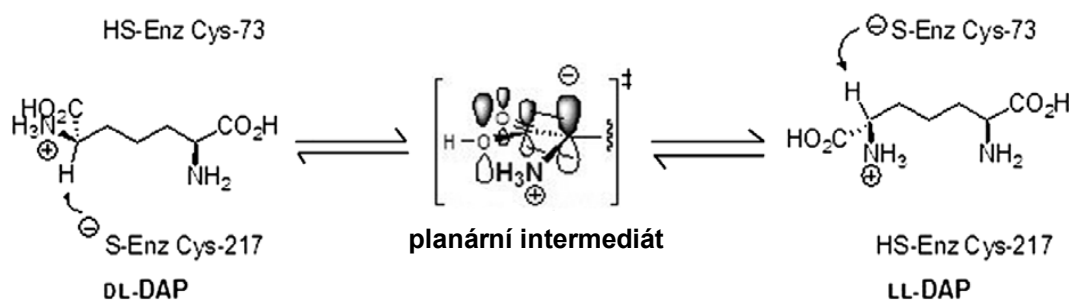
Kvartérní struktury PhzF a některých charakterizovaných proteinů PhzC-PhzF rodiny jsou vysoce homologní s kvartérní strukturou DapF (Obr. 2.14.) (BLANKENFELDT *et al.* 2004), epimerasou DAP, i když jejich aminokyselinové sekvence jsou velmi málo podobné. DapF katalyzuje změnu v prostorovém uspořádání molekuly LL-DAP na *meso*-DAP (DL-DAP; Obr. 2.15). To je nezbytná součást peptidoglykanu buněčné stěny Gram negativních bakterií a je to také přímý prekurzor v syntéze L-lysinu. Nejvíce je studována DapF *Haemophilus influenzae*. Mechanismus prostorové izomerace spočívá v přítomnosti dvou katalytických zbytků cysteinu, které se chovají jako kyselina a zásada. C73 (v N doméně) je ve formě thiolátu a chová se jako báze, takže deprotonuje alfa uhlík. Zbytek C217 (v C doméně) se naopak chová

jako kyselina (je ve formě thiolu) a vrací vodík k intermediátu z opačné strany (KOO a BLANCHARD 1999). Kvartérní struktura DapF *Haemophilus influenzae* byla zjištěna nejprve u enzymu v neaktivní formě. DapF je ve formě monomeru, který se skládá ze dvou domén a na rozhraní domén se nachází oba cysteinové zbytky (CIRILLI *et al.* 1998). Později byla publikována kvartérní struktura DapF v aktivní formě (PILLAI *et al.* 2007). Trojrozměrná struktura byla určena také u epimerasy DAP *Mycobacterium tuberculosis* (USHA *et al.* 2009).

Charakterizované proteiny PhzC-PhzF rodiny sdílejí s DapF vždy jeden katalytický cysteinový zbytek (IS7J sdílí oba; červené kolečko na Obr. 2.13). Není prokázáno, jestli jsou tyto cysteinové zbytky u PhzC-PhzF rodiny nezbytné pro aktivitu, ale bylo navrženo, že u proteinů, které mají analogní C72 může E45 buď reprotonovat substrát nebo aktivovat bázi a konzervovaný glutamát C domény může zastoupit roli kyseliny. U skupiny proteinů, které mají odpovídající aminokyselinový zbytek k C217 bylo navrženo, že substrát může být deprotonován konzervovaným E45 a reprotonován cysteinovým zbytkem. Samotný PhzF nemá žádný homologní katalytický cysteinový zbytek (BLANKENFELDT *et al.* 2004).



Obr. 2.14: Kvartérní struktura PhzF v otevřené formě, bez přítomnosti substrátu (A). Kvartérní struktura PhzF v uzavřené formě se substrátem (B). Aktivní místo PhzF s navázaným substrátem (DHHA; C). Aktivní místa podobných proteinů (D). Převzato z BLANKENFELDT *et al.* 2004.



Obr. 2.15: Mechanismus reakce katalyzované diaminopimelát epimerasou u *Haemophilus influenzae*. Převzato z PILLAI *et al.* 2007.

Do proteinové rodiny PhzC-PhzF patří YddE *Escherichia coli*, 1S7J *Enterococcus faecalis*, YHI9 *Saccharomyces cerevisiae*, aes1 *Schizosaccharomyces pombe*, hypotetický protein AJ390519 *Candida albicans* a MAWDBP *Homo sapiens*. Kvartérní struktura proteinu YddE byla určena dvěma nezávislými vědeckými skupinami. YddE je dimer, kde každý monomer je složený ze dvou domén a katalytické místo je stejně jako u PhzF a DapF mezi doménami (BLANKENFELDT *et al.* 2004, GRASSICK *et al.* 2004). YddE obsahuje C72 enzymu DapF *Haemophilus influenzae*. Tento cysteinový zbytek byl určen u YddE jako flexibilní a při krystalizaci proteinu vázal kovalentně glycerol. Takže je možné, že se tento cysteinový zbytek katalytické reakce účastní (GRASSICK *et al.* 2004). Stejnou architekturu proteinu má i 1S7J (BLANKENFELDT *et al.* 2004) a YHI9 (LIGER *et al.* 2005). YHI9 a jeho ortology aes1 a hypotetický protein AJ390519 jsou proteiny kvasinek. Protein aes1 (aes – antisense enhancing sequences) snižuje úroveň exprese genů zesílením působení antisense RNA (RNA, která je komplementární k mRNA a brání translaci) (RAPONI a ARNDT 2002). Ovšem u YHI9 nebyly nalezeny RNA vazebné vlastnosti, takže zřejmě tyto proteiny fungují jinak (LIGER *et al.* 2005). MAWDBP je lidský protein s neznámou funkcí. Poprvé byl identifikován jako vazebný partner domnělého aktivátoru mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK) s WD repetitivy. Exprese byla pozorována v mnoha tkáních, takže má pravděpodobně základní buněčnou funkci (IRIYAMA *et al.* 2001). Možná se účastní MAPK signální dráhy. MAWDBP se zřejmě skládá z tří až pěti monomerů. (HERDE a BLANKENFELDT 2006).

Všechny výše popsané proteiny jsou zahrnuty do Tab.2.2, která popisuje jejich podobnost s LmbX. Z porovnání proteinových sekvencí vyplývá, že funkce LmbX bude zřejmě podobná zatím neznámé funkci kvasinkových proteinů. Tyto proteiny sdílejí konzervované aminokyselinové zbytky zhruba po celé délce jejich sekvence (Obr. 2.16). Nicméně jediný podobný protein s prokázanou funkcí je isomerasa PhzF, proto je možné, že LmbX bude katalyzovat izomeraci nějakého intermediátu PPL dráhy.

	kódy v databázi Protein Data Bank (PDB)	E hodnota
hypotetický protein AJ390519 (<i>Candida albicans</i>)	-	1e-29
aes1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	-	1e-27
YddE (<i>Escherichia coli</i>)	1SDJ, 1QI9, 1QIA	1e-23
EpzF (<i>Streptomyces cinnamomensis</i>)	-	1e-22
YHI9 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1YM5	2e-21
PhzF (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	1U1V, 1U1W, 1U1X	5e-18
1S7J (<i>Enterococcus faecalis</i>)	1S7J	1e-13
MAWDBP (<i>Homo sapiens</i>)	-	3e-10
DapF (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	3FVE	0,035
DapF (<i>Haemophilus influenzae</i>)	1GQZ, 2Q9H, 2Q9J	0,14

Tab. 2.2.: Přehled proteinů podobných LmbX. Míru homologie určuje E hodnota.

1. LmbX	M I V V E R E M V D M F A H E P P R S G S Q L I T V - - - - V P D A D G L L T D A A M E A L A R E V N I T P E T A E
2. AJ390519	M P R R E K Q V D V E T N V K Y L G N P V A V - - - - I Y D S D N I L T Q E M Q K L A R W T N I S E T T E
3. aes1	M T E H S R E K Q L D V E S N K G P R G N P V A V - - - - F E D A D N I S Q K E M Q Q L A K W T N I S E T T E
4. YHI9	M T L M V E R E K Q V D V E T E K P R M G N P V A V I N F L E I D E N E V S Q E E L L Q A L A N W T N I S E T T E
1. LmbX	V L P P A D P G A T Y R V R V E T L A G - E T P E C G H S S D G T A V T L V R L G R V A P I - - G A V A Q E C
2. AJ390519	V L T P K S S I A X M S R I R E T S S G G N B L P R A G H P P F G T A F A L T E D G K I K P N D N G Q I I O E C
3. aes1	V Q K P T I D K A D Y R R I R E T P E C - B L S R A G H P P F G S C F A V V E S G Y C T P K - N I C K R I I O E C
4. YHI9	V F K P S D K K Y D Y K R I R E T P R - S B L P R A G H P P F G S C K A F E E T K N T P A T S I - F V O E C
1. LmbX	G S R L H S L S V G - - P D K G T - - - - - V N A B K P - - - V E A R E P P D L R L L T A A A G V - - D P A
2. AJ390519	G A G L V R F L S V E K T P N N S N E L P F L I S P E L B Y F K F H E I D D K V I E L O H S W N - - - G T
3. aes1	L A G L V E L R I D G E K D E D T - - - - W I S P K L B Y Y K I L Q T S E A T S E V E N A L G I P L N Y S
4. YHI9	K I G A V E R I N E G - - - - - L S P K A P M A D Y E S T S S E M L A D Y E R A I G - - - -
1. LmbX	D V M E A P V R T A G E C P A R H Y L Q V R E G - - - - M V P G A R A D L E L M A R R D L P D V M Y P S W D
2. AJ390519	N I I G K P V - L I D A C P K W L A V F Q I G S G K E V L D L N X D L A Q T E R L S L E N G W T G I G Y F G K H
3. aes1	S Q V S P P V - L I D D C P K W L V I Q I P N A T D V L N L V P K F Q S L S Q M C K N D W I G V T V E G E L
4. YHI9	L K F I K P A L L L H T C P E W I V A L V E D A E T C F N A N P N F A M L A H Q T K Q N D H V G I I A G P K
1. LmbX	- - P R T R - Q A T A R V E A P G Y G M P E D E A C A S N A L G I G E W L V A A G R L P A A D G T Y E Y L T R
2. AJ390519	- - N E N G D S V E L R N I A P A V G V A E D E A C G S G S G A I G A Y I - - A N H V P N E K E K F T I D I S
3. aes1	- - G K D - - S F E S R S F A P L I H V N E D E A C G S G A G A V G V Y I - - G S S Q K T P T S L S F T T S
4. YHI9	K E A A I K N S Y E M R A P A P V I N Y E D E V C G S G S V A L A R Y I - - Q E V Y K F E K T T D I T T S
1. LmbX	Q G V G S E R V G T V E C S V T - - V D S G C A V R A S A T C S V V P V A R G E F L L G E D L A T A V A S V
2. AJ390519	Q G K P I E R D A K I Q V K V N R L T T K N G D L S I H V G G H A I T C F E C T Y S I
3. aes1	Q C T K L S R Q A I S K V S V D - - V S S N K S I A V F V G C Q A K T C I S C K S F I
4. YHI9	E G G R L K R N G L M L A S T K K - - E A D N S T S Y Y I A G H A T T V I D C K I K V

Obr. 2.13: Porovnání aminokyselinových sekvencí LmbX a kvasinkových proteinů PhzC-PhzF rodiny. Stupně šedi označují míru konzervace. Černě podbarveny jsou aminokyseliny, které se vyskytují u všech porovnávaných proteinů. Od tmavě šedé postupuje menší konzervovanost aminokyselin.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli JM109 (Promega)

Tento kmen byl použit k transformaci plazmidovou DNA pro namnožení plazmidů a pro modrobílou selekci po TA klonování. Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacIqZΔM15*].

Escherichia coli BL21(DE3) (Stratagene)

Kmen BL21(DE3) byl použit k heterologní produkci proteinů. Kóduje T7 RNA polymerasu, která nasedá na T7 promotor, který je na vneseném plazmidu (pET vektor s vloženým genem). Genotyp: F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻), *gal* λ(DE3).

Escherichia coli BL21 (DE3)/pGroESL

Tento kmen *E. coli* BL21(DE3) nese plazmid pGroESL kódující chaperoniny GroES a GroEL.

Escherichia coli BW25113/pIJ790 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Kmen *E. coli* byl použit k vyřazení genu *Streptomyces lincolnensis* dle protokolu REDIRECT (GUST *et al.* 2003). Genotyp: (Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ*4787(::*rrnB-4*), *lacI*p-4000(*lacI*^o), λ, *rpoS*369(Am), *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*). Kmen nese plazmid pIJ790.

Escherichia coli ET12567/pUZ8002 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Nemethylující kmen *E. coli* byl použit k vyřazení genu *S. lincolnensis* dle protokolu REDIRECT. Genotyp: (*dam-13*:: Tn9, *dcm-6*, *hsdM*, *Cmr*). Kmen nese plazmid pUZ8002.

Escherichia coli DH5α/BT340 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Kmen *E. coli* byl použit k vyřazení genu *S. lincolnensis* dle protokolu REDIRECT. Genotyp: F⁻, ϕ 80*dlacZΔM15*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*. Kmen nese plazmid BT340.

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355)**

Typový kmen produkující linkomycin.

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355) $\Delta lmbA$**

Kmen *S. lincolnensis*, ve kterém je gen *lmbA* nahrazen sekvencí jizvy (NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Připravené dle protokolu REDIRECT.

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355) $\Delta lmbW$**

Kmen *S. lincolnensis*, ve kterém je gen *lmbW* nahrazen sekvencí jizvy (NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Připravené dle protokolu REDIRECT.

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355) $\Delta lmbX$**

Kmen *S. lincolnensis*, ve kterém je gen *lmbX* nahrazen sekvencí jizvy (SMUTNÁ 2007). Připravené dle protokolu REDIRECT.

***Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (DSM 40355) $\Delta lmbY$**

Kmen *S. lincolnensis*, ve kterém je gen *lmbY* nahrazen sekvencí inaktivační kazety (NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Připravené dle protokolu REDIRECT.

***Kocuria rhizophila* CCM 552**

Indikátorový kmen citlivý k antibiotikům, používaný pro testování produkce antimikrobiálních látek.

3.1.2 Vektory

pGEM-T Easy (3,0 kbp, Promega)

pGEM-T Easy vektor se využívá k TA klonování. Je to linearizovaný vektor, který má na svých 3'-koncích terminální deoxythymidin. Na 3'-koncích PCR produktu je naopak deoxyadenosin, což zajišťuje vnesení PCR produktu do vektoru. Vektor nese rezistenci k ampicilinu.

pET28b (+) (5,4 kbp, Novagen)

Vektor pET28 je expresní vektor, který slouží k produkci proteinů z vloženého genu. Obsahuje sekvenci pro silný T7 promotor a terminátor. Vektor také obsahuje sekvenci pro tzv. histidinovou kotvu, která je připojena na N-konec nebo C-konec proteinu. Kotva slouží následně k purifikaci proteinu. Vektor kóduje rezistenci ke kanamycinu.

pGroESL (6,5 kbp, Du Pont)

Vektor byl používán v buňkách BL21(DE3) pro koexpresi cílového proteinu s chaperoniny. Kóduje chaperoniny GroES (10 kDa) a GroEL (60 kDa). Ty umožňují lepší skládání proteinů. Plazmid nese chloramfenikolovou rezistenci.

pIJ773 (4,3 kbp, získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Vektor byl použit k vyřazení genu *S. lincolnensis* dle protokolu REDIRECT. Konstrukt je odvozen od vektoru pBluescriptKS(+) a nese inaktivační kazetu (1,4 kbp). Ta obsahuje gen rezistence k apramycinu a *oriT* plazmidu RP4. Kazeta je ohraničena FRT místy, které jsou rozpoznávány FLP rekombinasou.

pIJ790 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Vektor byl použit k vyřazení genu *S. lincolnensis* dle protokolu REDIRECT. Má teplotně senzitivní počátek replikace. Replikuje se při 30 °C a jeho ztráta je navozena při 37 °C. Nese rezistenci k chloramfenikolu. Konstrukt dále nese geny *gam*, *bet*, *exo*, jejichž proteinové produkty napomáhají homologní rekombinaci mezi okolím genu, který má být inaktivován, a homologní sekvencí kazety – lineární DNA. Geny *gam*, *bet*, *exo* jsou pod kontrolou promotoru indukovatelného L-arabinosou.

pUZ8002 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

pUZ8002 je odvozen od plazmidu RP4 s mutací v *oriT*. Nemůže se sám přenášet, ale napomáhá konjugacímu přenosu kosmidu z *E. coli* do streptomycety. Kóduje rezistenci ke kanamycinu.

BT340 (získáno z John Innes Centre, Norwich, Velká Británie)

Plazmid je teplotně senzitivní. Replikuje se při 30 °C a ztrácí se při 42 °C. BT340 nese gen pro FLP rekombinasu, která rozpoznává FRT místa inaktivační kazety a vyštěpí inaktivační kazetu z kosmidu. Výsledkem vyštěpení kazety je přítomnost 81 bp, tzv. jizvy. Exprese FLP rekombinasy probíhá při 42 °C. Plazmid je rezistentní ke karbencilinu a chloramfenikolu.

pLK6 (46 kbp)

pLK6 je kosmid SuperCos I (8 kbp) nesoucí celý genový shluk pro biosyntézu linkomycinu (38 kbp) ze *S. lincolnensis* ATCC 25466. Nese kanamycinovou rezistenci a *oriT*. pLK6 byl připraven v naší laboratoři (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008).

3.1.3 Kultivační média

LB médium:

trypton	10 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
destilovaná voda (dH ₂ O)	do 1000 ml
pH	7,5

LB agar:

LB médium	1000 ml
agar	15 g

SOC médium:

trypton	20 g
kvasničný extrakt	5,5 g
NaCl 1 M	10 ml
KCl 1 M	2,5 ml
dH ₂ O	970 ml
pH	7,0
po sterilizaci	
MgCl ₂ 2 M	10 ml
glukosa 2 M	10 ml

SOB médium:

trypton	20 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
dH ₂ O	do 1000 ml
po sterilizaci	
MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 M	20 ml

MS agar:

agar	20 g
manitol	20 g
sójová mouka	20 g
vodovodní voda	do 1000 ml

DNA agar:

Difco Nutrient Agar	23 g
dH ₂ O	do 1000 ml

ISP2 médium + CaCO₃:

kvasničný extrakt	4 g
sladový extrakt	10 g
glukosa	4 g
CaCO ₃	2 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH	7,2

ISP2 agar + CaCO₃:

ISP2 médium + CaCO ₃	1000 ml
agar	15 g

AVM médium:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
kvasničný extrakt	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	50 mg
CaCO ₃	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	31 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
dH ₂ O	880 ml
pH	7,4
po sterilizaci	
25% glukosa	120 ml

YEME médium:

kvasničný extrakt	3 g
pepton	5 g
sladový extrakt	3 g
glukosa	10 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH	7,2
po sterilizaci	
MgCl ₂ 2,5 M	2 ml

2× YT médium:

trypton	16 g
kvasničný extrakt	10 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	do 1000 ml

B1 agar:

hovězí extrakt	10 g
pepton	10 g
NaCl	5 g
agar	20 g
dH ₂ O	do 1000 ml
pH	7,2

3.1.4 Speciální kultivační média

AIX agar – agar pro modrobílou selekci:

LB agar	1000 ml
ampicilin (100 µg/ml)	1 ml zásobního roztoku ampicilinu – 100 mg/ml, rozpuštěno v dH ₂ O
IPTG (0,4 mM)	0,4 ml zásobního roztoku IPTG – 1M, rozpuštěno v dH ₂ O
X-gal (30 µg/ml)	1,5 ml zásobního roztoku X-gal – 20 mg/ml, rozpuštěno v DMSO

Média pro přípravu kompetentních buněk pro transformaci *E. coli* teplotním šokem**A médium** – LB médium; 10 mM MgSO₄; 0,2% glukosa**B médium** – LB médium, 36% glycerol, 12% polyethylenglykol (M_r 8000), 12 mM MgSO₄

3.1.5 Enzymy

DNA polymerasa Expand High Fidelity^{PLUS} (Roche)

LA DNA polymerasa (Top-Bio)

Taq purple DNA polymerasa (Top-Bio)

T4 DNA ligasa (New England BioLabs)

Alkalická fosfatasa CIP (New England BioLabs)

Restrikční endonukleasy *EcoRI*, *HindIII* (Fermentas)

Restrikční endonukleasy ostatní (New England BioLabs)

Ribonukleasa A z komerční soupravy izolace chromozomální DNA (Promega)

Lysozym (Sigma)

3.1.6 Pufry a roztoky

TAE pufr (agarosová elektroforéza) – 40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,0

10× DNA vzorkový pufr (agarosová elektroforéza) – 100 mM EDTA; 1% SDS, 20% glycerol; 0,25% bromfenolová modř; pH 8,0

TE⁻¹ pufr (součást roztoku standardu pro agarosovou elektroforézu) – 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0

Roztok Ponceau S (zjištění přítomnosti proteinů) – 0,2% Ponceau S; 3% trichloroctová kyselina

Roztok pro přípravu dialyzační membrány – 50 mM EDTA, 2 mM CaCO₃

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (SDS-polyakrylamidová elektroforéza) – 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS

Vzorkový pufr 2× pro SDS-PAGE – 125 mM Tris-HCl; 2% SDS; 5% merkaptoethanol; 20% glycerol; 0,002% bromfenolová modř; pH 6,8

Katodový pufr pro BN-PAGE (nativní polyakrylamidová elektroforéza – blue native) – 50 mM tricin; 15 mM Bis-Tris-HCl; 0,0002% Coomassie blue G-250; pH upraveno na hodnotu pH 7,0 u roztoku temperovaného na 4 °C

Anodový pufr pro BN-PAGE – 50 mM Bis-Tris-HCl; pH upraveno na hodnotu pH 7,0 u roztoku temperovaného na 4 °C

Gel pufr 3× pro BN-PAGE – 150 mM Bis-Tris-HCl; 1,5 M ε-aminokapronová kyselina; pH upraveno na hodnotu pH 7,0 u roztoku temperovaného na 4 °C

Vzorkový pufr 3× pro BN-PAGE – 150 mM Bis-Tris-HCl, 45% glycerol, pH upraveno na hodnotu pH 7,0 u roztoku temperovaného na 4 °C

Barvicí roztok pro SDS-PAGE a BN-PAGE – 50% methanol; 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250; 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE a BN-PAGE – 10% methanol, 10% kyselina octová

Roztoky pro izolaci plazmidové DNA alkalickou lyzí

Roztok 1 – 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0

Roztok 2 – 0,2 M NaOH, 1% SDS (roztok připravován vždy čerstvý)

Roztok 3 – 3 M CH₃COOK, pH 5,0

Zásobní roztoky antibiotik

Zásobní roztoky jsou 1000× koncentrované. Tedy např. do 100 ml média se přidává 100 µl zásobního roztoku.

ampicilin	100 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
apramycin	50 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
chloramfenikol	34 mg/ml, 25 mg/ml (rozpuštěno v ethanolu; 34 mg/ml používáno pro selekci <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pGroESL; 25 mg/ml používáno pro selekci <i>E. coli</i> dle protokolu REDIRECT)
karbenicilin	100 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O)
kanamycin	30 mg/ml, 50 mg/ml (rozpuštěno v dH ₂ O; 30 mg/ml používáno pro selekci buněk <i>E. coli</i> nesoucích vektor pET28; 50 mg/ml používáno pro selekci <i>E. coli</i> dle protokolu REDIRECT)
nalidixová kyselina	25 mg/ml (rozpuštěno v 0,3 M NaOH)

3.1.7 Komerční soupravy, standardy a nástroje

TA klonování – pGEM®-T and pGEM®-T-Easy Vector Systems (Promega)

Izolace chromozomální DNA – Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Izolace DNA fragmentu z gelu a z PCR reakce – Wizard® Plus SV Gel and PCR DNA Clean-Up System (Promega)

Minipreparace plazmidové DNA – Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Preparace plazmidové DNA – Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel)

Stanovení koncentrace proteinů – Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad)

Standardy molekulových velikostí pro elektroforézu

agarosová elektroforéza – 1 kb PLUS DNA ladder (Invitrogen) – standard obsahuje 20 fragmentů od 100 bp do 12000 bp (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 a 12000). Pro použití je 100 µl tohoto standardu smícháno se 100 µl 10× DNA vzorkového pufru a 800 µl TE⁻¹ pufru.

SDS-PAGE – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) – standard obsahuje 9 proteinů s molekulovou hmotností 10-250 kDa (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250)

BN-PAGE – Kalibrační kit pro určení molekulových hmotností vysokomolekulárních proteinů (Pharmacia) – standard obsahuje 5 proteinů s molekulovou hmotností 67-669 kDa (BSA – 67000 Da, laktát dehydrogenasa – 140000 Da, katalasa – 232000 Da, ferritin – 440000 Da, thyroglobulin – 669000 Da)

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

Zařízení na přípravu gradientového gelu – Hoefer SG50 (Hoefer)

Dialyzační membrána – VISKING® dialysis tubing 20/32 (Serva)

Nitroceluloseová membrána Protran® BA85 (velikost pórů – 0,45 µm; Whatman) – použita pro vazbu a detekci proteinů

Kolona pro purifikaci proteinu pomocí metaloafinitní chromatografie – HiTrap Chelating (objem 1 ml; Pharmacia Biotech)

Kolonky pro separaci nízkomolekulárních látek extrakcí na pevné fázi – kolonky HLB 3cc, 60 mg (Waters); Oasis MCX 3cc, 60 mg (Waters)

Chromatografická kolona pro separaci a analýzu nízkomolekulárních látek na reverzní fázi – Acquity BEH C₁₈ (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters)

3.1.8 Chemikálie

chemikálie	výrobce	zkratka
1,3-diazacyklopenta-2,4-diene	Sigma	imidazol
2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol	Fluka	Bis-Tris
4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina (substrát LmbX)	připraveno v naší laboratoři	YT
5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galaktopyranosid	Sigma-Aldrich	X-gal
acetonitril	Biosolve	
adenosin trifosfát	Fermentas	ATP
agar	Oxoid	
agarosa	Invitrogen	
akrylamid	Sigma	
ampicilin	Duchefa Biochemie	
apramycin	Fluka	
arabinosa	Sigma	
betain	Lachema	
bromfenolová modř	Bio-Rad	
Comassie brilliant blue G-250	Serva	
Comassie brilliant blue R-250	Serva	

chemikálie	výrobce	zkratka
deoxynukleosid trifosfátová směs	Fermentas	dNTP
Difco Nutrient Agar	Difco	DNA
dimethylsulfoxid	Serva	DMSO
dodecylsulfát sodný	Sigma	SDS
ethydium bromid	Sigma	
ethyl diamintetraoctová kyselina disodná sůl dihydrát	Sigma	EDTA
glukosa	Lach-Ner	
glycerol	Lachema	
hovězí extrakt	Difco	
hovězí sérum albumin	New England Biolabs Bio-Rad	BSA
hydrogenfosforečnan draselný	Lachema	K ₂ HPO ₄
hydroxid amonný	Sigma-Aldrich	NH ₄ OH
hydroxid sodný	Lach-Ner	NaOH
chloramfenikol	Serva	
chlorid draselný	Chemapol	KCl
chlorid hořečnatý hexahydrát	Crytur	MgCl ₂ ·6H ₂ O
chlorid manganatý tetrahydrát	Lach-Ner	MnCl ₂ ·4H ₂ O
chlorid měďnatý dihydrát	Chemapol	CuCl ₂ ·2H ₂ O
chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl
chlorid vápenatý dihydrát	Merck	CaCl ₂ ·2H ₂ O
chlorid zinečnatý	Aldrich	ZnCl ₂
isopropanol	Lachema	
isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid	Sigma-Aldrich	IPTG
kanamycin	Amresco	
karbenicilin	Sigma	
kvasničný extrakt	Oxoid	
kyselina mravenčí	Merck	HCOOH
kyselina octová	Lachema	CH ₃ COOH
leucin-enkefalin acetát	Sigma-Aldrich	
manitol	Fluka	
merkapt ethanol	Serva	
methanol	Lachema	
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin	Serva	TEMED
<i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid	ICN Biomedicals	bisakrylamid
<i>N</i> -tris(hydroxymethyl)methylguanin	Serva	tricin
nalidixová kyselina	Sigma	
nonidet P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol	Amresco	nonidet
octan draselný	Lach-Ner	CH ₃ COOK
pepton	Imuna	
peroxodisíran amonný	Sigma	APS
polyethylenglykol (M _r = 8000)	Sigma	
Ponceau S	Sigma	
síran amonný	Sigma-Aldrich	(NH ₄) ₂ SO ₄

chemikálie	výrobce	zkratka
síran hořečnatý heptahydrát	Merck	MgSO ₄ ·7H ₂ O
síran manganatý monohydrát	Merck	MnSO ₄ ·H ₂ O
síran nikelnatý hexahydrát	Merck	ZnSO ₄ ·6H ₂ O
síran železitý nonahydrát	Lachema	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·9H ₂ O
síran železnatý heptahydrát	Lach-Ner	FeSO ₄ ·7H ₂ O
sladový extrakt	Oxoid	
sójová mouka	Tree of life – z maloobchodní sítě	
trichloroctová kyselina	Lach-Ner	
tris(hydroxymethyl)aminomethan	Aldrich	Tris
trypton	Difco	
uhličitan vápenatý	Penta	CaCO ₃
ε-aminokapronová kyselina	Serva	

3.1.9 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly dodány firmou Eurogentec nebo Sigma. Primery Xf, Xr a Yrred byly navrženy pro tuto práci, primery chAf, chAr, chWf, chWr, chXf, chXr, chYf, chYr, Xfred, Xrred, Yfred byly využity v předchozích pracích (SMUTNÁ 2007, NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Seznam použitých oligonukleotidů a jejich použití je uveden v Tab. 3.1.

příprava expresního konstruktů s <i>lmbX</i>	Xf – CATATGATCGTGGTCCCGTTC Xr – AACCTCGAGCTACACGGAAGCGACCG
ověření $j\Delta lmbA$	chAf – ACCTTCCCGACAACACA chAr – GGTCCAGGAAACGGTACA
ověření $j\Delta lmbW$	chWf – CGCAACTACGGTGAACGA chWr – TCAGGGCACATGGAGTCT
ověření $j\Delta lmbX$	chXf – CCGGCATCAACGACT chXr – CCAGATGGAACGAATTCA
ověření $\Delta lmbY$	chYf – GGGCGCCTAACTCTG chYr – ACCACCGTCAACTGACTG
delece <i>lmbX</i>	Xfred – CGCGCCCATCCTGCACAGCGCACCCGGAGGAAGCATGA TCATTCCGGGGATCCGTCGACC Xrred – GAGAAAAGAGCCGCTGACGCAAGGGGCCCTCGGCGA CTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
delece <i>lmbY</i>	Yfred – GGGCGCGACGAACCATGAGAGGAGAGCGGGCGAACCA TGATTCCGGGGATCCGTCGACC Yrred – GAACACGTTCCGGCGCGCCCATCGTGACCCAGGTGTCCG CTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

Tab. 3.1: Seznam oligonukleotidů a jejich využití.

3.1.10 Software a internetové aplikace

EndNote 9 – program pro tvorbu citací

Geneious Pro 5.5.6. – program pro práci se sekvencemi

Chemsketch 12.01 – program pro tvoření chemických vzorců

Chromas 2.33 – program pro analýzu výstupu ze sekvenátoru

ISIS Draw 2.3 – program pro tvoření chemických vzorců

MassLynx 4.0 (Waters, USA) – program pro analýzu výstupu z UHPLC

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) – Basic Local Alignment Search Tools (ALTSCHUL *et al.* 1997) – nástroj pro porovnání sekvencí

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

Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) – databáze trojrozměrných struktur proteinů

Reaxys (<http://reaxys.com/>) – databáze chemických látek a reakcí

3.1.11 Speciální přístroje a zařízení

Analytické váhy ER-182A (Ohaus, Švýcarsko)

Box s laminárním prouděním (Clean Air, Nizozemí)

Box s laminárním prouděním umožňující sterilní práci, sterilizace UV světlem.

Centrifugy – 5415R (Eppendorf, Německo) – chlazená centrifuga, úhlový rotor, 24 × 1,5 ml, maximální rychlost 13200 RPM (16110×g)

– **Biofuge pico** (Heraeus, Německo) – nechlazená centrifuga, úhlový rotor, 24 × 1,5 ml, maximální rychlost 13000 RPM (16060×g)

– **Jouan BR4i** (Thermo Scientific, USA) – chlazená centrifuga, výměnné rotory, používán úhlový rotor, 6 × 50 ml, maximální rychlost 13000 RPM a výkyvný rotor, 5 × 15 ml v 1 ze 4 inzertů, maximální rychlost 4300 RPM

– **MR23i** (Thermo Scientific, USA) – chlazená centrifuga, výměnné rotory, používán úhlový rotor, 6 × 50 ml, maximální rychlost 13000 RPM (17572×g)

Elektroporátor – FPP elektroporátor (vyroben v dílnách MBÚ, Česká republika)

Elektroporátor generující elektrický pulz s exponenciálním poklesem (napětí v čase rychle vzroste na požadovanou hodnotu a pak klesne exponenciálně). Buňky vystavené pulzu vysokého napětí tvoří v membráně póry, a tak může dojít k přenosu DNA.

Inkubační třepačka Unitron (Infors, Švýcarsko)

Rotační inkubační třepačka, 20-400 RPM, teplota od 5 °C do 60 °C.

Magnetické míchadlo (Variomag, USA)

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)

NanoDrop 1000 měří koncentraci DNA ve velmi malých objemech – 1 µl. Měří se při 260 nm, kdy nukleové kyseliny absorbují světlo. NanoDrop určí také stupeň znečištění DNA – poměrem absorbancí 260/280 znečištění proteiny, poměrem 260/230 znečištění fenoláty, thiokyanáty a dalšími organickými látkami.

PCR-cyklery – T1 Thermocycler 96, TGradient Thermocycler 96 (Biometra, Německo)

PCR-cyklery jsou přístroje, v kterých probíhá PCR. Umožňují rychlé změny teplot. Je možné nastavit předehtátí víčka cyklerů na teplotu vyšší než je denaturační teplota, aby

nedocházelo k odpařování. TGradient Thermocycler umožňuje gradientové nastavení teplot, např. teploty nasedání primerů.

Peristaltická pumpa P-1 (Pharmacia Biotech, Švédsko)

Pumpa umožňující rovnoměrné čerpání roztoků.

pH metr MP225 (Mettler Toledo, USA)

Sonikátor Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Parmer, USA)

Ultrazvukový homogenizátor, který ultrazvukem rozbíjí buňky.

SPD1010 SpeedVac System (Thermo Savant, USA)

Přístroj odpařující vodu a organická rozpouštědla z mikroskopických aplikací vakua a zvýšené teploty (42 °C).

Spektrofotometr Hexios γ (Unicam, Velká Británie)

Spektrofotometr umožňující měření absorbance vzorků nebo optické denzity kultury průchodem světelného paprsku spektrofotometrickými kyvetami obsahujícími vzorek.

Spektrofotometr pro zjištění absorbance v 96 jamkových destičkách Multiskan EX (Thermo electron corporation, USA)

Termoblok (Grant, Velká Británie)

UHPLC s UV/MS detekcí – Acquity UPLC spojený s UV detektorem diodového pole 2996 a hmotnostně-spektrometrickým detektorem LCT Premier XE (Waters, USA)

Kapalinový chromatograf umožňuje dělit látky podle jejich interakce s chromatografickou kolonou. Čas, kdy látka opustí kolonu, je pro ni charakteristický a nazývá se retenční čas. Tento chromatograf je spojený s hmotnostním detektorem, který je schopen převést analyty na ionty a měřit jejich m/z . Přístroj dále umožňuje fragmentaci iontů, což může být využito při ověřování nebo určování struktury daného analytu.

Vodní lázeň CC1 (Huber, Německo)

Vortex MS2 Minishaker IKA (IKA-Works, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace bakterií

3.2.1.1 Kultivace *E. coli*

Kultivace probíhala v tekutých médiích (LB, SOC, SOB) nebo pevných půdách (LB) s příslušnými antibiotiky při 30 °C nebo 37 °C. Tekutá média byla třepána při 200 RPM (otáčky za minutu).

3.2.1.2 Kultivace *Streptomyces lincolnensis* na pevných půdách

Kultivace streptomycet na pevných půdách probíhala při 28-30 °C. Na MS a ISP2 agaru s CaCO₃ 4-6 dní, na DNA agaru 3-4 dny.

3.2.1.3 Kultivace *S. lincolnensis* – pro izolaci chromozomální DNA

Z MS agaru byly zaočkovány vysporulované kolonie *S. lincolnensis* do 25 ml ISP2 média s CaCO₃ v prolamovaných Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml. Při 28 °C a 200 RPM kultura rostla dva dny.

3.2.1.4 Kultivace *S. lincolnensis* – pro analýzu produktů pomocí UHPLC

Z MS agaru byly zaočkovány vysporulované kolonie *S. lincolnensis* do 50 ml YEME média v kulatých baňkách o objemu 500 ml. Kultura rostla 1 den při 28 °C, 200 RPM. Poté byly 2 ml narostlé kultury přeneseny do 40 ml AVM média také v kulatých baňkách o objemu 500 ml. Kultivace streptomycet v AVM médiu pokračovala dalších 5 dní. Pak byla kultura centrifugována (4000×g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl dále analyzován.

3.2.1.5 Příprava spor *S. lincolnensis*

Spory *S. lincolnensis* byly používány pro inaktivaci genů dle protokolu REDIRECT. Spory připravovala Kamila Plháčková, PhD. Z MS nebo ISP2 agaru s CaCO₃ byly setřeny spory z vysporulovaných kolonií a resuspendovány ve sterilní dH₂O pomocí vortexu. Pak byla suspenze přefiltrována přes sterilní vatový filtr, proteklá frakce byla centrifugována (4000×g, 15 min, 4 °C) a sediment byl resuspendován v 20% glycerolu. Spory byly uchovávány při -70 °C nebo -20 °C.

3.2.2 Metody práce s DNA

3.2.2.1 Transformace bakterií cizorodou DNA

Transformace buněk slouží k vnášení cizorodé DNA do buněk.

– Transformace *E.coli* tepelným šokem

Nejprve byly připraveny kompetentní buňky. 2 ml LB média bylo zaočkováno kolonií *E. coli* a kultivováno přes noc (37 °C, 200 RPM). 1 ml noční kultury byl zaočkován do 100 ml média A (OD₆₀₀~0.04) a bylo kultivováno (37 °C, 200 RPM) do dosažení OD₆₀₀ 0,4-0,6 (střed exponenciální fáze růstu). Kultura byla zchlazena 10 min v ledové lázni. Poté byly buňky odděleny centrifugací (4000×g, 10 min, 4 °C) a resuspendovány v 1 ml média A. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 5 ml předchlazeného uchovávacího média B a opatrně promícháno. Suspenze buněk byla rozdělena na alikvoty 100 µl a uchovávána při -70 °C. Kompetentní buňky byly připravovány laborantkou.

Ke 100 µl kompetentních buněk bylo přidáno minimálně 100 ng DNA (1-10 µl plazmidu nebo ligační směsi). Suspenze byla ponechána 20 min v ledu (po ligaci 40 min). Po tuto dobu se plazmidová DNA váže k povrchu buněk. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku – teplotě 42 °C po dobu 60 s. Pak byly buňky inkubovány 1-1,5 min v ledu. Následně byl přidán 1 ml předehřátého LB média (37 °C) a buňky byly kultivovány ve 37 °C 1 h. Po tento čas se bakterie neselektivně množí a dochází k expresi genů i genů rezistence, které jsou na vkládaném plazmidu a zajišťují selekci. Poté byly buňky vysety na misku s LB agarem a příslušným antibiotikem. Přes noc byly inkubovány ve 37 °C.

– Transformace *E.coli* elektroporací

Tato transformace byla využívána k inaktivaci genů dle protokolu REDIRECT.

Pro každou elektroporaci byly připraveny čerstvé kompetentní buňky a nebyly používány buňky zamrazené. Pro přípravu kompetentních buněk byla zainokulována *E. coli* do 1 ml LB média obsahující dané antibiotikum. Buňky byly kultivovány při 37 °C nebo 30 °C přes noc při 200 RPM. 100 µl noční kultury bylo přeneseno do 10 ml SOB média s příslušným antibiotikem. Kultura rostla do OD₆₀₀ 0,4 (zhruba 3 h; počátek až střed exponenciální fáze růstu). Pak byly buňky odděleny centrifugací (4000×g, 5 min, 4 °C) a resuspendovány v 10 ml 10% vychlazeného glycerolu. Roztok byl centrifugován stejným způsobem. Buňky byly promyty ještě 5 ml 10% glycerolu. Po stejné centrifugaci byly buňky resuspendovány ve 100 µl zbytku supernatantu a s polovinou množství bylo pracováno dále.

K 50 µl čerstvě připravené suspenze kompetentních buněk bylo přidáno minimálně 100 ng DNA (1-2 µl). Směs byla ponechána 15 min na ledu. Následně byly buňky vystaveny pulzu elektrického napětí ve vychlazených elektroporačních kyvetách v FPP elektroporátoru –

300 V, 32 μF po dobu 4 s. Pak byly buňky resuspendovány v 0,5 ml LB média a ponechány 10 min na ledu. Poté byly kultivovány ve 37 °C nebo 30 °C po dobu 2 h. Po ukončení kultivace byla kultura vyseta na agarové misky s příslušnými antibiotiky.

3.2.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce je založená na amplifikaci DNA, která je ohraničena specifickými oligonukleotidy – primery. Úsek templátové DNA mezi těmito primery je amplifikován podle počtu cyklů PCR. PCR probíhá v PCR-cyklerech, kde se mění tři teploty – teplota denaturace DNA (94 °C), teplota nasedání primerů (kolem 55 °C) a teplota prodlužování DNA (závisí na typu polymerasy – kolem 70 °C). Objem PCR reakce byl vždy 50 μl .

– Amplifikace genu *lmbX* pro jeho následnou expresi (Tab. 3.2)

Byl používán Expand High Fidelity^{PLUS} PCR systém. Součástí je velmi výkonná termostabilní Taq polymerasa a protein s opravnou aktivitou. Byly zkoušeny tři různé teploty nasedání primerů (50 °C, 55 °C, 60 °C). Templátem byl kosmid pLK6 nesoucí celý shluk genů biosyntézy linkomycinu, včetně genu *lmbX*.

Reakční směs		podmínky PCR		
Expand High Fidelity pufr 5 \times s 7,5 mM MgCl ₂	10 μl	95 °C (počáteční denaturace)	5 min	
dNTP (10 mM)	1 μl	68 °C (přidání polymerasy)	pauza	
pLK6 (100 ng/ μl)	1 μl	94 °C	40 s	35 cyklů
primer přímý (10 pmol/ μl)	1 μl	50 °C, 55 °C, 60 °C	30 s	
primer zpětný (10 pmol/ μl)	1 μl	72 °C	1,5 min	
DMSO	2,5 μl	72 °C (dokončení syntézy řetězců)	7 min	
betain – 2,6 M	25 μl			
Expand High Fidelity polymerasa (5 U/ μl)	0,5 μl			
dH ₂ O	8 μl			

Tab. 3.2: Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci *lmbX*.

– **Ověření připravených delečních mutantních kmenů *S. lincolnensis*** (Tab. 3.3)

Templátem pro tuto PCR byla izolovaná chromozomální DNA. Byla používána polymerasa Taq purple.

reakční směs	
Taq pufr 10× bez MgCl ₂	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
chromozomální DNA (20 ng/µl)	5 µl
primer přímý (10 pmol/µl)	1 µl
primer zpětný (10 pmol/µl)	1 µl
DMSO	2,5 µl
betain (2,6 M)	25 µl
Taq purple polymerasa (1 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	5,5 µl

podmínky PCR		
95 °C	5 min	
68 °C	pauza	
94 °C	45 s	30 cyklů
55 °C	45 s	
72 °C	1,5 min	
72 °C	5 min	

Tab. 3.3: Složení reakční směsi a podmínky PCR pro ověření připravených delečních mutantních kmenů *S. lincolnensis*.

– **Koloniová PCR** (Tab. 3.4)

Koloniová PCR byla používána pro ověření genetických změn ve streptomycetách. Do směsi byl přidán nonidet – detergent, který rozruší buněčnou stěnu bakterií. Do PCR reakční směsi byla sterilně „odpíchnuta“ kolonie. Byla použita LA polymerasa. První denaturace trvala 10 min pro lepší rozrušení buněčné stěny.

reakční směs	
LA pufr 10×	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
primer přímý (10 pmol/µl)	5 µl
primer zpětný (10 pmol/µl)	5 µl
DMSO	2,5 µl
nonidet	0,5 µl
LA polymerasa (5 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	30 µl

podmínky PCR		
94 °C	10 min	
65 °C	pauza	
94 °C	45 s	30 cyklů
55 °C	45 s	
68 °C	1,5 min	
68 °C	5 min	

Tab. 3.4: Složení reakční směsi a podmínky PCR pro koloniovou PCR.

- **Ověřovací PCR**

Bylo používáno stejné složení reakční směsi a stejné podmínky PCR jako v Tab. 3.4, s výjimkou přítomnosti nonidetu a teploty první denaturace, která trvala pouze 5 min.

– Amplifikace inaktivační kazety dle protokolu REDIRECT (Tab. 3.5)

reakční směs		podmínky PCR		
Expand High Fidelity pufr 5× s 7,5 mM MgCl ₂	10 μl	94 °C	2 min	
dNTP (10 mM)	1 μl	68 °C	-	
primer přímý (10 pmol/μl)	1 μl	94 °C	45 s	10 cyklů
primer zpětný (10 pmol/μl)	1 μl	50 °C	45 s	
DMSO	2,5 μl	72 °C	1,5 min	
DNA – inaktivační kazeta vyštěpená z pIJ773 (40 ng/μl)	0,5 μl	94 °C	45 s	15 cyklů
Expand High Fidelity polymerasa (5 U/μl)	0,5 μl	55 °C	45 s	
dH ₂ O	33,5 μl	72 °C	1,5 min	
		72 °C	5 min	

Tab. 3.5: Složení reakční směsi a podmínky PCR pro amplifikaci kazety dle protokolu REDIRECT.

3.2.2.3 TA klonování

TA klonování je založeno na tom, že některé DNA polymerasy (Taq) při PCR na konec PCR produktu přidávají navíc jeden deoxyadenosin. Vektor pGEM-T Easy je linearizovaný a na svých 3'-koncích má připojený jeden deoxythimidin. Tak může k sobě párovat vektor s PCR produktem. Molekuly DNA spojí ligasa. K rozlišení pozitivních a negativních klonů slouží modrobílá selekce. Je založena na tom, že pGEM-T Easy vektor nese gen *lacZ* pro β-galaktosidasu, uprostřed kterého je místo pro vložení PCR produktu. Pokud se PCR produkt vloží, přerušuje se tím gen *lacZ* a nevzniká β-galaktosidasa. Ta nemůže svůj substrát (X-gal), který je přidán do LB agaru (AIX agar), přeměnit na modrý produkt, a proto kolonie zůstávají bílé. Pokud by nedošlo k vložení PCR produktu, *lacZ* se bude přepisovat a kolonie budou modré.

TA klonování bylo využito pro vnesení genu *lmbX* po PCR do vektoru pGEM-T Easy. Byla použita komerční souprava pGEM®-T and pGEM®T-Easy Vector Systems. Složení ligační směsi je uvedeno v Tab 3.6. Ligace probíhala 1 h při pokojové teplotě. Poté byly ligační směsi (4 μl) transformovány buňky *E. coli* JM109 a následně byly vysety na AIX agar obsahující ampicilin, IPTG a X-gal. Pozitivní klony vyrostly jako bílé kolonie, zatímco negativní klony byly modré.

Ligační směs pro ligaci do pGEM-T	
Rapid ligační pufr 2×	5 μl
pGEM-T Easy (50 ng/ μl)	1 μl
PCR produkt	X μl
T4 DNA ligasa (5 U/μl)	1 μl
dH ₂ O	do 10 μl

Tab. 3.6: Složení ligační směsi pro TA klonování.

3.2.2.4 Ligace DNA

Spojení dvou molekul DNA bylo využito při vkládání genu do expresního vektoru. Doporučený molární poměr inzertu k vektoru je 3/1. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 3.7. Jako kontrola sloužila stejná ligační směs bez inzertu. Ligace probíhala při pokojové teplotě 1,5 h.

ligační směs pro ligaci do expresního vektoru	
T4 DNA ligační pufr 10×	2 μ l
vektor (100 ng)	X μ l
inzert	X μ l
ATP (10 mM)	1 μ l
T4 DNA ligasa (5 U/ μ l)	1 μ l
dH ₂ O	do 20 μ l

Tab. 3.7: Složení ligační směsi.

3.2.2.5 DNA elektroforéza v agarosovém gelu

DNA elektroforéza je elektromigrační metoda sloužící k separaci molekul DNA podle jejich velikosti (počtu páru bází). DNA díky záporně nabitým fosfátovým skupinám putuje v elektrickém poli k anodě.

Elektroforetická analýza DNA byla prováděna v 1% agarosovém gelu v TAE pufru. Pro zviditelnění byl do gelu přidán ethidium bromid v konečné koncentraci 0,005 %. Ke vzorkům byl před nanesením přidáván 10× koncentrovaný vzorkový pufr a jako standard byl používán připravený roztok 1kb PLUS DNA ladder. Napětí bylo 3-5 V/cm.

3.2.2.6 Izolace fragmentu DNA z agarosového gelu

Izolace DNA z agarosového gelu byla používána pro přečištění DNA z PCR reakce a pro získání určitého fragmentu po štěpení restrikními endonukleasami. K této izolaci DNA byla používána komerční souprava Wizard® Plus SV Gel and PCR DNA Clean-Up System. Nejprve byly vzorky elektroforeticky rozděleny v 1% gelu a pod UV světlem byl vyříznut gel s požadovanou DNA. Izolace DNA pak spočívá v tom, že se vzorek nalije na skleněnou membránu v kolonce, kde se za vysoké iontové síly zachytí DNA a nečistoty jsou odmyty. Kolonka se promývá a nakonec je DNA eluována roztokem o nízké iontové síle – dH₂O.

3.2.2.7 Štěpení DNA pomocí restrikních endonukleas

Štěpení DNA katalyzují restrikní endonukleasy. Ty rozpoznávají specifické sekvence na DNA. Reakce probíhaly za optimálních podmínek určených výrobcem 1-3 h.

3.2.2.8 Defosforylace molekul DNA

Tato metoda byla využívána k defosforylaci konců štěpených (linearizovaných) vektorů, aby se konce znovu nespojovaly. K defosforylaci byla použita alkalická fosfatasa CIP. Reakce byla prováděna hned po štěpení vektoru přidáním fosfatasy (5 U na 3 µg vektoru) do restriční směsi. Defosforylace probíhala 1,5 h při 37 °C.

3.2.2.9 Minipreparace plazmidové DNA alkalickou lyzí

Tato izolace DNA je založena na použití roztoků připravených v laboratoři (BIRNBOIM a DOLY 1979). Získaná DNA není tak čistá jako při izolaci pomocí komerční soupravy. Tato metoda byla využita pro ověření klonů restriční analýzou.

Jednou kolonií bylo zaočkováno 4 ml LB média s antibiotikem. Kultura rostla přes noc. Ráno byla kultura zcentrifugována při 4000×g, 15 min, 4 °C. Buňky byly resuspendovány ve 100 µl roztoku I. Bylo přidáno 200 µl roztoku II (obsahuje NaOH a SDS), který lyzuje buňky. Po 5 min byla suspenze neutralizována 150 µl roztoku III. Tím byly také vysráženy proteiny a chromozomální DNA. Pak byl roztok centrifugován při pokojové teplotě, 16000×g, 15 min. DNA byla získána alkoholovým srážením. K supernatantu bylo přidáno 2,5 objemu ethanolu a bylo ponecháno srážet 5 min na ledu. Centrifugací (16000×g, 15 min, 4 °C) byla oddělena vysrážená DNA. Byla promyta 0,5 ml 70% ethanolu a za stejných podmínek byla suspenze centrifugována. Sediment byl vysušen ve vakuu při 42 °C. DNA byla resuspendována ve 20 µl sterilní dH₂O s přidavkem ribonukleasy A (v celkové koncentraci 20 µg/ml).

3.2.2.10 Minipreparace plazmidové DNA vazbou na aktivované sklo

K izolaci plazmidové DNA z malého objemu kultury (4 ml) byla používána komerční souprava – Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Princip metody je obdobný jako v předchozí kapitole, DNA však není srážena alkoholem, ale přečištěna vazbou na aktivované sklo kolonky.

Po noční kultivaci 4 ml LB média s příslušným antibiotikem zainokulovaným jednou kolonií byla kultura centrifugována (4000×g, 15 min, 4 °C). Dále probíhala izolace DNA dle protokolu. Buňky byly resuspendovány a lyzovány. Po 3-5 min byl přidán roztok alkalické proteasy. Suspenze byla neutralizována a centrifugována. Supernatant byl nanesen na kolonku s aktivovaným sklem, které za vysoké iontové síly váže DNA. Pak byla kolonka promývána a nakonec DNA eluována dH₂O.

3.2.2.11 Preparace plazmidové a kosmidové DNA vazbou na aktivované sklo

Izolace plazmidové a kosmidové DNA ze 100 ml kultivace byla prováděna dle protokolu komerční soupravy Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi. Princip je stejný jako v předešlých dvou kapitolách. Nejprve je DNA přečištěna vazbou na aktivované sklo a pak ještě alkoholovým srážením.

Pro tuto izolaci byly kultivovány buňky *E. coli* ve 100 ml LB média při 37 °C přes noc. Druhý den byly buňky centrifugovány (4000×g, 15 min, 4 °C). Buňky byly resuspendovány, lyzovány (4-5 min) a neutralizovány dle protokolu. Pak byl lyzát nanesen na promytou kolonku (s aktivovaným sklem) s vloženým filtrem. Filtr byl promyt a odstraněn. Pak byla promyta kolonka a eluována DNA. K DNA (5 ml) bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu a důkladně promícháno. Tím se srazil DNA. Následovala centrifugace (16000×g, 30 min, 4 °C) a promytí vysrážené DNA 70% ethanolem. Roztok DNA byl centrifugován při pokojové teplotě 16000×g, 5 min. Supernatant byl odstraněn a DNA byla dosušena ve vakuu při 42 °C. DNA byla resuspendována v dH₂O.

3.2.2.12 Izolace chromozomální DNA *S. lincolnensis*

Kultura, která rostla dva dny v ISP2 médiu s CaCO₃, byla centrifugována při 5000×g, 15 min, 4 °C. Z buněk bylo odebráno sterilně zhruba 100 µl a s nimi bylo dále pracováno. Na jednu hodinu byly buňky uloženy do mrazáku z důvodu lepší izolace chromozomální DNA. Pak bylo postupováno podle protokolu Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Buňky byly resuspendovány v 480 µl 50 mM EDTA. Pro rozrušení buněčné stěny bylo přidáno 120 µl lysozymu (10 mg/ml). Buněčná suspenze byla kultivována 50 min při 37 °C. Pak byla centrifugována (16000×g, 5 min, pokojová teplota) a k sedimentu bylo přidáno 600 µl lyzačního roztoku. Lyze probíhala 5 min při 80 °C, pak byly přidány 3 µl ribonukleasy A a suspenze byla inkubována při 37 °C další hodinu. K lyzátu bylo přidáno 200 µl roztoku srážícího proteiny a ponecháno srážet 5 min na ledu. Lyzát byl centrifugován (16000×g, 5 min, pokojová teplota) a supernatant byl přenesen do 600 µl isopropanolu. Následovala stejná centrifugace a po ní byl sediment promyt 600 µl 70% ethanolu. Opět následovala stejná centrifugace. Byl odstraněn supernatant a DNA byla vysušena ve vakuu při 42 °C. DNA byla resuspendována ve 100 µl rehydratačního roztoku.

3.2.2.13 DNA sekvenování

Sekvenace byla prováděna na servisním pracovišti MBÚ. Výstup ze sekvenátoru byl analyzován v programu Chromas.

3.2.3 Metody práce s proteiny

3.2.3.1 Heterologní produkce proteinů

Z čerstvě narostlých kolonií buněk *E. coli* BL21(DE3) nebo *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL s vloženým expresním vektorem obsahujícím gen pro expresi bylo zaočkováno LB médium (100 ml) na optickou denzitu (OD_{600}) 0,05-0,1. Poté kultura rostla při 37 °C, 200 RPM do OD_{600} 0,6-0,8 (pozdní exponenciální fáze růstu). Po dosažení této OD byla indukována exprese heterologního genu přidáním IPTG (40 μ l 1M IPTG na 100 ml kultury). Poté byla přemístěna kultura do různých postindukčních teplot. Po kultivaci byly buňky odděleny centrifugací (4000 \times g, 15 min, 4 °C). Buňky byly buď rovnou resuspendovány a sonikovány nebo byly zmrazeny a uchovávány při -20 °C.

3.2.3.2 Sonikace po heterologní expresi *lmbX*

Buňky *E. coli* BL21(DE3) a BL21(DE3)/pGroESL získané centrifugací kultury produkující rekombinantní protein LmbX byly resuspendovány v sonikačním pufru – 1/20 objemu kultivace. K buňkám získaným ze 100 ml kultury bylo přidáno 5 ml sonikačního pufru. Suspenze byla rozdělena po 1 ml a sonikována 3 \times 10 s. Buňky a bezbuněčné extrakty byly chlazeny v ledové lázni. Po sonikaci byly bezbuněčné extrakty centrifugovány (16000 \times g, 15 min, 4 °C). Vzorky rozpustné i nerozpustné frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, nebo byla pro další práci použita pouze rozpustná frakce, z které byl purifikován LmbX.

3.2.3.3 Metaloafinitní chromatografie HiTrap

Tato metoda slouží k purifikaci proteinů. Jde o afinitní chromatografii, kde na kolonce (HiTrap Chelating) je sorbent, na kterém je připojena iminoctová kyselina a ta váže nikelnaté ionty. Ty pak reverzibilně reagují s histidinovou kotvou proteinu. Zachycené molekuly jsou vymývány roztoky se vzrůstající koncentrací imidazolu. Nakonec je eluován protein s histidinovou kotvou. Všechny roztoky byly vychlazené, aby se zabránilo denaturaci proteinu.

Nejprve byla připravena kolonka o objemu 1 ml. Pro vymytí 20% ethanolu, v kterém je uchovávána, byla kolonka promyta 5 ml dH₂O. Pak byla nabitá 0,5 ml 1M NiSO₄. Opět byla promyta 5 ml dH₂O a pak 5 ml sonikačního pufru. Na kolonku byl pomalu nanášen vzorek – supernatant získaný centrifugací sonikovaných buněk. Poté byla kolonka promývána sonikačními pufrů se zvyšující se koncentrací imidazolu (po 5 ml každé koncentrace) a jímány frakce po 1 ml. Po eluci proteinu byla kolonka promyta 5 ml sonikačního pufru. Proteiny v jímáných frakcích byly detekovány na nitrocelulosové membráně barvením Ponceau S a analyzovány na SDS-PAGE.

3.2.3.4 Dialýza

Dialýza je separační metoda, která slouží pro oddělení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek pomocí polopropustné membrány. Dialýza byla používána po purifikaci proteinu s cílem odstranit imidazol, který je obsažen v roztoku proteinu po jeho purifikaci. Imidazol na rozdíl od velkých molekul proteinů membránou prochází.

Nejprve byla připravena dialyzační membrána. Z kotouče byl odstřížen odpovídající kus dialyzační membrány a 10 min povařen v roztoku pro přípravu dialyzační membrány. Následně byl povařen 10 min v dH₂O. Takto připravená (změkklá) vychladlá membrána byla promyta 3 ml sonikačního pufru a na jedné straně uzavřena klipsem. Byl vnesen vzorek (v sonikačním pufru s imidazolem) a membrána byla uzavřena klipsem i na druhé straně. Pak byla membrána s cca 1 ml roztoku proteinu vložena do kádiny s 2 l dialyzačního pufru (objemový poměr 1 : 2000), který měl stejné složení jako pufr sonikační. Dialýza probíhala na magnetické míchačce při 4 °C přes noc.

3.2.3.5 Detekce proteinu roztokem Ponceau S

Ponceau S je červená barva, která se specificky váže na proteiny. Na nitroceluloseovou membránu bylo nanášeno 5 µl vzorku (např. analyzované frakce z kolonky) a ponecháno zaschnout. Poté byla membrána ponořena na 5 min do roztoku Ponceau S a následně byla opláchnuta pod tekoucí vodou. Pokud byly ve vzorku proteiny, na membráně se vytvořila červená skvrna v místě nanášení vzorku.

3.2.3.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE je elektromigrační separační metoda sloužící k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. SDS totiž denaturuje proteiny a dává jim záporný náboj, který je přímo úměrný velikosti proteinu. Záporně nabitě proteiny pak putují ke kladně nabitě elektrodě – anodě.

Ke vzorkům bezbuněčných extraktů (supernatant po sonikaci) a frakcím proteinu získaných při purifikaci proteinu bylo přidáno stejné množství 2× vzorkového pufru obsahujícího merkaptoethanol, který ruší disulfidické vazby. Vzorky nerozpustné frakce po sonikaci byly resuspendovány v 250 µl stejného pufru. Následně byly vzorky se vzorkovým pufrům vystaveny teplotě 80 °C po dobu 15 min.

Byl používán 10% separační gel a aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Elektroforéza probíhala v elektrodoém pufru pro SDS-PAGE při konstantním napětí 200 V. Složení gelů je uvedeno v Tab. 3.8.

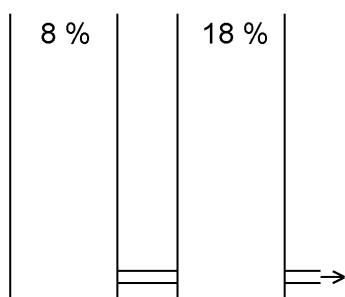
	10% separační gel	zaostřovací gel
akrylamid (40% akrylamid, 1,7% bisakrylamid)	1,25 ml	112 μ l
pufr Tris-HCl - pH 8,9 (1,875 M)	1 ml	-
pufr Tris-HCl - pH 6,9 (1 M)	-	126 μ l
deionizovaná H ₂ O	2,625 ml	875 μ l
SDS (4%)	125 μ l	32 μ l
APS (30%)	5 μ l	2,5 μ l
TEMED	5 μ l	2,5 μ l

Tab. 3.8: Složení separačního a zaostřovacího gelu SDS-PAGE.

3.2.3.7 BN-PAGE

BN-PAGE je elektromigrační separační metoda sloužící k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti, vliv tvaru je ale při této elektroforéze mnohem větší než při SDS-PAGE. BN-PAGE je založena na migraci proteinů v elektrickém poli, které jsou obaleny barvou Coomassie brilliant blue G-250, která uděluje proteinům částečně záporný náboj, ale nedenedaturuje je. Proto umožňuje tato metoda separaci proteinů v jejich nativní konformaci. Pro tuto analýzu je potřeba chladit všechny roztoky, a i samotná elektroforéza probíhá při 4 °C. To je z toho důvodu, aby se proteiny nezdenaturovaly.

V této práci byla prováděna elektroforéza s gradientem 8%-18%. Složení gelů je uvedeno v Tab. 3.9. K získání gradientového gelu bylo používáno zařízení Hoefer SG50 – dvě



Obr. 3.1: Schéma zařízení na přípravu gradientových gelů.

spojené nádoby, z jedné je výpust' (Obr. 3.1). Do komory u výpusti se nalévá hustší gel, do druhé komůrky řidší. Do komůrky s hustším gelem se dává míchadlo. To zaručuje promíchávání přitékajícího řidšího gelu s hustším gelem. Hadičkou z výpusti je gel naléván mezi skla.

Vzorky byly připraveny smícháním se vzorkovým pufrům v poměru 2:1. Standard (Kalibrační kit pro určení molekulových hmotností vysokomolekulárních proteinů) byl rozpuštěn ve 100 μ l sonikačního pufru a také smíchán se vzorkovým pufrům. Aparatura byla používána stejná jako při SDS-PAGE. Mezi skla byl naléván katodový pufr, který je obarvený barvou Coomassie brilliant blue G-250 a do elektroforetické vany byl naléván bezbarvý anodový pufr. V průběhu elektroforézy barva prostupuje gelem, až nakonec začne vytékat spodní stranou gelu. V této fázi byla elektroforéza ukončena. Napětí bylo použito 100 V po dobu půl hodiny až hodiny, než vzorky postoupily do separačního gelu, a pak bylo zvýšeno na 300 V.

	8% separační gel	18% separační gel	zaostřovací gel
akrylamid (48,0% akrylamid, 1,5% bisakrylamid)	483 µl	916 µl	83 µl
gel pufr 3×	1 ml	833 µl	333 µl
glycerol	-	0,5 g	-
APS (30%)	5,5 µl	2,8 µl	2,8 µl
TEMED	1,6 µl	0,8 µl	0,8 µl
dH ₂ O	1,5 ml	347 µl	580 µl

Tab. 3.9: Složení separačních gelů 8 % a 18 % a složení zaostřovacího gelu BN-PAGE.

3.2.3.8 Barvení proteinů po SDS-PAGE a BN-PAGE

Gely byly přeneseny na 10-20 min do nádoby s barvicím roztokem pro SDS-PAGE a BN-PAGE. Pak byly gely odbarvovány nejprve dvakrát horkým odbarvovacím roztokem pro SDS-PAGE a BN-PAGE po dobu 15 min a poté byly přelity odbarvovacím roztokem pokojové teploty a ponechány odbarvovat přes noc.

3.2.3.9 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno soupravou Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit dle návodu. 5 µl standardů (různé koncentrace BSA) a 5 µl naředěných vzorků bylo smícháno s 250 µl činidla Bradfordové v 96 jamkové destičce a kolorimetrické změny byly měřeny při 560 nm na přístroji Multiskan EX. Kalibrační křivka byla sestavena z naměřené absorpance standardů BSA a z ní byla vypočtena koncentrace vzorku.

3.2.4 Testování funkce LmbX

3.2.4.1 Testování funkce LmbX *in vitro*

Předpokládaným substrátem pro LmbX byl žlutý produkt reakce řízené proteinem LmbB1 – kyselina 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová (YT). Tato látka byla získána z předchozích experimentů (NOVOTNÁ *et al.* 2004) a je uchovávána při -70 °C v pevném stavu. Byl připraven 500 mM zásobní roztok.

Funkce LmbX byla testována v přítomnosti YT. Nejprve nebyla do reakční směsi přidávána aditiva. Dále byly zkoušeny přídavky solí. Jako kontroly sloužily stejné reakční směsi bez enzymu. Reakce probíhaly ve 100 µl v pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0. Koncentrace proteinu LmbX byla 1 mg/ml, koncentrace YT a solí byla

10 mM. Reakční směsi byly ponechány 1,5 h při 30 °C. Reakční směsi byly analyzovány ten samý den pomocí UHPLC.

3.2.4.2 Testování funkce LmbX *in vivo*

Funkce LmbX byla testována *in vivo* v heterologním producentovi *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL produkující rekombinantní LmbX.

Buňky byly kultivovány v 13 ml LB média. Po dosažení OD₆₀₀ 0,6-0,7 bylo odebráno 6 ml kultury. U odebrané kultury byla indukována exprese *lmbX* přidáním IPTG a YT byl přidán do celkové koncentrace 5 mM. Exprese probíhala přes noc při 17 °C, 200 RPM. Po kultivaci byly kultury centrifugovány (4000×g, 15 min, 4 °C). Médium bylo odděleno a buňky byly resuspendovány v 500 µl sonikačního pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0. Buňky byly sonikovány 3× 10 s a následně centrifugovány (16000×g, 15 min, 4 °C). Supernatant získaný sonikací a centrifugací kultury byl analyzován pomocí UHPLC.

3.2.4.3 Extrakce a měření YT a podobných látek

Všechny extrakce a měření pomocí UHPLC prováděl Zdeněk Kameník, PhD.

Existuje protokol stanovení produktu enzymu LmbB1 (YT, předpokládaný substrát pro LmbX). Tento protokol byl použit i pro extrakci a měření možných produktů LmbX.

Pro získání produktů z kultivace v LB médiu byla použita extrakce na pevné fázi (SPE = solid phase extraction). Supernatant kultivačního média byl okyselen koncentrovanou kyselinou mravenčí tak, aby jeho pH bylo v rozmezí 2,3–2,7. Takto upravený vzorek (2 ml) byl nanesen na předem kondicionovanou (3 ml methanolu) a ekvilibrovanou (3 ml vody) SPE kolonku Oasis MCX 3cc, 60 mg. Kolonka byla dále promyta (3 ml 2% kyseliny mravenčí) a analyt zachycený na sorbentu byl eluován 1,5 ml methanolu. Eluát byl odpařen do sucha a rozpuštěn ve 2 ml 50% methanolu. Rozpuštění bylo usnadněno promícháním (vortex), sonikací (5 min) a opět promícháním. Takto připravený vzorek byl analyzován UHPLC.

Reakční směs nebo SPE extrakt z LB média byl po centrifugaci (13 000×g, 5 min) analyzován pomocí UHPLC na přístroji Acquity UPLC spojeném s UV detektorem diodového pole 2996 a hmotnostně-spektrometrickým detektorem LCT Premier XE s analyzátozem doby letu. Data byla zpracována pomocí softwaru MassLynx 4.0. 5 µl vzorku bylo dávkováno na kolonu Acquity BEH C₁₈ (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) udržovanou při teplotě 30 °C. Jako mobilní fáze byly použity 0,1% HCOOH (A) a methanol (B) s průtokovou rychlostí 0,4 ml min⁻¹ a s lineární gradientovou elucí (min/% B): 0/5; 1,5/5; 4,5/25 s následným výplachem kolony (100% B, 1,5 min) a ekvilibrací (5% B, 2,0 min). Pro UV detekci bylo použito rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Podmínky hmotnostně-spektrometrické detekce:

napětí na kapiláře, +2400 V; napětí na vstupu do analyzátoru, 240 V; teplota bloku iontového zdroje, 120 °C; teplota desolvatačního plynu – dusíku, 350 °C; průtok desolvatačního plynu, 800 L h⁻¹; průtok dusíku při vstupu do analyzátoru 50 L h⁻¹. Hmotnostní spektrum v pozitivním W módu bylo měřeno v rozsahu hodnot 100-1000 *m/z*. Doba skenu byla 0,1 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při změně polarity, 0,3 s, pro referentní látku, 0,1 s). Jako referentní látka pro udržení přesné hmoty v průběhu měření byl použit leucin-enkefalin (2 ng μl⁻¹, 5 μl min⁻¹).

3.2.4.4 Extrakce a měření linkomycinových derivátů

Optimální podmínky pro extrakci a měření linkomycinu pomocí UHPLC byly publikovány (OLŠOVSKÁ *et al.* 2007). Naše měření probíhala podle modifikovaného protokolu.

Supernatant z kultivace v AVM médiu byl extrahován na pevné fázi pomocí kolonky HLB 3cc (60 mg). Kolonka byla před nanesením vzorku kondicionována 3 ml methanolu a ekvilibrována 3 ml vody. Bylo na ni naneseno 3 ml supernatantu a byla promyta 3 ml vody. Kolonka byla vysušena 1-2 min ve vakuu. Linkomycin a jeho deriváty byly eluovány 1,5 ml methanolu. Eluát byl vysušen na rotační vakuové odparce a následně byl rozpuštěn ve 150 μl 50% methanolu, čímž se získal 20× koncentrovanější vzorek než byl původní supernatant. Pak se vzorek zamíchal (vortex), 5 min sonikoval v lázni a ještě jednou zamíchal. Pro detekci na hmotnostním spektrometru byly takto připravené vzorky naředěny 100× 50% methanolem. Vzorky byly centrifugovány (13000×g, 5 min) a přeneseny do UHPLC vialky.

5 μl vzorků bylo naneseno na chromatografickou kolonu Acquity BEH C₁₈ (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) udržovanou při teplotě 40 °C. Jako mobilní fáze byly použity 1 mM mravenčan amonný, pH 9 (A; připraven titrací roztoku kyseliny mravenčí hydroxidem amonným na příslušné pH) a acetonitril (B) s průtokovou rychlostí 0,4 ml min⁻¹ a s lineární gradientovou elucí (min/% B): 0/5; 1,5/5; 15/70; 16/100 s následným výplachem kolony (100% B, 1 min) a ekvilibrací (5% B, 3 min). UV detekce byla provedena při vlnové délce 194 nm. Podmínky hmotnostně-spektrometrické detekce byly následující: napětí na kapiláře, +2800 V; napětí na vstupu do analyzátoru, 240 V; teplota bloku iontového zdroje, 120 °C; teplota desolvatačního plynu – dusíku, 350 °C; průtok desolvatačního plynu, 800 L h⁻¹; průtok dusíku při vstupu do analyzátoru 50 L h⁻¹. Hmotnostní spektrum v pozitivním W módu bylo měřeno v rozsahu hodnot 100-1000 *m/z*. Doba skenu byla 0,1 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při změně polarity, 0,3 s, pro referentní látku, 0,1 s). Jako referentní látka pro udržení přesné hodnoty *m/z* v průběhu měření byl použit leucin-enkefalin (2 ng μl⁻¹, 5 μl min⁻¹).

3.2.4.5 Testování biologické aktivity linkomycinových derivátů

Testování biologické aktivity prováděl Zdeněk Kameník, PhD.

Biologická aktivita byla testována pomocí diskového difúzního testu. Na disk z filtračního papíru (Whatman) bylo nanášeno 20 μ l SPE extraktu kultivačního média. Po odpaření rozpouštědla byly disky umístěny na kultivační misky s agarovou půdou B1, na které byla nejprve rovnoměrně rozprostřena suspenze citlivé bakterie *Kocuria rhizophila* CCM 552. Takto připravené misky byly kultivovány 24 h při 37 °C. Případné zóny inhibice růstu citlivého kmene vytvořené kolem napuštěného disku indikovaly přítomnost biologicky aktivní látky.

3.2.5 Metoda inaktivace genů u streptomycet

K inaktivaci genů z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu *S. lincolnensis* byl využíván protokol REDIRECT PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) (GUST *et al.* 2003). Podrobný protokol je dostupný na http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf. Celkové schéma protokolu inaktivace genu je znázorněno na Obr. 3.2.

Principem inaktivace genů je vložení inaktivační kazety místo genu homologní rekombinací. Kazeta obsahuje gen kódující rezistenci k apramycinu, takže se dají klony s vnesenou kazetou dobře selektovat. Kazetu ohraničují FRT místa, které rozpoznává FLP rekombinasa, ta vyštěpí kazetu a nechá tzv. jizvu. Délka sekvence jizvy je 81 bp a tedy neporuší čtení genetické informace.

Příprava kazety (kroky 1-3 z Obr. 3.2). V první fázi byla připravena kazeta. Sekvence kazety byla vyštěpena z vektoru pIJ773 restrikcími enzymy *EcoRI* a *HindIII*. DNA odpovídající kazetě byla přečištěna extrakcí z gelu (3.2.2.6). Takto připravená kazeta sloužila jako templát pro PCR (Tab. 3.5). PCR primery byly navrženy dle protokolu REDIRECT (Obr. 3.3). Oba primery obsahují 39 nukleotidů ohraničujících okolí cílového genu a sekvenci kazety (20 nukleotidů přímý primer, 19 nukleotidů zpětný primer). PCR produkt byl přečištěn extrakcí z gelu.

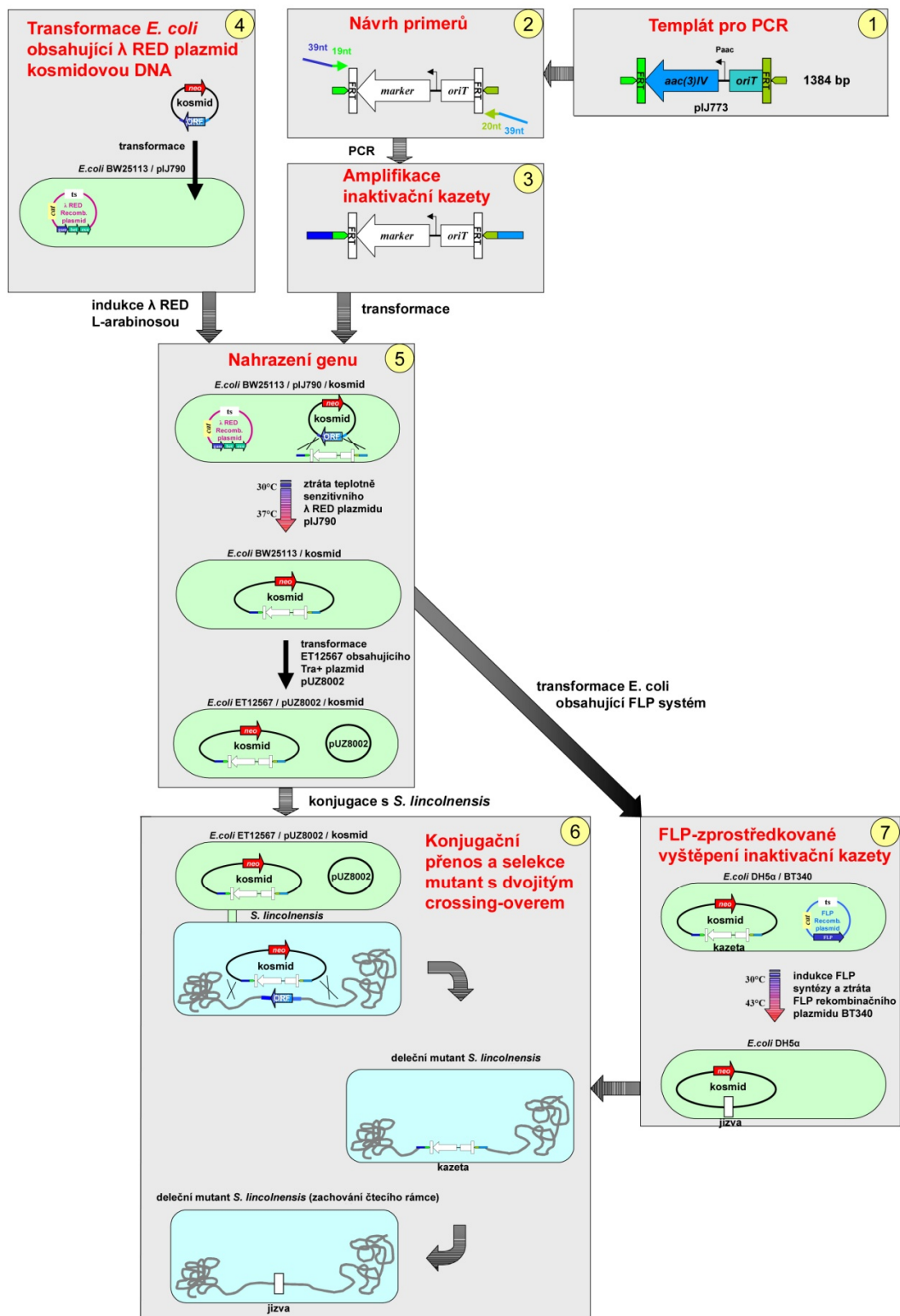
Nahrazení genu kosmidu inaktivační kazetou (4, 5). Do *E. coli* BW25113/pIJ790 byl transformován elektroporací (3.2.2.1) kosmid pLK6 (nese celý genový shluk pro biosyntézu linkomycinu). Buňky byly selektovány na LB agaru s chloramfenikolem, kanamycinem a karbenicilinem. Do takto připravených buněk byla elektroporací vnesena inaktivační kazeta prodloužená o sekvenci homologní s okolím genu, který chceme inaktivovat. Plazmid pIJ790 je λ RED rekombinační plazmid, který umožňuje vysokoúčinnou rekombinaci mezi lineárním DNA fragmentem a cirkulárním kosmidem. Přidáním L-arabiny se aktivují *red* geny. Zvýšením teploty z 30 °C na 37 °C se plazmid ztratí. Selekcí antibiotiky (karbenicilin, kanamycin a apramycin) byly získány buňky BW25113 obsahující kosmid s inaktivační kazetou

vloženou místo genu. Pro potvrzení vložení kazety byla izolována kosmidová DNA (3.2.2.11), která sloužila jako templát pro ověřovací PCR i restriční analýzu. Primery pro ověřovací PCR jsou vzdáleny zhruba 100-300 bp od inaktivovaného genu.

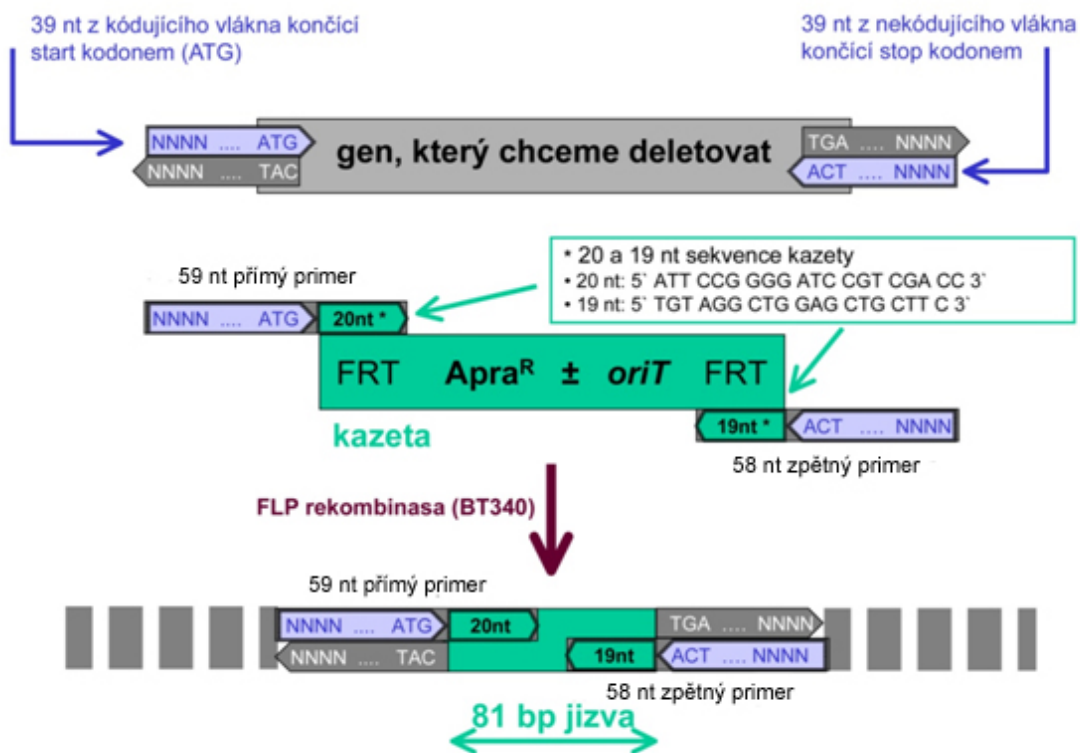
*Mezidruhov*á konjugace (6). Izolovaný kosmid byl elektroporací vnesen do nemethylující *E. coli* ET12567/pUZ8002. Tento kmen byl kultivován v SOC médiu (bohatší médium), protože roste pomalu. Kosmid byl přenesen z *E. coli* do *S. lincolnensis* mezidruhovou konjugací. Spory *S. lincolnensis*, aktivované zahřátím v 500 μ l 2 \times YT média 10 min při 50 °C, byly smíchány s čerstvě elektroporovanými buňkami *E. coli* ET12567/pUZ8002 nesoucí kosmid a směs byla vyseta na MS agar s 10 mM MgCl₂. Po 16 h byl agar přelit 1 ml roztoku kyseliny nalidixové a apramycinu (oba 25 μ l ze zásobních roztoků). Kyselina nalidixová selektivně zabíjí *E. coli* a apramycin selektuje buňky s inaktivační kazetou. Transkonjugáty byly přečárkovány na dva DNA agary – jeden s nalidixovou kyselinou a apramycinem a druhý s nalidixovou kyselinou, apramycinem a kanamycinem. Streptomycety byly selektovány tak dlouho, dokud nebyly senzitivní ke kanamycinu a rezistentní k apramycinu. Rezistence ke kanamycinu se ztrácí, protože po homologní rekombinaci genu dvěma crossing-overy se zbytek kosmidu odstraní. Inaktivovaný gen na chromozomu byl ověřen koloniovou PCR z ověřovacích primerů.

Příprava jizvy (7). Další fází inaktivace genu je příprava jizvy, která neruší přepis genů přítomných za kazetou. Kosmid s vloženou inaktivační kazetou byl vnesen elektroporací do *E. coli* DH5 α /BT340. BT340 je teplotně senzitivní plazmid, který se replikuje při 30 °C. Kóduje FLP rekombinasi, která rozpoznává FRT místa kazety a vyštěpí tedy kazetu z kosmidu. FLP rekombinasi je exprimována při 42 °C. Při této teplotě dochází i ke ztrátě plazmidu. Elektroporované buňky rostly 2 dny při 30 °C na LB agaru s apramycinem a chloramfenikolem. Jednotlivé kolonie byly přečárkovány na LB agar bez antibiotik a ponechány růst přes noc při 42 °C. Vyrostlé kolonie byly přečárkovány na dvě misky s LB agarem. Jedna obsahovala apramycin a druhá kanamycin. Pozitivní jsou kolonie, které vyrostly pouze na kanamycinu. To znamená, že ztratily inaktivační kazetu. Pozitivní kolonie byly ověřeny koloniovou PCR a izolovaný kosmid restriční analýzou.

Dalším krokem je příprava protoplastů *S. lincolnensis*, do kterých se pak vnáší kosmidová DNA s jizvou místo genu. Tato poslední část inaktivace nebyla již provedena.



Obr. 3.2: Schéma protokolu pro inaktivaci genu chromozomu streptomycet dle protokolu REDIRECT. Převzato a upraveno z protokolu REDIRECT.



Obr. 3.3: Schéma návrhu primerů pro delecí genů chromozomu streptomycet dle protokolu REDIRECT. Kazeta obsahuje Apra^R – gen pro rezistenci k apramycinu, *oriT* – počátek replikace a FRT – místa, která rozpoznává FLP rekombinasa. Gen kódující tuto rekombinasa je umístěn na plazmidu BT340. Převzato a upraveno z protokolu REDIRECT.

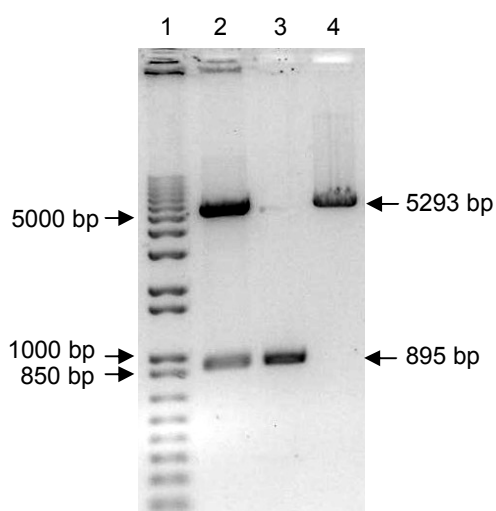
4 Výsledky

4.1 Příprava konstruktů pro heterologní expresi *lmbX*

Pro amplifikaci genu *lmbX* byly navrženy primery, které obsahovaly *NdeI* restrikční místo a start kodon genu *lmbX* (primer Xf) a *XhoI* restrikční místo a stop kodon (primer Xr). Byla provedena PCR při třech různých teplotách nasedání primerů (50 °C, 55 °C, 60 °C). Teplota neměla žádný vliv na výtěžek. Přečištěný PCR produkt byl pomocí TA klonování ligován do vektoru pGEM-T Easy. Ligační směsi byly transformovány buňky *E. coli* JM109. Z buněk pozitivních (bílých) kolonií byla izolována plazmidová DNA. Vložení genu bylo ověřeno endonukleasami *NdeI* a *XhoI* a sekvenováním byla ověřena identita s genem *lmbX*.

Jako expresní vektor byl vybrán pET28. Gen *lmbX* ohraničený restrikčními místy se vložil pomocí *NdeI* a *XhoI* do oblasti mezi dvě sekvence pro histidinovou kotvu. Kotva je připojena pouze na N-konec proteinu LmbX, protože gen *lmbX* končí stop kodonem, což neumožňuje translaci druhé kotvy na C-konci proteinu.

Vektor pET28 a konstrukt *lmbX* v pGEM-T Easy byl štěpen *NdeI* a *XhoI*. K restrikční směsi vektoru byla přidána alkalická fosfatasa. Restrikční směsi byly elektroforeticky rozděleny, fragment DNA požadované velikosti byl vyříznut a přečištěn. Fragment nesoucí sekvenci *lmbX* byl ligován s linearizovaným pET28 a ligační směsi byly transformovány buňky *E. coli* JM109. Z vyrostlých kolonií byla izolována plazmidová DNA a vložení genu bylo ověřeno štěpením *NdeI* a *XhoI* (Obr. 4.1). Takto byl získán vektor pET28 s vloženým genem *lmbX*.

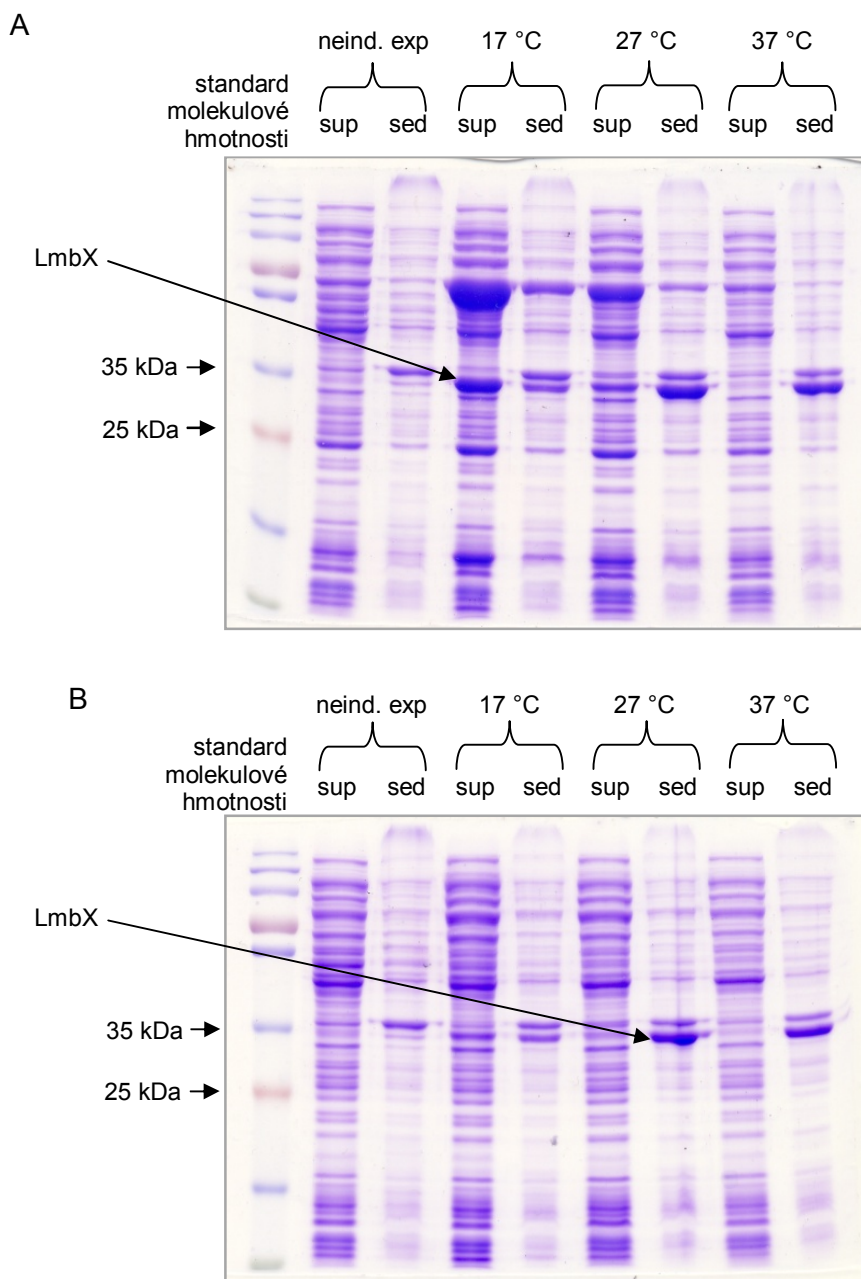


Obr. 4.1: Kontrola připraveného konstruktů pro heterologní expresi *lmbX*. 1 – standard velikosti DNA, 2 – zpětné vyštěpení *lmbX* z pET28, 3 – *lmbX* (získaný štěpením konstruktů pGEM-T Easy s *lmbX* enzymy *NdeI* a *XhoI*, 895 bp), 4 – linearizovaný pET28 (získaný štěpením *NdeI* a *XhoI*, 5293 bp).

4.2 Protein LmbX

4.2.1 Optimalizace podmínek pro heterologní produkci LmbX

Pro zjištění optimálních podmínek nadprodukce rekombinantního proteinu LmbX byly použity dva typy buněk *E. coli* BL21(DE3) a BL21(DE3)/pGroESL. Ty byly kultivovány do pozdní exponenciální fáze. Bylo odebráno 10 ml kultury (z celkového množství 100 ml) pro následnou negativní kontrolu (před indukcí se neprodukuje protein LmbX). U zbytku kultury byla indukována exprese *lmbX* přidáním IPTG. Pro stanovení optimální postindukční teploty byly testovány tři teploty. Bylo odebráno 3× 10 ml kultury a přeneseno do třepaček vytemperovaných na 37 °C, 27 °C a 17 °C. Kultura buněk neindukované exprese byla také paralelně kultivována ve 37 °C. V 17 °C probíhala kultivace 22 h, v 27 °C 4,5 h a ve 37 °C 1 h. Buňky byly odděleny centrifugací a resuspendovány v 500 µl sonikačního pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. Buněčné suspenze byly sonikovány a vzniklý bezbuněčný extrakt byl centrifugován. Ze supernatantu a sedimentu byly připraveny vzorky SDS-PAGE. Vzorky sedimentu a supernatantu indukované i neindukované exprese *lmbX* z různých teplot byly naneseny na SDS PAGE (Obr. 4.2).



Obr. 4.2: Optimalizace podmínek heterologní produkce rekombinantního LmbX (SDS-PAGE).

A: Vzorky kultivace za různých podmínek v *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL.

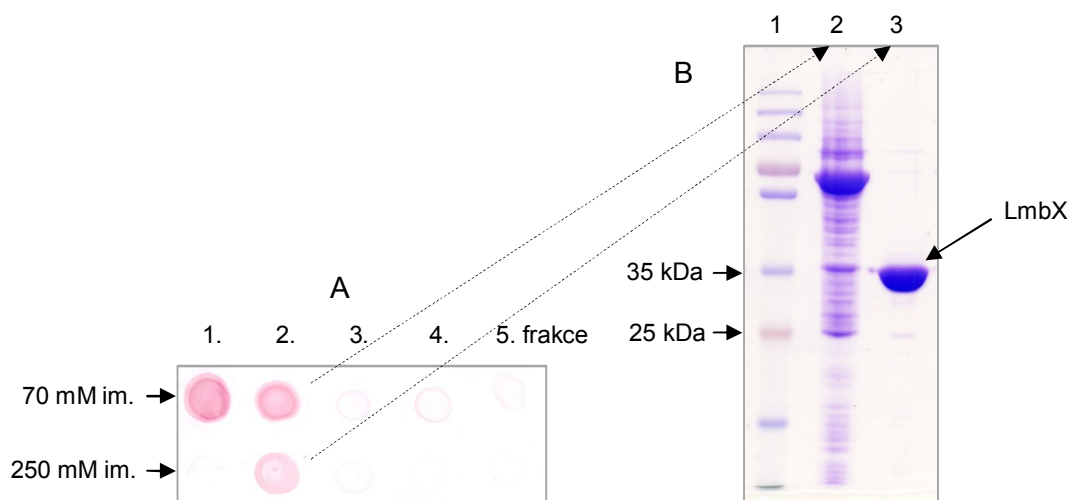
B: Vzorky kultivace za různých podmínek v *E. coli* BL21(DE3).

Vzorky neindukované exprese – negativní kontrola; sup – vzorky supernatantu; sed – vzorky sedimentu.

Z Obr. 4.2 je patrné, že optimální produkce proteinu LmbX v rozpustné formě je při postindukční teplotě 17 °C v buňkách *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL, tedy při koexpresi s chaperony. Rozpustná forma proteinu je důležitá pro jeho následnou purifikaci, proto pro další kultivace byly voleny vždy buňky BL21(DE3)/pGroESL a podmínky exprese 17 °C po dobu 20-22 h. Při 27 °C a 37 °C se LmbX produkuje, ale je z velké části v nerozpustné formě v sedimentu. Vypočtená molekulová hmotnost LmbX je 30727, ale na SDS-PAGE zdánlivá pohyblivost proteinu LmbX odpovídá velikosti 33 kDa.

4.2.2 Purifikace LmbX

Nadprodukovaný LmbX byl purifikován metaloafinitní chromatografií na kolonce. Kolonka byla promývána sonikačními pufrů (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0) se vzrůstající koncentrací imidazolu – 15 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 100 mM a 250 mM. Optimální pro purifikaci LmbX bylo promytí sonikačním pufrům se 70 mM imidazolem a eluce zachyceného proteinu sonikačním pufrům s 250 mM imidazolem. Vzorky frakcí získané promytím a elucí byly nanášeny na nitrocelulosoovou membránu a barveny roztokem Ponceau S (Obr. 4.3A). Vzorky frakcí byly analyzovány i SDS-PAGE (Obr. 4.3B). Přečištěný protein byl následně dialyzován proti sonikačnímu pufru bez imidazolu. Tím se vyřídil imidazol, který je přítomný v pufru proteinu po jeho purifikaci. Po dialýze byl stanoven výtěžek LmbX. Ze 100 ml kultivace byly získány zhruba 3 mg proteinu LmbX.



Obr. 4.3: Purifikace rekombinantního proteinu LmbX (v pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0). A: Nitrocelulosoová membrána se vzorky z purifikace proteinu obarvená roztokem Ponceau S. Nahoře – pět frakcí promytí sonikačním pufrům se 70 mM imidazolem, dole – pět frakcí vymytí sonikačním pufrům s 250 mM imidazolem. B: Purifikace LmbX (SDS-PAGE). 1 – standard molekulové hmotnosti, 2 – vzorek 2. frakce promytí sonikačním pufrům se 70 mM imidazolem, 3 – vzorek 2. frakce vymytí sonikačním pufrům s 250 mM imidazolem.

4.2.3 Zjištění kvartérní struktury a stability LmbX

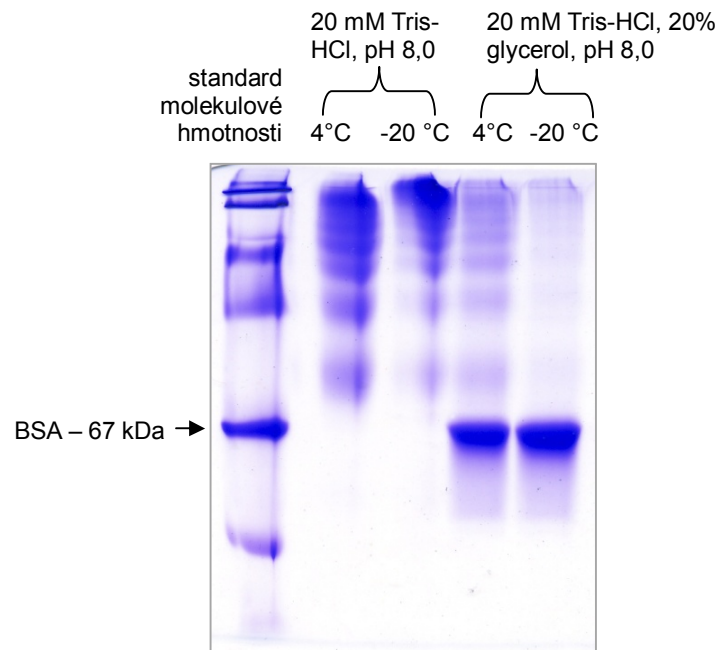
Pro zjištění kvartérní struktury a stability proteinu LmbX byla použita BN-PAGE. Bylo pozorováno, že protein je v původním pufru (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0) nestabilní a tvoří agregáty. Byly proto provedeny další purifikace v různých pufrům lišících se koncentrací NaCl a přítomností 20% glycerolu (vždy byl přítomen 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Glycerol obecně stabilizuje proteiny a inhibuje vznik agregátů. LmbX v sonikačních pufrům

se 100 mM nebo 500 mM NaCl byl purifikován promytím sonikačním pufrům se 70 mM imidazolem a vymýván sonikačním pufrům s 250 mM imidazolem. LmbX v sonikačních pufrům bez NaCl byl purifikován promytím sonikačním pufrům s 15 mM imidazolem a LmbX byl eluován sonikačním pufrům se 70 mM imidazolem. Přehled pufrů a jejich vlivu na tvorbu agregátů LmbX je uveden v Tab. 4.1. Stabilita byla kontrolována pomocí BN-PAGE hned po purifikaci proteinu, po dialýze, po týdnu, po 14 dnech.

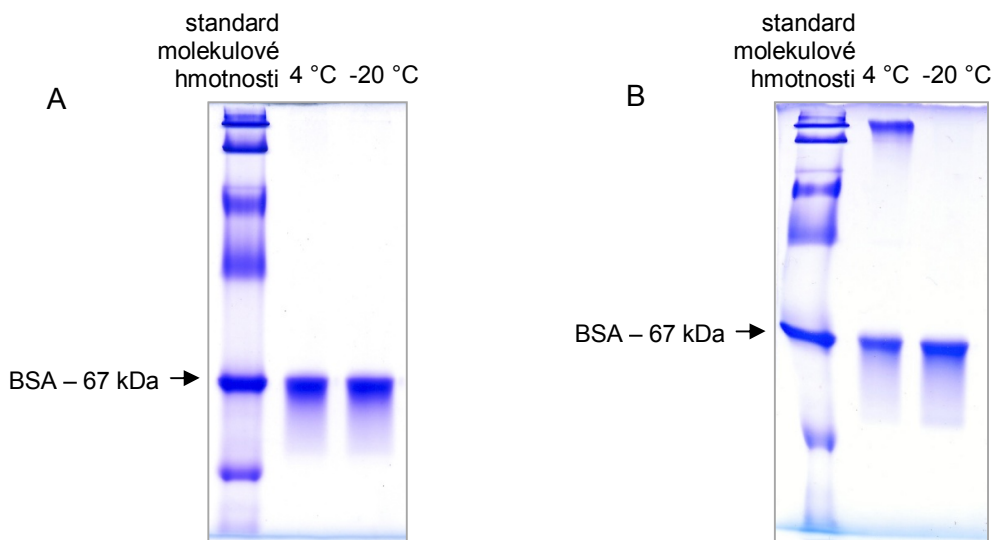
Bylo zjištěno, že množství NaCl, přítomnost glycerolu a teplota skladování má velký vliv na stabilitu LmbX (Obr. 4.4). V pufrům 20 mM Tris-HCl, 100 nebo 500 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0 byl protein nejvíce stabilní (Obr. 4.5). Dále bylo pracováno v pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0. Rozdílná stabilita byla pozorována také při různé teplotě skladování proteinu. Obecně LmbX skladovaný při -20 °C agregoval méně než skladovaný při 4 °C. V pufrům s NaCl a glycerolem však byla částečná agregace pozorována až zhruba po měsíci.

pufr	tvorba agregátů
20 mM Tris-HCl, pH 8,0	po purifikaci
20 mM Tris-HCl, 20% glycerol, pH 8,0	po týdnu
20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0	po purifikaci
20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0	po 4 měsících zhruba polovina LmbX z 4 °C v agregátech, LmbX z -20 °C agregáty netvoří
20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0	po purifikaci
20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0	po měsíci zhruba čtvrtina LmbX z 4 °C v agregátech, LmbX z -20 °C agregáty netvoří

Tab. 4.1: Stabilita LmbX v různých pufrům.



Obr. 4.4: Stabilita LmbX v různých pufrch a při různých teplotách skladování – vzorky LmbX 1 týden po purifikaci (BN-PAGE).
Aplikované množství proteinu – 18 µg.



Obr. 4.5: Stabilita LmbX v čase, v pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0 (BN-PAGE).
A: LmbX 1 týden po purifikaci.
B: LmbX 4 měsíce po purifikaci.
Aplikované množství proteinu – 6 µg.

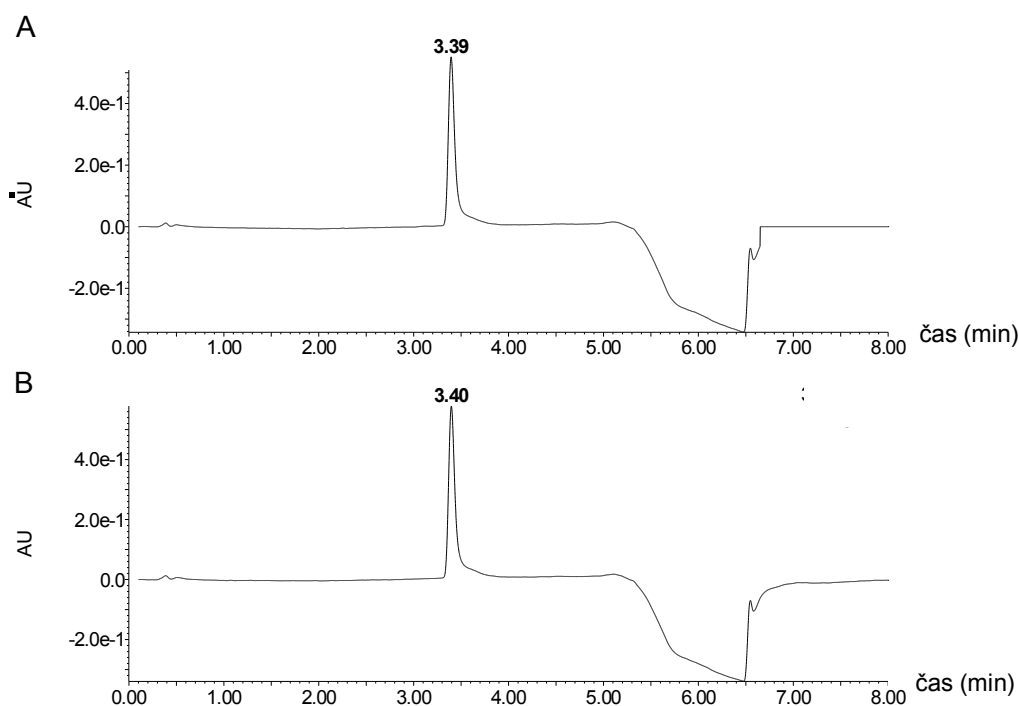
LmbX je na gelech BN-PAGE detekován kolem 67 kDa. To odpovídá zhruba dvojnásobku jeho vypočtené molekulové hmotnosti, takže LmbX je ve své kvartérní struktuře zřejmě ve formě homodimeru.

4.3 Testování funkce LmbX

Dle literatury se biosyntézy PPL účastní šest enzymů. První dvě reakce katalyzované LmbB2 a LmbB1 byly funkčně prokázány. Bylo navrženo, že třetí reakci by měl katalyzovat LmbX (LI *et al.* 2009a). Funkčním testováním LmbB1 byl získán domnělý substrát LmbX, žlutá látka (4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina) (NOVOTNÁ *et al.* 2004), dále označována jako YT. LmbX by měl hydrolyzovat C-C vazbu bočního řetězce YT (Obr. 2.10).

4.3.1 Testování funkce LmbX *in vitro*

Funkce LmbX byla testována *in vitro* v reakční směsi s YT. Jako kontrola sloužila stejná reakční směs bez LmbX. Produkty byly analyzovány pomocí UHPLC s UV/MS detekcí. Měření prováděl Zdeněk Kameník, PhD. Výsledkem bylo, že hydrolyza YT neproběhla a v reakční směsi (jak s LmbX, tak i bez LmbX) byla pozorována jen jedna látka, jejíž retenční čas odpovídal YT (Obr. 4.6).



Obr. 4.6: Pokus o přeměnu látky YT proteinem LmbX *in vitro*, extrahovaný chromatogram při 405 nm.
A: Vzorek reakční směsi s LmbX.

B: Vzorek reakční směsi bez LmbX (kontrola).

V čase 3,4 min – eluční čas látky YT. (Poznámka: AU je jednotka absorbance odpovídající relativnímu množství látek vztážené k referenční látce.)

4.3.2 Hledání optimálních podmínek aktivity LmbX

Protože v reakční směsi s LmbX a YT nevznikal žádný produkt, byly testovány různé podmínky pro aktivitu LmbX. Jiný pufr a pH nebylo testováno, neboť aktivita enzymů katalyzujících první dva kroky biosyntézy PPL byla měřena za podobných podmínek (NOVOTNÁ *et al.* 2004, NOVOTNÁ 2008). Také teplota měněna nebyla. Teplota 30 °C je optimální pro růst streptomycet, a tedy i při této teplotě by měly být enzymy streptomycet aktivní. Byly zkoušeny různé přísady kovových iontů, potenciálních kofaktorů enzymu. Dále byla aktivita testována i *in vivo* v heterologním producentovi *E. coli* s cílem zjistit, zda buněčné prostředí neobsahuje nějakou látku (kofaktor, pomocný protein), která napomáhá aktivitě LmbX. Potřeba nějakého kofaktoru nebo dalších iontů však nevyplývá ze sekvenční analýzy proteinu LmbX, ze sekvence nebyla identifikována přítomnost vazebného místa pro kofaktor. Podobný protein PhzF žádné takové látky nepotřebuje (AHUJA *et al.* 2008).

4.3.2.1 Testování funkce LmbX *in vitro* (vliv iontů)

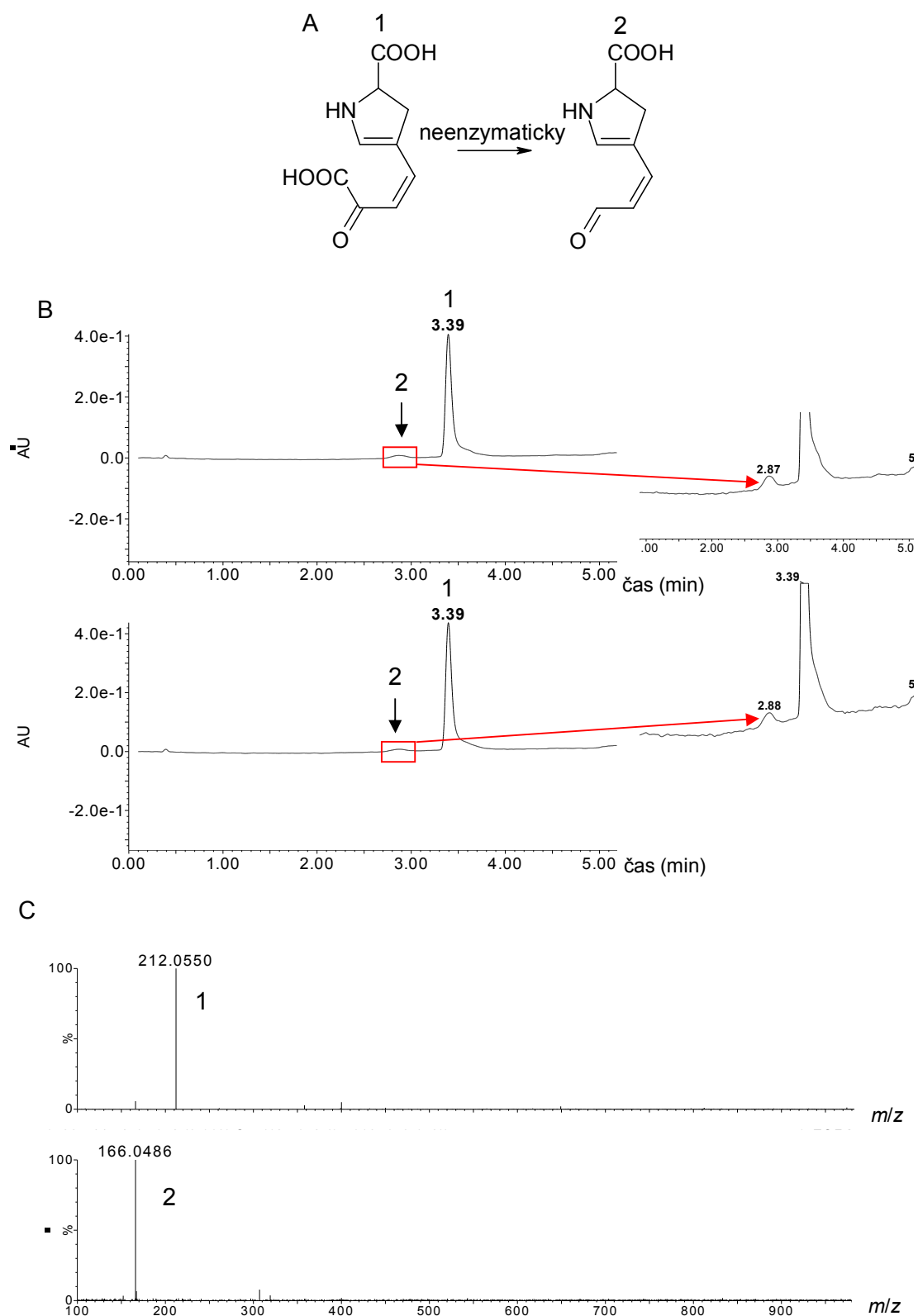
Bylo testováno, zda přidání iontů do reakční směsi s LmbX a YT ovlivní aktivitu LmbX. Byly zkoušeny MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, Fe₃(SO₄)₂ a CuCl₂. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.2. Výsledek pokusu s Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ byl stejný jako u pokusu, při kterém nebyly do reakční směsi přidány soli (kapitola 4.3.1). Na chromatogramu byla detekována pouze jedna látka odpovídající YT.

Zajímavý výsledek byl pozorován na chromatogramu v reakční směsi s Mn²⁺ (Obr. 4.7), kdy byl v retenčním čase 2,9 min eluován minoritní produkt. Hmotnostní spektrum YT změřené v pozitivním módu obsahuje iont s hodnotou m/z 212,06, což odpovídá aduktu YT (M) s vodíkem, tedy $[M+H]^+$. Naproti tomu minoritní produkt pozorovaný v retenčním čase 2,9 min poskytuje v pozitivním módu hmotnostní spektrum s majoritním iontem o hodnotě m/z 166,05. Tato data naznačují, že by se mohlo jednat o dekarboxylovaný YT (N), přičemž pozorovaný iont by představoval adukt $[N-2H+H]^+$. Tuto domněnku by bylo třeba ověřit dalšími experimenty s využitím jiných technik hmotnostní spektrometrie, případně nukleární magnetické rezonance. Vznik uvedeného degradačního produktu byl však pozorován jak v reakci s enzymem, tak bez něj. Zdá se tedy, že manganaté ionty způsobují dekarboxylaci substrátu, enzym LmbX se této reakce ovšem neúčastní.

V reakční směsi s Cu²⁺ a Fe³⁺ vznikaly degradační produkty YT s nízkým retenčním časem 0,48 min a 0,35 min, které bylo obtížné blíže identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Ovšem i v tomto případě vznikaly degradační produkty i bez enzymu. Dále nebyly charakterizovány.

vzorek	koncentrace YT v reakční směsi, mmol/l	koncentrace degradačního produktu substrátu v retenčním čase 2,9 min, mmol/l
0 kontrola	10.8	–
0	10.6	–
Ca²⁺ kontrola	9.5	–
Ca²⁺	10.9	–
Mg²⁺ kontrola	10.9	–
Mg²⁺	11.2	–
Zn²⁺ kontrola	10.3	–
Zn²⁺	10,0	–
Mn²⁺ kontrola	8.3	0.4
Mn²⁺	7.8	0.4
Cu²⁺ kontrola	–	–
Cu²⁺	–	–
Fe³⁺ kontrola	–	–
Fe³⁺	–	–

Tab. 4.2: Koncentrace YT a dekarboxylovaného produktu v reakční směsi bez přidaných solí (označeno 0) a se solemi. Kontrola odpovídá reakční směsi bez LmbX. Koncentrace byla určena z kalibrační křivky YT (UV detekce, 405 nm). Pomlčka značí hodnoty pod limitem detekce.



Obr. 4.7: Vliv mangantých iontů na stabilitu látky YT, předpokládaného substrátu. 1 – YT, 2 – produkt (dekarboxylovaný YT).

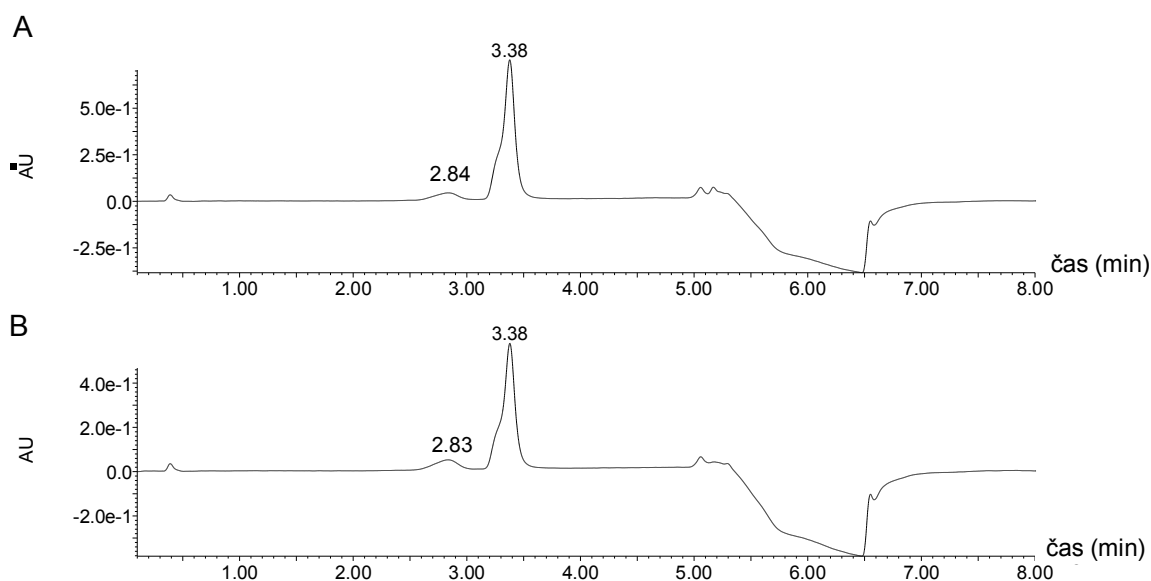
A: Navržené reakční schéma pozorované reakce.

B: Analýza reakční směsi – chromatogram (měřeno při 405 nm). Nahoře – vzorek reakční směsi s LmbX, dole – vzorek reakční směsi bez LmbX (kontrola). V čase 2,9 min – minoritní pík produktu (zvětšeno vpravo).

C: Analýza reakční směsi – hmotnostní spektrum odpovídající YT (1) a dekarboxylovanému YT (2).

4.3.2.2 Testování funkce LmbX *in vivo*

Protože nebyla prokázána funkce *in vitro*, byl proveden pokus přidání YT přímo k buňkám *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL, které exprimovaly gen *lmbX*. YT byl přidán po indukci exprese v celkové koncentraci 5 mM. Expres probíhala za optimálních podmínek při 17 °C 22 h. Jako kontrola byly kultivovány buňky *E. coli* BL21(DE3)/pGroESL bez plazmidu pET28 s vloženým genem *lmbX* a se stejnou koncentrací YT. Supernatanty z kultivace a po sonikaci buněk byly smíchány, extrahovány na pevné fázi a analyzovány UHPLC (Obr. 4.8).



Obr. 4.8: Vliv buněčného prostředí na YT. Extrahovaný chromatogram při 405 nm.

A: Vzorek kultivace bez enzymu LmbX (kontrola).

B: Vzorek kultivace s enzymem LmbX.

V čase 3,4 min – YT, v čase 2,8 min – dekarboxylovaný YT.

Výsledek testování funkce LmbX přímo v buňkách byl podobný jako při pokusu *in vitro* s manganatými ionty. V retenčním čase 2,8 min vznikl nový produkt, zřejmě dekarboxylovaný YT. Nesymetrický tvar píku YT v retenčním čase 3,4 min navíc naznačuje vznik dalšího degradačního produktu koelujícího s YT. Podstatné ovšem je, že přítomnost LmbX neměla na vznik žádné z těchto látek vliv, což je vidět z porovnání chromatogramů vzorků s LmbX a kontrolních vzorků bez LmbX, které jsou velmi podobné.

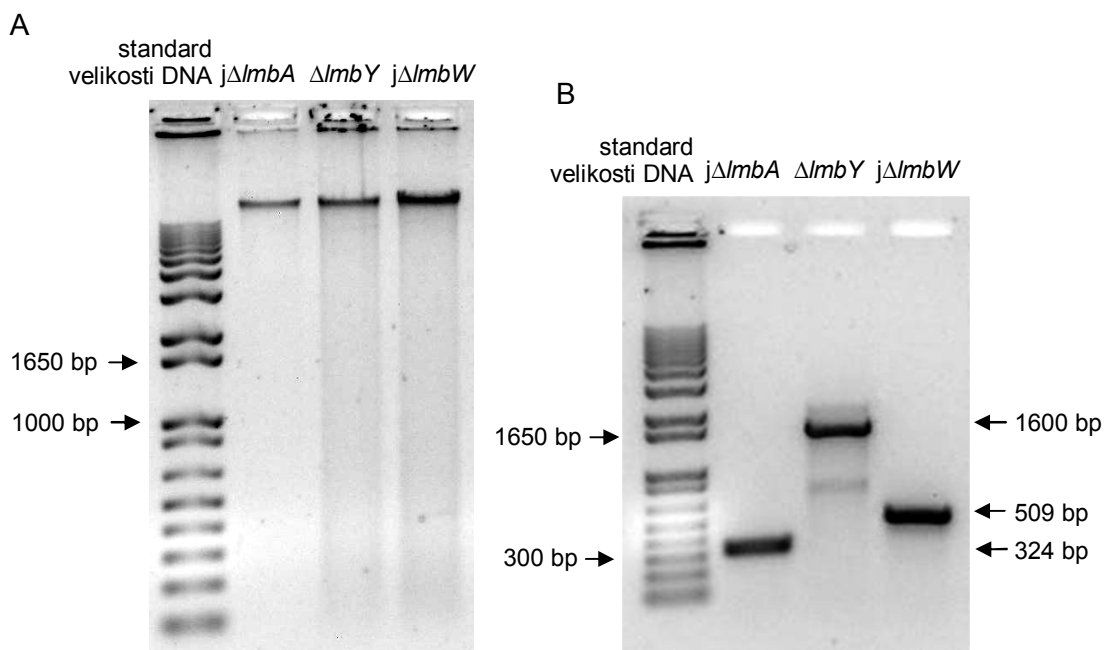
Výsledkem testování funkce LmbX bylo zjištění, že LmbX zřejmě nekatalyzuje reakci, která byla předpokládána. Zato bylo zjištěno, že YT je v buněčném prostředí *E. coli* nestabilní a podléhá degradaci.

4.4 Ověření mutantních kmenů *S. lincolnsensis* s deletovanými geny pro PPL dráhu

Neprokázáním funkce LmbX bylo zpochybněno navržené schéma biosyntézy PPL. Proto byla další práce zaměřena na PPL dráhu jako celek. V naší laboratoři jsou k dispozici mutantní kmeny *S. lincolnsensis*, které mají deletované jednotlivé geny PPL dráhy. První dva kroky v biosyntéze PPL jsou již prokázány, proto byla práce zaměřena na zbylé čtyři geny, které kódují proteiny účastnící se biosyntézy PPL. Jsou k dispozici mutantní kmeny *S. lincolnsensis* označené jako $j\Delta lmbA$, $j\Delta lmbW$, $j\Delta lmbX$, u kterých je odpovídající gen nahrazen sekvencí jizvy, a kmen $\Delta lmbY$, u kterého je gen nahrazen jen inaktivační kazetou. Tyto mutantní kmeny byly připraveny v předchozích letech dle protokolu inaktivace chromozomálních genů REDIRECT (SMUTNÁ 2007, NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Mutantní kmeny byly ověřeny a následně u nich byla stanovena produkce linkomycinových derivátů.

Mutantní kmen $\Delta lmbY$ se bude zřejmě svým fenotypovým projevem chovat jako dvojitý mutantní kmen $\Delta lmb(XY)$ ze dvou důvodů. Gen *lmbX* má své vazebné místo pro ribozom v koncové sekvenci *lmbY*. Tyto dva geny se překrývají ve čtyřech nukleotidech, s velkou pravděpodobností je mezi nimi proto tzv. translační vazba (translation coupling). Tím, že je celý gen *lmbY* nahrazen kazetou, je odstraněno i vazebné místo pro ribozom genu *lmbX*. Druhým důvodem je ukončení transkripce za inaktivační kazetou.

Prvním krokem bylo ověřování přítomnosti sekvence jizvy nebo inaktivační kazety u mutantních kmenů *S. lincolnsensis* $j\Delta lmbA$, $j\Delta lmbW$, $\Delta lmbY$. Kmen $j\Delta lmbX$ ověřován nebyl, protože byl ověřen do publikace (ULANOVÁ *et al.* 2010) a je uchováván při -70 °C. Ostatní mutantní kmeny jsou uchovávány přeočkováním a nebyly používány, proto raději ověřeny byly. Mutantní kmeny $j\Delta lmbA$, $\Delta lmbY$, $j\Delta lmbW$ byly kultivovány na MS agaru tak, aby byly získány izolované kolonie. Jedna kolonie byla přenesena na tři různé misky s DNA agary – bez antibiotik, s kanamycinem a s apramycinem. Pokud by kolonie obsahovaly kosmid pLK6, byly by rezistentní na kanamycin, pokud by obsahovaly kazetu, pak by byly rezistentní na apramycin. Výsledek příslušné mutantní kmeny potvrdil. Kmeny $j\Delta lmbA$ a $j\Delta lmbW$ vyrostly jen na DNA agaru bez antibiotik, $\Delta lmbY$ vyrostl i na agaru s apramycinem. Pro další ověření byla izolována chromozomální DNA z mutantních kmenů, která sloužila jako templát pro PCR s ověřovacími primery chAf, chAr, chWf, chWr, chYf, chYr (Obr. 4.9). Teoretická velikost PCR produktu $j\Delta lmbA$ je 324 bp, $\Delta lmbY$ je 1600 bp a $j\Delta lmbW$ je 509 bp. Tyto hodnoty byly potvrzeny pomocí agarosové elektroforézy.



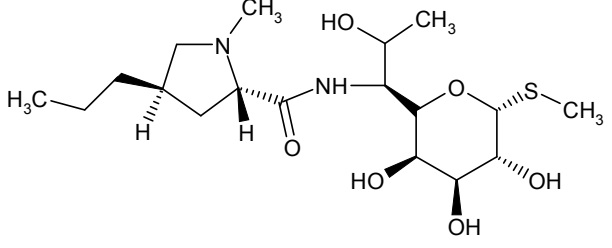
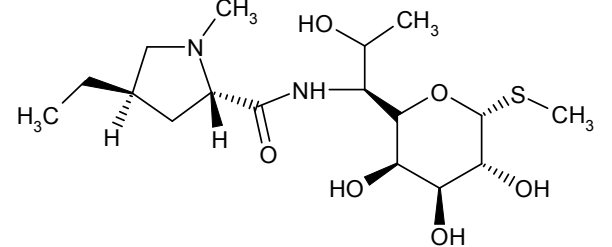
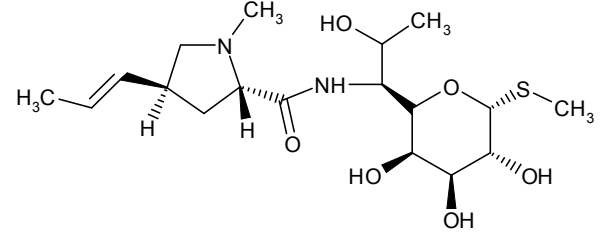
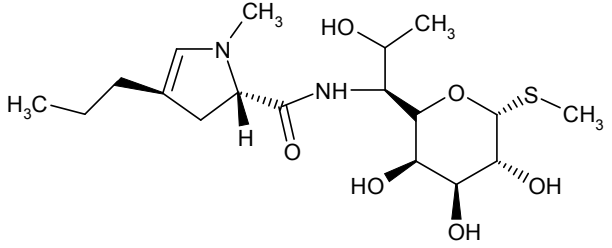
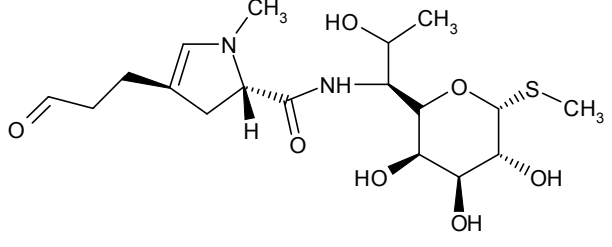
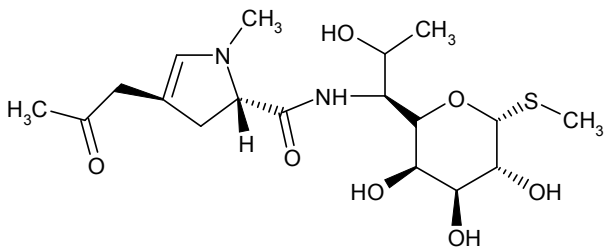
Obr. 4.9: Kontrola mutantních kmenů *S. lincolnensis* s inaktivovanými geny pro PPL dráhu.
 A: Izolace chromozomální DNA.
 B: Ověřovací PCR. Kmen *jΔlmbA* – očekávaná velikost 324 bp; *ΔlmbY* – očekávaná velikost 1600 bp; *jΔlmbW* – očekávaná velikost 509 bp.

4.5 Produkce linkomycinových derivátů mutantními kmeny PPL dráhy

Pro stanovení linkomycinových derivátů produkovaných mutantními kmeny *S. lincolnensis* byla provedena kultivace v AVM médiu a supernatant byl analyzován UHPLC s UV/MS detekcí. Podle hmotnostních spekter produktů byly navrženy struktury produkovaných linkomycinových derivátů (Tab. 4.3).

U divokého kmene byla podle očekávání pozorována majoritní produkce linkomycinu A. U mutantního kmene *ΔlmbY* se neprodukoval žádný linkosamid. Mutantní kmen *jΔlmbW* produkoval linkomycin B, tedy strukturu, která má na bočním řetězci prolinu připojen ethyl. Zajímavý výsledek byl zjištěn u mutantních kmenů *jΔlmbX* a *jΔlmbA*. U *jΔlmbX* se produkoval analog linkomycinu A, který na rozdíl od linkomycinu A postrádá dva vodíky. Z toho vyplývá, že tento analog obsahuje dvojnou vazbu. Po změření hmotnostního spektra s využitím disociace vyvolané kolizí (CID) způsobující fragmentaci iontů bylo potvrzeno, že dvojná vazba se nachází v PPL části derivátu linkomycinu A. Ovšem není zřejmé, kde dvojná vazba přesně leží. V Tab. 4.3 jsou zobrazeny dvě struktury, které odpovídají změřeným datům, ovšem teoreticky existuje několik dalších možností. Tento analog linkomycinu A je dále označován „dehydrolinkomycin A“. Kmen *jΔlmbA* produkoval analog linkomycinu A, jehož

struktura má v PPL části (potvrzeno fragmentací pomocí CID) navíc jeden atom kyslíku a naopak má opět v PPL části o dva atomy vodíku méně. Nedá se ale říci, jestli je produkt *jΔmbA* keton nebo alkohol s dvojnou vazbou na jiném místě molekuly a kde přesně leží tato skupina. V Tab. 4.3 jsou zobrazeny dvě z několika možných struktur, které odpovídají naměřeným datům. Tento analog linkomycinu A je dále označován „oxolinkomycin A“. Protože byl produkován linkomycinový derivát kmenu *jΔmbA* zcela nečekaný, byla provedena kultivace tohoto kmenu znovu. Výsledek byl však stejný – produkoval se oxolinkomycin A. Pro zjištění struktury dehydrolinkomycinu A a oxolinkomycinu A a prostorového uspořádání na chirálních uhlících bude nutné tyto produkty izolovat v dostatečném množství a analyzovat je nukleární magnetickou rezonancí.

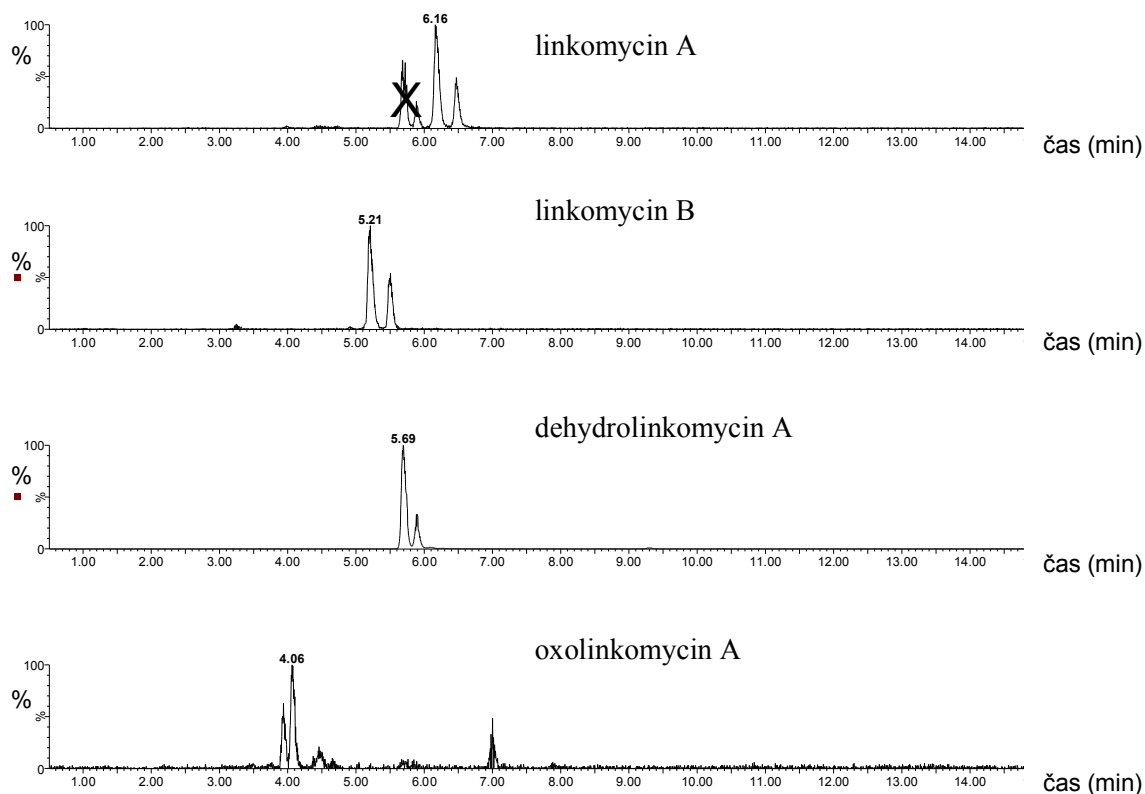
<p>divoký kmen (linkomycin A) $C_{18}H_{34}N_2O_6S$ $M_r - 406,54$ <i>m/z</i> aduktu s vodíkem – 407,2216</p>	
<p><i>jΔlmbW</i> (linkomycin B) $C_{17}H_{32}N_2O_6S$ $M_r - 392,52$ <i>m/z</i> aduktu s vodíkem – 393,2059</p>	
<p><i>jΔlmbX</i> (dehydrolinkomycin A) $C_{18}H_{32}N_2O_6S$ $M_r - 404,53$ <i>m/z</i> aduktu s vodíkem – 405,2059</p>	 
<p><i>jΔlmbA</i> (oxolinkomycin A) $C_{18}H_{32}N_2O_7S$ $M_r - 420,53$ <i>m/z</i> aduktu s vodíkem – 421,2008</p>	 

Tab. 4.3: Linkomycin A a jeho deriváty produkované divokým kmenem *S. lincolnensis* a mutantními kmeny *S. lincolnensis* s inaktivovanými geny pro PPL dráhu jako majoritní produkty. Vyobrazené struktury jsou pouze ilustrační, neboť možných struktur o stejné hodnotě *m/z* může existovat daleko více – skutečná struktura dosud není známa.

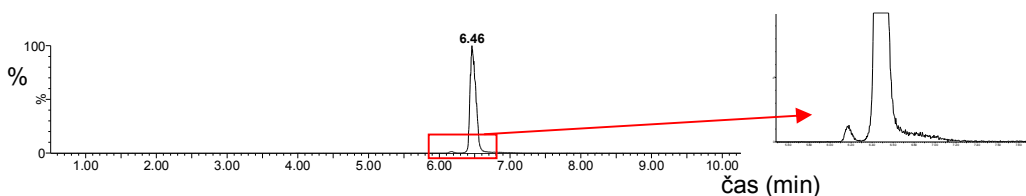
Přítomnost a zastoupení linkomycinu A, linkomycinu B, dehydrolinkomycinu A a oxolinkomycinu A byla prověřena u všech kultivovaných kmenů. Tab 4.4 shrnuje výsledky. Zajímavý výsledek byl získán u mutantního kmenu *jΔlmbX*, kde byly pozorovány dvě látky s odlišným retenčním časem, ale stejnou hodnotou *m/z* (Obr. 4.10). Bude se zřejmě jednat o stereoizomery nebo v případě látky s dvojnou vazbou to mohou být izomery lišící se polohou dvojně vazby. Minoritní produkt druhého izomeru byl pozorován i v případě linkomycinu A produkovaného divokým kmenem (Obr. 4.11). U ostatních kmenů byly pozorované látky tvořeny vždy jen jedním izomerem.

	linkomycin A	linkomycin B	dehydrolinkomycin A	oxolinkomycin A
divoký kmen	8730	104	17	12
<i>jΔlmbW</i>	–	11200	–	–
<i>ΔlmbY</i>	–	–	–	–
<i>jΔlmbA (K1)</i>	55	264	–	2500
<i>jΔlmbA (K2)</i>	174	1910	–	4940
<i>jΔlmbX</i>	601, 295	437, 237	4860, 1620	102, 64

Tab. 4.4: Množství linkomycinu A a jeho derivátů produkovaných divokým kmenem *S. lincolnensis* a mutantními kmeny *S. lincolnensis* s inaktivovanými geny pro PPL dráhu. Hodnoty vyjadřují počet iontů odpovídajících dané látce v maximu chromatografického píku. Zvýrazněny jsou hodnoty pro typické/majoritní látky produkované daným kmenem *S. lincolnensis*. U *jΔlmbX* je uvedeno množství dvou detekovaných izomerů. K1 a K2 u *jΔlmbA* značí dvě nezávislé kultivace. Pomlčka značí hodnoty pod limitem detekce.



Obr. 4.10: Analýza linkomycinových derivátů produkovaných mutantním kmenem *S. lincolnensis* Δ *lmbX*. Extrahováno při *m/z* odpovídající linkomycinu A, linkomycinu B, dehydrolinkomycinu A a oxolinkomycinu A. (Poznámka: hodnota *m/z* linkomycinu A je blízká *m/z* dehydrolinkomycinu A, proto se na prvním chromatogramu ukázaly i oba izomery dehydrolinkomycinu A; tyto píky jsou škrtnuty.)



Obr. 4.11: Linkomycin A produkovaný divokým kmenem *S. lincolnensis*. Extrahovaný chromatogram při *m/z* odpovídající linkomycinu A. Vpravo je zvětšený detail.

Překvapujícím zjištěním bylo, že deleční mutantní kmen Δ *lmbY*, který neprodukuje žádný linkosamid, produkuje biologicky aktivní látku, která inhibuje růst citlivých bakterií *Kocuria rhizophila*. Zdeněk Kameník, PhD na základě dat hmotnostní spektrometrie a porovnání s databází Reaxys zjistil, že se jedná o homology pamamycinu. Následně byly homology pamamycinu detekovány u všech delečních mutantních kmenů. Množství jednotlivých homologů pamamycinu u mutantních kmenů shrnuje Tab. 4.5. Kmen Δ *lmbW* produkuje tyto látky jen ve stopovém množství.

	pamamycin 607 <i>m/z</i> 608.4526	pamamycin 621 A-D <i>m/z</i> 622.4683	pamamycin 635 A-F <i>m/z</i> 636.4839	pamamycin 649 A-B <i>m/z</i> 650.4996
divoký kmen	–	–	–	–
jΔ<i>lmbW</i>	55	44	41	15
Δ<i>lmbY</i>	21000	28200	37100	29100
jΔ<i>lmbA</i> (K1)	1190	3440	4800	4940
jΔ<i>lmbA</i> (K2)	4040	4020	7650	6000
jΔ<i>lmbX</i>	13300	19100	27000	18100

Tab. 4.5: Množství různých homologů pamamycinu produkovaných divokým kmenem *S. lincolnensis* a mutantními kmeny *S. lincolnensis* s inaktivovanými geny pro PPL dráhu. Hodnoty vyjadřují počet iontů odpovídajících dané látce v maximu chromatografického píku. Pamamyciny 621, 635 a 649 existují ve více izomerech, které se nedají rozlišit hodnotou *m/z*. Pamamycin 621 existuje ve čtyřech izomerech A, B, C, D; pamamycin 635 v šesti izomerech A až F a pamamycin 649 existuje ve dvou izomerech A, B. K1 a K2 u jΔ*lmbA* značí dvě nezávislé kultivace. Pomička značí hodnoty pod limitem detekce.

4.6 Inaktivace genů chromozomální DNA

S. lincolnensis

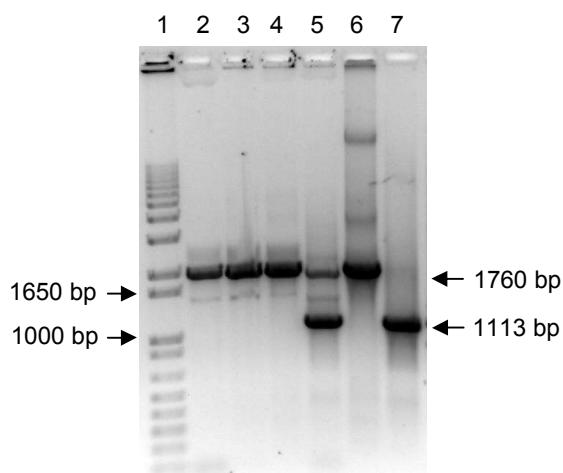
4.6.1 Inaktivace *lmbY*

Protože je v naší sbírce zatím jen kmen Δ*lmbY*, který se zřejmě fenotypově chová jako Δ*lmb(XY)*, byla zahájena příprava mutantního kmenu Δ*lmbY*, ve kterém bude gen *lmbY* nahrazen kazetou jen zhruba ze dvou třetin. Protože *lmbX* a *lmbY* se přepisují ze společného promotoru, který je umístěn před *lmbY*, bude následně nutné kazetu nahradit sekvencí jizvy, protože kazeta ukončuje transkripci a gen *lmbX* by se nepřepisoval. Dle protokolu REDIRECT byl navržen zpětný primer pro inaktivaci *lmbY* (Yrred), který začíná 585 bp od start kodonu *lmbY*. Přímý primer Yfred byl používán z předchozí inaktivace a začíná dle protokolu start kodonem (NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Kazetou vytvořenou pomocí těchto primerů se nahradí 546 bp genu *lmbY* z celkového počtu 888 bp.

Pomocí Yfred a Yrred primerů byla provedena PCR a inaktivační kazeta byla prodloužena o homologní úseky genu a okolí genu *lmbY*. Tyto homologní úseky sloužily k homologní rekombinaci PCR produktu do kosmidu pLK6. Kosmid byl izolován a vložení kazety do kosmidu bylo ověřeno pomocí PCR z chYf, chYr primerů a restriční analýzou. Obě metody potvrdily vložení kazety. Ověřený kosmid s deletovaným *lmbY* byl přenesen konjugací do *S. lincolnensis*. Buňky byly selektovány na rezistenci k apramycinu (kódováno kazetou) a na ztrátu rezistence ke kanamycinu (kódováno kosmidem). Získaný mutantní kmen Δ*lmbY* s vloženou kazetou nahrazující dvě třetiny genu *lmbY* byl ověřen kolonií PCR s chYf, chYr

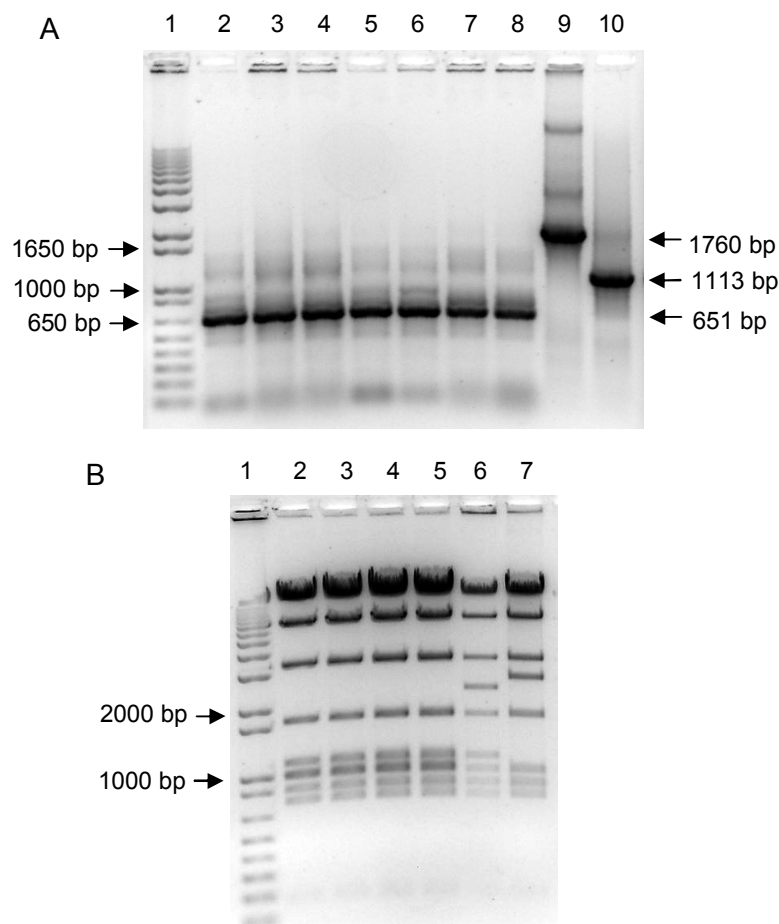
primery (Obr. 4.12). Teoretická velikost PCR produktu $\Delta lmbY$ je 1760 bp. Tato velikost byla potvrzena.

Dále byla z izolovaného kosmidu s vloženou kazetou vyštěpena kazeta FLP rekombinasou a místo kazety zůstala sekvence jizvy. Vyštěpení probíhalo následovně: Kosmid byl vnesen do buněk *E. coli* DH5a s plazmidem BT340, který kóduje FLP rekombinasu. Při 42 °C dochází k její expresi a vyštěpuje kazetu mezi FRT místy. Po noční kultivaci ve 42 °C byly buňky selektovány na rezistenci ke kanamycinu (kódována kosmidem) a ztrátu rezistence k apramycinu (kódováno kazetou). Vyštěpení kazety bylo také ověřeno pomocí PCR z chYf, chYr primerů a restrikční analýzou kosmidu pomocí *Bam*HI (Obr. 4.13). Délka PCR produktu (651 bp) i restrikční analýza odpovídaly teoretickým hodnotám. Je tedy připraven mutantní kmen $\Delta lmbY$ s inaktivační kazetou místo dvou třetin genu *lmbY* a připravený kosmid pLK6 s jizvou místo kazety. V dalším kroku, který zbývá dokončit, bude následovat příprava protoplastů $\Delta lmbY$, do kterých bude vnesen kosmid s jizvou.



Obr. 4.12: Kontrola náhrady genu *lmbY* inaktivační kazetou pomocí koloniové PCR.

1 – standard velikosti DNA; 2-4 – pozitivní klony; 5 – negativní klon; 6 – pozitivní kontrola (PCR z kosmidu pLK6 s vloženou kazetou místo genu *lmbY*, 1760 bp); 7 – negativní kontrola (PCR z nemutovaného kosmidu pLK6, 1113 bp).



Obr. 4.13: Kontrola náhrady inaktivační kazety místo genu *lmbY* sekvencí jizvy.

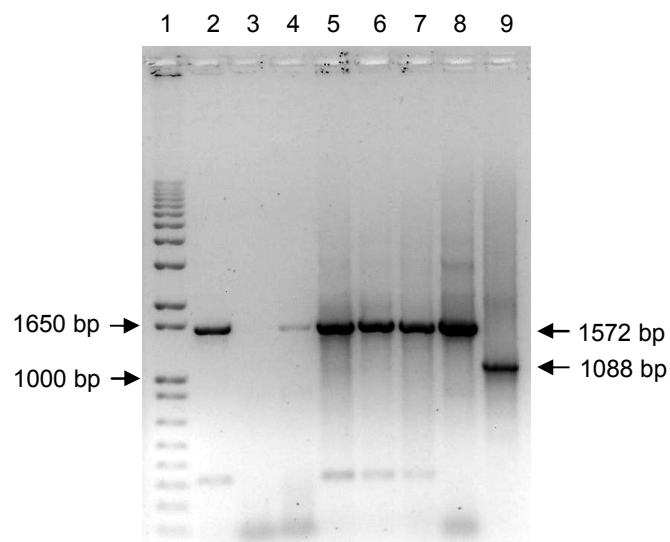
A: PCR. 1 – standard velikosti DNA; 2-8 – pozitivní klony; 9 – negativní kontrola (PCR z kosmidu pLK6 s vloženou kazetou místo genu *lmbY*, 1760 bp), 10 – negativní kontrola (PCR z nemutovaného kosmidu pLK6, 1113 bp).

B: Štěpení kosmidu pLK6 enzymem *Bam*HI. 1 – standard velikosti DNA; 2-5 – pozitivní klony; 6 – negativní kontrola (štěpení kosmidu pLK6 s vloženou kazetou místo genu *lmbY*); 7 – negativní kontrola (štěpení nemutovaného kosmidu pLK6).

4.6.2 Inaktivace *lmbX* v mutantním kmenu *jΔlmbW*

Následně byl připravován dvojité mutantní kmen $\Delta lmb(WX)$, jehož produkční profil by mohl objasnit funkci LmbX. Respektive mohla by být vyvrácena hypotéza, že LmbX hydrolyzuje C-C vazbu. Gen *lmbX* stačí nahradit pouze kazetou, protože za genem *lmbX* není přímo další gen, který by mohl být kazetou ovlivněn.

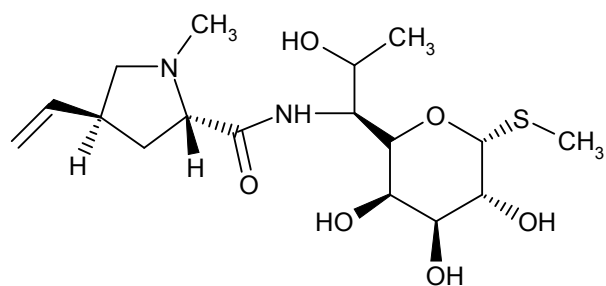
Bylo postupováno stejně jako při inaktivaci *lmbY*. Primery Xfred, Xrred byly navrženy z předchozí inaktivace *lmbX* (SMUTNÁ 2007). Kosmid pLK6 s vloženou kazetou místo genu *lmbX* byl přenesen z *E. coli* do mutantního kmenu *S. lincolnensis* s genem *lmbW* nahrazeným jizvou (NOVOTNÁ a SMUTNÁ nepublikovaná data). Nahrazení genu *lmbX* kazetou bylo ověřeno koloniovou PCR z chXf, chXr primerů (Obr. 4.14). Délka PCR produktu (1572 bp) odpovídala kontrole.



Obr. 4.14: Kontrola náhrady genu *lmbX* inaktivační kazetou pomocí koloniové PCR. 1 – standard velikosti DNA; 2, 5, 6, 7 – pozitivní klony; 3, 4 – negativní klony; 8 – pozitivní kontrola (PCR z kosmidu pLK6 s vloženou kazetou místo genu *lmbX*, 1572 bp); 9 – negativní kontrola (PCR z nemutovaného kosmidu pLK6, 1088 bp).

Takto připravený mutantní kmen byl kultivován jako ostatní mutantní kmeny pro analýzu supernatantu pomocí UHPLC. Bylo očekáváno, že bude vznikat tzv. dehydrolinkomycin B – tedy látka mající dvouuhlíkatý boční řetězec na C4' na rozdíl od dehydrolinkomycinu A, který má tříuhlíkatý boční řetězec (Obr. 4.15). Kmen $\Delta lmb(WX)$ by měl totiž produkovat dvojnou vazbu ve struktuře (jako $j\Delta lmbX$) a měl by být menší o methyl v bočním řetězci prolinu, protože *lmbW* kóduje methyltransferasu.

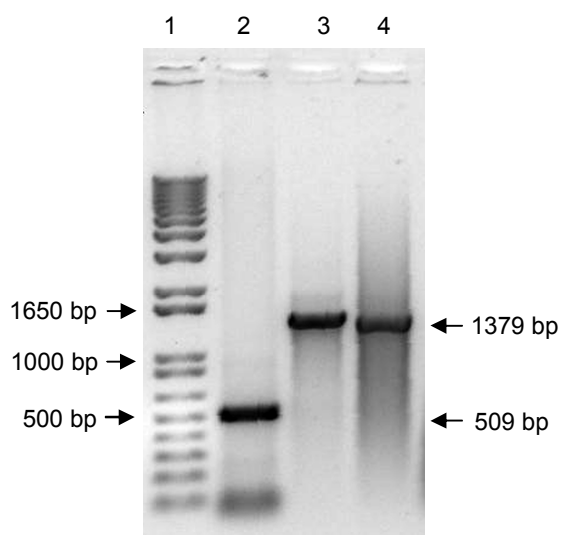
Produkované látky jsou shrnuty v Tab. 4.6. Nebyl pozorován vznik předpokládaného produktu, ale produkce dehydrolinkomycinu A. Všechny látky byly ve dvou izomerech a byla zjištěna produkce pamamycinů. Tyto výsledky se plně shodují s výsledky produkovaných látek mutantního kmenu $j\Delta lmbX$, proto byla přítomnost jizvy místo genu *lmbW* ověřena pomocí PCR z *chWf*, *chWr* primerů u izolované chromozomální DNA z připraveného mutantního kmenu (Obr. 4.16). Z výsledků vyplývá, že jizva v místě genu *lmbW* byla nahrazena zpátky genem *lmbW* z kosmidu pLK6. Tento jev se dá vysvětlit mechanismem, kterým se geny dle protokolu REDIRECT nahrazují. Může totiž docházet k delším náhradám genových úseků, než je pouze náhrada cílového genu. Obecně tento jev nevadí, protože se vymění homologní sekvence, které jsou přítomny na chromozomu a kosmidu. Ovšem v tomto případě rozdíl sekvence chromozomu a kosmidu nebyl jen v genu *lmbX*, ale také v genu *lmbW*. Navíc geny *lmbX* a *lmbW* jsou v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu blízko u sebe, a proto mohlo snadno dojít k nahrazení DNA chromozomu za DNA kosmidu dvěma crossing-overy až za úsekem genů *lmbW-lmbX*.



Obr. 4.15: Jedna z možných struktur dehydrolinkomycinu B.

	linkomycin A	linkomycin B	dehydrolinkomycin A	oxolinkomycin A
$\Delta lmb(WX)$	194, 72	68, 41	4300, 336	–

Tab. 4.6: Množství dvou izomerů linkomycinu A a jeho derivátů produkovaných připraveným mutantním kmenem $\Delta lmb(WX)$. Hodnoty vyjadřují počet iontů odpovídajících dané látce v maximu chromatografického píku. Pomlčka značí hodnotu pod limitem detekce.



Obr. 4.16: Kontrola přítomnosti sekvence jizvy místo genu *lmbW* pomocí PCR.

1 – standard velikosti DNA, 2 – pozitivní kontrola (PCR z chromozomální DNA $\Delta lmbW$, 509 bp), 3 – negativní kontrola (PCR z chromozomální DNA divokého kmenu *S. lincolnsis*, 1379 bp), 4 – PCR z chromozomální DNA připraveného $\Delta lmb(WX)$.

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat protein LmbX, který se účastní biosyntézy PPL, stavební jednotky linkomycinu. Funkce LmbX předpokládaná v původní pracovní hypotéze sice prokázána nebyla, ovšem byly získány výsledky, které celkově naznačují, že PPL dráha probíhá jinak, než se až dosud předpokládalo. V době zadání diplomové práce byla v literatuře přijímána hypotéza, že LmbX katalyzuje hydrolýzu bočního řetězce produktu reakce katalyzované enzymem LmbB1 (YT) (LI *et al.* 2009a). Postupem času však přibývaly poznatky, které tuto domněnku nepotvrzovaly. Zcela zásadní byl v tomto směru poznatek, že genový shluk pro biosyntézu hormaomycinu neobsahuje ortolog genu *lmbX* (HÖFER *et al.* 2011). Výsledná struktura prolinového derivátu hormaomycinu, lišící se od PPL pouze dvojnou vazbou v bočním řetězci, totiž neodpovídá struktuře, která by měla vzniknout, kdyby LmbX katalyzoval hydrolýzu C-C vazby. Prvotním indikátorem, že LmbX může mít v biosyntéze PPL jinou funkci, však bylo již dřívější upřesnění funkce PhzF v biosyntéze fenazinu (AHUJA *et al.* 2008). Původní představa funkce PhzF byla izomerace a následná kondenzace dvou jednotek (BLANKENFELDT *et al.* 2004). V tomto případě nebylo neopodstatněné domnívat se, že když podobný protein může katalyzovat kondenzaci, tak LmbX může katalyzovat děj opačný – hydrolýzu. Ovšem revize funkce PhzF pouze na isomerasu (AHUJA *et al.* 2008) nasvědčuje, že LmbX může vykazovat spíše jinou než hydrolytickou aktivitu. Hydrolytickou funkci však ani dnes úplně vyloučit nelze, neboť funkce ostatních proteinů této široké proteinové rodiny nejsou známy. Nelze proto vyloučit i jiné než isomerasové aktivity v rámci této proteinové rodiny. Ovšem hydrolytickou funkci LmbX nepodporují ani nově získané výsledky v rámci této diplomové práce. Hydrolytická funkce zde nebyla prokázána, a navíc vše nasvědčuje funkci isomerasy, která je i v souladu se srovnávací analýzou proteinové sekvence. Tato práce tedy přináší nový náhled nejen na samotnou funkci proteinu LmbX, ale i na celou biosyntetickou dráhu PPL. Součástí práce je proto i pokus o vytvoření nového schématu, které by plně korespondovalo s dosaženými výsledky. Na interpretaci výsledků chromatografických analýz pro tvorbu tohoto schématu se podíleli Zdeněk Kameník, PhD a Ing. Radek Gažák, PhD.

LmbX

Pomocí nativní elektroforézy bylo zjištěno, že LmbX je zřejmě ve formě homodimeru. To se shoduje s charakterizovanými kvarténními strukturami podobných proteinů. Proteiny PhzF, Ydde a YHI9 jsou také homodimery (BLANKENFELDT *et al.* 2004, GRASSICK *et al.* 2004, LIGER *et al.* 2005). Tím, že je LmbX podobný těmto proteinům nejen sekvenčně, ale i svou kvarténní strukturou, můžeme oprávněněji předpokládat, že bude i podobně fungovat. Z těchto tří proteinů je prokázána funkce pouze u PhzF.

Byly nalezeny optimální podmínky, za kterých se protein LmbX správně skládal a byl po dlouhou dobu stabilní. Tyto podmínky optimální stability byly následně aplikovány i do reakčních podmínek pro zjištění aktivity LmbX.

Funkci LmbX nebylo možné prokázat reakcemi s YT (4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina), produktem reakce řízené proteinem LmbB1, protože nevznikal žádný produkt. Byly přitom testovány různé podmínky pro zajištění aktivity LmbX. Aktivita byla testována v přítomnosti různých solí a zejména širokého spektra iontů kovů, potenciálních kofaktorů enzymu. Dokonce byl proveden experiment *in vivo* v *E. coli*, což mělo zvýšit šanci v případě, že pro aktivitu LmbX jsou potřeba další neidentifikované faktory, jako např. proteiny, které by pomohly LmbX ve sbalení, nebo nějaké kofaktory. Dalším vodítkem byly i údaje z literatury: Kofaktory a ani další ionty nebyly identifikovány jako nezbytné pro aktivitu PhzF (AHUJA *et al.* 2008).

Výsledkem série pokusů prokázat aktivitu enzymu bylo pouze zjištění, že YT, substrát třetího kroku biosyntézy PPL, je za některých podmínek nestabilní jak v buněčném prostředí, tak *in vitro*. V přítomnosti manganatých iontů zřejmě dochází k jeho dekarboxylaci. Manganaté ionty jsou součástí enzymů, které katalyzují dekarboxylaci, avšak i samotné vykazují určitou katalytickou aktivitu (RUND a PLANE 1964). Spontánní dekarboxylativní oxidace za fyziologických podmínek byla popsána u podobné látky, jako je YT. Touto látkou byla 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (DOPAC; hlavní metabolit dopaminu) v umělé cerebrospinální tekutině. V přítomnosti manganatých, měďných a měďnatých iontů je DOPAC dekarboxylován a rychle hydratován a vzniklá látka je následně oxidována (MEFFORD *et al.* 1996). Ovšem DOPAC nemá karbonylovou skupinu jako YT, pozorovaná dekarboxylace tedy probíhá jiným mechanismem. Podle našich výsledků by dekarboxylace YT neměla hrát v biosyntéze PPL roli, což i naznačuje poměr dekarboxylovaného produktu vůči nezměněnému substrátu, který byl velmi malý. Optimalizace podmínek pro aktivitu LmbX však nezahrnovala testování dalších pufrů, ani pH a teploty. Základní testovací podmínky vycházely z optimální teploty růstu *S.lincolnensis*, z optimalizace stability proteinu a optimálních podmínek enzymů katalyzujících první dva kroky biosyntézy PPL (NOVOTNÁ *et al.* 2004, NOVOTNÁ 2008). Další pokusy se změnou těchto podmínek nebyly provedeny, protože v příslušné době publikací o hormaomycinu přibyl zásadní argument, že LmbX má zřejmě jinou funkci a štěpení YT nekatalyzuje. Proto byla další práce zaměřena na připravené mutanty PPL dráhy a charakterizaci jimi produkovaných látek.

Z následných pokusů s inaktivanty PPL dráhy vyplývá, že deleční mutantní kmen $\Delta lmbX$ produkuje dehydrolinkomycin A. To je v souladu s literaturou, kde se uvádí, že hormaomycinový genový shluk neobsahuje gen *lmbX* a produkuje se stejný prolinový derivát, který jsme detekovali při inaktivaci *lmbX* (HÖFER *et al.* 2011). Přesná poloha dvojně vazby u dehydrolinkomycinu A není určena, ale bylo by logické, že bude ve stejné poloze jako

u hormaomycinu. Přesná poloha dvojné vazby dehydrolinkomycinu A bude určena nukleární magnetickou rezonancí.

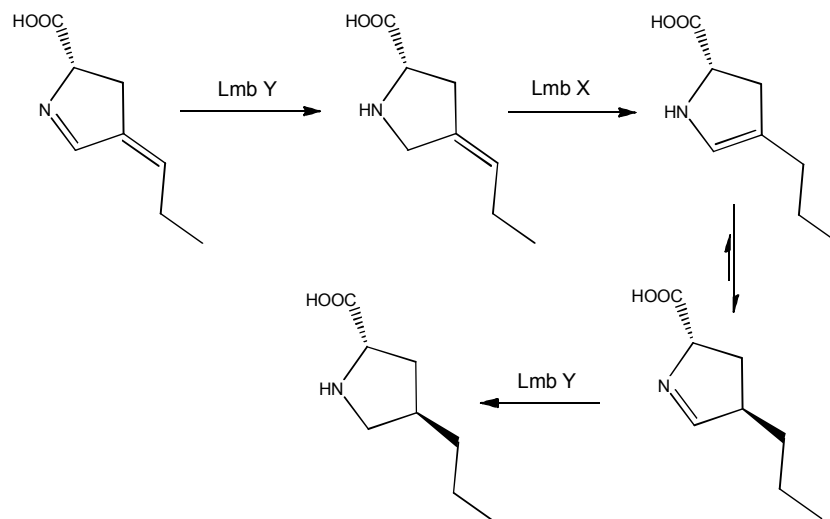
Dehydrolinkomycin A a ostatní měřené látky (linkomycin A, linkomycin B, oxolinkomycin A) produkované kmenem *jΔlmbX* vznikají ve dvou formách, pravděpodobně jako dva prostorové izomery, případně u oxolinkomycinu A a dehydrolinkomycinu A to mohou být izomery lišící se polohou dvojné vazby. Zřejmě se bude jednat o prostorové izomery, protože dva izomery byly pozorovány jak u látek s přítomností dvojné vazby, tak bez ní. Tyto prostorové izomery se pravděpodobně liší různou konfigurací na C4', kde je alkyl připojen k prolinu.

LmbX zřejmě funguje jako isomerasa, která přesouvá dvojnou vazbu u meziprojektu PPL dráhy a účastní se posledních kroků biosyntézy PPL. LmbX pravděpodobně katalyzuje reakci po redukcí LmbY (F420 dependentní reduktasa). Izomerací způsobí přesun dvojné vazby z bočního řetězce do heterocyklu a pak dochází ke spontánnímu přesunu dvojné vazby na dusík. Dvojná vazba na dusíku slouží následně jako substrát pro opakovanou redukcí enzymem LmbY a vzniká PPL (Obr. 5.1; GAŽÁK osobní sdělení). Podle nově navrženého schématu budou dva izomery dehydrolinkomycinu A dva *cis-trans* izomery na dvojné vazbě.

Mechanismus izomerace by mohl být podobný jako u PhzF, který katalyzuje přesun vodíku, což způsobí přesun dvojných vazeb a oxidaci alkoholu na keton (BLANKENFELDT *et al.* 2004). LmbX obsahuje všechny klíčové aminokyselinové zbytky PhzF, ovšem oxidace alkoholu na keton zjevně u LmbX neprobíhá.

Pokud LmbX chybí, pak se majoritně produkuje dehydrolinkomycin A, struktura s dvojnou vazbou. Z toho vyplývá, že meziprojekt PPL dráhy, který je inkorporován do molekuly dehydrolinkomycinu A, není substrátem LmbY, nebo je rozpoznáván jen velmi špatně. Produkce malého množství linkomycinu A, linkomycinu B a oxolinkomycinu A kmenem *jΔlmbX* opravdu naznačuje, že nutnost LmbX není absolutní a že LmbY zřejmě dokáže redukovat meziprojekt PPL dráhy také bez izomerace dvojné vazby. Je ovšem také možné, že LmbY prekurzor dehydrolinkomycinu A nerozpoznává vůbec a izomeraci částečně supluje jiný enzym *S. lincolnensis*.

Pozorovaná velmi malá produkce druhého izomeru u divokého kmenu *S. lincolnensis* může být vysvětlena přítomností spontánní reakce po katalýze LmbX (GAŽÁK osobní sdělení).



Obr. 5.1: Navržené schéma dokončení biosyntézy PPL. LmbY redukuje meziprodukt PPL dráhy. Následně LmbX katalyzuje přesun dvojné vazby z bočního řetězce do heterocyklu a pak dochází ke spontánnímu přesunu dvojné vazby na dusík. Tato dvojná vazba je poté redukována enzymem LmbY a vzniká PPL.

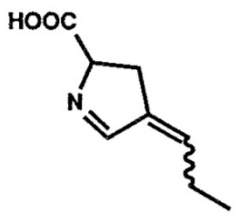
Hydrolytickou funkci LmbX nepodporuje ani skutečnost, že dle uvedených mechanismů štěpení C-C vazby hydrolasami BphD a MhpC (HENDERSON a BUGG 1997, HORSMAN *et al.* 2007), by měl být substrát (YT) hypotetické hydrolasy LmbX rozštěpen ne na bočním řetězci, ale v heterocyklu (GAŽÁK osobní sdělení). Právě tyto hydrolasy však byly označeny v literatuře jako funkčně podobné LmbX (LI *et al.* 2009a, BURKS *et al.* 2011).

Předpokládanou hydrolytickou funkci LmbX by měl také vyvrátit dvojitý mutantní kmen $\Delta lmb(WX)$. Ovšem při vložení inaktivační kazety místo genu *lmbX* do genového shluku pro biosyntézu linkomycinu *S. lincolnensis*, která měla již gen *lmbW* nahrazen sekvencí jizvy, byl gen *lmbW* opět vložen místo sekvence jizvy, a tak byl získán mutantní kmen *S. lincolnensis* pouze s inaktivovaným genem *lmbX* nahrazeným kazetou. V mezikroku byl získán kosmid pLK6, který obsahoval místo *lmbX* kazetu. Tento kosmid bude použit v další práci pro přípravu dvojitého mutantního kmenu. Do kosmidu bude místo genu *lmbW* vložena jiná kazeta, která kóduje rezistenci k hygromycinu. Pak se budou selektovat pozitivní klony $\Delta lmb(WX)$ na rezistenci k apramycinu (kódováno kazetou místo *lmbX*) a hygromycinu (kódováno kazetou místo *lmbW*).

Ostatní produkty inaktivantů propylprolinové dráhy

Testovaný mutantní kmen $\Delta lmbY$ se pravděpodobně fenotypově chová jako kmen s navíc vyřazeným genem *lmbX*. Tento mutantní kmen neprodukoval žádný linkomycinový derivát. Zřejmě se produkoval intermediát PPL dráhy, který nebyl kondenzační enzym schopen rozpoznat a spojit ho s cukernou částí. Pokusy o izolaci a analýzu tohoto intermediátu byly neúspěšné. Enzym LmbY by měl být ze sekvenční podobnosti F420 dependentní reduktasa. To

souhlasí s tím, že mutanční kmen neprodukuje fragment F420, tzv. kosyntetický faktor linkomycinu, nemůže syntetizovat PPL (KUO *et al.* 1992). F420 je koenzym, který přenáší vodíky. V další práci se budu zabývat dokončením delečního mutančního kmenu $\Delta lmbY$, ve kterém gen bude nahrazen jizvou, a bude se tedy produkovat LmbX. Výsledek by měl být stejný jako u necharakterizovaného mutančního kmenu neprodukujícího fragment F420 (Obr. 5.2).



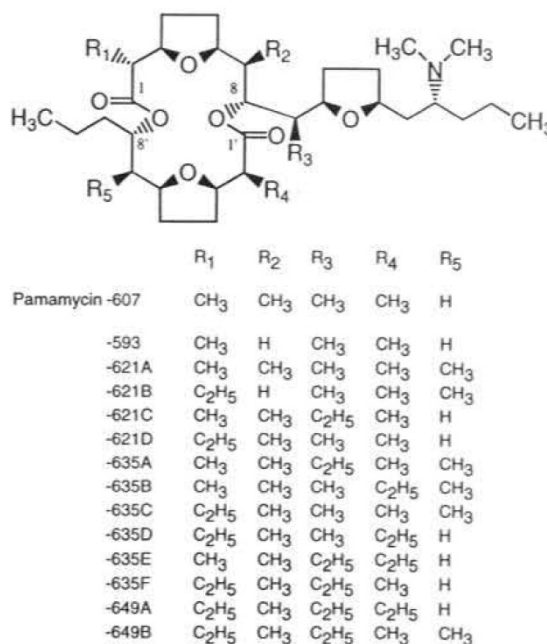
Obr. 5.2: 4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylová kyselina – produkt mutančního kmenu *S. lincolnensis*. Převzato z KUO *et al.* 1992.

Produkt mutančního kmenu $\Delta lmbW$ je v souladu s předpokládanou funkcí LmbW. Je to methytransferasa, která přenáší metyl na boční řetězec prolinu. Pokud je gen vyřazen, pak se produkuje látka pouze s dvouuhlíkatým bočním řetězcem (linkomycin B).

Zato produkt delečního mutančního kmenu $\Delta lmbA$ byl poměrně nečekaný. Produkuje totiž oxolinkomycin A, ale také linkomycin B a linkomycin A ve stopovém množství. Dosud se myslelo, že LmbA je zodpovědný za přenos glutamátových zbytků za účelem aktivace F420, který funguje jako koenzym reduktasy LmbY (PESCHKE *et al.* 1995). Ovšem ani z proteinové sekvence LmbA tato funkce nevychází. Jedná se o γ -glutamyltransferasu. Tento enzym katalyzuje štěpení γ -glutamylu (C-N vazby) z různých látek obsahujících γ -glutamyl, např. z glutathionu, a jeho uvolnění nebo přenos na další aminokyseliny nebo peptidy (OKADA *et al.* 2006). Přenos glutamátu na intermediát PPL dráhy nebyl dosud předpokládán, ale je možné, že k němu dochází. Funkce přenosu glutamátu by odpovídala struktuře oxolinkomycinu A produkovaného $\Delta lmbA$ (diskutováno dále).

Zajímavé bylo zjištění, že se u všech delečních mutančních kmenů produkuje ještě jiná, pro tento druh mikroorganismu nová, biologicky aktivní látka. Jde o čtyři homology pamamycinu s různou molekulovou hmotností (607, 621A-D, 635A-F, 649A-B). Produkce linkomycinu A (z velké části i linkomycinu B) zřejmě inhibuje syntézu pamamycinu. Pamamycin je antibiotikum působící proti Gram pozitivním bakteriím, mykobakteriím a *Neurospora crassa*. Ovlivňuje také vznik vzdušného mycelia u svého producenta, *Streptomyces alboniger*. Tento vliv na *S. alboniger* měl i linkomycin A (MCCANN a POGELL 1979). Produkce pamamycinu u *S. lincolnensis*, producenta linkomycinu A, je zde popsána poprvé. Je tedy možné, že vznik vzdušného mycelia u divokého kmenu *S. lincolnensis* podporuje linkomycin A, zato u delečních mutančních kmenů (s výjimkou $\Delta lmbW$) tuto funkci přebírá pamamycin. Pamamycin 607 podporuje vznik vzdušného mycelia u mnoha druhů

streptomycet a ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů (HASHIMOTO *et al.* 2003). Bohužel v této práci nebyla testována *S. lincolnensis*. Pamamycin je produkován v několika homologních formách. Jsou to makrodiolidy lišící se alkylovými skupinami (methyly, ethyly) na různých místech struktury (Obr. 5.3). Tyto homology se liší i v aktivitě. Se vzrůstající molekulovou hmotností se schopnost stimulace vzdušného mycelia snižuje. Mechanismus stimulace spočívá zřejmě ve zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Pamamycin je však nepřenáší, i když funguje také jako ionofor, který ale naopak přenáší anionty (KONDO *et al.* 1988, NATSUME 1999). Mechanismus inhibice produkce pamamycinu působením linkomycinu A (linkomycinu B) bude zřejmě spočívat v regulaci transkripce, což je obecný mechanismus regulační funkce antibiotik (YIM *et al.* 2006). Bylo popsáno, že linkomycin A reguluje produkci různých látek. Například inhibuje syntézu prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α (NAMEDA *et al.* 2007).



Obr. 5.3: Struktury pamamycinů. Převzato z NATSUME 1990.

Propylprolinová dráha

To, že LmbX zřejmě nekatalyzuje třetí reakci PPL dráhy, vede k myšlence, že PPL dráha bude probíhat jinak, než jsme se dosud domnívali. Původní představa PPL dráhy nebyla jen naše hypotéza, ale všeobecně v literatuře přijímané reakční schéma biosyntézy nejen linkomycinu, ale také PBD a hormaomycinu. Pochyby o PPL dráze byly naznačeny u hormaomycinu: Jeho biosyntetický shluk neobsahuje gen *lmbX*, přesto vzniká látka, v jejíž biosyntéze by podle dosavadního schématu muselo docházet k hydrolyze C-C vazby.

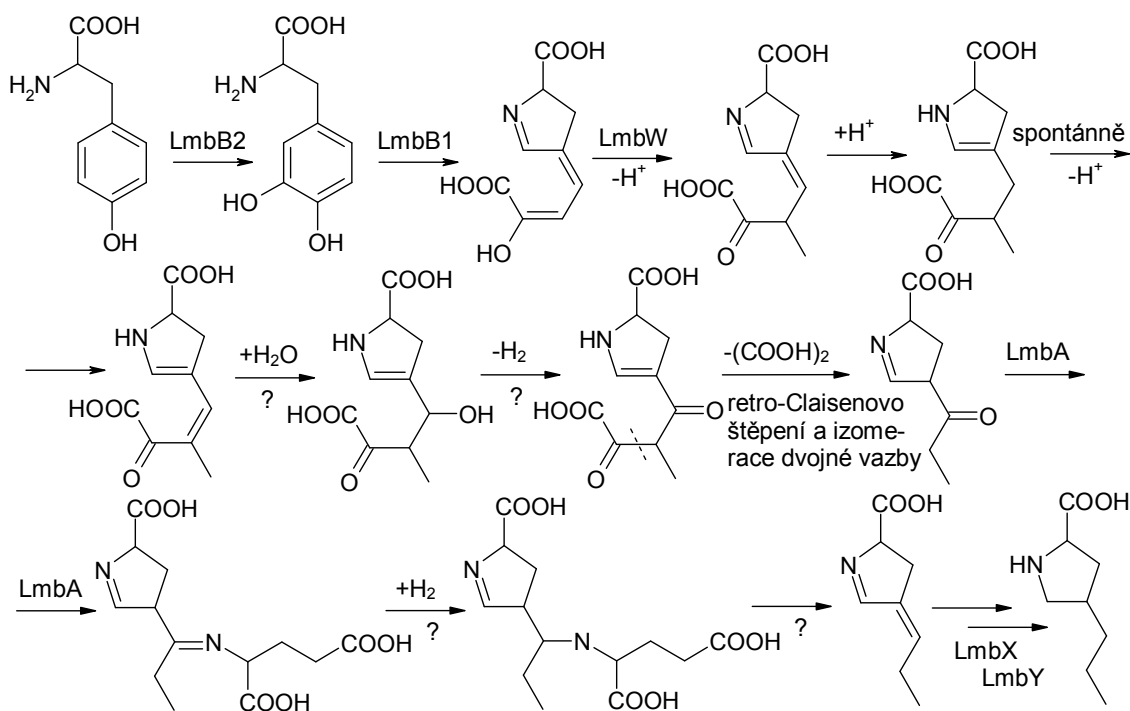
Bylo identifikováno šest genů z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, které se účastní biosyntézy PPL. Z toho funkce dvou enzymů (LmbB2, LmbB1) byla funkčně prokázána. Zbývají tedy čtyři geny kódující enzymy, které by měly být zodpovědné za zbytek dráhy vedoucí k PPL (*lmbX*, *lmbW*, *lmbA*, *lmbY*).

Dle literatury a získaných výsledků vytvořil Ing. Radek Gažák, PhD možný návrh PPL dráhy (Obr. 5.4).

Biosyntéza PPL po prokázaných reakcích katalyzovaných LmbB2 a LmbB1 bude pravděpodobně pokračovat methylací bočního řetězce methyltransferasou LmbW. Produkt reakce katalyzované LmbB1 je totiž nejvhodnější intermediát PPL dráhy pro methylaci, protože je díky přítomnosti karbonylové skupiny schopen akceptovat elektrofilní částici (methyliový karbokation) v α -poloze (GAŽÁK osobní sdělení). Předpoklad, že k methylaci dochází v tomto místě biosyntézy, je v souladu s hypotézou funkce TomN v biosyntéze tomaymycinu. TomN není ortolog methyltransferasy LmbW, ale bylo navrženo, že katalyzuje tautomerizaci, která je analogická tautomerizaci spojené s methylací řízenou ortology LmbW. Tedy TomN by měl fungovat na stejném místě biosyntézy jako LmbW. V literatuře bylo uvedeno, že je možné, že tautomeruje produkt extradiolového štěpení katalyzovaného ortologem LmbB1 (BURKS *et al.* 2011), což by potvrdilo, že methylace a tedy i tautomerizace nastávají u produktů reakcí řízených ortology LmbB1.

Po methylaci dochází zřejmě ke spontánním reakcím, které mají za následek přesun dvojně vazby. Pak by mohlo dojít k hydrataci nebo hydroxylaci bočního řetězce a dehydrogenaci na karbonylovou skupinu. Tyto reakce neprobíhají spontánně, ale jsou katalyzované enzymy. Ovšem žádný z těchto enzymů nebyl v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu zatím identifikován. Je možné, že dehydrogenaci katalyzuje FAD dependentní oxidoreduktasa. To je enzym, který se účastní primárního metabolismu, ale u sibiromycinu a anthramycinu je kódován i v jejich genovém shluku. Avšak enzym, který by mohl katalyzovat předchozí krok, tedy hydrataci násobné vazby, není znám. Enzymy katalyzující tuto reakci jsou nicméně velmi rozšířené v primárním metabolismu (biosyntéza mastných kyselin, ale také citrátový cyklus). Vznik karbonylové skupiny v poloze β vůči dvouuhlíkatému zbytku řetězce tvořenému karboxylovou a karbonylovou skupinou, aktivuje tento meziprodukt k tzv. retro-Claisenovu štěpení a dochází ke spontánnímu (či enzymově asistovanému) odštěpení oxalátu. Následně katalyzuje γ -glutamyltransferasa LmbA navázání γ -glutamyly na karbonylovou skupinu za vzniku iminu. Ten je redukován na amin a amin je odštěpen. Redukce a deaminace by měly být také katalyzované enzymy. Redukce by mohla teoreticky být umožněna stejnou reduktasou, která oxidovala hydroxylovou skupinu na karbonylovou skupinu. Enzym pro deaminaci však znám není. Pak by docházelo k redukci dvojných vazeb reduktasou LmbY s pomocí isomerasy LmbX (Obr. 5.1) a vznikl by PPL (GAŽÁK osobní sdělení).

Všechny reakce jsou jen předpokládáné a musí se potvrdit experimentálně. Nejdůležitější je zjistit polohu karbonylové skupiny oxolinkomycinu A produkovaného $\Delta lmbA$, protože to by mělo potvrdit, že biosyntéza PPL probíhá dle námi navrženého schématu. Pokud však karbonylová skupina bude na jiném místě molekuly, popř. se bude jednat o kombinaci hydroxylové skupiny s dvojnou vazbou, bude ihned zřejmé, že biosyntéza PPL bude probíhat odlišně. Z našeho návrhu PPL dráhy vyplývá, že potřebujeme minimálně tři další enzymy (hydroxylasu/hydratasu, oxidoreduktasu a deaminasu), které jsou teoreticky nutné k dokončení biosyntézy PPL. Tyto enzymy však nejsou kódovány v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu. Teoreticky se může jednat o enzymy primárního metabolismu nebo enzymy genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, které mají špatně určenou funkci. Nicméně zřejmé je, že genové shluky linkomycinu, PBD a hormaomycinu sdílejí pouze šest homologních genů. Potřeba minimálně tří dalších enzymů je citlivé místo nové hypotézy.



Obr. 5.4: Schéma PPL dráhy vytvořené dle získaných výsledků. Otazníkem jsou označeny reakce, které by měly být katalyzované enzymy, které pravděpodobně nejsou součástí genového shluku pro biosyntézu linkomycinu.

Plány do budoucna

Tato diplomová práce neprokázala funkci LmbX, a tím zpochybnila dosud přijímané schéma PPL dráhy. V navazujícím doktorském studiu se budu snažit objasnit sporné body biosyntézy PPL. Nezbytným předpokladem k tomuto úkolu bude izolace produktů tvořených delečními mutantními kmeny $\Delta lmbA$ a $\Delta lmbX$, oxolinkomycinu A a dehydrolinkomycinu A, a určení jejich struktury pomocí nukleární magnetické rezonance, popř. dalších strukturně-

analytických metod. Dále se bude dokončovat deleční mutantní kmen $\Delta lmbY$ a $\Delta lmb(WX)$ a nadprodukovat protein LmbW. Nadprodukce a charakterizace enzymu LmbW je důležitá pro prokázání, že LmbW pokračuje v biosyntéze PPL po reakcích katalyzovaných LmbB2 a LmbB1.

Vyvrcholením charakterizace PPL dráhy bude příprava produkčního kmenu hybridního antibiotika linkomycinového derivátu s využitím genů z genového shluku pro biosyntézu PBD, které by modifikovaly boční řetězec PPL.

6 Souhrn

- Byl nadprodukován protein LmbX z biosyntézy linkomycinu a byly zjištěny optimální podmínky jeho heterologní produkce, purifikace a stability. Nejstabilnější je LmbX v pufru 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20% glycerol, pH 8,0.
- Pomocí BN-PAGE bylo prokázáno, že protein LmbX zřejmě tvoří homodimer. Tento poznatek je v souladu s literaturou, kde je uvedeno, že podobné proteiny mají také homodimerní kvartérní strukturu.
- Hydrolytická funkce LmbX, která byla doposud pro tento protein navrhována, nebyla potvrzena. Aktivita LmbX v přítomnosti domnělého substrátu nebyla prokázána *in vitro* ani *in vivo*.
- Byly určeny linkomycinové deriváty produkované připravenými mutantními kmeny *S. lincolnensis* s inaktivovanými jednotlivými geny pro PPL dráhu. Všechny čtyři identifikované produkty kmenu $j\Delta lmbX$ vznikají ve dvou izomerech, zřejmě prostorových: dehydrolinkomycin A a minoritní oxolinkomycin A, linkomycin A a linkomycin B.
- Hlavním produktem kmenu $j\Delta lmbX$ je dehydrolinkomycin A, který obsahuje dvojnou vazbu v PPL motivu antibiotika. Tato struktura odpovídá mj. prolinovému derivátu ze struktury hormaomycinu, jehož biosyntetický genový shluk ortolog genu *lmbX* skutečně postrádá.
- Byla navržena funkce LmbX. Zřejmě funguje jako isomerasa, která přesouvá dvojnou vazbu intermediátu PPL dráhy, který vznikne po redukci řízené LmbY. Přesun vazby umožní LmbY opakovanou redukci a vznikne konečný produkt dráhy, PPL.
- Na základě produkce linkomycinových derivátů mutantních kmenů *S. lincolnensis* bylo navrženo nové schéma odpovídající získaným výsledkům.
- Produkce linkomycinu A (linkomycinu B) pravděpodobně reprimuje biosyntézu homologů pamamycinů. V mutantních kmenech $j\Delta lmbA$, $j\Delta lmbX$ a $\Delta lmbY$ byla u *S. lincolnensis* nově identifikována tvorba těchto látek, a to ve velkém množství.

7 Seznam literatury

Adefarati, A. A., Giacobbe, R. A., Hensens, O. D. and Tkacz, J. S. (1991): Biosynthesis of L-671,329, an echinocandin-type antibiotic produced by *Zalerion arboricola*: Origins of some of the unusual amino acids and the dimethylmyristic acid side chain. *Journal of the American Chemical Society* 113(9): 3542-3545.

Ahuja, E. G., Janning, P., Mentel, M., Graebisch, A., Breinbauer, R., Hiller, W., Costisella, B., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V. and Blankenfeldt, W. (2008): PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 130(50): 17053-17061.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.

Andam, C. P., Fournier, G. P. and Gogarten, J. P. (2011): Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Reviews* 35(5): 756-767.

Andres, N., Wolf, H. and Zahner, H. (1990). Citováno podle Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J. (2011): Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in inducing cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 45(7-8): 850-855.

Argoudelis, A. D., Eble, T. E., Fox, J. A. and Mason, D. J. (1969): Studies on biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry* 8(8): 3408-3411.

Argoudelis, A. D., Fox, J. A. and Eble, T. E. (1965): U-21,669: a new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry* 4(4): 698-703.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, 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. W., 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., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. and Hopwood, D. A. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885): 141-147.

Bergy, M. E., Herr, R. R. and Mason, D. J. (1963): Antibiotic lincolnensis and method of production. US patent 3086912.

Birkenmeyer, R. and Kagan, F. (1970): Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin. A potent antibacterial agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 13(4): 616-619.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523.

Blankenfeldt, W., Kuzin, A. P., Skarina, T., Korniyenko, Y., Tong, L., Bayer, P., Janning, P., Thomashow, L. S. and Mavrod, D. V. (2004): Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(47): 16431-16436.

Brahme, N. M., Gonzalez, J. E., Rolls, J. P., Hessler, E. J., Mizsak, S. and Hurley, L. H. (1984): Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B. Journal of the American Chemical Society 106(25): 7873-7878.

Burks, E. A., Yan, W. P., Johnson, W. H., Li, W. Z., Schroeder, G. K., Min, C., Gerratana, B., Zhang, Y. and Whitman, C. P. (2011): Kinetic, crystallographic, and mechanistic characterization of TomN: elucidation of a function for a 4-oxalocrotonate tautomerase homologue in the tomaymycin biosynthetic pathway. Biochemistry 50(35): 7600-7611.

Cane, D. E. and Walsh, C. T. (1999): The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. Chemistry & Biology 6(12): R319-R325.

Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Albert, H., Robison, R., Condon, M. A. M., Teplow, D. B., Stevens, D. and Yaver, D. (2002): Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. Microbiology 148: 2675-2685.

Cipolla, L., Araujo, A. C., Airoidi, C. and Bini, D. (2009): Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine as a scaffold for the design and synthesis of anti-tumour drugs. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 9(1): 1-31.

Cirilli, M., Zheng, R. J., Scapin, G. and Blanchard, J. S. (1998): Structural symmetry: the three-dimensional structure of *Haemophilus influenzae* diaminopimelate epimerase. Biochemistry 37(47): 16452-16458.

Coats, J. H., Li, G. P., Kuo, M. S. T. and Yurek, D. A. (1989): Discovery, production, and biological assay of an unusual flavenoid cofactor involved in lincomycin biosynthesis. Journal of Antibiotics 42(3): 472-474.

Colabroy, K. L., Hackett, W. T., Markham, A. J., Rosenberg, J., Cohen, D. E. and Jacobson, A. (2008): Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics 479(2): 131-138.

Connor, K. L., Colabroy, K. L. and Gerratana, B. (2011): A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin. Biochemistry 50(41): 8926-8936.

De Boer, C., Dietz, A. and Hoeksema, H. (1960): Celesticetin, its salts and method of preparation. US patent 2928844.

Deege, M. P. D. and Paterson, D. L. (2011): Reducing the development of antibiotic resistance in critical care units. Current Pharmaceutical Biotechnology 12(12): 2062-2069.

Doroghazi, J. R. and Buckley, D. H. (2010): Widespread homologous recombination within and between *Streptomyces* species. ISME Journal 4(9): 1136-1143.

- Douthwaite, S. (1992): Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 20(18): 4717-4720.
- Eustaquio, A. S., Luft, T., Wang, Z. X., Gust, B., Chater, K. F., Li, S. M. and Heide, L. (2003): Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Archives of Microbiology* 180(1): 25-32.
- Fischbach, M. A. (2009): Antibiotics from microbes: converging to kill. *Current Opinion in Microbiology* 12(5): 520-527.
- Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2006): Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews* 106(8): 3468-3496.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T. and Clardy, J. (2008): The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(12): 4601-4608.
- Garneau, S., Dorrestein, P. C., Kelleher, N. L. and Walsh, C. T. (2005): Characterization of the formation of the pyrrole moiety during chlorobiocin and coumermycin A₁ biosynthesis. *Biochemistry* 44(8): 2770-2780.
- Gatto, G. J., Boyne, M. T., Kelleher, N. L. and Walsh, C. T. (2006): Biosynthesis of pipercolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster. *Journal of the American Chemical Society* 128(11): 3838-3847.
- Grassick, A., Sulzenbacher, G., Roig-Zamboni, V., Campanacci, V., Cambillau, C. and Bourne, Y. (2004): Crystal structure of *E. coli* YddE protein reveals a striking homology with diaminopimelate epimerase. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* 55(3): 764-767.
- Graupner, M., Xu, H. M. and White, R. H. (2002): Characterization of the 2-phospho-L-lactate transferase enzyme involved in coenzyme F₄₂₀ biosynthesis in *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry* 41(11): 3754-3761.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. and Chater, K. F. (2003): PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 1541-1546.
- Hashimoto, M., Kondo, T., Kozono, I., Kawaide, H., Abe, H. and Natsume, M. (2003): Relationship between response to and production of the aerial mycelium-inducing substances pamamycin-607 and A-factor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67(4): 803-808.
- Henderson, I. M. J. and Bugg, T. D. H. (1997): Pre-steady-state kinetic analysis of 2-hydroxy-6-keto-nona-2,4-diene-1,9-dioic acid 5,6-hydrolase: kinetic evidence for enol/keto tautomerization. *Biochemistry* 36(40): 12252-12258.
- Herde, P. and Blankenfeldt, W. (2006): The purification, crystallization and preliminary structural characterization of human MAWDBP, a member of the phenazine biosynthesis-like protein family. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 62: 546-549.

Hoeksema, H. (1964): Celesticetin. IV. The structure of celesticetin. *Journal of the American Chemical Society* 86(19): 4224-4225.

Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A. and Piel, J. (2011): Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chemistry & Biology* 18(3): 381-391.

Horsman, G. P., Bhowmik, S., Seah, S. Y. K., Kumar, P., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. (2007): The tautomeric half-reaction of BphD, a C-C bond hydrolase - kinetic and structural evidence supporting a key role for histidine 265 of the catalytic triad. *Journal of Biological Chemistry* 282(27): 19894-19904.

Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C. M., Zazopoulos, E. and Bachmann, B. O. (2007): Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology* 14(6): 691-701.

Hurley, L. H., Zmijewski, M. and Chang, C. J. (1975): Biosynthesis of anthramycin. Determination of the labeling pattern by the use of radioactive and stable isotope techniques. *Journal of the American Chemical Society* 97(15): 4372-4378.

Chen, C. W., Huang, C. H., Lee, H. H., Tsai, H. H. and Kirby, R. (2002): Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends in Genetics* 18(10): 522-529.

Iriyama, C., Matsuda, S., Katsumata, R. and Hamaguchi, M. (2001): Cloning and sequencing of a novel human gene which encodes a putative hydroxylase. *Journal of Human Genetics* 46(5): 289-292.

Kadlčík, S. (v tisku): Enzymové aktivity využitelné pro přípravu hybridních antibiotik na bázi linkosamidů. *Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Dizertační práce.*

Kadlec, J. (2000): Závěrečný krok biosyntézy linkomycinu. *Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Diplomová práce.*

Kim, C. G., Lamichhane, J., Song, K. I., Nguyen, V. D., Kim, D. H., Jeong, T. S., Kang, S. H., Kim, K. W., Maharjan, J., Hong, Y. S., Kang, J. S., Yoo, J. C., Lee, J. J., Oh, T. J., Liou, K. and Sohng, J. K. (2008): Biosynthesis of rubradirin as an ansamycin antibiotic from *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Archives of Microbiology* 189(5): 463-473.

Kinashi, H. (2011): Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *Journal of Antibiotics* 64(1): 19-25.

Kirby, R. and Hopwood, D. A. (1977): Genetic determination of methylenomycin synthesis by SCP1 plasmid of *Streptomyces Coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* 98: 239-252.

Koběrská, M. (2010): Komparativní analýza shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu. *Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Dizertační práce.*

Koběrská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelinková, M., Ulanová, D., Man, P., Flieger, M. and Janata, J. (2008): Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiologica* 53(5): 395-401.

- Kondo, S., Yasui, K., Natsume, M., Katayama, M. and Marumo, S. (1988): Isolation, physico-chemical properties and biological activity of pamamycin-607, an aerial mycelium-inducing substance from *Streptomyces alboniger*. *Journal of Antibiotics* 41(9): 1196-1204.
- Koo, C. W. and Blanchard, J. S. (1999): Chemical mechanism of *Haemophilus influenzae* diaminopimelate epimerase. *Biochemistry* 38(14): 4416-4422.
- Kuo, M. S., Yurek, D. A., Coats, J. H., Chung, S. T. and Li, G. P. (1992): Isolation and identification of 3-propylidene- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *Journal of Antibiotics* 45(11): 1773-1777.
- Kuo, M. S. T., Yurek, D. A., Coats, J. H. and Li, G. P. (1989): Isolation and identification of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, an unusual cosynthetic factor in streptomycetes, from *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Antibiotics* 42(3): 475-478.
- Leimgruber, W., Batcho, A. D. and Schenker, F. (1965): The structure of anthramycin. *Journal of the American Chemical Society* 87(24): 5793-5795.
- Li, H., Graupner, M., Xu, H. M. and White, R. H. (2003): CofE catalyzes the addition of two glutamates to F₄₂₀-0 in F₄₂₀ coenzyme biosynthesis in *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry* 42(32): 9771-9778.
- Li, W., Chou, S. C., Khullar, A. and Gerratana, B. (2009b): Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2958-2963.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A. and Gerratana, B. (2009a): Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2869-2878.
- Liger, D., Quevillon-Cheruel, S., Sorel, I., Bremang, M., Blondeau, K., Aboufath, I., Janin, J., van Tilbeurgh, H. and Leulliot, N. (2005): Crystal structure of YHI9, the yeast member of the phenazine biosynthesis PhzF enzyme superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 60(4): 778-786.
- Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. and Chen, C. W. (1993): The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology* 10(5): 923-933.
- Magerlein, B. J. (1971): Modification of lincomycin. *Advances of applied microbiology* 14: 185-229.
- Magerlein, B. J., Birkenmeyer, R. D., Herr, R. R. and Kagan, F. (1967): Lincomycin. V. Amino acid fragment. *Journal of the American Chemical Society* 89(10): 2459-2464.
- Matter, A. M., Hoot, S. B., Anderson, P. D., Neves, S. S. and Cheng, Y. Q. (2009): Valinomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*: conservation, ecology and evolution. *Plos One* 4(9): e7194.
- Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M. and Thomashow, L. S. (1998): A seven-gene locus for synthesis is of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Journal of Bacteriology* 180(9): 2541-2548.

- McCann, P. A. and Pogell, B. M. (1979): Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *Journal of Antibiotics* 32(7): 673-678.
- Mefford, I. N., Kincl, L., Dykstra, K. H., Simpson, J. T., Markey, S. P., Dietz, S. and Wightman, R. M. (1996): Facile oxidative decarboxylation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catalyzed by copper and manganese ions. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1290(3): 224-230.
- Miyamoto, M., Sawa, T., Kondo, S., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1978): Biosynthesis of neothramycin. *Journal of Fermentation Technology* 56(4): 329-333.
- Nameda, S., Miura, N. N., Adachi, Y. and Ohno, N. (2007): Lincomycin protects mice from septic shock in β -glucan-indomethacin model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30(12): 2312-2316.
- Natsume, M. (1999): Differentiation of aerial mycelia - pamamycins and calcium ion in *Streptomyces alboniger*. *Actinomycetologica* 13(1): 11-19.
- Neusser, D., Schmidt, H., Spížek, J., Novotná, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichý, P. and Piepersberg, W. (1998): The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Archives of Microbiology* 169(4): 322-332.
- Novotná, J. (2008): Studium biosyntetické dráhy antibiotika linkomycinu. Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Dizertační práce.
- Novotná, J., Honzátko, A., Bednář, P., Kopecký, J., Janata, J. and Spížek, J. (2004): L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* 271(18): 3678-3683.
- Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H. and Fukuyama, K. (2006): Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17): 6471-6476.
- Olšovská, J., Jelinková, M., Man, P., Koběřská, M., Janata, J. and Flieger, M. (2007): High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A* 1139(2): 214-220.
- Otvos, L. (2002): The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(7): 1138-1150.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H. Z. and Piepersberg, W. (1995): Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology* 16(6): 1137-1156.
- Petrusek, R. L., Anderson, G. L., Garner, T. F., Fannin, Q. L., Kaplan, D. J., Zimmer, S. G. and Hurley, L. H. (1981): Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the *in vitro* deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycin A and B. *Biochemistry* 20(5): 1111-1119.

- Pierson, L. S. and Pierson, E. A. (2010): Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6): 1659-1670.
- Pillai, B., Cherney, M., Diaper, C. M., Sutherland, A., Blanchard, J. S., Vederas, J. C. and James, M. N. G. (2007): Dynamics of catalysis revealed from the crystal structures of mutants of diaminopimelate epimerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363(3): 547-553.
- Pulsawat, N., Kitani, S. and Nihira, T. (2007): Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene* 393(1-2): 31-42.
- Raponi, M. and Arndt, G. M. (2002): Dominant genetic screen for cofactors that enhance antisense RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic Acids Research* 30(11): 2546-2554.
- Rund, J. V. and Plane, R. A. (1964): Catalysis of the decarboxylation of dimethylaloacetate by manganese(II), nickel(II), and their complexes. *Journal of the American Chemical Society* 86(3): 367-371.
- Seeger, K., Flinspach, K., Haug-Schifferdecker, E., Kulik, A., Gust, B., Fiedler, H. P. and Heide, L. (2011): The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microbial Biotechnology* 4(2): 252-262.
- Schroeder, W., Bannister, B. and Hoeksema, H. (1967): Lincomycin. III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *Journal of the American Chemical Society* 89(10): 2448-2453.
- Smutná, Y. (2007): Analýza genu *lmbX* zahrnutého v biosyntéze propylprolinu. Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Diplomová práce.
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. and Edwards, J. E. (2004): Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases* 38(9): 1279-1286.
- Spížek, J. and Tichý, P. (1995): Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiologica* 40(1): 43-50.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. and Marahiel, M. A. (1999): The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 6(8): 493-505.
- Thomas, M. G., Burkart, M. D. and Walsh, C. T. (2002): Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chemistry & Biology* 9(2): 171-184.
- Ulanová, D., Novotná, J., Smutná, Y., Kameník, Z., Gažák, R., Sulc, M., Sedmera, P., Kadlčík, S., Plháčková, K. and Janata, J. (2010): Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(2): 927-930.

Umezawa, K., Ikeda, Y., Kawase, O., Naganawa, H. and Kondo, S. (2001): Biosynthesis of polyoxypeptin A: novel amino acid 3-hydroxy-3-methylproline derived from isoleucine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(13): 1550-1553.

Usha, V., Dover, L. G., Roper, D. I., Fuetterer, K. and Besra, G. S. (2009): Structure of the diaminopimelate epimerase DapF from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 65: 383-387.

Witz, D. F., Hessler, E. J. and Miller, T. L. (1971): Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* 10(7): 1128-1133.

Yim, G., Wang, H. H. M. and Davies, J. (2006): The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology* 296(2-3): 163-170.

Zlatopolskiy, B. D. and de Meijere, A. (2004): First total synthesis of hormaomycin, a naturally occurring depsipeptide with interesting biological activities. *Chemistry - A European Journal* 10(19): 4718-4727.

Zlatopolskiy, B. D., Loscha, K., Alvermann, P., Kozhushkov, S. I., Nikolaev, S. V., Zeeck, A. and de Meijere, A. (2004): Final elucidation of the absolute configuration of the signal metabolite hormaomycin. *Chemistry - A European Journal* 10(19): 4708-4717.