

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



Tomáš BAKAL

Název závěrečné práce: ***Cílené vyhledávání genů sekundárního metabolismu ve streptomycetách.***

Název závěrečné práce v *anglickém jazyce*: ***The directed search of genes for secondary metabolites in streptomycetes***

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Najmanová Phd.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 18.07.2011

Tomáš Bakal

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2009-2011 v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České Republiky, v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu a je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy 1M06011 "Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí".

Poděkování...

Chtěl bych poděkovat všem, kteří se přímo i nepřímo podíleli na vzniku mé diplomové práce. Veliké díky patří mé školitelce Lucii Najmanové za cenné rady, obrovskou ochotu a trpělivost, s jakou mou prací vedla. Dále pak děkuji Kamile Plháčkové, Jiřímu Janatovi, Standovi Kadlčíkovi a Vendulce Jechové za užitečné rady a pomoc při překonání nejrůznějších útrap a úskalí spojených s prací, se kterými jsem se setkal během uplynulých dvou let. Děkuji také ostatním členům našeho laboratorního kolektivu- Elišce, Petře, Daně, Aničce, Evě, Bojaně, Gábině, Tomovi, Mílovi a Kubovi – za vytváření skvělé přátelské atmosféry. Zvláštní poděkování pak patří mé rodině a známým, kteří mě ve studiu podporovali. Děkuji.

Abstrakt

Objevy nových přírodních antibiotik jsou dnes již vzácností, proto se jako velmi perspektivní možnost zisku nových antibiotik a látek se zajímavou biologickou aktivitou jeví konstrukce kmenů produkujících hybridní látky. Tato práce je součástí širšího projektu zaměřeného na přípravu nových biologicky aktivních látek odvozených od antibiotika linkomycinu. Linkomycin se skládá z cukerné (MTL) a aminokyselinové (kyselina propylhygrová) složky spojených peptidovou vazbou. Je známo, že nejrůznější modifikace aminokyselinové části molekuly, zvláště pak bočního alkylového řetízku, vedou ke zlepšení antibiotických vlastností výsledné látky. Úzkým hrdlem syntézy takto modifikovaných látek je kondenzační enzym NDL-syntetáza a především jeho A-doména, která, stejně jako u nonribosomálních peptidových syntetáz (NRPS), specificky rozpoznává a aktivuje aminokyselinový prekurzor. V rámci této práce byla navržena sada degenerovaných primerů pro vyhledávání A-domén NRPS metodou PCR a byly optimalizovány podmínky reakce. Zdrojem genetické informace pro vyhledávání zajímavých A-domén NRPS, použitelných pro konstrukci hybridních biosyntetických shluků, bude v první fázi sbírka cca 800 půdních izolátů aktinomycet. Kmeny této sbírky byly charakterizovány taxonomicky (sekvenace 16S rDNA) a sbírka byla utříděna (byly vyloučeny duplicitní kmeny). Z vybraných izolátů byla izolována chDNA, která bude templátem pro vyhledávání A-domén NRPS a případně jakýchkoli dalších zajímavých genových aktivit. Navržená sada degenerovaných primerů je naopak použitelná i pro vyhledávání v širším měřítku, například v půdním metagenomu.

Klíčová slova: aktinomycety, antibiotika, A-domény NRPS, PCR, 16S ribosomální DNA

Abstract

Discoveries of new natural antibiotics are now relatively rare, therefore the construction of strains producing hybrid substances seems to be a very promising opportunity to gain new interesting biologically active compounds. This work is part of a larger project focused on the preparation of new biologically active substances derived from the antibiotic lincomycin. Lincomycin is composed of saccharide (MTL) and amino acid (propylhygric acid) moieties condensed by amide bond. Various modifications of amino acid moiety, especially of the side alkyl chain, are known to improve the antibiotic properties of final molecule. The bottleneck of biosynthesis of such modified compounds is the condensing enzyme NDL-synthetase, and especially its A-domain, which, similarly to nonribosomal peptide synthetases (NRPS), specifically recognizes and activates the amino acid precursor.

In this work a set of degenerate primers for PCR searching of NRPS A-domains was proposed and the conditions of PCR reaction were optimized. In the first step a collection approximately 800 isolates of soil actinomycetes will serve as a source of genetic information for search of interesting NRPS A-domains, applicable for the construction of hybrid biosynthetic clusters. The isolates of this collection have been also characterized taxonomically (16S rDNA sequencing) and the collection was sorted in order to eliminate the duplicate strains. Chromosomal DNAs were isolated from selected strains, which will serve as a template for search of NRPS A-domains and possibly in future also other interesting gene activities. The proposed set of degenerate primers on the other hand can also be used for searching on a wider scale, such as in soil metagenom.

Key words: actinomycetes, antibiotics, A-domain NRPS, PCR, 16S ribosomal DNA

Seznam zkratek:

ACP= protein přenášející acyl

DEBS= 6'-deoxyerytronolid-B-syntetáza

f primer (z anglického forward primer)= oligonukleotid se sekvencí odpovídající kódujícímu řetězci DNA

f primer (z anglického forward primer)= oligonukleotid se sekvencí odpovídající kódujícímu řetězci DNA

chDNA= chromozomální DNA

L-DOPA= L-3',4'-dihydroxyfenylalanin

MTL= metyl-6'-amino-6',8'-dideoxy-1'-thio-D-erythro- α -D-galakto-oktopyranóza

NRPS= nonribosomální polypeptid syntetáza

PHA= trans-N-metyl-4'-n-L-prolin (kyselina propylhygrová)

PCP= protein přenášející peptidyl

PKS= polyketid syntetáza

r primer (z anglického reverse primer)= oligonukleotid se sekvencí odpovídající komplementárnímu nekódujícímu řetězci DNA

r-DNA= DNA kódující ribosomální RNA

r-RNA=ribosomální RNA

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

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Literární přehled | 11 |
| 2.1. Aktinomycety | 11 |
| 2.1.1. Metody využívané v taxonomii aktinomycet | 12 |
| 2.1.2. Rod Streptomyces | 15 |
| 2.2. Sekundární metabolismus | 18 |
| 2.2.1. Typy sekundárních metabolitů | 20 |
| 2.2.2. Antibiotika | 21 |
| 2.2.3. Vybrané enzymy účastnící se biosyntézy biologicky aktivních látek | 31 |
| 2.2.4. Cílené genetické manipulace producentů biologicky aktivních látek | 39 |
| 3. Materiál a metody | 44 |
| 3.1. Materiál | 44 |
| 3.1.1. Bakteriální kmeny a použité kosmidy | 44 |
| 3.1.2. Kultivační média | 51 |
| 3.1.4. Enzymy | 55 |
| 3.1.5. Komerční soupravy | 55 |
| 3.1.6. Chemikálie, roztoky, pufry a gely | 56 |
| 3.1.7. Software | 57 |
| 3.2. Metody | 58 |
| 3.2.1. Kultivace aktinomycet | 58 |
| 3.2.2. Izolace genomové DNA aktinomycet | 58 |
| 3.2.3. Transformace kompetentních buněk E. coli teplotním šokem | 59 |
| 3.2.4. Purifikace plazmidové DNA | 60 |
| 3.2.5. Polymerázová řetězová reakce | 60 |
| 3.2.4. Navrhování degenerovaných oligonukleotidů | 65 |
| 3.2.5. Elektroforéza v agarózovém gelu | 68 |

| | |
|---|----|
| 3.2.6. Sekvenování DNA | 68 |
| 3.2.7. Analýza sekvencí DNA | 69 |
| 4. Výsledky | 70 |
| 4.1. Uspořádání a charakterizace sbírky izolátů půdních aktinomycet | 70 |
| 4.2. Izolace chromozomální DNA vybraných kmenů. | 77 |
| 4.3. Testování vhodných degenerovaných primerů pro vyhledávání genů kódujících A-domény NRPS | 79 |
| 5. Diskuze | 86 |
| 6. Závěr | 90 |
| 7. Přehled literatury | 91 |

1. Úvod

V dnešní době se neustále zvyšuje potřeba nových farmakologicky účinných látek. Mezi nejžádanější patří protinádorové látky a imunomodulátory, to v souvislosti se stále se rozmáhajícím fenoménem nárůstu počtu případů tzv. civilizačních chorob (rakovina, ateroskleróza či onemocnění srdce), a samozřejmě také antibiotika, a to především vzhledem k šíření rezistencí k těmto sloučeninám mezi bakteriemi a nárůstu výskytu nebezpečných multirezistentních patogenů (WHO Media center, Fact sheet No.194, February 2011). Mezi nebezpečné patogenní bakterie způsobující vážná onemocnění patří methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) a z gramnegativních bakterií lze jmenovat kupříkladu multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* či *Mycobacterium tuberculosis*.

Navzdory zvyšující se potřebě nových antimikrobiálních látek dochází v posledních desetiletích k regresi vývoje nových antibiotik, která je důsledkem nejrůznějších ekonomických, lékařských, sociálních a politických faktorů (Oancea, 2010). Antibiotika se obvykle užívají pro krátkodobé terapie během léčby nemocí, mají schopnost cíleně a velmi efektivně potlačit bakteriální infekce, a díky tomu jsou, na rozdíl od preparátů působících dlouhodobě (léky pro léčbu hypercholesterolemie, hypertenze, poruch nálady či artritidy), pro velké farmaceutické firmy z ekonomického hlediska méně zajímavé (Spellberg et al., 2004). Dalším aspektem, proč ubývá nově objevených antibiotik zavedených do klinické praxe, jsou neustále se zvyšující náklady a doba potřebná pro jejich vývoj a testování, a také to že je celkem obtížné získat nové přírodní produkty s antibakteriální aktivitou, když ty v přírodě převažující již byly objeveny. V nedávné minulosti byly velké naděje vkládány do přípravy zcela nových nebo hybridních sloučenin synteticky či semisynteticky. Chemická syntéza je však velmi nákladná a připravené látky velmi často nevykazovaly očekávané biologické účinky.

V současnosti jsou asi nejrozšířenějším přístupem při vývoji nových derivátů léčiv cílené manipulace genomu již známého produkčního kmene (Cortes et al., 1995; Olyinik et al., 1996; Ulanová et al., 2010). Tyto změny genetické informace umožňují přípravu nadprodukčních kmenů, ale také biosyntézu prekurzorů antibiotik nebo nových hybridních sloučenin. Geny kódující enzymové aktivity vhodné pro konstrukci hybridních

biosyntetických sluků lze vyhledávat buď v databázích (již popsané geny, osekvenované bakteriální genomy), nebo přímo v metagenomu (půda, voda, atd) (Gontang et al., 2010). Metodami genového inženýrství pak lze ve vhodně zvoleném organismu kombinovat příslušné geny nebo celé bloky genů za vzniku hybridních biosyntetických sluků. (Challis, 2008).

Tato diplomová práce se zaměřuje na problematiku cíleného vyhledávání genů kódujících enzymy biosyntézy sekundárních metabolitů, potenciálně využitelných pro přípravu biologicky aktivních látek odvozených od vybraných linkosamidových antibiotik. Na pracovišti je z dřívějších projektů k dispozici sbírka 808 půdních izolátů (převážně aktinomycet), pocházejících z celkem dvanácti lokalit. Ta byla v rámci této diplomové práce roztržena pomocí porovnání sekvencí fragmentu genu kódujícího 16S r-RNA a byly vyloučeny duplicitní kmeny. Srovnání se sekvencemi v genových databázích poskytlo informaci o taxonomické diverzitě sbírkových kmenů, respektive lokalit ze, kterých byly izolovány. Dále byly navrženy a testovány degenerované primery pro cílené vyhledávání genů pro aktivační domény nonribosomálních peptidových syntetáz, které budou dále využity jak pro vyhledávání v utříděné sbírce, tak i pro případné vyhledávání zajímavých genových aktivit v půdním metagenomu. Charakterizace sbírky z hlediska výskytu vybraných genových aktivit sekundárního metabolismu zároveň poskytne cennou ekologickou informaci o produkční rozmanitosti v závislosti na typu lokality.

2. Literární přehled

2.1. Aktinomycety

Aktinobakterie (*Actinobacteria*) (Tab. 1) jsou významným kmenem především půdních, ale i sladkovodních a mořských grampozitivních bakterií. Důležitou roli tyto bakterie hrají během rozkladu organických látek. Některé aktinobakterie však mohou způsobovat i onemocnění. Mezi známé patogeny patří *Actinomyces israeli* a někteří příslušníci rodů *Mycobacterium*, *Corynebacterium* či *Nocardia*. Jejich hlavním významem pro člověka je však produkce široké palety sekundárních metabolitů s různou biologickou aktivitou, zejména pak antibiotik. V tomto směru vyniká především rod *Streptomyces*, jehož zástupci jsou nejčastějšími producenty antibiotik přírodního původu.

Tabulka 1: Aktinobakterie, taxonomické zařazení rodu *Streptomyces*. Vzhledem k tomu, že se jedná o velice rozsáhlou taxonomickou skupinu a pro tuto práci je zásadní především rod *Streptomyces*, jsou ostatní rody kvůli přehlednosti v tabulce opomenuty, nicméně kompletní taxonomické členění kmene, včetně příbuzných nezařazených kmenů actinobakterií, lze najít například na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>.

| | | | | | |
|--------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------|
| kmen | | | | | |
| Actinobacteria | třída | podtřída | řád | | |
| | | Acidimicrobidae | <i>Acidimicrobiales</i> | | |
| | Actinobacteria | Actinobacteridae | <i>Actinomycetales</i> | podřád | rod |
| | | | | Streptomycineae | <u>Streptomyces</u> |
| | | | <i>Bifidobacteriales</i> | | |
| | | Coriobacteridae | <i>Coriobacterales</i> | | |
| | | Rubrobacteridae | <i>Rubrobacterales</i> | | |
| | | | <i>Solirubrobacterales</i> | | |
| | | | <i>Thermoleophilales</i> | | |
| | | Nitriliruptoridae | <i>Euzebyales</i> | | |
| <i>Nitriliruptorales</i> | | | | | |

2.1.1. Metody využívané v taxonomii aktinomycet

Klasický přístup

Klasické metody klasifikace využívají morfologických, fyziologických a biochemických znaků, mezi které patří:

- 1) zbarvení vzdušného mycelia
- 2) produkce melaninových pigmentů
- 3) produkce pigmentů na spodní straně kolonií

- 4) produkce rozpustných pigmentů
- 5) morfologie řetízků spór
- 6) povrch spór
- 7) asimilace různých zdrojů uhlíku

Tyto metody jsou však z taxonomického hlediska poměrně nepřesné, hodí se tedy spíše pro doplnění dalších taxonomických postupů například molekulárně genetických. Zároveň je také poměrně důležité mít dostatek zkušeností s organizmy, které jsou tímto způsobem porovnávány.

Chemotaxonomický přístup

Chemotaxonomie se zabývá studiem chemických změn v bakteriálních organismech a používá chemických znaků, tedy produkovaných molekul, při jejich třídění a identifikaci. Základní pravidla pro výběr chemotaxonomických znaků jsou:

- I. Znaky by měly být všeobecně rozšířeny mezi studovanými mikroorganismy.
- II. Znaky by měly být homologní mezi kmeny v rámci taxonu, a zároveň musí mezi nimi existovat výrazné rozdíly u taxonů, které mají být diferencovány.

Tato metoda je výhodná pro rychlou identifikaci kmenů s nejrůznějšími manipulacemi biosyntetických či regulačních genů ovlivňujících tvorbu produktů, které slouží jako znak. Nevýhodou je například to, že chemické profily testovaných kmenů mohou být porovnávány s dalšími pouze tehdy, pokud tyto kmeny rostly za zcela totožných podmínek, což často omezuje použití této metody.

Numerický přístup

Numerická taxonomie (fenetika) je metoda využívající třídění organismů výhradně na základě jejich podobnosti, přičemž všem znakům (bez ohledu na jejich původ a význam) je přisuzována stejná hodnota. Získané hodnoty podobnosti (afinity) mezi posuzovanými taxony jsou základem pro konstrukci fylogenetických vztahů mezi nimi. Tato metoda je schopna

využít zároveň data z různých zdrojů (morfologických, fyziologických, biochemických či genetických studií) a používá se pro hodnocení velkého množství relativně blízko stojících taxonů za použití velkého množství znaků.

Má však hned několik nevýhod. Nedokáže odlišit homologické a analogické znaky. Důležité určující znaky se mohou ztrácet v množství jiných. Vztahy zobrazené ve fenogramu jsou silně ovlivněny subjektivním výběrem znaků, počtem jednotlivých taxonů, typem použitého koeficientu podobnosti či použitou shlukovací metodou. Fenetická klasifikace vytváří umělé seskupení taxonů, spíše než by odkrývala stabilní (genealogické) vztahy a koneckonců je to relativně pracná metoda vyžadující měření mnoha znaků.

Molekulárně genetický přístup

Dnes nejvyužívanější taxonomický přístup používá při objasňování fylogenetických vztahů porovnávání sekvencí vhodných úseků nukleových kyselin.

Molekuly ribozomální RNA (r-RNA) (především 16S a 23S r-RNA) jsou vhodným nástrojem studia fylogenetických vztahů, neboť splňují všechny předpoklady molekulárního fylogenetického markeru, tj. univerzální distribuce, strukturální a funkční neměnnost a dostatečná velikost. V jejich primární struktuře se střídají sekvence víceméně konzervované a vysoce variabilní oblasti. Frekvence kompozičních změn v různých oblastech těchto molekul se mohou výrazně lišit. Tato skutečnost umožňuje odlišit široké spektrum fylogenetických vztahů. Neměnné a vysoce konzervativní pozice jsou nezbytné pro porovnání homologních sekvencí, méně variabilní oblasti poskytují cenné informace o vztazích vyšších taxonomických skupin, a oblasti s vyšší variabilitou jsou užitečné pro objasnění novějších fylogenetických větvení (Ludwig a Schleifer, 1994).

Pro klasifikaci organismů tímto způsobem je důležité využití sekvenčních databází. Porovnání genových sekvencí r-RNA s databázemi obsahujícími sekvence prostudovaných mikroorganismů umožňuje rychle identifikovat prokaryotické kmeny. Navíc mikrobiologům, kteří prozkoumávají obrovskou rozmanitost prokaryot pomocí molekulárních přístupů, umožňuje zařadit jejich poznatky do širšího kontextu, i když studované kmeny nemohou být kultivovány. Nicméně se ukazuje, že využití pouze genů pro r-RNA je při klasifikaci prokaryot často limitováno nízkou rozlišovací schopností v porovnání s DNA-DNA hybridizací (DDH) genomu. Mnohé druhy vykazující podobnost úseků genů pro r-RNA nižší než 97% při porovnání sdílejí více než 70% genetické informace (což je hranice pro zařazení

do stejného druhu) a naopak jiné druhy s podobností $\geq 97\%$ v r-RNA genech hranice 70-ti % genetické shody nedosahují (Gevers et al., 2005).

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) je způsob genotypové charakteristiky prokaryot na vnitrodruhové úrovni, využívající alelického nesouladu malého počtu (obvykle 7) konstitutivně exprimovaných genů (housekeeping). Slouží jako nástroj molekulární epidemiologie a je používána pro taxonomické zařazení na nejnižší úrovni.

Multilokusová sekvenční analýza (MLSA) je metoda genotypové charakteristiky mnohem diverzifikovanějších skupin prokaryot (včetně celých rodů), která využívá sekvence protein-kódujících genů. MLSA, stejně jako MLST, je méně citlivá na vliv protichůdných signálů (vytvářejících fylogenetický nesoulad), které vyplývají z případného horizontálního přenosu genetické informace (Gevers et al., 2005).

2.1.2. Rod *Streptomyces*

Tato práce se zabývá sbírkou půdních izolátů aktinomycet, z nichž převážná většina patří do rodu *Streptomyces*. Příslušníkem tohoto rodu je i *Streptomyces lincolnensis*, což je hlavní modelový organismus studovaný v naší laboratoři, jehož biosyntetický potenciál hodláme využít pro konstrukci hybridních biosyntetických shluků. Proto je na místě se o tomto rodu zmínit podrobněji.

Streptomycety jsou významnými půdními producenty biologicky aktivních látek. Jsou to převážně saprofytycké vláknité bakterie s grampozitivním typem buněčné stěny a jsou schopny sporulace. Taxonomicky rod *Streptomyces*, který popsal Waksman & Henrici (1943), patří do řádu *Actinomycetales* a třídy *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997) (Tab. 1).

2.1.2.1. Genom streptomycet

Genetická informace u streptomycet je nesena lineárním chromozómem, který je tvořen různým počtem nukleotidů v závislosti na tom o jaký druh se jedná. Obvykle dosahuje délky od 5 do 11Mbp. Je také známo, že chromozomální DNA streptomycet obsahuje

zvýšený počet GC párů, který činí 69-78% z celkového počtu bází (Korn-Wendisch a Kutzner, 1992).

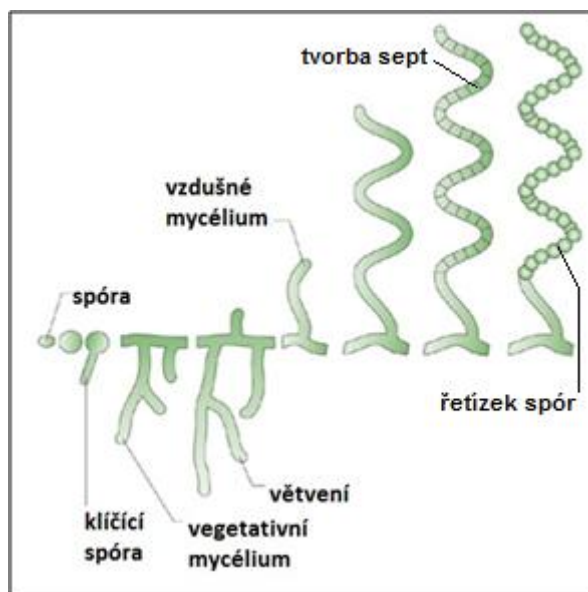
K replikaci u streptomycet dochází z jediného replikačního počátku označovaného, stejně jako u ostatních bakterií, ORI. Díky linearitě chromozómu dochází k tomu, že 5' konce chromozomální DNA nejsou dosyntetizovány a vytváří se tak jednořetězcové (ss) DNA přesahy. Tyto přesahy obsahují opakující se palindromatické sekvence, které umožňují vytvoření smyčky a dávají tak vzniknout koncovým telomerám.

Kromě chromozomální DNA se u většiny kmenů vyskytuje též plazmidová DNA, která může nést geny kódující enzymy biosyntézy nejrůznějších biologicky aktivních látek a geny kódující nástroje rezistence vůči baktericidním a bakteriostatickým látkám včetně antibiotik (Saadoun et al., 1999).

2.1.2.2. Životní cyklus streptomycet

Streptomycety jsou bakterie typické svým poměrně složitým životním cyklem. Prvním krokem životního cyklu streptomycet (viz. Obr. 1) je vyklíčení jednobuněčné spóry a nárůst substrátového vegetativního mycelia. V dalším kroku, poté co je ukončen vegetativní růst, vyrůstají ze substrátového mycelia vzdušné hyfy (sporofory). Na koncích těchto hyf diferencují spirálovitě stočené řetízky spór (konidie). Různorodost barev vzdušných mycelií a spór u jednotlivých kmenů je dána produkcí nejrůznějších pigmentů a složením buněčné stěny a spórových obalů. Produkce těchto látek je u *Streptomycet* zahájena po ukončení vegetativní fáze růstu, kdy jsou aktivovány jednotlivé biosyntetické genové shluky.

Obrázek 1: Životní cyklus *Streptomyces coelicolor* (upraveno podle Flärdh a Buttner 2009)



Životní cyklus streptomycet začíná vyklíčením jednobuňčné spóry, ta se rozrůstá a tvoří nepřehrádkované vegetativní mycelium. Po dokončení vegetativního růstu vyrůstají ze substrátového mycelia vzdušné hyfy, které na koncích diferencují v řetízky exospor.

2.1.2.3. Produkce biologicky aktivních látek

U streptomycet bylo charakterizováno více než 7600 bioaktivních sekundárních metabolitů a dalších 2500 jich bylo popsáno u jiných aktinomycet (z rodů *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* a *Actinoplanes*), což tvoří zhruba 45% z celkového počtu 22000-23000 popsanych biologicky aktivních látek mikrobiálního původu (viz Tab. 2) (Bérdy, 2005). Typicky jsou tyto sekundární metabolity vytvářeny, když producent vstupuje do dormantní nebo reprodukční fáze, tedy po období nejaktivnějšího vegetativního růstu (Demain a Fang, 2000).

Tabulka 2: Počet mikrobiálních bioaktivních přírodních produktů popsanych do roku 2002 (upraveno dle Bérdy, 2005).

| <i>zdroj</i> | <i>antibiotika</i> | <i>„ostatní“ biologicky aktivní látky</i> | <i>biologicky aktivní látky- celkově</i> | <i>prakticky využívané metabolity (v humánní medicíně)</i> | <i>neaktivní metabolity</i> |
|----------------|--------------------|---|--|--|---------------------------------|
| Bacteria | 2900 | 900 | 3800 | 10-12 (8-10) | 3000 až 5000 |
| Atinomycetales | 8700 | 1400 | 10100 | 100-120 (70-75) | 5000 až 10000 |
| Fungi | 4900 | 3700 | 8600 | 30-35 (13-15) | 2000 až 15000 |
| Celkem | 16500 | 6000 | 22500 | 140-160 (≈100) | 20000 až 25000 |

2.2. Sekundární metabolismus

Látky patřící do skupiny sekundárních metabolitů mají velmi různorodou chemickou strukturu a funkci. Tato velká skupina organických látek syntetizovaná nejrozličnějšími organismy je produkována metabolickými drahami souborně označovanými jako sekundární metabolismus. Sekundární metabolity se vyznačují tím, že nejsou pro růst a vývoj producenta esenciální. Mají však často pro producenta význam z hlediska jeho ekologie a přežití v nepříznivých podmínkách. Jsou totiž obvykle součástí mezibuněčné komunikace, kde fungují jako signální molekuly (Demain, 1998; Yim *et al.*, 2007) a uplatňují se také v rámci komplexních společenstev jako mediátor růstu okolních mikroorganismů.

Specifické vlastnosti genů sekundárního metabolismu (upraveno dle Spížek a Tichý, 1995).

- geny bývají z velké části seřazeny ve shlucích a lze je lokalizovat v rámci chromozómu, ale i plazmidů

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • genový shluk obvykle není organizován jako jeden operón, ale je často tvořen několika transkripčními jednotkami |
| <ul style="list-style-type: none"> • geny udávající rezistenci daného organismu vůči produkovanému metabolitu jsou obvykle v těsné blízkosti biosyntetického genového shluku nebo jsou přímo jeho součástí |
| <ul style="list-style-type: none"> • exprese genů je regulována především na úrovni transkripce, ale svou roli zde může hrát regulace na úrovni translace |
| <ul style="list-style-type: none"> • exprese biosyntetických genů a genů udávajících rezistenci produkčního organismu je obvykle regulována stejným regulačním faktorem |
| <ul style="list-style-type: none"> • exprese některých transkripčních jednotek v rámci genového shluku bývá regulována specifickými produkty regulačních genů, které se nacházejí v těsné blízkosti genů biosyntetických |

U *Streptomyces coelicolor*, typického představitele rodu *Streptomyces* bylo díky sekvenaci celého genomu odhaleno 23 genových shluků potenciálně kódujících enzymy biosyntézy sekundárních metabolitů (Challis a Hopwood, 2003). U dalšího zástupce tohoto rodu *Streptomyces avermitilis* bylo identifikováno 30 shluků, což představuje 271 genů (Ikeda et al., 2003), přičemž většina genetické informace kódující biosyntetické mechanismy sekundárního metabolismu se nachází mimo centrální část chromozómu. Kromě toho, obě okrajové oblasti chromozómu obsahují mnoho genů pro transpozázy v těsné blízkosti genů pro biosyntézu sekundárních metabolitů. Tyto transpozázy mohou hrát důležitou roli během horizontálního přenosu genů biosyntetických genových shluků, a také ve vnitřní genetické přestavbě genomu (Omura et al., 2001; Ikeda et al., 2003).

Produkce sekundárních metabolitů obvykle nastává, pokud je organismus stimulován stresem z nedostatku zdroje esenciální živiny v jeho okolí. Tento stres se tak stává signálem pro spuštění fyziologických procesů, jejichž výstupem je produkce sekundárních metabolitů a také případné morfologické změny (Demain, 1999).

Na rozdíl od metabolismu primárního, jehož produkty jsou společné i pro vyšší taxony, jsou látky vzniklé drahami sekundárního metabolismu specifické jen pro určitý rod, případně druh.

Metabolické dráhy primárního a sekundárního metabolismu jsou navzájem složitě propleteny, neboť substrátem pro tvorbu sekundárních metabolitů jsou produkty metabolismu primárního. V rámci sekundárního metabolismu se často uplatňují i některé enzymy z metabolismu primárního. V jiných případech je jejich funkce nahrazena specializovanými enzymy, které se uplatňují jen v drahách metabolismu sekundárního.

Substráty, pro tvorbu nových sekundárních metabolitů, pocházející z primárního metabolismu jsou:

- a) sacharidy
- b) meziprodukty Krebsova cyklu
- c) kyselina šikimová
- d) aromatické i nearomatické aminokyseliny
- e) krátké karboxykyseliny (octová k., propionová k.)
- f) puriny a pirimidiny

2.2.1. Typy sekundárních metabolitů

Z hlediska využití pro člověka jsou sekundární metabolity velice různorodou skupinou látek přírodního původu, zahrnující antibiotika, nejrůznější toxiny, imunomodulátory, protinádorové látky, efekторы ekologické kompetice a symbiózy, pesticidy, feromony, pigmenty, enzymové inhibitory a růstové stimulanty rostlin a živočichů (Demain, 1998). Ve valné většině se jedná o látky nízkomolekulárního charakteru a jednotlivé sloučeniny jsou produkovány jen omezeným počtem mikrobiálních kmenů.

Z hlediska biologické aktivity je možné rozdělit sekundární metabolity produkované streptomycetami dle jejich využití do čtyř skupin (Tarrka a Hampp, 2008):

1. látky antagonistické- do této skupiny patří antibiotika, antivirotika, antimykotika a antiprotozoální látky

2. látky farmakologické- sem patří protinádorové látky, imunosupresiva a enzymové inhibitory

3. biologicky aktivní látky užívané v rostlinné produkci- zde jsou uváděny insekticidy, pesticidy a herbicidy

4. látky s regulačními vlastnostmi- růstové faktory, siderofory a morfogenní látky

Bezesporu nejpočetnější skupinou sekundárních metabolitů streptomycet, které jsou v praxi využívány, jsou antibiotika. Mezi antibiotika se řadí i linkosamidy a pyrrolbenzodiazepiny, kterými se v naší laboratoři zabýváme. Z tohoto důvodu je následující kapitola věnována právě tomuto typu sekundárních metabolitů.

2.2.2. Antibiotika

Antibiotika, jsou látky s velmi různorodou chemickou strukturou. Jejich rozmanitost se také odráží v mechanismech účinku na citlivou mikrobiální buňku. Tyto sloučeniny jsou využívány v mnoha odvětvích lidské činnosti. Nejen v humánní a veterinární medicíně, ale také v průmyslové sféře a zemědělství. Antibiotik, pocházejících z přirozených zdrojů, bylo identifikováno zhruba 16 500, přičemž více než polovina z nich je produkována bakteriemi z rodu *Streptomyces* (Anderson a Wellington, 2001; Bérdy, 2005). Syntetických antibiotik a semisyntetických derivátů je dodnes popsáno přes 100 000. Nicméně, zdaleka ne všechna známá antibiotika je možno využít v klinické praxi, kupříkladu pro jejich nestabilitu či toxicitu. V současnosti se jich využívá jen přibližně 160 (Baltz, 1998; Bérdy, 2005).

Do léčebné praxe byla antibiotika zavedena ve čtyřicátých letech dvacátého století. Prvním takto užívaným antibiotikem byl penicilin, což je β -laktamové antibiotikum izolované z eukaryotického mikroorganismu, houby rodu *Penicillium*. Historicky druhým objeveným antibiotikem byl bacitracin, izolovaný I. M. Lockhartem v roce 1943 z *Bacillus subtilis*. L. A. Waksman roku 1944 izoluje další významnou látku, streptomycin ze *Streptomyces griseus*. V roce 1947 je A. C. Finlayem objeven chlortetracyklin a o rok později jej izoluje ze *Streptomyces aureofaciens*. Tehdy je také objeven J. Ehrlichem chloramfenikol získaný ze *Streptomyces venezuelae*. Následuje období objevů mnoha nových antibiotik, ale také

zklamání, neboť již v padesátých letech se objevují první epidemie způsobené multirezistentními kmeny patogenních bakterií, konkrétně rodu *Shigella* v Japonsku (Davies, 2007). Problém rezistence byl zpočátku přehlížen, jelikož byly neustále objevovány nové látky, ke kterým běžné patogenní bakterie ještě neměly vvinutou rezistenci. Postupem času však začal zájem farmaceutických firem o vývoj nových antibiotik opadat a naopak mezi bakteriemi rapidně vzrostlo rozšíření rezistence vůči používaným antibiotikům. Dnes se proto lidstvo ocitá podle mnohých na prahu postantibiotické éry. Velkým problémem v současné medicíně je rostoucí výskyt multirezistentních kmenů patogenních bakterií a volá se proto po vývoji nových látek s vylepšenými účinky, případně s novými zásahovými cíli v bakteriální buňce (WHO Media center, Fact sheet No.194, February 2011).

2.2.2.1. Přehled mechanismů antibakteriálních účinků

Antibiotika můžeme rozdělit podle typu účinku na citlivé mikrobiální buňky do dvou základních skupin. Buď nevratně poškozují určité buněčné struktury nezbytné pro existenci buňky, pak se jedná o látky baktericidní, nebo reverzibilně interagují s určitou biomolekulou, čímž pozastavují některý z životně důležitých buněčných procesů, pak se jedná o látky bakteriostatické. Pro medicínské využití těchto látek je pak velice důležité, aby selektivně poškozovaly buňky patogenní bakterie a pro hostitele byly co možná nejméně toxické.

Z hlediska biochemického účinku pak lze antibiotika rozdělit do několika obsáhlých skupin:

- antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny
- antibiotika inhibující funkci cytoplazmatické membrány
- antibiotika inhibující proteosyntézu
- antibiotika inhibující tvorbu a správnou funkci nukleových kyselin

2.2.2.2. Biosyntéza antibiotik

Jak již bylo uvedeno výše, geny pro biosyntézu ATB bývají uspořádány ve shlucích spolu s geny rezistenčními i regulačními. Tyto shluky bývají lokalizovány v okrajových částech chromozomu a ohraničeny transpozičními elementy (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Ty pak umožňují horizontální přenos biosyntetických shluků mezi různými mikroorganismy v prostředí. Často však dochází i k přenosu menších úseků biosyntetických shluků – tzv. podshluků – tj. souborů genů odpovědných za biosyntézu některého z prekurzorů antibiotik. Takový podshluk se pak může stát součástí jiného biosyntetického shluku v recipientním kmeni a výsledkem může být nová bioaktivní látka. Podobně mohou být přenášeny i jednotlivé geny nebo dokonce jen části genů, kódující funkční domény příslušných proteinů. Příkladem takové molekulární evoluce je biosyntetický shluk antibiotika linkomycinu (viz. následující kapitola). Stejný princip plánujeme využít pro konstrukci hybridních biosyntetických shluků odvozených od shluku linkomycinového.

2.2.2.3. Vybrané skupiny antibiotik

Část naší laboratoře se dlouhodobě zabývá studiem biosyntézy linkosamidových antibiotik a nověji také pyrrolobenzodiazepiny, se kterými linkomycin sdílí část biosyntetické dráhy (biosyntézu neobvyklé aminokyseliny propylprolinu). Je velmi pravděpodobné, že linkomycinový biosyntetický shluk vzniknul v průběhu evoluce spojením částí biosyntetických shluků pyrrolobenzodiazepinů (propylprolinová stavební jednotka) a linkosamidu (cukerná stavební jednotka) a následnou adaptací příslušného kondenzačního enzymu (princiálně se jedná o NRPS, nebo enzym s podobnou funkcí). A právě takové evoluční jevy se staly inspirací pro tvorbu hybridních biosyntetických shluků metodami genového inženýrství.

2.2.2.3.1. Linkosamidy

Linkosamidy jsou malou, ale z hlediska praktického využití významnou skupinou antibiotik. Vyznačují se poměrně širokým spektrem účinku vůči grampozitivním kokům (MacLeod et al., 1964) a anaerobním bakteriím, ale některé deriváty mají také antiprotozoální aktivitu (Spížek et al., 2004). Přírodní linkosamidy jsou produkovány hned několika druhy rodu *Streptomyces* (Hoeksoma et al., 1955; Peschke et al., 1995) a to zejména *S. lincolnensis*, *S. roseolus*, *S. epinosus* a *S. caelestis*, a *Micromonospora halophytica*.

- využití v praxi

V klinické praxi se využívají pouze dva linkosamidy: linkomycin A a klindamycin, který co do objemu výroby patří mezi dvacet nejvýznamnějších antibiotik. Klindamycin je semisyntetický derivát linkomycinu (Obr. 3) připravovaný chlorací, který má širší spektrum účinku než linkomycin A. Při orálním užití se mnohem lépe vstřebává a v cílových tkáních dosahuje potřebné koncentrace (Joshi, 1999). Klindamycin je také díky svým antiprotozoálním účinkům využíván v kombinaci spolu s dalšími preparáty k léčbě toxoplazmózy či pneumocystózy u imunodeficientních pacientů. V kombinaci s chininem vykazuje uspokojivé výsledky při léčbě malárie způsobené *Plasmodium falciparum* (Metzger, 1995). Používá se při léčbě malárie u dětí do osmi let, těhotných žen, a také v oblastech výskytu rezistence vůči chlorochinům (Griffith et al., 2010).

- struktura

Linkosamidy jsou skupinou látek, jejichž základní vzorec sestává ze sacharidové části a aminokyselinového zbytku spojených navzájem amidovou vazbou. Prvním izolovaným linkosamidem z přírodního zdroje byl celesticetin (Hoeksoma et al., 1955), jehož aminokyselinovou část tvoří proteinogenní prolin, ke kterému je amidovou vazbou připojena molekula cukru (thiocelestoamid), dále modifikovaná salicylátem (Obr. 2). Z praktického hlediska významnějším linkosamidem je linkomycin A, jehož chemická struktura (Obr. 3) byla poprvé popsána roku 1962, kdy byl izolován z produkčního kmene *S. lincolnensis* var. *lincolnensis*. Linkomycin byl (tam není příčinná vazba s předchozí větou) prvním linkosamidem u něhož byla známa chemická struktura. Cukernou složku molekuly linkomycinu (linkomycin A) tvoří 6'-amino-6', 8'-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-

galaktopyranosid (methylthiolinkosamid = MTL), aminokyselinovou částí je trans-N-metyl-4'-n-L-prolin (kyselina propylhygrová (PHA), která vzniká N-metylací propyl prolinu (PPL)) (Hoeksoma et al., 1964). Prozkoumáním fermentačních produktů *S. lincolnensis* byl později objeven další přírodní derivát linkomycinu, linkomycin B (4'-depropyl-4'-ethyllinkomycin).

- *mechanismus účinku*

Tato bakteriostatická antibiotika se váží na velkou ribozomální podjednotku (50S) a blokují tak proteosyntézu. Interakce probíhá mezi molekulou linkosamidu a 23S r-RNA, kdy vznikají vodíkové můstky mezi hydroxy skupinami cukerné části ATB molekuly a adeninovými zbytky r-RNA. Linkosamidy se takto specificky váží do oblastí A a P místa na ribozómu, čímž brání navázání aminoacyl t-RNA. Blokují také peptydyl transferázovou reakci a stéricky brání prodlužování peptidového řetězce (Schlünzen et al., 2001). Způsobem účinku jsou tak velice podobné chloramfenikolu a makrolidovým antibiotikům. Mají totiž stejnou cílovou molekulu a mezi sebou mohou vzájemně interferovat.

- *biosyntéza*

Biosyntézu linkosamidů lze demonstrovat na příkladu typického zástupce, linkomycinu A. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu (biosyntetický klastr) můžeme rozdělit na geny pro syntézu sacharidové složky (MTL), aminokyselinové složky (PHA), kondenzační aparát (katalyzující spojení obou částí molekuly), gen pro N-demetyllinkomycin methyltransferázu, a geny kódující mechanismy rezistence a regulační funkce.

Aminokyselinová část má původ v L-tyrozinu (Witz 1971). Proteinogenní aminokyselina L-tyrozin je v prvním kroku přeměněna na 3',4'-dihydroxy fenylalanin (L-DOPA). L-DOPA je přímým prekurzorem propyl prolinu (PPL).

Sacharidová složka (MTL) pochází z nukleotidem aktivované hexózy, ze které se tvoří pentóza C5, jež spolu s triózou C3 dává vzniknout oktulóze (Brahme et al., 1984), jejíž sacharidová kostra je dále enzymaticky upravována. Na oktulózu je na pátém uhlíku transaminačně přenesena amino skupina a na C1 je přenesena S-metylová skupina (Argoudelis, 1965) pomocí transthiolmethylázy.

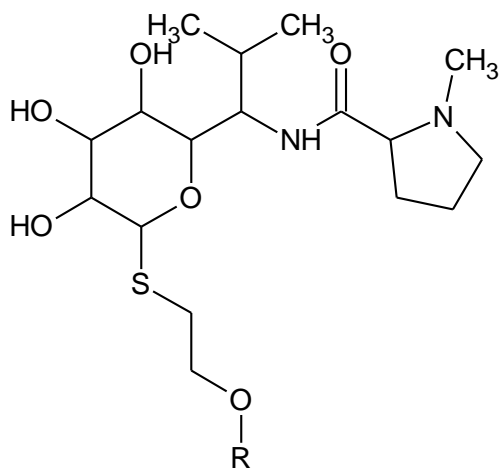
Kondenzace obou složek (MTL a PPL) je katalyzována na ribozómu nezávislou N-demetyllinkomycin syntetázou (NDLS) (Argoudelis et al., 1965, Chung et al., 1997). Jedná se

o komplex volně disociovatelných enzymů s různými katalytickými funkcemi. Za zdůraznění stojí především produkt genu *lmbC*, který je v tomto komplexu zodpovědný za přednostní identifikaci a aktivaci aminokyseliny PPL pomocí adenylace (Kadlčík, S., nepublikovaná data).

Tato funkce, kdy je specifická aminokyselina aktivována adenylací, byla již mnohokrát popsána u adenylačních (A) domén neribozomálních peptid syntetáz. Objev příbuzných enzymů z rodiny A-domén přirozeně využívajících různě modifikované deriváty PPL, by mohl být využit k přípravě hybridních látek odvozených od linkomycinu, které by mohly mít vylepšené, či neobvyklé vlastnosti. Je známo, že deriváty linkomycinu s prodlouženým bočním řetězcem PPL mají lepší antibiotické vlastnosti než linkomycin (Magerlein et al., 1967). Příkladem takového derivátu je 4'-pentyl-4'-depropyllinkomycin, který byl produkován kmenem s cílenou delecí v biosyntetickém genu (*lmbX*) pokud mu byl dodán 4'-pentyl-L-prolin (Ulanová et al., 2010)

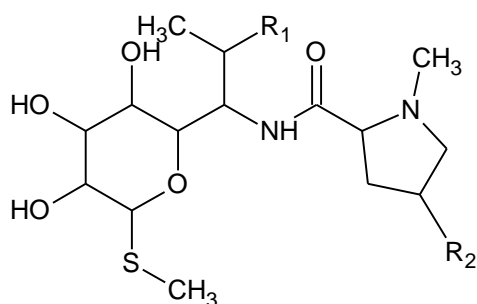
Závěrečným krokem biosyntézy linkomycinu je metylace N-demetyllinkomycinu na linkomycin katalyzovaná N-demetyllinkomycin metyltransferázou jejímž kofaktorem je S-adenozyl-L-metionin (Chung et al., 1997).

Obrázek 2: Struktura celesticetinu a jeho derivátů



| | |
|----------------|------------|
| | R |
| celesticetin | salicylyl |
| desalicyetin | H |
| celesticetin B | izobutyryl |
| celesticetin C | antranilyl |
| celesticetin D | acetyl |

Obrázek 3: Struktura linkomycinu A,B a klindamycinu



| | R1 | R2 |
|--------------|----|--------|
| linkomycin A | OH | propyl |
| linkomycin B | OH | etyl |
| klindamycin | Cl | propyl |

2.2.2.3.2. Pyrrolo(1,4)benzodiazepiny (PBD)

Bioaktivní látky patřící do této skupiny jsou hlediska biosyntézy příbuzné k linkosamidům, mají vlastnosti antibiotik, ale mnohem zajímavější jsou jejich protinádorové účinky.

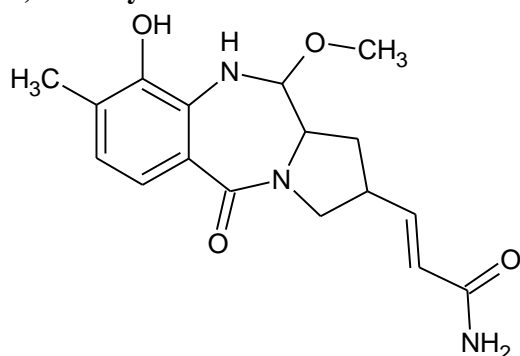
Prvním objeveným pyrrolbenzodiazepinovým (PBD) antibiotikem byl antramycin izolovaný roku 1965 Leimgruberem a jeho spolupracovníky z termofilní actinomycety *Streptomyces refuineus* varianta *thermotolerans* NRRL 314 popsané Tendlerem a Kormanem (1963). O velkém potenciálu této skupiny látek svědčí i to, že dodnes bylo připraveno přes 200 syntetických a polosyntetických derivátů, s cílem zvýšit specifitu a snížit toxické účinky. Z pohledu této práce jsou však zajímavé hlavně pro značnou podobnost částí svých biosyntetických drah s biosyntézou PPL podjednotky linkomycinu.

- *struktura*

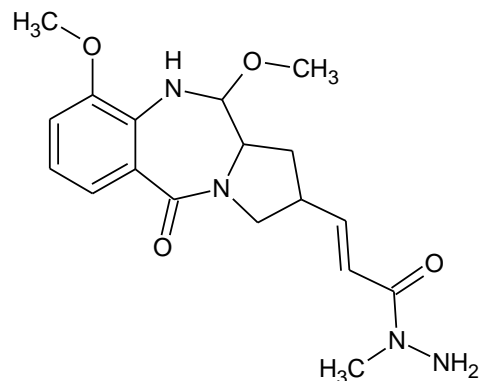
Leimgruber et al. při určování chemické struktury antramycinu zjistili, že základní část se skládá z pyrrolového kruhu, benzenového jádra a diazepinového kruhu, proto se tato skupina protinádorových látek nazývá pyrrolo(1,4)benzodiazepiny (PBD). Jádro molekuly (Obr. 5A) může být dále substituováno různými postranními řetězci (viz Obr. 4).

Obrázek 4: Struktura (1) antramycinu, (2) porothramycinu B, (3) sibiromycinu a (4) tomaymycinu

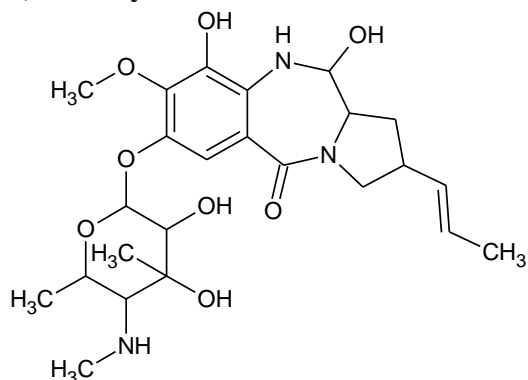
1) antramycin



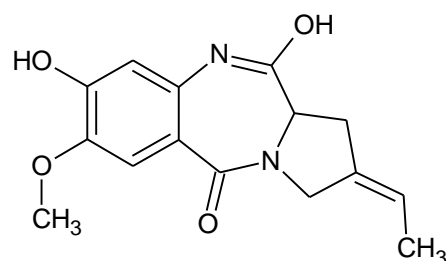
2) porothramycin



3) sibiromycin



4) tomaymycin



- mechanismus účinku

Molekula PBD se kovalentně váže na molekulu DNA, konkrétně na N (2') guaninu v mělkém žlábků dvoušroubovice. Tato vazba má za následek zastavení replikačních a transkripčních pochodů (Kohn, 1975).

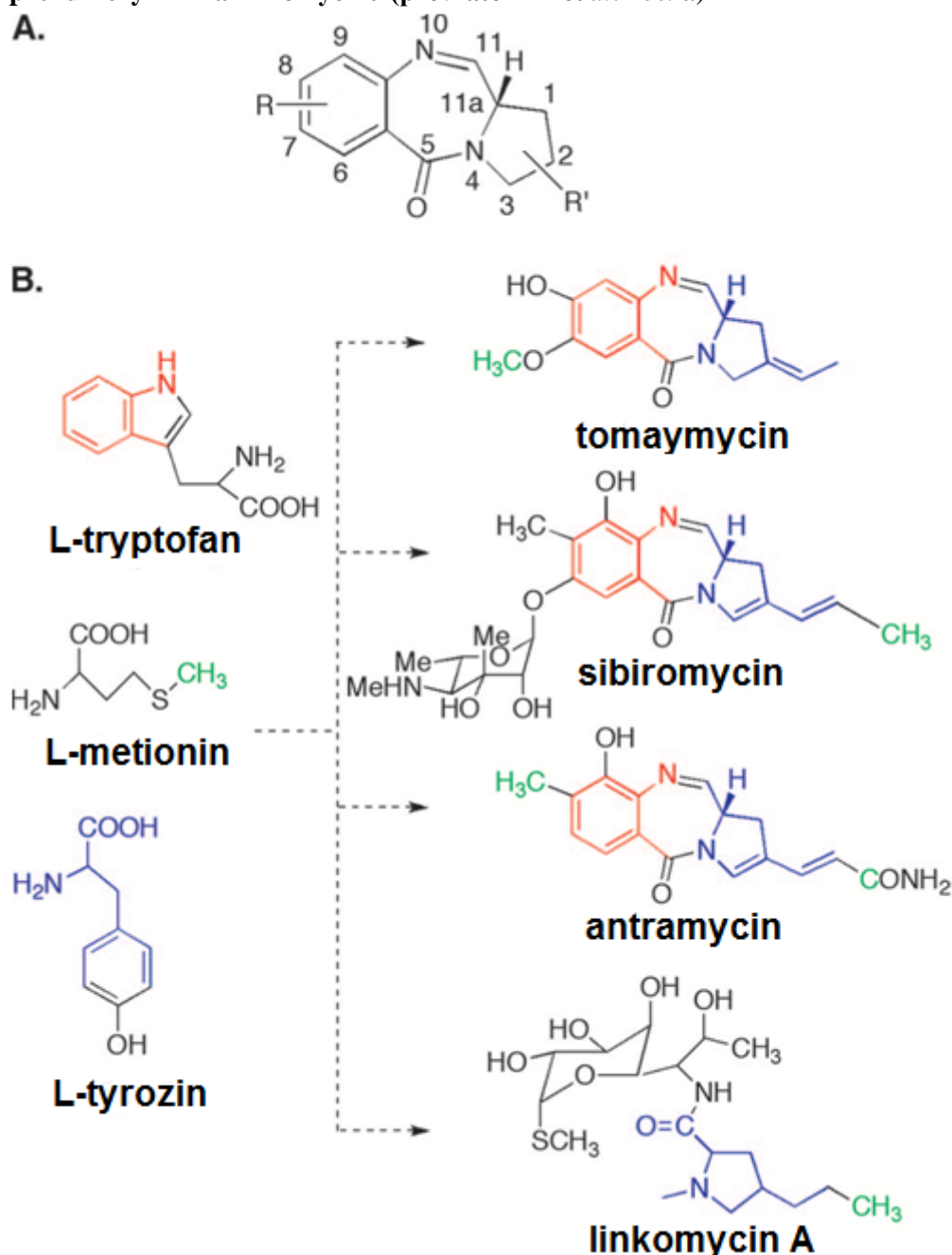
- biosyntéza

Hurley et al. (1980) prokázali, že biosyntéza molekuly antramycinu probíhá ve dvou větvích a produkty jsou nakonec kondenzovány. Každý meziprodukt pochází z jiné oxidativě štěpené aromatické aminokyseliny (L-tryptofan a L-tyrozin). Jedna část molekuly je tvořena 4'-metyl-3'-hydroxy antranilovou kyselinou (původem z L-tryptofanu) a zbývající část pochází z dehydroprolinakrylamidu (odvozeného z L-tyrozinu). Dehydroprolinakrylamid je

strukturně podobný aminokyselinové stavební podjednotce linkomycinu (viz. Obr.5B). Analýzou osekvenovaných genových shluků pro PBD látky (Hu et *al.*, 2007; Li et *al.*, 2009a; Li et *al.*, 2009b) se zjistilo, že 6 (v případě tomaymycinu 5) genů dehydroprolinakrylamidové dráhy má své protějšky i ve shluku pro biosyntézu linkomycinu (Peschke et *al.*, 1995).

Konečný krok při vzniku molekuly PBD je katalyzován specifickou syntetázou, která umožňuje kondenzaci derivátu kyseliny antranilové a dehydroprolinakrylamidové části molekuly (Hurley, 1980). Tato modulárně uspořádaná syntetáza patří mezi nonribosomální peptid syntetázy (NRPS) (Hu et *al.*, 2007).

Obrázek 5: A- základní struktura pyrrolo(1,4) benzodiazepinových antibiotik; B-metabolické prekurzory PBD a linkomycinu (převzato z Li *et al.* 2009a)



(A) Společná část molekuly pyrrolobenzodiazepinů. R a R' naznačují, které aromatické kruhy jsou substituovány. (B) Červeně je znázorněna část L-tryptofanu, která se stane součástí antranilátové podjednotky pyrrolobenzodiazepinového kruhu, tvořícího základ PBD. Zeleně jsou označeny metylové skupiny pocházející z metioninu. Modře jsou označeny pyrrolové části molekul PBD a aminokyselinová část linkomycinu A, které mají společný původ v L-tyrozinu.

2.2.3. Vybrané enzymy účastníci se biosyntézy biologicky aktivních látek

Při přípravě hybridních látek je možné metodami genového inženýrství kombinovat nejrůznější geny do jednoho biosyntetického shluku, to nám umožní získat kmen, který bude v ideálním případě produkovat větší množství prekurzorů antibiotik různého původu. Zcela klíčový je proto enzym, který tyto podjednotky dokáže rozpoznat, aktivovat a spojit dohromady. Takové enzymy známe a jsou jimi nonribosomální peptid syntetázy (NRPS) a polyketid syntetázy (PKS). Během biosyntézy linkosamidových i PBD látek se uplatňují kondenzační enzymy, které můžeme řadit do rodiny NRPS.

2.2.3.1. Nonribosomální peptid syntetáza (NRPS)

Nonribosomální peptid syntetázy (NRPS) jsou rozsáhlé enzymatické komplexy modulárního uspořádání, které se vyskytují u mnoha skupin mikroorganismů, ale především u grammpozitivních bakterií ze skupiny aktinomycet či rodu *Bacillus* a vláknitých hub (např. rod *Penicillium*). NRPS se vyznačují tím, že pro syntézu nového peptidu nevyžadují templát ve formě

m-RNA, a tudíž ani ribozom. Jako substrát využívají kromě 20 proteinogenních aminokyselin i jiné amino-, karboxy- a hydroxykyseliny (Marahiel et al., 1997; Mootz a Marahiel, 1998; Konz a Marahiel, 1999). Celkem je popsáno kolem 300 různých sloučenin, které mohou být inkorporovány do peptidového řetězce nonribosomálních peptidů (NRP) (Kleinkauf a von Döhren, 1996).

Činností NRPS vzniká velice zajímavá skupina sekundárních metabolitů peptidového charakteru se širokým spektrem biologických aktivit. Tyto látky jsou označovány jako NRP a patří mezi ně peniciliny, cephalosporiny, vankomyciny (Marahiel et al., 1997; von Doehren, 1997), imunosupresor cyklosporin A (Webber et al., 1994) nebo bleomycin s protinádorovými účinky (Du et al., 2000). Do dubna 2010 bylo v databázi NORINE (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>) registrováno celkem 1122 NRP.

Pro enzymatické komplexy NRPS je typické modulární uspořádání (Obr.6). Každý modul je zodpovědný za správné zařazení specifické podjednotky do rostoucího peptidového

řetězce. Počet modulů tak často odráží i počet jednotek v peptidu (Mootz et al., 2002). Udává se, že jeden modul, který se podílí na tvorbě funkční stavební podjednotky, tvoří přibližně 1000 aminokyselin (Conti et al. 1997).

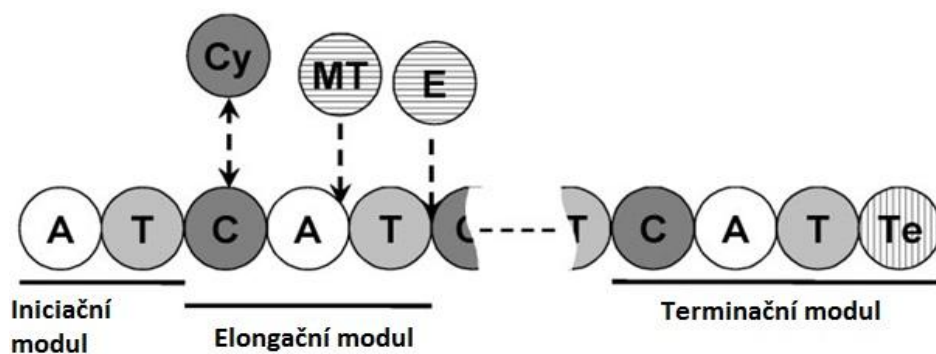
V každém modulu se nachází několik domén s patřičnou enzymatickou aktivitou. Existují čtyři základní typy těchto domén.

- a) Adenylační (A) doména
- b) PCP (peptidyl carrying protein) někdy též označována jako thiolační (T) doména
- c) Kondenzační (C) doména
- d) Thioesterázová (TE) doména

Moduly NRPS můžeme z hlediska jejich uspořádání rozdělit na tři základní typy:

- 1) Iniciační, který je tvořen A a PCP doménou
- 2) Elongační, sestávající z C, A a PCP domény
- 3) Terminační, tvořený doménami C, A, PCP a TE

Obrázek 6: Schéma modulárního uspořádání NRPS (upraveno dle Lautru a Challis, 2004)



Elongační moduly typicky obsahují tři základní domény: adenylační (A) doména, peptidyl carrier protein neboli thiolační (T) doména a kondenzační (C) doména. C doména je někdy nahrazena heterocyklyzační (Cy) doménou. Metyltransferázové (MT) domény a epimerizační (E) domény jsou „volitené“ domény zavádějící modifikace na prodlužujícím se peptidovém řetězci. Iniciační moduly obvykle postrádají C doménu a terminační moduly obsahují thioesterázovou (Te) doménu.

V rámci modulů NRPS má každá doména přesně danou enzymatickou aktivitu, která se uplatňuje při biosyntéze nově vznikajícího peptidového řetězce (Obr. 7).

Adenylační (A) doména je nedílnou součástí každého modulu NRPS; obsahuje ATP vazebnou subdoménu a oblast zodpovídající za rozpoznání specifické aminokyseliny (kyseliny), kterou aktivuje na aminoacyl (acyl) adenylát za spotřeby ATP a Mg^{2+} iontů (Stachelhaus a Marahiel, 1995).

Na substrátové specifitě v té oblasti, která v A doméně tvoří substrát vazebné místo, se podílí celkem deset aminokyselin (Stachelhaus *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 1997). Je to tedy právě tato sekvence aminokyselin, která rozhoduje, jaký substrát příslušná NRPS dokáže zařadit do nově vznikající molekuly. Avšak podobně jako je tomu u genetického kódu, kde triplet ribonukleotidů na m-RNA určuje, která z aminokyselin bude zařazena během ribozomální syntézy bílkovin, tak i tento kód je degenerovaný, protože některé aminokyseliny jsou rozpoznávány i vícero sekvencemi (viz. Obr. 8).

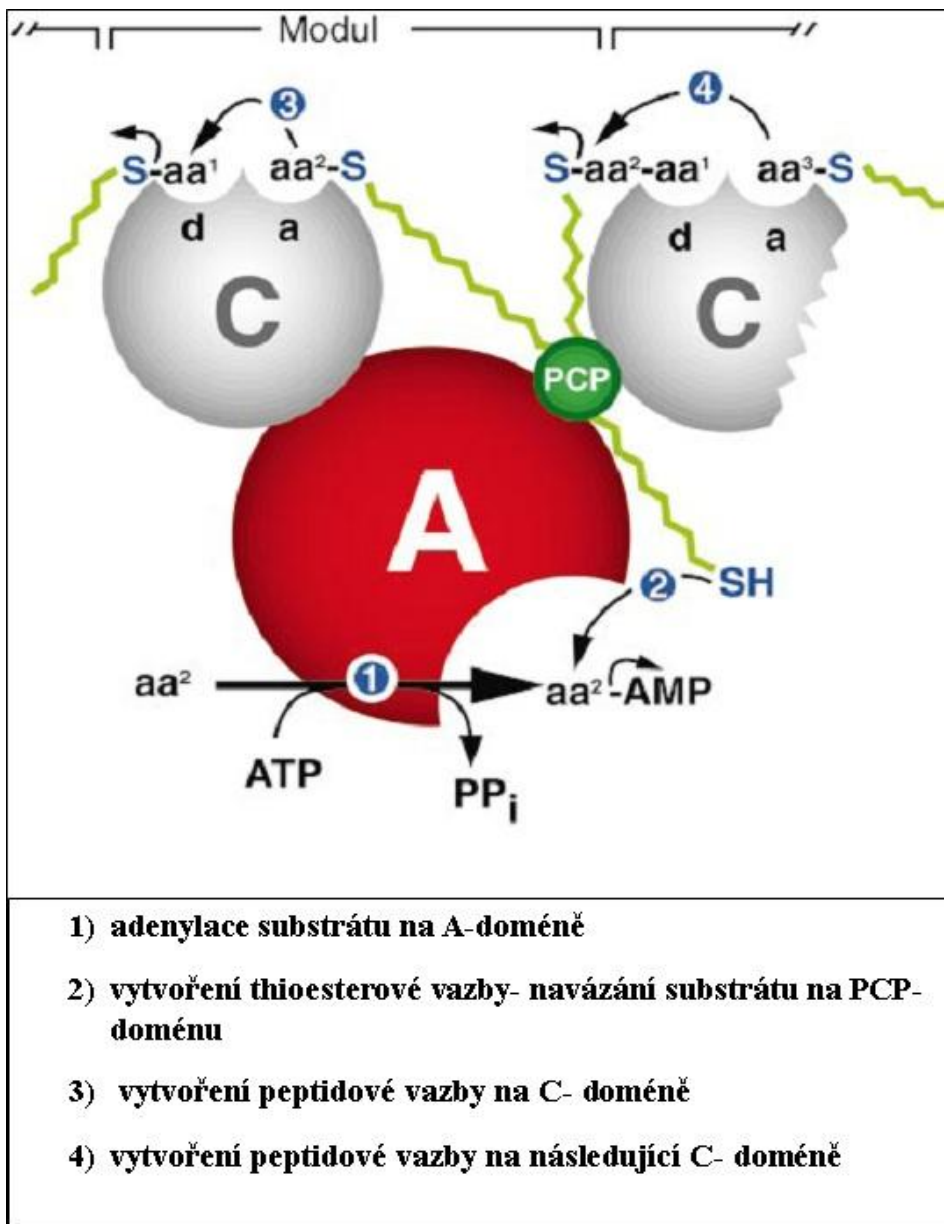
PCP (peptidyl carrying protein) doména někdy též označována jako **thiolační (T)** poutá přes sulfhydrylovou skupinu fosfopantetheinylové prostetické části thioesterovou vazbou aminoacyl (acyl) či v dalším stupni již peptidyl. Takto nabitá PCP doména se stává

donorem acylu/peptidylu pro akceptorovou PCP doménu s navázaným aminoacylem (acylem) v následujícím modulu.

Kondenzační (C) doména katalyzuje tvorbu peptidické vazby mezi substráty vázanými na akceptorové a donorové PCP doméně (Weber a Marahiel, 2001).

Thioesterázová (TE) doména katalyzuje rozpad thioesterové vazby mezi výsledným produktem a poslední PCP doménou.

Obrázek 7: Schéma základního elongačního modulu (Weber a Marahiel, 2001)



Obrázek 8: Kód určující selektivitu A-domén (Stachelhaus et al., 1999)

| Doména | Pozice | | | | | | | | | | Biosyntetický templát |
|-------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 235 | 236 | 239 | 278 | 200 | 301 | 322 | 330 | 331 | 517 | |
| Aad | E | P | R | N | I | V | E | F | V | K | AcvA |
| Ala | D | L | L | F | G | I | A | V | L | K | CssA, Hts1 |
| Asn | D | L | T | K | L | G | H | V | G | K | BacA, CepA, Dae, Glig1, TycC |
| Asp | D | L | T | K | V | G | E | I | G | K | BacC, SrfAB, LicB, LchAB |
| Cys(1) | D | H | E | S | D | V | G | I | T | K | AcvA |
| Cys(2) | D | L | Y | N | L | S | L | I | W | K | BacA, HMWP2 |
| Dab | D | L | E | H | L | T | T | V | S | K | SyrE |
| Dhb/Sal | P | L | P | A | Q | G | V | V | N | K | EntE, DhbE, MbiA, PchD, VibE, YbtE |
| Gln | D | A | Q | D | L | G | V | V | D | K | LicA, LchAA |
| Glu(1) | D | A | W | H | F | G | G | V | D | K | FenA, FenC, FenE, PPS1, PPS3, PPS4 |
| Glu(2) | D | A | K | D | L | G | V | V | D | K | BacC, SrfAA |
| Ile (1) | D | G | F | F | L | G | V | V | Y | K | BacA, BacC, LicC, LchAC |
| Ile (2) | D | A | F | F | Y | G | I | T | F | K | FenB, PPS9 |
| Leu(1) | D | A | W | F | L | G | N | V | V | K | BacA, LicA, LchAA, LicB, LchAB, SrfAA, SrfAB |
| Leu(2) | D | A | W | L | Y | G | A | V | M | K | CssA |
| Leu(3) | D | G | A | Y | T | G | E | V | V | K | GrsB, TycC |
| Leu(4) | D | A | F | M | L | G | M | V | F | K | LicA, LchAA, SrfAA |
| Orn(1) | D | M | E | N | L | G | L | I | N | K | FxbC |
| Orn(2) | D | V | G | E | I | G | S | I | D | K | BacB, FenC, GrsB, PPS1, TycC |
| Phe | D | A | W | T | I | A | A | V | C | K | GrsA, SnbDE, TycA, TycB |
| Phg/hPhg | D | I | F | L | L | G | L | L | C | K | CepB, CepC, SnbDE |
| Pip/Pip-@ | D | F | Q | L | L | G | V | A | C | K | FibP, RapP, SnbA, SnbDE |
| Pro | D | V | Q | L | L | G | V | V | V | K | GrsB, FenA, PPS4, SnbDE, TycB |
| Ser | D | V | W | L | I | A | H | V | V | K | ErifF, SyrE |
| Thr/Dht | D | F | W | N | L | S | L | I | D | K | AcmbB, Fib, PPS2, PycD, SnbC, SyrB, SyrE |
| Tyr(1) | D | G | T | I | I | G | M | V | H | K | FenA, PPS2, PPS4 |
| Tyr(2) | D | A | L | V | I | G | A | V | A | K | Iycb, IycC |
| Tyr(3) | D | A | S | T | V | A | A | V | C | K | BacC, CepA, CepB |
| Val(1) | D | A | F | W | I | G | G | T | F | K | GraB, FenE, LicB, LchAB, PPS3, SrfAB, TycC |
| Val(2) | D | F | E | S | T | A | A | V | Y | K | AcvA |
| Val(3) | D | A | W | M | F | A | A | V | L | K | CssA |
| Variabilita | 3% | 16% | 16% | 39% | 52% | 13% | 26% | 23% | 26% | 0% | Wobble-like positions |

Aad,G(L-a-aminoacidipiková kyselina); Dab,kyselina 2',3'-diamino máselná ; Dhb, kyselina 2',3'-dihydroxy benzoová; Sal, salicylát; Phg, L-fenylglycin; hPhg, 4'-hydroxy-L-fenylglycin; Pip, kyselina L-pipecolinová ; Dht, dehydrothreonin; @ značí modifikace acylu. Číslování aminokyselin odpovídá proteinu GrsA (biosyntéza antibiotika gramicidinu S) který je adenylační doménou pro fenylalanin. Nejvyšší variabilita aminokyselin je na pozici 278 a 299.

2.2.3.2. Polyketid syntetáza (PKS)

Polyketid syntetázy (PKS) jsou enzymatické komplexy účastnící se produkce sekundárních metabolitů polyketidového charakteru. Podobně jako NRPS jsou i PKS schopny připojovat monomerní podjednotky k nově syntetizovanému řetězci. V modulech PKS se mohou vyskytovat následující domény:

AT: Acyltransferázová doména

ACP: (Acyl carrier protein), doména s SH skupinou na kofaktoru, kterým je přes serin připojený 4'-fosfopantethein

KS: Ketosyntetázová doména s SH skupinou cysteinu v aktivním místě

KR: Ketoreduktázová doména

DH: Dehydratázová doména

ER: Enoylreduktázová doména

MT: Metyltransferázová doména, O- i C-(α nebo β)metyltransferáza

SH: Sulfhydrolázová doména

TE: Thioesterázová doména

Podle struktury a složení těchto enzymových komplexů rozlišujeme 3 typy bakteriálních PKS:

PKS typ I:

PKS typu I jsou multifunkční enzymy, které jsou organizovány do modulů stejně jako NRPS. Každý modul v sobě ukrývá řadu různých domén zodpovědných za připojení jedné podjednotky polyketidového řetězce, což lze ukázat na příkladu 6'-deoxyerytromycin syntetázy B (DEBS) (Obr. 9), která se účastní biosyntézy makrolidu erytromycinu (Staunton a Weissman 2001).

Iniciace syntézy

Zahajovací podjednotka polyketidu je předána acyltransferázovou (AT) doménou na ACP (acyl carrier protein) doménu.

Elongace

Z ACP předchozího modulu je přenesen polyketid na thiolovou skupinu cysteinu v aktivním místě ketosyntetázové (KS) domény.

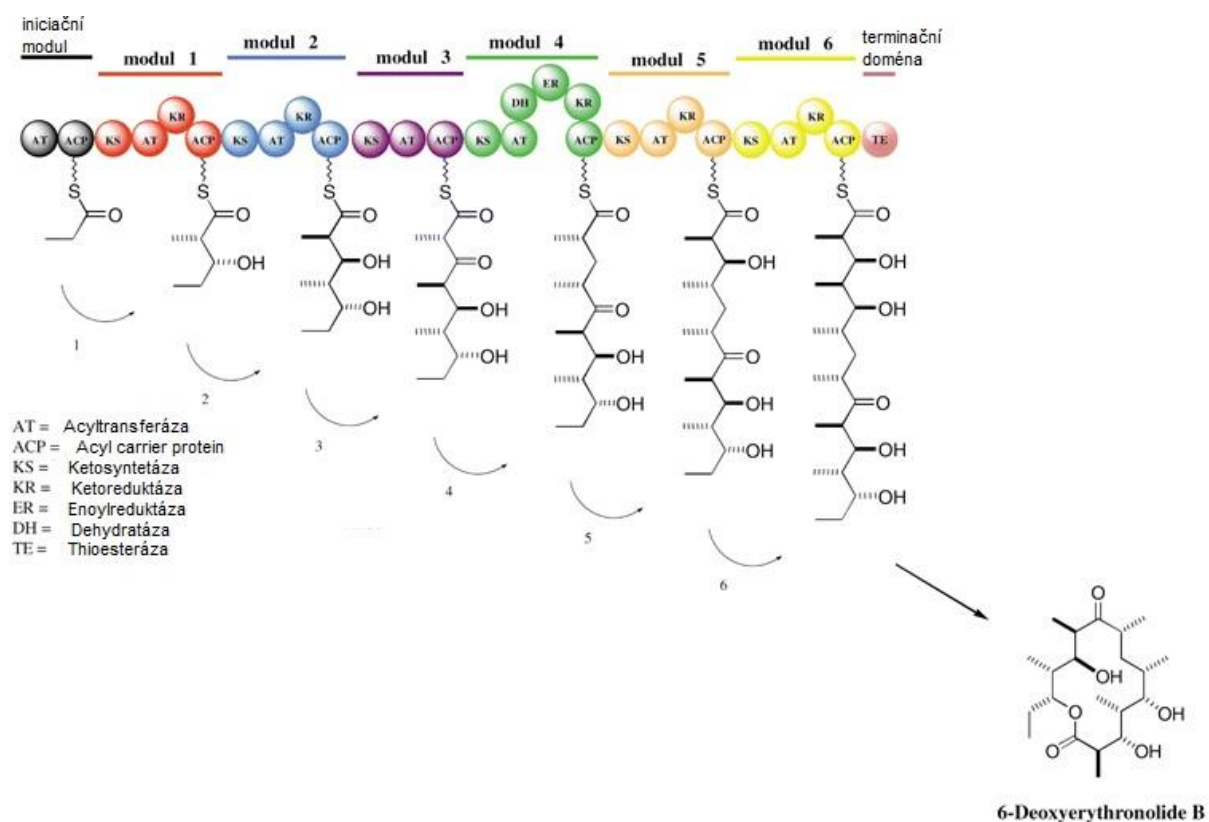
Na ACP doménu (ve stejném modulu) se naváže elongační podjednotka o kterou má být řetězec prodloužen. Reakce je katalyzována acyltransferázovou (AT)doménu.

ACP vázaná elongační podjednotka je propojena s prodlužovaným řetězcem polyketidu na KS doméně během Claisenovy kondenzace za vzniku prodlouženého β -keto acyl intermediátu a molekuly CO_2 . Tento meziprodukt je vázán na ACP doménu a KS doména je volná. V následných analogických krocích dochází k prodlužování polyketidu o další stavební podjednotky (Fischbach a Walsh, 2006).

Moduly podle složení domén můžeme rozdělit na:

- a) iniciační modul: AT-ACP-
- b) elongační modul: -KS-AT-[DH-ER-KR]-ACP-
- c) terminační modul: -TE

Obrázek 9: Uspořádání domén PKS typu I účastníci se biosyntézy prekurzoru erytromycinu (upraveno dle Staunton a Weissman 2001)



Domény jsou představovány jednotlivými kroužky, přičemž strukturní rezidua jsou opomenuta. Každý elongační modul sestává z esenciálních KS, AT a ACP domén a všechny kromě třetího modulu mají i „nepovinnou/nepovinné“ doménu/domény s redukčními aktivitami (KR, DH, ER). Přenosy mezi jednotlivými po sobě jdoucími doménami a biosyntetické transformace objasňují, jak je dosaženo programování této modulární PKS.

PKS typ II.:

PKS typu II jsou multienzymové komplexy, které mají jediný soubor katalytických podjednotek. Avšak působí na rozdíl od typu I. opakovně. Jednotlivé monofunkční podjednotky tak opakovaně syntetizují jednotlivé kroky. Do této skupiny patří PKS, které se účastní biosyntézy aromatických polyketidů (které často bývají polycyklické), například tetracenomycin C (Shen, 2000).

PKS typ III.:

PKS typ III jsou homodimerní enzymy. Jsou to v zásadě opakovaně účinkující kondenzační enzymy, jak dokládá syntetáza RppA pro biosyntézu aromatických polyketidů (často monocyklických nebo bicyklických), jakým je například flaviolin (Moore a Hopke, 2001). Tento typ PKS na rozdíl od předchozích nevyžaduje přítomnost ACP domény.

Navzdory strukturním a mechanickým rozdílům všechny typy PKS syntetizují polyketidy sekvencí dekarboxylačních kondenzací stavebních prvků, které představuje acyl koenzym A. Ketoacylsyntetázové (KS) domény (u PKS typu I) nebo enzymatické podjednotky (u PKS typu II a III)

katalyzují krok vytvářející C-C vazbu mezi jednotlivými podjednotkami nově vznikajícího polyketidu (Shen, 2003).

Zvláštní skupinou jsou hybridní enzymatické komplexy **PKS/NRPS syntetázy**. Tyto modulární enzymové komplexy se skládají z různého počtu modulů, které skladbou domén patří buď mezi PKS I nebo NRPS moduly. Mezi produkty takovýchto syntetáz patří rapamycin, neomycin, epothilone nebo yersiniabaktin (Fischbach a Walsh, 2006).

2.2.4. Cílené genetické manipulace producentů biologicky aktivních látek

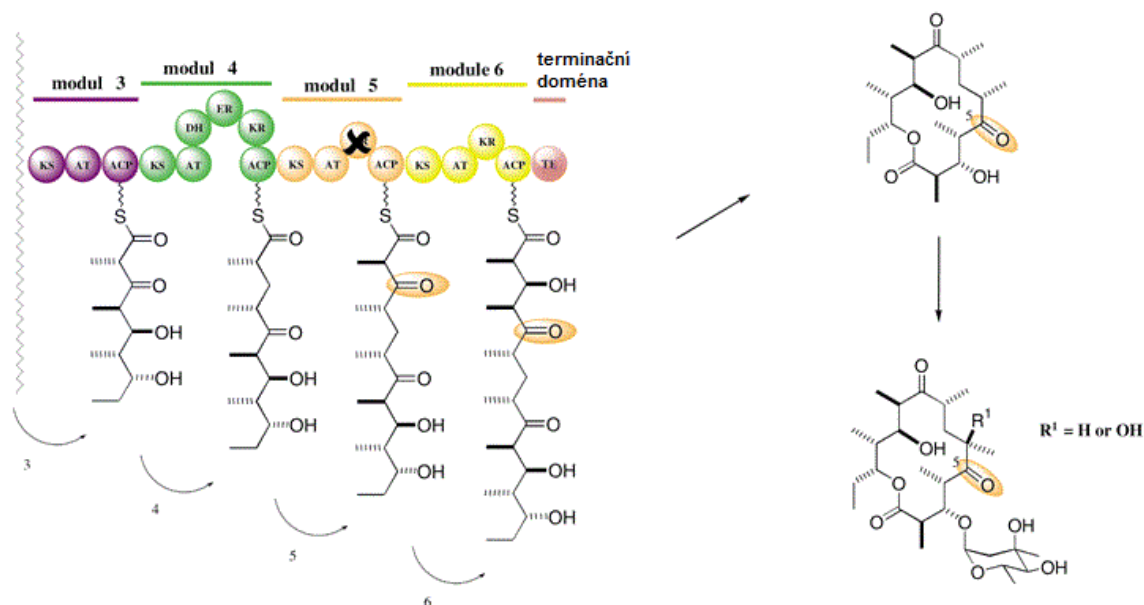
Velmi perspektivní možností zisku nových antibiotik a látek se zajímavou biologickou aktivitou je příprava hybridních látek. Tyto sloučeniny jsou získávány z geneticky pozměněných producentů (Hopwood *et al.*, 1985). Je třeba poměrně detailně prostudovat biosyntetické dráhy a odpovídající genové shluky, aby tyto cílené manipulace byly možné. Důležitý je také rozvoj metod genového inženýrství. U streptomycet a dalších významných producentů zejména β -laktamových, polyketidových a peptidových antibiotik již tyto metody umožňují cílené manipulace (Baltz, 1998). Peptidová antibiotika vzniklá činností NRPS a polyketidová antibiotika (produkovaná funkčně příbuznými modulárními enzymy, polyketid syntetázami (PKS)) jsou z hlediska přípravy hybridních látek velmi prostudovanou skupinou (Hutchinson, 1998; Baltz, 1998, Menzella a Reeves, 2007).

Hybridní produkt může být získán činností modulárního proteinu složeného z produktů genů, které patří do odlišných biosyntetických drah (Olyinik *et al.*, 1996).

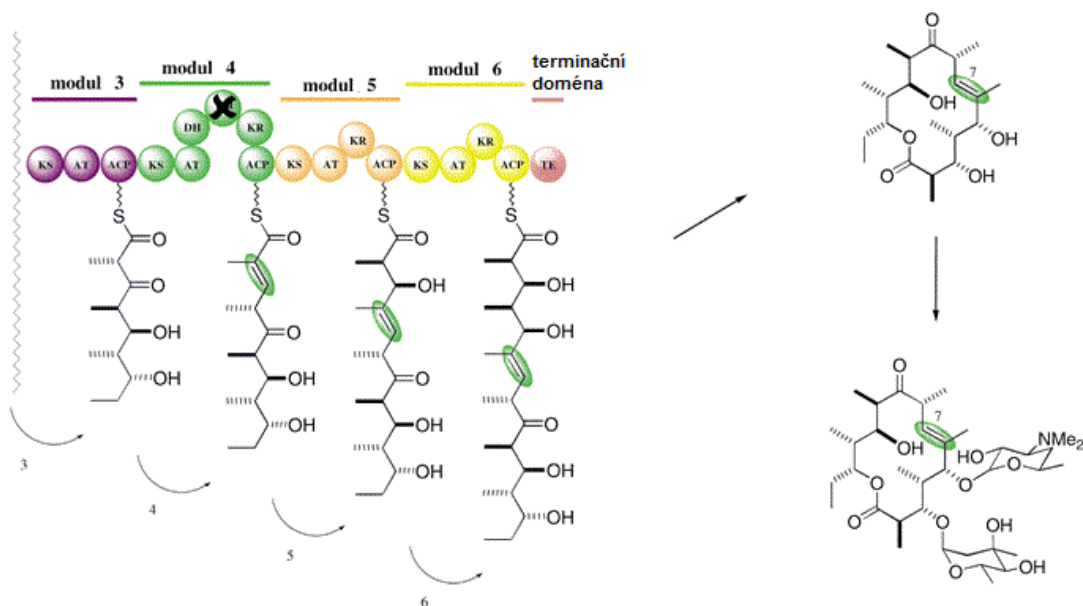
Příkladem genových manipulací produkčního kmene, za účelem biosyntetické přípravy nových hybridních bioaktivních látek, jsou modifikace polyketid syntetázy (PKS), která se účastní biosyntézy erytromycinu (6'-deoxyerytronolid B syntetáza (DEBS)). Nové látky jsou získávány přeskupováním jednotlivých modulů nebo cílenými delecemi podjednotek modulů. Cílenou delecí v 5. modulu (delece v ketoreduktáze) nebo ve 4. modulu (delece v enoylreduktáze) byly získány deriváty erytromycinu stabilnější v kyselém prostředí (Khosla a Zawada, 1996) (Obr. 10).

Obrázek 10: Experimentální důkaz modulárního uspořádání DEBS, biosyntéza hybridních analogů erytromycinu (upraveno dle Staunton a Weissman, 2001).

(a)



(b)



(a) Inaktivace KR pátého modulu DEBS má za následek produkci analogu erytromycinu s keto skupinou na pozici C-5. (b) Inaktivace ER čtvrtého modulu zapříčinila biosyntézu analogu erytromycinu s dvojnou vazbou na očekávaném místě mezi C-6 a C-7.

Přenosem koncové thioesterázové (TE) domény lze získat deriváty erytromycinu se zkráceným základním uhlíkatým řetězcem. Přenosem TE domény z 6. modulu na konec

5. modulu byl získán makrolid podobný metymycinu. Přenos této domény na konec 2. modulu vede k biosyntéze triketidů (Cortes et al., 1995).

Dalším příkladem přípravy hybridních látek manipulací genetické informace producenta je biosyntéza 4'-pentyl-4'-depropyl-linkomycinu a

4'-butyl-4'-depropyl-linkomycinu. Tyto deriváty linkomycinu byly produkovány kmenem *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 s cílenou delecí v biosyntetickém genu (*lmbX*), tj. s vyřazenou větví pro biosyntézu 4'-propyl-L-prolinu. Kmen byl kultivován v médiu s přidavkem prekurzorů, nahrazujících chybějící PPL: 4'-pentyl-L-prolin nebo 4'-butyl-L-prolin (Ulanová et al., 2010).

Důležitá je i příprava nadprodukčních kmenů, které syntetizují žádané sloučeniny s vyšším výtěžkem oproti nepozměněnému produkčnímu kmeni. Nadprodukční kmene mohou být připraveny vložením silného či konstitutivního promotoru, před geny kódující enzymy biosyntézy dané látky, a to zejména před ty, které prezentují tzv. „úzké místo“ biosyntézy. Dalšími možnostmi přípravy nadprodukčního kmene jsou vložení kopií biosyntetických genů do neutrální oblasti genomu a manipulace s regulačními geny.

Uvedené metody přípravy hybridních antibiotik, případně konstrukce nadprodukčních kmenů, vyžadují v prvé řadě identifikaci genů příslušných biosyntetických shluků.

Tato práce je zaměřena na vyhledávání A-domén NRPS metodou PCR s vhodně zvolenou kombinací degenerovaných primerů. Adenylační domény NRPS byly zvoleny z toho důvodu, že rozpoznání a kondenzace jednotlivých prekurzorů jsou klíčovými místy biosyntézy antibiotika. A právě A-doména NRPS zodpovídá za rozpoznání a aktivaci příslušného prekurzoru. Zároveň lze předpokládat, že v těsné blízkosti příslušné A-domény se bude nacházet i shluk genů pro biosyntézu odpovídajícího prekurzoru. Ze sekvence A-domény lze s poměrně vysokou mírou pravděpodobnosti odvodit také povahu substrátu, který rozpoznává a aktivuje, a tak lze na samém počátku zvolit pro další práci ty pozitivní klony, jejichž A-domény rozpoznávají deriváty aminokyseliny prolinu, tj. prekurzory, které jsou vhodné pro kombinování s MTL za vzniku různě modifikovaných derivátů linkomycinu.

Metoda vyhledávání genů pomocí PCR s vhodně zvolenými degenerovanými primery je na pracovišti dlouhodobě úspěšně používána (např. izolace genového shluku pro biosyntézu prothramycinu – Najmanová, nepublikovaná data). Výhodou je možnost provedení skupinových reakcí (až 30 templátů v jedné reakci), čímž se značně snižují náklady i časová

náročnost. Teprve v případě pozitivního výsledku jsou pak testovány jednotlivé klony. Po optimalizaci podmínek PCR je pak tato metoda využitelná nejen pro vyhledávání v utříděné sbírce, ale i pro vyhledávání v půdním metagenomu. Tímto způsobem je tedy možné získat pro další práci i geny kryptických shluků nebo geny z nekultivovatelných klonů.

Do budoucna předpokládáme rozšíření projektu o vyhledávání genů pro halogenázy (chlorované deriváty linkomycinu vykazují lepší účinnost), případně genů pro nejruznější PKS.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriální kmeny a použité kosmidy

3.1.1.1. Použité bakteriální kmeny:

Sbírka půdních izolátů čítající 808 kmenů, které pocházejí z dřívějších projektů. Z dvanácti přírodních biotopů pochází 439 izolátů a 369 kmenů bylo izolováno z experimentálních lokalit Srbsko a Třeboň. Jedná se o lesní půdy s výrazně odlišným pH (Srbsko pH= 7,65 a Třeboň pH= 4,01), které byly navíc ošetřeny různými dávkami antibiotika linkomycinu (Čermák et al., 2008). Lokality sběru a jejich označení jsou uvedeny v tabulce 3. Vybrané kmeny byly zdrojem chromozomální DNA, která bude dále sloužit jako templát pro vyhledávání genů A-domén NRPS metodou PCR.

Tabulka 3: Označení lokalit sběru.

| název lokality | zkratka | název lokality | zkratka |
|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| Gargano | G | Děvín | DEV |
| Kotýz | KOT | Podyjí | P |
| Maroko | M8 | Nechranice | N |
| Zakopané | ZAK | Oblík | OBL |
| rašelina | R | Meluzina | MEL |
| Srbsko (les) | L | Markenstein | MER |
| Třeboň (olše) | O | Stampftal | STA |

Tabulka 4: Přehled sbírky kmenů s označením lokalit sběru

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| 1 | MER | 41 | O1 | 83 | MER | 123 | L1 |
| 2 | MER | 42 | O1 | 85 | KOT | 124 | MER |
| 3 | MER | 43 | O1 | 85a | KOT | 125 | MER |
| 4 | MER | 44 | STA | 85b | KOT | 126 | MER |
| 5 | MER | 45 | STA | 85c | KOT | 127 | MER |
| 6 | MER | 46 | STA | 86 | KOT | 128 | MER |
| 7 | MER | 47 | STA | 87 | KOT | 129 | MER |
| 8 | MER | 49 | L3 | 88 | KOT | 130 | MER |
| 9 | MER | 50 | L3 | 89 | KOT | 131 | MER |
| 10 | MER | 51 | L11 | 90 | KOT | 133 | MER |
| 11 | MER | 52 | L11 | 91 | KOT | 136 | STA |
| 12 | MER | 53 | L11 | 92 | KOT | 137 | STA |
| 12b | MER | 54 | O1 | 93 | KOT | 137b | STA |
| 13 | MER | 55 | O1 | 94 | KOT | 138 | STA |
| 14 | MER | 56 | O1 | 95 | KOT | 138b | KOT |
| 16 | MER | 57 | O1 | 96 | KOT | 139 | KOT |
| 17 | MER | 58 | O1 | 97 | STA | 140 | KOT |
| 17 | MER | 59 | O1 | 98 | STA | 141 | KOT |
| 18 | MER | 60 | O1 | 99 | STA | 141b | KOT |
| 19 | MER | 61 | O1 | 100 | STA | 142 | OBL |
| 20 | MER | 62 | O1 | 101 | STA | 143 | OBL |
| 21 | MER | 63 | O1 | 102 | STA | 144 | OBL |
| 22 | MER | 64 | O1 | 103 | STA | 145 | OBL |
| 23 | MER | 65 | O1 | 104 | STA | 146 | OBL |
| 24 | MER | 66 | O1 | 105 | STA | 147 | OBL |
| 25 | KOT | 67 | O1 | 106 | STA | 148 | OBL |
| 26 | KOT | 68 | O5 | 107 | STA | 149 | OBL |
| 27 | KOT | 69 | O5 | 108 | O1 | 150 | OBL |
| 28 | KOT | 70 | O5 | 109 | MER | 151 | O9 |
| 29 | KOT | 71 | O5 | 110 | MER | 121b | O3 |
| 30 | KOT | 72 | O9 | 111 | MER | 152 | L3 |
| 31 | KOT | 73 | O9 | 112 | MER | 153 | L11 |
| 32 | MER | 74 | O9 | 113 | MER | 154 | L11 |
| 32b | MER | 75 | O9 | 114 | MER | 155 | L1 |
| 33a | KOT | 76a | O11 | 115 | MER | 156 | L1 |
| 33b | KOT | 76b | O11 | 116 | MER | 157 | L1 |
| 34 | STA | 77b | O11 | 117 | MER | 157b | L1 |
| 35 | STA | 77a | O11 | 118 | MER | 158 | L1 |
| 36 | STA | 78 | L11 | 119 | MER | 159 | L1 |
| 37 | STA | 79 | STA | 120 | O1 | 160 | L1 |
| 38 | STA | 80 | MER | 121 | O3 | 161 | L1 |
| 39 | MEL | 81 | MER | 121b | O4 | 162 | L1 |
| 40 | O1 | 82 | MER | 122 | O5 | 163 | L1 |

| | | | | | | | |
|------|----|------|-----|------|-----|------|----|
| 164 | L1 | 213 | N | 257 | O9 | 306 | L3 |
| 165 | L1 | 214 | N | 258 | O9 | 307 | L3 |
| 166 | R | 215 | N | 258a | O9 | 308 | L3 |
| 167 | R | 216 | N | 258b | O9 | 310 | L3 |
| 168 | R | 217 | N | 259 | O9 | 311 | L3 |
| 169 | R | 217a | N | 260 | O9 | 312 | L3 |
| 170 | R | 218 | N | 261 | O9 | 313 | L3 |
| 171 | R | 219 | N | 262 | O9 | 314 | L3 |
| 173 | R | 220 | N | 263 | O9 | 315 | L3 |
| 174 | R | 221 | N | 264 | O9 | 316 | L3 |
| 175b | R | 222 | N | 265a | O11 | 317 | L3 |
| 176b | R | 223 | N | 265b | O11 | 318 | L3 |
| 177 | R | 224 | N | 266 | O11 | 318a | L4 |
| 178 | R | 225 | N | 267 | O11 | 318b | L5 |
| 180 | P | 226 | N | 268 | O11 | 319 | L3 |
| 181 | P | 227 | N | 269 | O11 | 320 | L3 |
| 182 | G | 228 | N | 269b | O11 | 321 | L3 |
| 183 | G | 229 | N | 271 | L1 | 322 | L3 |
| 185 | G | 230 | P | 272 | O11 | 323 | L3 |
| 187 | G | 231 | O1 | 273 | L1 | 323a | L3 |
| 188 | G | 232 | O1 | 274 | L1 | 323b | L3 |
| 189 | G | 233 | O1 | 276 | L1 | 324 | L5 |
| 190 | D | 234 | MEL | 278 | L1 | 325 | L5 |
| 191 | D | 237 | R | 279b | L1 | 326a | L5 |
| 192 | D | 238 | MER | 279 | L1 | 326b | L5 |
| 193 | M8 | 239 | MER | 280 | L1 | 327 | L5 |
| 194 | M8 | 240 | O1 | 281 | L3 | 328 | L5 |
| 195 | M8 | 241 | O1 | 283 | L7 | 329 | L5 |
| 196 | M8 | 242 | O1 | 284 | L7 | 330 | L5 |
| 197 | M8 | 243 | O1 | 285 | L9 | 331 | L7 |
| 198 | M8 | 244 | O1 | 286 | L9 | 332 | L7 |
| 201 | M8 | 245 | O1 | 287 | L9 | 333 | L7 |
| 201b | M8 | 246 | O1 | 288 | L9 | 334 | L7 |
| 203 | M8 | 247 | O3 | 289 | L9 | 335 | L8 |
| 204 | M8 | 248 | O3 | 290 | L11 | 336 | L7 |
| 205 | M8 | 249 | O5 | 292 | O11 | 337 | L7 |
| 205b | M8 | 250 | O7 | 293 | L3 | 338 | L7 |
| 206 | M8 | 251 | O7 | 294 | S | 339 | L7 |
| 207 | M8 | 252 | O7 | 299 | L1 | 340 | L7 |
| 208 | M8 | 253 | O7 | 300 | L1 | 341 | L7 |
| 209 | N | 254 | O7 | 301 | L3 | 342 | L7 |
| 211 | N | 255 | O7 | 302 | L3 | 345 | L9 |
| 212 | N | 256 | O7 | 305 | L3 | 346 | L9 |

| | | | | | | | |
|------|----|------|---------|------|-----|------|-----|
| 347 | L9 | 391 | D | 434 | O3 | 492 | ZAK |
| 349a | L9 | 392 | D | 435 | O3 | 493 | ZAK |
| 349b | L9 | 393 | D | 436 | O3 | 494 | ZAK |
| 349c | L9 | 394 | R | 437 | O3 | 495 | ZAK |
| 350 | L9 | 395 | O1 | 438 | O7 | 496 | ZAK |
| 351 | L9 | 396 | O1 | 439 | O3 | 497 | ZAK |
| 352 | L1 | 397 | L11 | 440 | O7 | 498 | ZAK |
| 353 | L1 | 398 | O1 | 441 | O5 | 499 | ZAK |
| 354 | L1 | 399 | O1 | 442 | O9 | 500 | ZAK |
| 355 | O1 | 400 | O1 | 443 | O9 | 502 | DEV |
| 356 | O1 | 401 | O1 | 444 | O9 | 503 | DEV |
| 357 | O1 | 402 | O1 | 445 | O9 | 504 | DEV |
| 358 | O1 | 403 | O3 | 446 | O11 | 505 | DEV |
| 359 | O1 | 404 | O3 | 449 | L3 | 506 | DEV |
| 361 | O3 | 405 | O3 | 450 | L3 | 507a | DEV |
| 363 | O3 | 406a | O3 | 451 | L1 | 507b | DEV |
| 364 | O5 | 406b | O3 | 452 | L5 | 508 | DEV |
| 365 | O5 | 407 | O3 | 453 | L7 | 509 | DEV |
| 366 | O5 | 408 | O3 | 454 | L7 | 510 | DEV |
| 367 | O5 | 409 | O3 | 455a | L9 | 511 | DEV |
| 368 | O5 | 410 | O3 | 455b | L9 | 512b | DEV |
| 369 | O5 | 411 | O3 | 456a | L9 | 512a | DEV |
| 370 | O5 | 412 | O9 | 456b | L9 | 512c | DEV |
| 371 | O5 | 413 | O9 | 457a | L9 | 513 | DEV |
| 372 | O7 | 415 | O11 | 457b | L9 | 514 | DEV |
| 373 | O7 | 416 | asi 423 | 458 | L5 | 515 | DEV |
| 375 | O7 | 419 | O11 | 459 | O3 | 515a | DEV |
| 376 | O9 | 420 | O11 | 460 | O3 | 515b | DEV |
| 377 | O9 | 421 | O11 | 461 | O3 | 516 | DEV |
| 378 | O9 | 422 | O11 | 463 | O5 | 517 | DEV |
| 379 | O9 | 423 | L1 | 464 | L1 | 517b | DEV |
| 380 | O9 | 424 | S | 465 | L1 | 518 | DEV |
| 381 | O9 | 425 | S | 466 | L1 | 519 | DEV |
| 382 | O3 | 426 | O1 | 467 | L1 | 520 | DEV |
| 383 | O3 | 427 | O1 | 468 | L1 | 521 | DEV |
| 384 | S | 428 | O1 | 469 | L3 | 522 | DEV |
| 385 | S | 429 | O1 | 472 | L5 | 523 | DEV |
| 386 | S | 430 | O3 | 473 | L5 | 524 | DEV |
| 387a | S | 431a | O3 | 474 | L7 | 525 | DEV |
| 387b | S | 431b | O3 | 475 | L7 | 526 | DEV |
| 388 | S | 432 | O3 | 476 | L9 | 527 | DEV |
| 389 | S | 433 | O3 | 490 | ZAK | 528 | DEV |
| 390 | S | 433A | O3 | 491 | ZAK | 529 | DEV |

| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-------|-----|
| 530 | DEV | 846 | MER | 905 | MER |
| 531 | DEV | 847 | MER | 906 | MER |
| 532 | DEV | 848 | MER | 907 | MER |
| 533 | DEV | 849 | MER | 908 | MER |
| 534 | DEV | 850 | MER | 909 | MER |
| 535 | DEV | 851 | MER | 910 | MER |
| 536 | DEV | 852 | MER | 911 | MER |
| 537 | DEV | 853 | MER | 911/2 | MER |
| 538 | DEV | 854 | MER | 912 | MER |
| 539 | DEV | 856 | MER | 912b | MER |
| 540 | DEV | 859 | STA | 913 | MER |
| 801 | MER | 861 | STA | 914 | MER |
| 803 | MER | 863 | STA | 915 | STA |
| 804 | MER | 864 | STA | 916 | STA |
| 805 | MER | 865 | STA | 917 | STA |
| 806 | MER | 866 | STA | 918 | STA |
| 812 | MER | 867 | STA | 920 | STA |
| 813 | MER | 869 | STA | 919 | STA |
| 814 | MER | 870 | STA | 922 | STA |
| 815 | MER | 871 | STA | 923 | STA |
| 817 | MER | 872 | STA | 925 | STA |
| 818 | MER | 873 | STA | 926 | STA |
| 820 | MER | 874 | STA | 927 | STA |
| 821 | MER | 875 | STA | 928 | STA |
| 823 | MER | 876 | STA | 929 | STA |
| 824 | MER | 877 | STA | 930 | STA |
| 825 | MER | 878 | STA | 931 | STA |
| 826 | MER | 879 | STA | 932 | STA |
| 829 | MER | 880 | STA | 933 | STA |
| 830 | MER | 881 | STA | 934 | STA |
| 831 | MER | 882 | STA | 935 | STA |
| 832 | MER | 883 | STA | 936 | STA |
| 833 | MER | 886 | STA | 937 | STA |
| 834 | MER | 887 | STA | 938 | STA |
| 835 | MER | 888 | STA | 939 | STA |
| 837 | MER | 890 | STA | 940 | STA |
| 838 | MER | 891 | STA | 941 | STA |
| 839 | MER | 892 | STA | 942 | STA |
| 840 | MER | 900 | MER | 943 | STA |
| 841 | MER | 901 | MER | 944 | STA |
| 842 | MER | 902 | MER | 945 | STA |
| 843 | MER | 903 | MER | 946 | STA |
| 844 | MER | 904 | MER | | |

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-------|-----|
| 1v | O9 | 45v | O3 | 92v | L9 | 139v | L5 |
| 2v | O3 | 46v | O3 | 93v | L9 | 140va | L5 |
| 3v | O3 | 47v | O11 | 94v | L9 | 141v | L5 |
| 4v | O11 | 48v | O11 | 95v | L9 | 142v | L5 |
| 5v | O3 | 49v | O1 | 96vb | L9 | 143v | L5 |
| 6v | O3 | 50v | O1 | 97v | L9 | 144v | L5 |
| 7v | O9 | 51v | L1 | 98v | L9 | 146v | L7 |
| 8v | O1 | 52v | L1 | 99v | L9 | 147v | L7 |
| 9v | O7 | 53v | L1 | 100v | L11 | 148v | L7 |
| 10v | O5 | 54v | L1 | 101v | L11 | 149v | L7 |
| 11v | O5 | 55v | L1 | 102v | L11 | 150v | L7 |
| 12v | O1 | 56v | L2 | 103v | L11 | 151v | L7 |
| 13v | O9 | 57v | L1 | 104v | L11 | 152v | L7 |
| 14v | O9 | 59v | L1 | 105v | L11 | 153v | L7 |
| 15v | O9 | 60v | L3 | 106v | L11 | 154v | L7 |
| 16v | O5 | 61v | L3 | 107v | L11 | 155v | L7 |
| 17v | O3 | 62v | L3 | 108v | ZAK | 156v | L7 |
| 18v | O3 | 63v | L3 | 109v | ZAK | 157v | L7 |
| 19v | O3 | 64v | L3 | 110v | ZAK | 158v | L7 |
| 20v | O7 | 65v | L3 | 111v | ZAK | 159v | L9 |
| 21v | O7 | 66v | L3 | 112v | L1 | 160v | L9 |
| 22v | O7 | 67v | L3 | 113v | L1 | 161v | L9 |
| 23v | O1 | 69v | L5 | 114v | L1 | 162v | L9 |
| 24v | O1 | 68v | L3 | 115v | L1 | 163v | L9 |
| 25v | O1 | 70v | L5 | 116v | L1 | 164v | L9 |
| 26v | O3 | 71v | L5 | 117v | L1 | 165v | L9 |
| 27v | O3 | 73v | L5 | 118v | L1 | 166v | L9 |
| 28v | O3 | 74v | L5 | 119v | L1 | 167v | L9 |
| 29v | O3 | 75v | L5 | 120v | L1 | 168v | L11 |
| 30v | O7 | 76v | L5 | 121v | L1 | 169v | L11 |
| 31v | O1 | 77v | L5 | 122va | L1 | 170v | L11 |
| 32v | O1 | 78v | L5 | 122vb | L1 | 171v | L11 |
| 33v | O1 | 80v | L5 | 124v | L3 | | |
| 34v | O1 | 81v | L7 | 125va | L3 | | |
| 35v | O1 | 82v | L7 | 125vb | L3 | | |
| 36v | O11 | 83v | L7 | 127v | L3 | | |
| 37v | O11 | 84v | L7 | 129v | L3 | | |
| 38v | O3 | 85v | L7 | 130v | L3 | | |
| 39v | O3 | 86v | L7 | 131v | L3 | | |
| 40v | O3 | 87v | L7 | 132v | L3 | | |
| 41v | O3 | 88v | L7 | 133v | L3 | | |
| 42v | O5 | 89v | L7 | 135v | L5 | | |
| 43v | O5 | 90v | L7 | 136v | L5 | | |
| 44v | O5 | 91v | L9 | 138v | L5 | | |

Čísla u zkratk pro oblasti Srbsko a Třeboň značí koncentraci přidaného linkomycinu v půdě:

Kontrolní izoláty z půd s minimálním přídávkem vody, bez linkomycinu jsou označeny **1 a 2**.

Kontrolní izoláty z půd s přídávkem vody, bez linkomycinu jsou označeny **11**.

Izoláty z půd s přídávkem vody a linkomycinu (50 mg kg⁻¹ půdy) jsou označeny **3 a 4**.

Izoláty z půd s přídávkem vody a linkomycinu (5 mg kg⁻¹ půdy) jsou označeny **5 a 6**.

Izoláty z půd s přídávkem vody a linkomycinu (500 mg kg⁻¹ půdy) jsou označeny **7 a 8**.

Izoláty z půd s přídávkem vody a 10,000 CFU *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355 na 1 g půdy jsou označeny **9** (Čermák et al., 2008).

Streptomyces lincolnensis DSM 40355 (ATCC 25466). Typový kmen produkující linkomycin. Zdroj chromozomální DNA.

Streptomyces albus ATCC 39897. Typový kmen produkující porotramycin. Zdroj chromozomální DNA.

Escherichia coli JM109 (Stratagene)- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]. Tento kmen byl použit jako recipientní kmen pro transformaci kosmidy pLK6 a pPOR 4 (konstrukty odvozené od SuperCos 1 s vloženou částí sekvence příslušného biosyntetického shluku).

3.1.1.2. Použité kosmidy:

pLK6- kosmid odvozený od vektoru SuperCos 1. Konstrukt nese cca 40 000 pb dlouhý fragment chromozomální DNA *S. lincolnensis* DSM40355, který obsahuje úplnou sekvenci linkomycinového biosyntetického shluku.

pPOR4- kosmid odvozený od vektoru SuperCos 1. Konstrukt nese cca 35 000 pb dlouhý fragment chromozomální DNA *Streptomyces albus* ATCC 39897, který obsahuje velkou část sekvence porotramycinového biosyntetického shluku.

3.1.2. Kultivační média

ISP 2 médium + CaCO₃

| | |
|-------------------|------|
| glukóza | 4 g |
| kvasničný extrakt | 4 g |
| maltózový extrakt | 10 g |
| CaCO ₃ | 2 g |

destilovanou H₂O doplnit na objem 1000 ml

upravit pH na 7.2

ISP 2 agar + CaCO₃

| | |
|----------------------------------|---------|
| Agar | 15 g |
| ISP 2 médium + CaCO ₃ | 1000 ml |

LB médium pro kultivaci *E. coli*.

| | |
|-------------------|------|
| Trypton | 10 g |
| Kvasničný extrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |

destilovanou H₂O doplnit na objem 1000 ml a upravit pH na 7,5

LB agar

LB médium 1000 ml

Agar 15 g

Pro selekci transformantů *E. coli* nesoucích kosmid pLK6 nebo pPOR4 byla přidána antibiotika ampicilin (100 µg/ml) a kanamycin (50µg/ml).

3.1.3. Oligonukleotidy

Všechny oligonukleotidy dodala firma SIGMA- ALDRICH

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>

3.1.3.1. Oligonukleotidy použité při charakterizaci sbírky pomocí 16S rDNA (Sakai et al., 2004)

| | | |
|---|----|-----------------------------|
| 16Seu 27f | | 5'-AGAGTTTGATCMTGGCKCAG-3' |
| 16Seu783r ekvimolární mix složek a, b a c | a) | 5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG-3' |
| | b) | 5'-CTACCGGGGTATCTAATCCCG-3' |
| | c) | 5'-CTACCCGGGTATCTAATCCGG-3' |

3.1.3.2. Oligonukleotidy použité pro identifikaci přítomnosti genů kódujících A domény NRPS

| | | |
|--|----|---------------------------|
| UNI2f | | 5'-ACS GGI IIS CCS AAG-3' |
| UNIAf | | 5'-ACC GGS SIS CCC AAG-3' |
| UNIBf | | 5'-ACC GGS SIS CCG AAG-3' |
| UNI2r ekvimolární mix složek a a b | a) | 5'-GTC SCC SGT SCG GTA-3' |
| | b) | 5'-GTC SCC SGT SGC GTA-3' |

(I= inozin, S= báze C nebo G)

3.1.3.2.1. Proteiny, jejichž aminokyselinová sekvence byla použita při navrhování degenerovaných oligonukleotidů

Je uveden: název genového produktu (označení A domény)/GenBank přístupové číslo (pokud je dostupné)/ produkční organizmus/látka, která je A doménou aktivována (pokud je známa).

CouN4/AAG29789.1/*Streptomyces rishiriensis*/Pro

CloN4/AAN65233.1/*Streptomyces roseochromogenes*/Pro

LmbC/ABX00600.1/*Streptomyces lincolnensis*/PPL

NeoA/CAF33324.1/*Streptomyces fradiae*/derivát prolinu

Ccb2/ADB92576.1/*Streptomyces caelestis*/salicylát

CcbC/GQ912700/*Streptomyces caelestis*/Pro

VioA/AAP92491.1/*Streptomyces vinaceus*/Ser

VioO/AAP92505.1/*Streptomyces vinaceus*/Lys

VioF/AAP92496.1/*Streptomyces vinaceus*/diaminopropionát

Pyr8/ABO15844.1/*Streptomyces vitaminophilus*/Pro
Orf22/ABW71853.1/*Streptomyces refuineus*/derivát prolinu
BlmIV/AAG02364.1/*Streptomyces verticillus*/Cys
SnbDE(1)/CAA67249.1/*Streptomyces pristinaespiralis*/Pro
SnbDE(2)/CAA67249.1/*Streptomyces pristinaespiralis*/Phe
SnbC(1)/CAA67248.1/*Streptomyces pristinaespiralis*/Thr
SttM/CAB67712.1/*Streptomyces rochei*/beta Lys
RedM/CAA16182.1/*Streptomyces coelicolor*/Pro
AcmC(1)/AAF42473.1/*Streptomyces chrysomallus*/Pro
AcmC(2)/AAF42473.1/*Streptomyces chrysomallus*/Gly
LnmQ/AAN85530.1/*Streptomyces atroolivaceus*/
CouH/AAG29780.1/*Streptomyces rishiriensis*/
PlaP4/ABB69752.1/*Streptomyces* sp. Tu6071/Pro
SibD/ACN39727.1/*Streptosporangium sibiricum*/derivát prolinu
RphM/BAG84247.1/*Streptomyces griseoviridis*/Pro
BlmVII/AAG02358.1/*Streptomyces verticillus*/Thr
Por21/*HQ872605/*Streptomyces albus*/derivát prolinu
IdmJ/ACN69986.1/*Streptomyces antibioticus*/Pro
VinM/BAD08370.1/*Streptomyces halstedii*/3-metylAsp
TomB/ACN39015.1/*Streptomyses achromogenes*/derivát prolinu

***Sekvence Por21 je v naší laboratoři k dispozici. Byla poskytnuta do databáze, ale bude uvolněna zároveň s vydáním příslušné publikace**

3.1.4. Enzymy

3.1.4.1. DNA polymerázy

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| LA DNA polymeráza | (Top-Bio) |
| <i>Taq</i> purple DNA polymeráza | (Top-Bio) |
| One <i>Taq</i> DNA polymeráza | (NEB) |
| Supreme NZY <i>Taq</i> polymeráza | (NZYTech) |

3.1.4.2. Enzymy používané při izolaci a purifikaci chromozomální DNA

lysozym pracovní koncentrace= 10 mg/ml

3.1.5. Komerční soupravy

izolace chromozomální DNA- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

purifikace PCR reakce- QIAquick® PCR Purification Kit

purifikace plazmidové DNA- NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel)

standardy molekulových hmotností- 1kb PLUS DNA ladder (Gibco BRL)

Standard obsahuje 20 fragmentů od 100bp do 12000bp (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 a 12000)

3.1.6. Chemikálie, roztoky, pufry a gely

3.1.6.1. Použité chemikálie

| název chemikálie | dodavatel | zkratka |
|---|-------------------|-------------------|
| agaróza | Lonza | |
| ampicilin | Duchefa Biochemie | amp |
| Bacto agar | Difco | |
| betain | Sigma | |
| bromfenolová modř | Bio-rad | BPB |
| dimetylsulfoxid | Sigma | DMSO |
| dodecylsulfát sodný | Serva | SDS |
| etanol | Fagron | EtOH |
| etidumbromid | Sigma | EtBr |
| etylendiaminotetraoctová kyselina | Sigma | EDTA |
| glukóza | Penta | |
| glycerol | Merck | |
| hovězí sérový albumin | Top-Bio | BSA |
| chlorid hořečnatý | Top-Bio | MgCl ₂ |
| chlorid sodný | Top-Bio | NaCl |
| izopropanol | Lachema | |
| kanamycin | Amresco | kan |
| kvasinkový extrakt | Difco | |
| maltózový extrakt | Difco | |
| nonidet P-40 oktylfenoxypolyetoxyetanol | Amresco | nonidet |
| Tris (hydroxymetyl) aminometan | Serva | Tris |
| Trypton | Difco | |
| uhličitan vápenatý | Lachema | CaCO ₃ |
| 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfátová směs | Top-Bio | dNTP mix |

3.1.6.2 Chemické složení použitých pufřů

| | | |
|---------------------------------------|---|--------|
| TE ⁻¹ | 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA | pH 7,5 |
| TAE | 40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA | pH 8,0 |
| 10x vzorkový pufř (DNA elektroforéza) | 20% glycerol; 0,25% BPB; 1% SDS; 100 mM EDTA | pH 8,0 |

3.1.6.3. Složení použitých gelů pro analýzu DNA

1% agarózový gel pro horizontální elektroforézu v TAE- 1% agarózový gel s 1xTAE pufřem a přídavkem EtBr na konečnou koncentraci 0,005%.

3.1.7. Software

Programy:

Genious Pro 4.8.4 (Biomatters)

Artemis Release 12.0- (www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/)

Internet:

BLAST – Basic Local Alignment Search Tools (Altschul et al., 1997)-

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

GenBank®- www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

NORINE- (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>)

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace aktinomycet

Jednotlivé kmeny aktinomycet byly kultivovány na ISP 2 agaru s přidaným CaCO₃ při 28°C. Jelikož se jedná o pomalu rostoucí sporulující bakterie, trvala kultivace obvykle 6-7 dní.

Pro účely izolace chromozomální DNA byly kmeny inokulovány z ISP 2 agaru s přidaným CaCO₃ do prolamovaných 250ml Erlenmayerových baněk s 25ml ISP 2 média s CaCO₃. Kultivace probíhala na třepačce při 28°C a 200RPM 2-3dny. Narostlá kultura byla poté převedena do 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugována 15min. při 4500ot. /min. a teplotě 4°C. Pelet buněk byl rozdělen na alikvoty o objemu cca 100μl a uchováván při teplotě -20°C.

3.2.2. Izolace genomové DNA aktinomycet

Chromozomální DNA byla z buněk izolována pomocí komerční soupravy Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Jelikož se jedná o gramnegativní bakterie se silnou buněčnou stěnou, byl použit modifikovaný základní protokol:

- 1) Alikvot buněk (viz kapitola 3.2.1.) resuspendovat ve 480μl roztoku 50mM EDTA (pH 8.0).
- 2) K suspenzi přidat 120μl roztoku lysozymu (koncentrace 10mg/ml) a při 37°C kultivovat 1 hodinu.
- 3) Odstředit při 16000ot./min. 3min. a odstranit supernatant.
- 4) Pelet resuspendovat v 600μl *Nuclei lysis solution* a inkubovat 5min. při 80°C.
- 5) Zchladit na pokojovou teplotu, přidat 3μl *RNase Solution*, 3-5x převrátit a kultivovat 1hodinu při 37°C.

- 6) Po schlazení na pokojovou teplotu a přidání 200 μ l *Protein precipitation solution* 20 vteřin silně vortexovat a 5 min. inkubovat na ledu.
- 7) Centrifugovat při 16000 ot. /min. 3 min. a supernatant přenést do čisté 1,5 ml zkumavky a opět za stejných podmínek odstředit.
- 8) Supernatant přenést do nové sterilní zkumavky s 600 μ l izopropanolu, pomalým převrácením promíchat, stočit při 16000 ot. /min. 3 minuty a odstranit supernatant.
- 9) Pelet promýt 70% etanolem, centrifugovat při 16000 ot. /min. 3 minuty a odstranit supernatant.
- 10) Vysušit produkt za sníženého tlaku při 40°C po dobu 20-25 minut (dokud se veškerý etanol neodpaří).
- 11) Na závěr pelet resuspendovat ve 100 μ l *DNA Rehydration Solution*.

3.2.3. Transformace kompetentních buněk *E. coli* teplotním šokem

1. K alikvotu (100 μ l) zmražených kompetentních buněk byl přidán 1 μ l vzorku plazmidu o koncentraci 100 ng/ μ l kosmidové DNA a lehce promíchat.
2. Suspenzi inkubovat 20 - 25min. na ledu.
3. Poté vzorek ihned vystavit teplotě 42°C po dobu 1 min.
4. Zchladit na ledu po dobu 2min.
5. K buněčné suspenzi přidat 800 μ l LB média.
6. Vzorek kultivovat 1 hod. na třepačce při 37 °C a 200 rpm.
7. Buňky vysít na LB agar s přidaným ampicilinem (100 μ g/ml) a kanamycinem (50 μ l/ml).
8. Kultivovat přes noc při 37 °C.

3.2.4. Purifikace plazmidové DNA

Jedna kolonie byla zaočkována do 100ml LB média s přidavkem selekčních antibiotik. Kultura byla inkubována přes noc při 37°C a 200 RPM.

Před vlastní izolací byla kultura zchlazena 10min. v ledové lázni a buňky byly následně odděleny centrifugací 4500 ot. /min., 4°C, 15minut.

Pro izolaci a purifikaci kosmidové DNA byla použita komerční souprava NucleoBond® Xtra Midi/Maxi. Postup dle pokynů výrobce.

Kvalita izolace byla ověřena pomocí gelové elektroforézy a koncentrace kosmidové DNA byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.2.5. Polymerázová řetězová reakce

Všechny reakce probíhaly v objemu 50µl na přístroji TGradient Thermocycler 96 nebo T1 Thermocycler 96 (oba od Whatman Biometra). Metoda PCR byla využita jednak pro amplifikaci částí genů 16S r-DNA (taxonomická charakterizace sbírky půdních izolátů) a dále pro testování degenerovaných oligonukleotidů pro vyhledávání A-domén NRPS.

3.2.5.1. Polymerázová řetězová reakce- charakterizace sbírky aktinomycet

Při amplifikaci fragmentů 16 S r-DNA bylo použito dvou PCR protokolů s odlišnou přípravou reakční směsi. Primárně byla používána koloniová PCR. Do reakční směsi s přidavkem detergentu (Nonidet P 40, usnadňující rozrušení buněčné stěny) bylo přeneseno pomocí ostré strany sterilního dřevěného párátko nepatrné množství buněk z okraje kolonie rostoucí na pevné půdě (koloniová PCR). První krok protokolu (denaturace) je prodloužen na 10 min., aby byly narušeny buněčné obaly a DNA byla přístupná pro polymerázu.

Pokud pomocí koloniové PCR nebyl příslušný fragment genu amplifikován v dostatečném množství, byla jako templát použita chromozomální DNA izolovaná pomocí komerční soupravy.

Oligonukleotidy použité jako primery jsou uvedeny v podkapitole 3.1.3.1..

1) složení reakční směsi a protokol pro koloniovou PCR:

V tabulce je uvedeno složení reakční směsi pro dvě různé DNA polymerázy. V průběhu prací byly používány střídavě oba enzymy dle aktuální dostupnosti. Výběr enzymu v tomto případě neměl vliv na výsledek reakce.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro koloniovou PCR.

| | pro Taq purple DNA polymerázu | pro LA DNA polymerázu |
|------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 10x reakční pufr | 5 μ l | 5 μ l |
| 25mM MgCl₂ | 3 μ l | 3 μ l |
| DMSO pro PCR | 2,5 μ l | 2,5 μ l |
| 100xBSA | 3 μ l | 3 μ l |
| 10mM DNTPs | 1 μ l | 1 μ l |
| 10pM f primer | 2 μ l | 2 μ l |
| 10pM r primer | 2 μ l | 2 μ l |
| H₂O | 30,5 μ l | 30,5 μ l |
| NONIDET | 0,5 μ l | 0,5 μ l |

Tabulka 6: Protokol pro koloniovou PCR

| pro Taq purple DNA polymerázu | pro LA DNA polymerázu | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 94°C | 94°C | 10 min. |
| 72°C | 68°C | přidání 0,5 µl polymerázy |
| 94°C | 94°C | 1min. |
| 57°C | 57°C | 45s |
| 72°C | 68°C | 1min. 30s |
| 72°C | 68°C | 5min. |

2) Protokol pro standardní PCR a složení reakční směsi:**Tabulka 8: Složení reakční směsi pro PCR.**

| | pro Taq purple DNA polymerázu | pro LA polymerázu |
|------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 10x reakční pufr | 5 µl | 5 µl |
| 25mM MgCl ₂ | 3 µl | 3 µl |
| DMSO pro PCR | 2,5 µl | 2,5 µl |
| 100xBSA | 3 µl | 3 µl |
| 10mM DNTPs | 1 µl | 1 µl |
| 10pM primer Fwd | 2 µl | 2 µl |
| 10pM primer Rev | 2 µl | 2 µl |
| H ₂ O | 30 µl | 30 µl |
| templátová DNA | 1 µl | 1 µl |

Tabulka 9: Protokol pro PCR.

| pro Taq purple DNA polymerázu | pro LA DNA polymerázu | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 94°C | 94°C | 1min. |
| 72°C | 68°C | přidání 0,5 µl polymerázy |
| 94°C | 94°C | 1min. |
| 57°C | 57°C | 45s |
| 72°C | 68°C | 1min. 30s |
| 72°C | 68°C | 5min. |

3.2.5.2. Polymerázová řetězová reakce- identifikace adenylačních (A) domén NRPS

Metoda PCR byla využita i pro ověření specifity degenerovaných oligonukleotidů, navržených pro identifikaci přítomnosti A-domén NRPS ve sbírce kmenů aktinomycet. Jako templát byla použita jednak DNA izolovaná z modelových kmenů *S. lincolnensis* (obsahuje gen *lmbC*- A-doména NDLS rozpoznávající derivát prolinu - PPL) a *S. albus* (obsahuje gen *por21*-A doména kondenzačního enzymu rozpoznávající derivát prolinu), a také geny pro

A-domény NRPS ve formě purifikovaného PCR produktu (kompletní gen *lmbC* poskytnutý S. Kadlíkem) nebo jako součást kosmidu (LK6- obsahuje sekvenci *lmbC* a POR4- obsahující sekvenci *por21*).

Základní protokol PCR reakce byl modifikován za účelem dosažení optimální specifity primerů a zvýšení výtěžku reakce. Modifikovanými parametry byly: teplota nasedání primerů a čas polymerace. Dále byla testována různá aditiva (BSA vs betain) a kromě běžně používané Taq purple DNA polymerázy (Top-Bio), byly testovány také One Taq DNA polymeráza (NEB) a Supreme NZYTaq polymeráza (NZYTech). Tyto dvě DNA polymerázy jsou podle údajů výrobce schopné amplifikovat fragmenty z obtížných a GC bohatých oblastí.

Tabulka 9: Složení reakční směsi s BSA.

| | pro Taq purple polymerázu a Supreme NZYTaq polymerázu | pro One Taq polymerázu |
|---|--|--|
| 10x reakční pufr (5x GCreakční pufr pro One Taq pol.) | 5 μ l | 5 μ l (10 μ l + 7,5 μ l One Taq GC enhancer) |
| 25mM MgCl ₂ | 3 μ l | 3 μ l |
| DMSO pro PCR | 2,5 μ l | 2,5 μ l |
| 100xBSA | 3 μ l | 3 μ l |
| 10mM DNTPs | 1 μ l | 1 μ l |
| 10pM primer Fwd | 2 μ l | 2 μ l |
| 10pM primer Rev | 2 μ l | 2 μ l |
| H ₂ O | 30 μ l | 30 μ l (13,5 μ l) |
| templátová DNA | 1 μ l | 1 μ l |

Tab 10: Složení reakční směsi s 2,6 M roztokem betainu.

| | |
|------------------------|-------------|
| 10x reakční pufr | 5 μ l |
| 25mM MgCl ₂ | 3 μ l |
| DMSO pro PCR | 2,5 μ l |
| Betain | 25 μ l |
| 10mM DNTPs | 1 μ l |
| 10pM primer Fwd | 2 μ l |
| 10pM primer Rev | 2 μ l |
| H ₂ O | 8 μ l |
| templátová DNA | 1 μ l |

Tabulka 11: Protokol pro PCR

| pro Taq purple DNA polymerázu a NZYTaq polymerázu | pro One Taq polymerázu | |
|---|---|---------------------------|
| 94°C | 94°C | 1min. |
| 72°C | 68°C | přidání 0,5 µl polymerázy |
| 94°C | 94°C | 1min. |
| (gradient v rozmezí 40-60°C, pro vyhledání vhodné teploty nasedání primerů) | (gradient v rozmezí 40-60°C, pro vyhledání vhodné teploty nasedání primerů) | 45s |
| 72°C | 68°C | 20s |
| 72°C | 68°C | 5min. |

3.2.4. Navrhování degenerovaných oligonukleotidů

Degenerované oligonukleotidy použité pro PCR amplifikace specifických fragmentů genů kódujících A-domény NRPS byly navrženy na základě porovnání aminokyselinových sekvencí konzervovaných míst vybraných adenylačních enzymů, které jsou součástí NRPS. Tyto enzymy jsou uvedeny v podkapitole 3.1.3.2.1. Aktinomycety mají GC bohatý genom, proto se při navrhování oligonukleotidů využívá toho, že na třetí pozici kodónu se s velkou pravděpodobností vyskytuje guanin nebo cytosin. Tento fakt umožňuje při navrhování primerů využívat aminokyselin kódovaných více kodóny, jako by byly kódovány jen těmi, které končí C či G. Pro navrhování degenerovaných primerů jsou vhodná konzervovaná místa s výskytem aminokyselin kódovaných jedním kodónem (Met, Trp) a dvěma (v případě Ile třemi) kodóny (viz. Tab. 12), protože můžeme pracovat jen s tripletem končícím C nebo G. Díky dostupnosti sekvencí z genomových programů bylo navíc možné stanovit procentuální využití jednotlivých kodonů pro geny sekundárního metabolismu u vybraných streptomycet (program ARTEMIS). I k tomuto údaji bylo při navrhování primerů přihlédnuto.

Sekvence konzervovaných míst musejí být navíc dostatečně dlouhé a ve vhodné vzdálenosti od sebe. Velmi se tak omezuje výběr a často je při navrhování oligonukleotidů

nutné využít i ne zcela ideální oblasti, což vede k zavádění degenerací. V místech, kde byla příliš velká variabilita bazí, byl zařazen inozin, který se všemi nukleotidy tvoří vazbu.

Tabulka 12: Genetický kód

| | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A | R | N | D | C | Q | E | G | H | I |
| | Ala | Arg | Asn | Asp | Cys | Gln | Glu | Gly | His | Ile |
| 5' | GCA | CGA | AAC | GAC | UGC | CAA | GAA | GGA | CAC | AUA |
| | C | C | U | U | U | G | G | C | U | C |
| | G | G | | | | | | G | | U |
| | U | U | | | | | | U | | |
| | | | | | | | | | | |
| | L | K | M | F | P | S | T | W | Y | V |
| | Leu | Lys | Met | Phe | Pro | Ser | Thr | Trp | Tyr | Val |
| | CUA | AAA | AUG | UUC | CCA | UCA | ACA | UGG | UAC | GUA |
| | C | G | | U | C | C | C | | U | C |
| | G | | | | G | G | G | | | G |
| | U | | | | U | U | U | | | U |
| | | | | | | | | | | |
| | UUA | | | | | AGC | | | | |
| | G | | | | | U | | | | |

F primer **UNI2f** byl navržen z aminokyselinové sekvence TGXPK, která je součástí sekvence ATP vazebného místa. (X je označena pozice, kde je příliš velká variabilita aminokyselin). Výsledná sekvence nukleotidů byla:

5'ACS GGI IIS CCS AAG 3' (I= inozin, S= báze C nebo G)

Primery **UNIAf** a **UNIBf** byly navrženy jako alternativa k UNI2f. Bylo využito přímo nukleotidových sekvencí částí genů (Tab. 13), které kódují konzervovanou oblast vybraných enzymů. Červeně označeny jsou thyminové báze, které byly při navrhování záměrně opomenuty. Zeleně označené jsou adeninové báze, které mohou být v primeru nahrazeny guaninem, který je schopen částečně párovat s thyminem.

Tabulka 13: Nukleotidové sekvence využité pro návrh primerů UNIAf aUNIBf.

| | | triplet určující příslušnou aminokyselinu | | | | |
|---|------------------|---|------------|------------|------------|------------|
| | | T | G | X | P | K |
| části genů, které kódují konzervovanou oblast, ze které byl navržen UN12f | <i>lmb C</i> | ACC | GGC | GTT | CCC | AAG |
| | <i>tom B</i> | ACC | GGC | GCC | CCC | AAG |
| | <i>vin M</i> | ACC | GGG | CGG | CCC | AAG |
| | <i>cou H</i> | ACC | GGG | CGG | CCC | AAG |
| | <i>orf 22</i> | ACC | GGG | CGC | CCC | AAG |
| | <i>blm VII</i> | ACC | GGC | GGC | CCC | AAG |
| | <i>blm IV</i> | ACC | GGC | ACC | CCC | AAG |
| | <i>sib D</i> | ACC | GGC | CGC | CCC | AAG |
| | <i>clo N</i> | ACC | GGG | ACA | CCC | AAG |
| | <i>lmb Q</i> | ACC | GGC | CGC | CCC | AAG |
| | <i>ccb C</i> | ACC | GGA | GTG | CCC | AAG |
| | <i>pyr 8</i> | ACC | GGG | GAC | CCG | AAG |
| | <i>idm J</i> | ACC | GGT | GCT | CCC | AAA |
| | <i>pla P4</i> | ACA | GGC | ACG | CCG | AAA |
| | <i>red M</i> | ACC | GGC | ACG | CCC | AAG |
| | <i>rph M</i> | ACC | GGC | GTG | CCC | AAG |
| | <i>acm C(2)</i> | ACC | GGC | CGG | CCC | AAG |
| | <i>acm C(1)</i> | ACC | GGC | GTG | CCC | AAG |
| | <i>snb DE(1)</i> | ACC | GGC | ACC | CCC | AAG |
| | <i>snb C(1)</i> | ACC | GGC | CGC | CCC | AAG |
| | UNIAf | ACC | GGG | SIS | CCC | AAG |
| | UNIBf | ACC | GGG | SIS | CCG | AAG |

R primery **UN12r a** a **b** byly navrženy z aminokyselinové sekvence Y (R/A)TGD.
 ((R/A) pozice, kde je zastoupení R a A na přibližně stejné úrovni)

kódující sekvence: a) 5'TAC CGS ACS GGS GAC 3'
b) 5'TAC GCS ACS GGS GAC 3'

komplementární sekvence: **5'GTC SCC SGT SCG GTA3' (UNI2r a)**
5'GTC SCC SGT SGC GTA3' (UNI2 r b)

UNI2r a je navržen ze sekvence YRTGD a **UNI2r b** je vytvořen podle sekvence YATGD.

Specifita primerů byla ověřena amplifikací příslušných fragmentů genů pro A-domény z DNA vybraných kontrolních templátů.

3.2.5. Elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforetická analýza DNA byla prováděna v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Pro zviditelnění DNA pod UV lampou byla DNA barvena etidiumbromidem. Před nanesením na gel byl ke každému vzorku přidán 10x vzorkový pufr v poměru 1:9. Jednotlivé fragmenty byly od sebe na gelu separovány při konstantním napětí 3-5 V/cm.

3.2.6. Sekvenování DNA

Sekvenování fragmentů DNA bylo prováděno Sangerovou metodou společností MACROGEN Inc. Korea a v laboratoři Dr. J. Felsberga (MBÚ AV ČR). Fragment DNA byl v případě potřeby purifikován z PCR reakce pomocí komerčního kitu QIAquick® PCR Purification Kit.

3.2.7. Analýza sekvencí DNA

Vzájemným porovnáním získaných sekvencí úseků 16 S r-DNA jednotlivých izolátů jsou identifikovány jednotlivé skupiny kmenů. Pro určení duplicitních kmenů byla tato metoda doplněna o porovnání morfologických znaků kolonií izolátů v rámci určených skupin. Všechny získané sekvence byly také porovnány s dostupnými geny v genomových databázích pomocí programu BLAST, což umožnilo taxonomické zařazení každého izolátu alespoň na úroveň rodu.

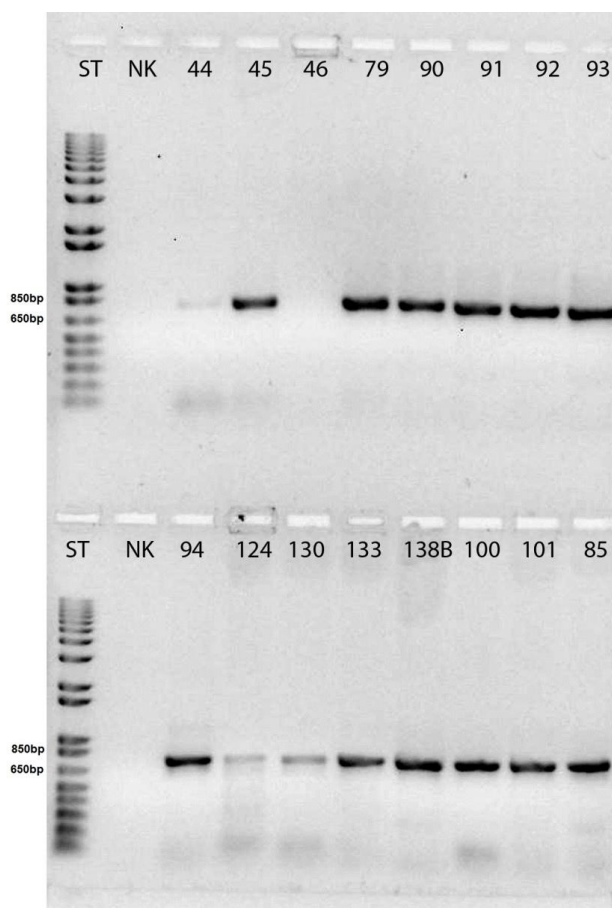
Analýza sekvencí 16 S r-DNA byla prováděna pomocí programu Genious Pro 4.8.4. Jednotlivé DNA sekvence v **.ab1** formátu byly porovnány tak, aby minimální překryv byl 300 nukleotidů a identita překryvu byla 100 %. Poté byly jednotlivé skupiny sekvencí ještě překontrolovány manuálně.

4. Výsledky

4.1. Uspořádání a charakterizace sbírky izolátů půdních aktinomycet

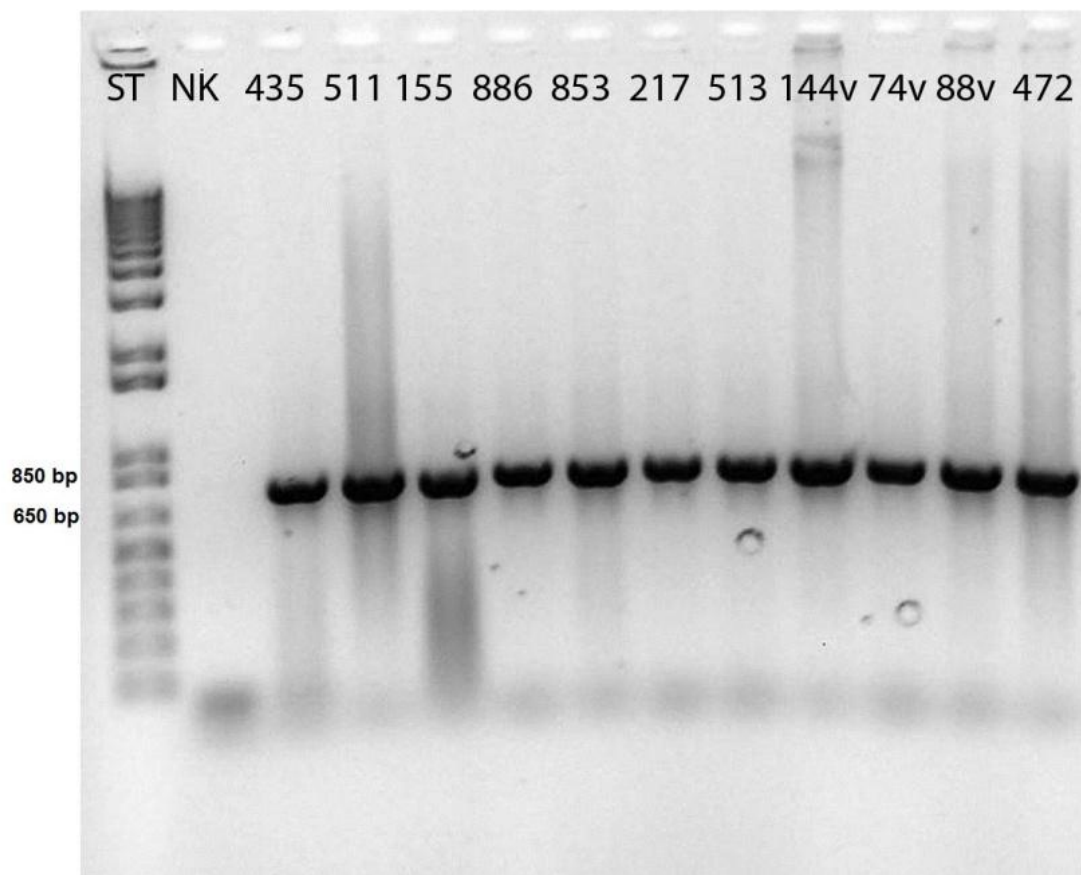
Nejdříve bylo nutno charakterizovat a roztrždit sbírku půdních aktinomycet. K vyloučení duplicitních izolátů byly využity sekvence fragmentů genů 16 S r-DNA amplifikovaných pomocí PCR z primerů 16 Seu27f a 16 Seu783r (a, b a c) (pro ilustraci Obr. 11 a 12).

Obrázek 11: Amplifikované fragmenty genů pro 16S r-RNA metodou koloniové PCR ze sbírkových izolátů.



ST= standard (1kb PLUS DNA ladder), NK= negativní kontrola. Velikost fragmentů 16S r-DNA odpovídá očekávané velikosti cca 750bp. Bylo naneseno 5 μ l standardu a vzorky obsahující 5 μ l PCR reakce a odpovídající množství nanášecího pufu.

Obrázek 12: Amplifikované fragmenty genů pro 16S r-RNA metodou klasické PCR ze vzorků chromozomálních DNA sbírkových izolátů.



ST= standard (1kb PLUS DNA ladder), NK= negativní kontrola. Velikost fragmentů 16 S r-DNA odpovídá očekávané velikosti cca 750bp. Bylo naneseno 5 μ l standardu a vzorky obsahující 5 μ l PCR reakce a odpovídající množství nanášecího pufru.

Jednotlivé sekvence byly mezi sebou porovnány a na základě identity rozříděny do skupin. Z celkového počtu 538 získaných sekvencí bylo 241 (Tab. 14A) samostatných, tj. ve sbírce nebyly nalezeny jiné identické sekvence, a 297 (Tab. 14B) bylo rozděleno na základě shody do 52 skupin.

V dalším kroku byly sekvence pomocí programu BLAST porovnány s internetovými genovými databázemi, a tak byl u každého izolátu taxonomicky určen rod. Ve sbírce převažoval rod *Streptomyces*, dále byly nalezeny aktinomycetální rody *Nocardia* (4x), *Nocardioides* (1x), *Rhodococcus* (2x), *Promicromonospora* (2x), *Kribbella* (4x) a *Amycolatopsis* (1x). Byly také identifikovány 3 rody proteobakterií: *Variovorax* (1x), *Methylobacterium* (1x) a *Tetrathiobacter* (1x). Jeden izolát patřil k rodu *Staphylococcus* a jeden k rodu *Bacillus*.

Tabulka 14A: Unikátní kmeny. Rody jsou pro přehlednost barevně odlišeny: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Kribbella*, *Nocardioides*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Amycolatopsis*, *Tetrathioabacter*.

| | | | | | |
|------|-----------------------------|-------|------------------------------|-------|-------------------------|
| 3 | <i>Streptomyces sp.</i> | 81v | <i>Streptomyces sp.</i> | 189 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 7 | <i>Streptomyces sp.</i> | 83 | <i>Streptomyces sp.</i> | 191 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 8 | <i>Streptomyces sp.</i> | 83v | <i>Streptomyces sp.</i> | 197 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 11 | <i>Streptomyces sp.</i> | 85b | <i>Streptomyces sp.</i> | 201 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 14 | <i>Streptomyces sp.</i> | 86v | <i>Streptomyces sp.</i> | 211 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 16 | <i>Streptomyces sp.</i> | 87 | <i>Streptomyces sp.</i> | 217 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 18 | <i>Streptomyces sp.</i> | 88 | <i>Streptomyces sp.</i> | 217a | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 19 | <i>Streptomyces sp.</i> | 88v | <i>Streptomyces sp.</i> | 219 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 20 | <i>Kribbella sp.</i> | 90 | <i>Streptomyces sp.</i> | 220 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 22 | <i>Streptomyces sp.</i> | 92 | <i>Nocardia sp.</i> | 221 | <i>Kribbella sp.</i> |
| 22v | <i>Streptomyces sp.</i> | 95 | <i>Streptomyces sp.</i> | 222 | <i>Kribbella sp.</i> |
| 23 | <i>Methylobacterium sp.</i> | 97v | <i>Streptomyces sp.</i> | 225 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 24 | <i>Streptomyces sp.</i> | 98 | <i>Streptomyces sp.</i> | 226 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 26v | <i>Streptomyces sp.</i> | 99 | <i>Streptomyces sp.</i> | 229 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 27 | <i>Streptomyces sp.</i> | 101va | <i>Streptomyces sp.</i> | 231 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 28 | <i>Streptomyces sp.</i> | 109v | <i>Bacillus sp.</i> | 232 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 32 | <i>Streptomyces sp.</i> | 110 | <i>Streptomyces sp.</i> | 237 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 32b | <i>Streptomyces sp.</i> | 111 | <i>Streptomyces sp.</i> | 238 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 35 | <i>Variovorax sp.</i> | 112 | <i>Streptomyces sp.</i> | 239 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 37 | <i>Streptomyces sp.</i> | 119 | <i>Streptomyces sp.</i> | 240 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 40 | <i>Streptomyces sp.</i> | 121b | <i>Streptomyces sp.</i> | 243 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 42 | <i>Streptomyces sp.</i> | 133 | <i>Streptomyces sp.</i> | 244 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 43 | <i>Streptomyces sp.</i> | 133v | <i>Streptomyces sp.</i> | 248 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 45 | <i>Streptomyces sp.</i> | 136 | <i>Streptomyces sp.</i> | 256 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 46v | <i>Streptomyces sp.</i> | 137b | <i>Promicromonospora sp.</i> | 261 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 51 | <i>Streptomyces sp.</i> | 138B | <i>Streptomyces sp.</i> | 265b | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 50v | <i>Streptomyces sp.</i> | 141b | <i>Streptomyces sp.</i> | 266 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 53 | <i>Streptomyces sp.</i> | 141v | <i>Streptomyces sp.</i> | 269b | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 53v | <i>Streptomyces sp.</i> | 142 | <i>Streptomyces sp.</i> | 271 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 56va | <i>Streptomyces sp.</i> | 142v | <i>Streptomyces sp.</i> | 273 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 57v | <i>Streptomyces sp.</i> | 143 | <i>Streptomyces sp.</i> | 279 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 58 | <i>Streptomyces sp.</i> | 145 | <i>Streptomyces sp.</i> | 280 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 61 | <i>Streptomyces sp.</i> | 149 | <i>Streptomyces sp.</i> | 281 | <i>Rhodococcus sp.</i> |
| 64va | <i>Amycolatopsis sp.</i> | 150 | <i>Streptomyces sp.</i> | 285 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 70 | <i>Streptomyces sp.</i> | 153 | <i>Streptomyces sp.</i> | 290 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 73v | <i>Streptomyces sp.</i> | 154 | <i>Streptomyces sp.</i> | 300 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 74v | <i>Streptomyces sp.</i> | 155 | <i>Streptomyces sp.</i> | 302 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 78 | <i>Streptomyces sp.</i> | 156v | <i>Streptomyces sp.</i> | 310 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 78v | <i>Streptomyces sp.</i> | 159 | <i>Streptomyces sp.</i> | 314 | <i>Kribbella sp.</i> |
| 79 | <i>Streptomyces sp.</i> | 160 | <i>Streptomyces sp.</i> | 326B2 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 80 | <i>Streptomyces sp.</i> | 165v | <i>Streptomyces sp.</i> | 328 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 80v | <i>Streptomyces sp.</i> | 170 | <i>Promicromonospora sp.</i> | 331 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 81 | <i>Streptomyces sp.</i> | 173 | <i>Streptomyces sp.</i> | 332 | <i>Streptomyces sp.</i> |

| | | | | | |
|------|---------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------------------|
| 333 | <i>Streptomyces sp.</i> | 474 | <i>Streptomyces sp.</i> | 880 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 335 | <i>Streptomyces sp.</i> | 492 | <i>Nocardia sp.</i> | 882 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 338 | <i>Streptomyces sp.</i> | 493 | <i>Streptomyces sp.</i> | 886 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 349a | <i>Streptomyces sp.</i> | 495 | <i>Streptomyces sp.</i> | 888 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 352 | <i>Streptomyces sp.</i> | 496 | <i>Streptomyces sp.</i> | 900 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 353 | <i>Streptomyces sp.</i> | 500 | <i>Streptomyces sp.</i> | 901 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 356 | <i>Streptomyces sp.</i> | 502 | <i>Streptomyces sp.</i> | 903 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 357 | <i>Streptomyces sp.</i> | 503 | <i>Streptomyces sp.</i> | 905 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 359 | <i>Streptomyces sp.</i> | 504 | <i>Streptomyces sp.</i> | 906 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 366 | <i>Streptomyces sp.</i> | 506 | <i>Streptomyces sp.</i> | 915 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 367 | <i>Streptomyces sp.</i> | 511 | <i>Streptomyces sp.</i> | 916 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 368 | <i>Streptomyces sp.</i> | 513 | <i>Streptomyces sp.</i> | 920 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 375 | <i>Streptomyces sp.</i> | 515 | <i>Streptomyces sp.</i> | 926 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 384a | <i>Streptomyces sp.</i> | 518 | <i>Streptomyces sp.</i> | 927 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 387a | <i>Nocardioides sp.</i> | 524 | <i>Streptomyces sp.</i> | 928 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 390 | <i>Streptomyces sp.</i> | 525 | <i>Streptomyces sp.</i> | 929 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 392 | <i>Streptomyces sp.</i> | 527 | <i>Streptomyces sp.</i> | 932 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 393 | <i>Streptomyces sp.</i> | 528 | <i>Streptomyces sp.</i> | 933 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 398 | <i>Streptomyces sp.</i> | 529 | <i>Streptomyces sp.</i> | 934 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 401 | <i>Streptomyces sp.</i> | 533 | <i>Streptomyces sp.</i> | 935 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 401 | <i>Streptomyces sp.</i> | 534 | <i>Streptomyces sp.</i> | 937 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 402 | <i>Rhodococcus sp.</i> | 536 | <i>Streptomyces sp.</i> | 940 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 405 | <i>Streptomyces sp.</i> | 538 | <i>Streptomyces sp.</i> | 941 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 406b | <i>Streptomyces sp.</i> | 539 | <i>Streptomyces sp.</i> | 942 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 409 | <i>Streptomyces sp.</i> | 812 | <i>Streptomyces sp.</i> | 945 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 411 | <i>Streptomyces sp.</i> | 815 | <i>Streptomyces sp.</i> | 946 | <i>Streptomyces sp.</i> |
| 413 | <i>Streptomyces sp.</i> | 823 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 420 | <i>Streptomyces sp.</i> | 829 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 422 | <i>Streptomyces sp.</i> | 832 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 427 | <i>Streptomyces sp.</i> | 834 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 431a | <i>Streptomyces sp.</i> | 838 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 434 | <i>Staphylococcus sp.</i> | 840 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 435 | <i>Streptomyces sp.</i> | 841 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 437 | <i>Streptomyces sp.</i> | 844 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 442 | <i>Streptomyces sp.</i> | 846 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 444 | <i>Streptomyces sp.</i> | 853 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 446 | <i>Streptomyces sp.</i> | 856 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 449 | <i>Streptomyces sp.</i> | 867 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 450 | <i>Streptomyces sp.</i> | 870 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 453 | <i>Nocardia sp.</i> | 871 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 457 | <i>Streptomyces sp.</i> | 876 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 458 | <i>Streptomyces sp.</i> | 877 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |
| 472 | <i>Streptomyces sp.</i> | 878 | <i>Streptomyces sp.</i> | | |

Tabulka 14B: Izoláty, které byly rozděleny do skupin podle identity sekvence fragmentu 16 S r-DNA.

| skupina 1 | | | skupina 5 | | | 23v | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
|-----------|-------------------------|-----|-----------|-------------------------|-----|------|-------------------------|-----|
| 1 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | 55v | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 40v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 118 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 104v | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 41v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 148 | <i>Streptomyces sp.</i> | OBL | 118v | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 42v | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 805 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 131 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 43v | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 825 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 131v | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 44v | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 826 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 138v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 57 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 837 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 147v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 60 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 852 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 148v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 63 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 925 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 154v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 65 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| skupina 2 | | | 157 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 66 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 10 | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 157v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 67 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 12 | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 313 | <i>Streptomyces sp.</i> | L | 68 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 86 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | 318b | <i>Streptomyces sp.</i> | L | 71 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 94 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | 339 | <i>Streptomyces sp.</i> | L | 76a | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 |
| 109 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 473 | <i>Streptomyces sp.</i> | L | 76b | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 |
| 817 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | skupina 6 | | | 84v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 |
| 887 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 2 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 108 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 887a | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 5v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 120 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 891 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 33b | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | 121 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 908 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 38 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 122 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 938 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 105v | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 180 | <i>Streptomyces sp.</i> | P |
| skupina 3 | | | 107 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 181 | <i>Streptomyces sp.</i> | P |
| 52 | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 168 | <i>Streptomyces sp.</i> | R | 241 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 54v | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 168v | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 | 241a | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 56v | <i>Streptomyces sp.</i> | L2 | 294 | <i>Streptomyces sp.</i> | S | 242 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 63v | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 305 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 246 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 67v | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 306 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 247 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 96vb | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 340 | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 249 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 100 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 347 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 251 | <i>Streptomyces sp.</i> | O7 |
| 101 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 532 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV | 251a | <i>Streptomyces sp.</i> | O7 |
| 105 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 830 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 257 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 114 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 859 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 258 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 150v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | skupina 7 | | | 260 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 276 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 106 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 262 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 284 | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 818 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 263 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 321 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | skupina 8 | | | 264 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 |
| 423 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 2v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 265a | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 |
| skupina 4 | | | 4v | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | 355 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 37v | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | 6v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 358 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 44 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 8v | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | 364 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 102 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 12b | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 365 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 137 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 17v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 369 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |

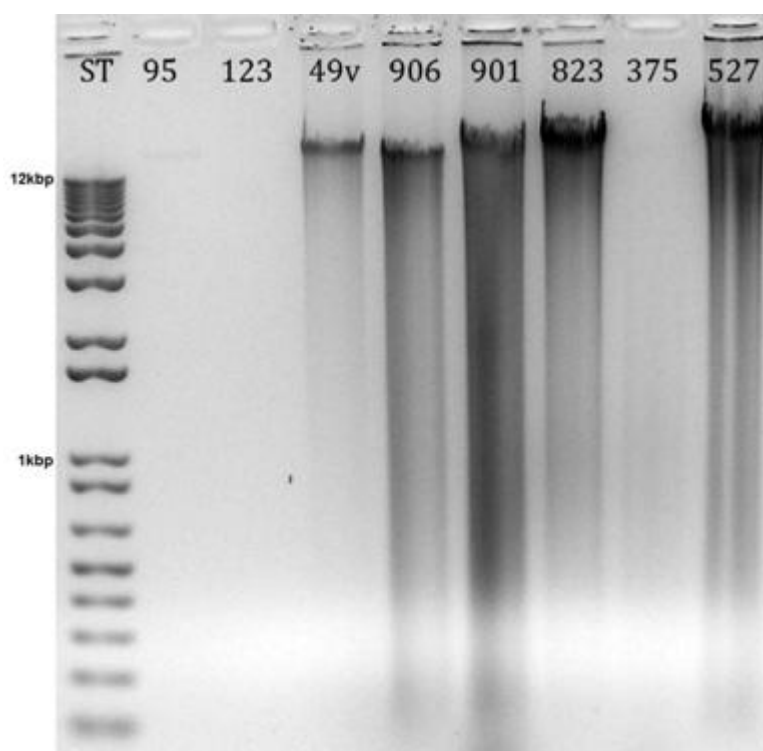
| | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------|-----|-------------------|-------------------------|-----|-------------------|-------------------------|-----|
| 370 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 | 146v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | <u>skupina 20</u> | | |
| 371 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 | 346 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 34 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 376 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | 455b | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 153v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 |
| 377 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | <u>skupina 12</u> | | | 341 | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 |
| 379 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | 93 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | <u>skupina 21</u> | | |
| 380 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | 117v | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 160v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 |
| 381 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | <u>skupina 13</u> | | | 166 | <i>Streptomyces sp.</i> | R |
| 382a | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 123 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | <u>skupina 22</u> | | |
| 399 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | 288 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 99v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 |
| 415 | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | <u>skupina 14</u> | | | 159v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 |
| 421 | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | 18 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | <u>skupina 23</u> | | |
| 430 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 125 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 171 | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 |
| 432 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | <u>skupina 15</u> | | | 174 | <i>Streptomyces sp.</i> | R |
| 433 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 130 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 209 | <i>Streptomyces sp.</i> | N |
| 439 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 98v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 233 | <i>Streptomyces sp.</i> | O |
| 440 | <i>Streptomyces sp.</i> | O7 | 166v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | <u>skupina 24</u> | | |
| 441 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 | 349c | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 87v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 |
| 445 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | <u>skupina 16</u> | | | 169v | <i>Streptomyces sp.</i> | L11 |
| 451 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | 138 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 316 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 |
| 460 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 813 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 317 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 |
| 461 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 824 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 455a | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 |
| <u>skupina 9</u> | | | 842 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | <u>skupina 25</u> | | |
| 6 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 843 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 426 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 |
| 17 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 873 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 463 | <i>Streptomyces sp.</i> | O5 |
| 33a | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | 912 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 19v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 33b | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | <u>skupina 17</u> | | | 69v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 |
| 113 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 466 | <i>Streptomyces sp.</i> | L1 | <u>skupina 26</u> | | |
| 129 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 140v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 9 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 801 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 151v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 196 | <i>Streptomyces sp.</i> | M8 |
| 849 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | <u>skupina 18</u> | | | 205 | <i>Streptomyces sp.</i> | M8 |
| 851 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 140 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | 205b | <i>Streptomyces sp.</i> | M8 |
| 931 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 216 | <i>Streptomyces sp.</i> | N | <u>skupina 27</u> | | |
| 944 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 234 | <i>Streptomyces sp.</i> | MEL | 190 | <i>Streptomyces sp.</i> | D |
| <u>skupina 10</u> | | | 289 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 192 | <i>Streptomyces sp.</i> | D |
| 115 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 301 | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 208 | <i>Streptomyces sp.</i> | M8 |
| 286 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 330 | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 517 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| 287 | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 378 | <i>Streptomyces sp.</i> | O9 | <u>skupina 28</u> | | |
| 861 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 917 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 89 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT |
| 864 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | <u>skupina 19</u> | | | 91 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT |
| 919 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | 95v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | <u>skupina 29</u> | | |
| <u>skupina 11</u> | | | 143v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 215 | <i>Streptomyces sp.</i> | N |
| 116 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 162v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 407 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 |
| 68v | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | | | | 48v | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 |

| | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----|-------------------|-------------------------|-----|
| <u>skupina 30</u> | | | <u>skupina 42</u> | | |
| 204 | <i>Streptomyces sp.</i> | M8 | 508 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| 803 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | 530 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| 850 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | <u>skupina 43</u> | | |
| <u>skupina 31</u> | | | 523 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| 363 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 526 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| 382 | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | <u>skupina 44</u> | | |
| 21v | <i>Streptomyces sp.</i> | O7 | 5 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| <u>skupina 32</u> | | | 930 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 283 | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | <u>skupina 45</u> | | |
| 326a | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 | 519 | <i>Streptomyces sp.</i> | DEV |
| <u>skupina 33</u> | | | 831 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 272 | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | <u>skupina 46</u> | | |
| 429 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | 806 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| <u>skupina 34</u> | | | 848 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 30 | <i>Streptomyces sp.</i> | KOT | <u>skupina 47</u> | | |
| 93v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 82 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 94v | <i>Streptomyces sp.</i> | L9 | 804a | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| <u>skupina 35</u> | | | 804b | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 318a | <i>Streptomyces sp.</i> | L4 | 814 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 86v | <i>Streptomyces sp.</i> | L7 | 909 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| <u>skupina 36</u> | | | 914 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 45v | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 939 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 62v | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 | 943 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 400 | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | <u>skupina 48</u> | | |
| <u>skupina 37</u> | | | 79 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 49v | <i>Streptomyces sp.</i> | O1 | 875 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 77a | <i>Streptomyces sp.</i> | O11 | <u>skupina 49</u> | | |
| 431b | <i>Streptomyces sp.</i> | O3 | 904 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| <u>skupina 38</u> | | | 907 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER |
| 494 | <i>Streptomyces sp.</i> | ZAK | <u>skupina 50</u> | | |
| 497 | <i>Streptomyces sp.</i> | ZAK | 890 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| <u>skupina 39</u> | | | 892 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 512a | <i>Nocardia sp.</i> | DEV | 874 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA |
| 512b | <i>Nocardia sp.</i> | DEV | <u>skupina 51</u> | | |
| 512c | <i>Nocardia sp.</i> | DEV | 144v | <i>Streptomyces sp.</i> | L5 |
| <u>skupina 40</u> | | | 323b | <i>Streptomyces sp.</i> | L3 |
| 903 | <i>Streptomyces sp.</i> | MER | | | |
| 923 | <i>Streptomyces sp.</i> | STA | | | |
| <u>skupina 41</u> | | | | | |
| 47v | <i>Tetrathlobacter sp.</i> | O11 | | | |
| 522 | <i>Tetrathlobacter sp.</i> | DEV | | | |

4.2. Izolace chromozomální DNA vybraných kmenů.

Chromozomální DNA byla izolována z 234 kmenů (Tab. 15). Míra fragmentace a přibližná koncentrace vzorku DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu (pro ilustraci Obr. 13).

Obrázek 13: Přibližná koncentrace a kvalita vzorků chromozomální DNA (5 μ l vzorku).



Kvalita vzorků chromozomální DNA byla posuzována z hlediska přítomnosti nefragmentované frakce, která špatně procházela agarózovým gelem, z tohoto pohledu jsou dostačující i vzorky 906 i 49v (Obr. 13). Vzorky byly po ověření přítomnosti chromozomální DNA rozděleny na alikvoty po 30 μ l a uloženy pro budoucí využití do -20°C .

Tabulka 15: kmeny, ze kterých byla izolována chromozomální DNA.

| | | | | | |
|-----|-------|------|------|------|-----|
| 1 | 86v | 156v | 286 | 466 | 865 |
| 6 | 88v | 157b | 299 | 468 | 866 |
| 7v | 90v | 158v | 300 | 469 | 872 |
| 10v | 91 | 163v | 302 | 472 | 877 |
| 13v | 92v | 164 | 305 | 474 | 881 |
| 14 | 93 | 164v | 306 | 475 | 883 |
| 18 | 95v | 166v | 307 | 476 | 886 |
| 19v | 96 | 167v | 308 | 490 | 888 |
| 21v | 99v | 174 | 311 | 491 | 892 |
| 27v | 100 | 177 | 314 | 495 | 901 |
| 31v | 100v | 188 | 320 | 497 | 904 |
| 33b | 103v | 195 | 322 | 498 | 906 |
| 34 | 108v | 196 | 323a | 499 | 910 |
| 34v | 109 | 201b | 323b | 507a | 911 |
| 35v | 110v | 204 | 324 | 507b | 913 |
| 42 | 111v | 206 | 331 | 509 | 929 |
| 46 | 112 | 208 | 332 | 511 | 930 |
| 47 | 112b | 213 | 337a | 512c | 942 |
| 49v | 113v | 215 | 349a | 513 | 943 |
| 50 | 115v | 217 | 350 | 514 | |
| 50v | 115 | 218 | 351 | 515b | |
| 51 | 120v | 219 | 354 | 517 | |
| 51v | 122av | 221 | 366 | 521 | |
| 52v | 122bv | 225 | 372 | 524 | |
| 53 | 123 | 230 | 373 | 527 | |
| 54v | 124 | 232 | 375 | 529 | |
| 59 | 124v | 244 | 385 | 530 | |
| 61v | 125av | 250 | 386 | 531 | |
| 62 | 125bv | 253 | 390 | 534 | |
| 63v | 127 | 254 | 395 | 536š | |
| 64v | 128 | 256 | 406a | 536b | |
| 65v | 129v | 258b | 408 | 537 | |
| 66v | 130v | 259 | 419 | 540 | |
| 64 | 132v | 265a | 426 | 803 | |
| 67 | 136v | 265b | 434 | 821 | |
| 69 | 137 | 266 | 437 | 823 | |
| 70v | 141 | 267 | 444 | 831 | |
| 72 | 141b | 269 | 452 | 839 | |
| 74v | 139v | 269b | 455a | 841 | |
| 75v | 144 | 274 | 458 | 843 | |
| 77v | 144v | 278 | 459 | 844 | |
| 79v | 147b | 279b | 463 | 847 | |
| 85v | 147v | 280 | 464 | 848 | |

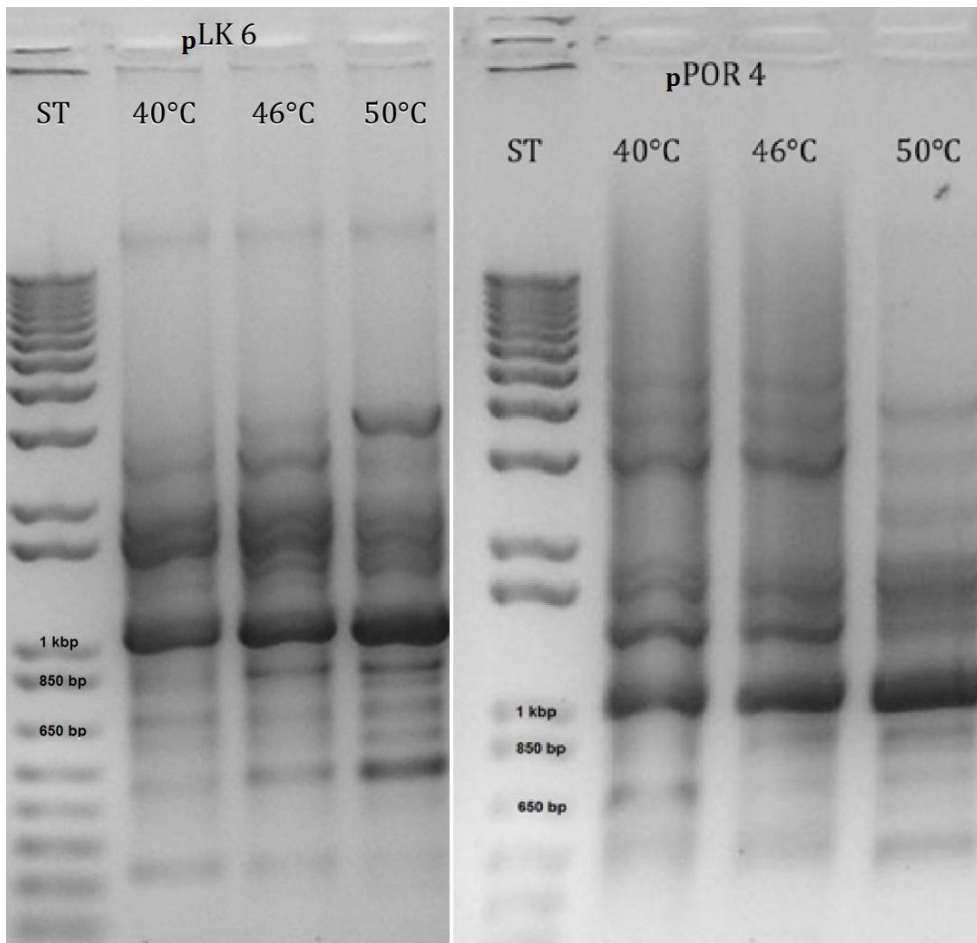
4.3. Testování vhodných degenerovaných primerů pro vyhledávání genů kódujících A-domény NRPS

Specifita navržených degenerovaných primerů byla testována na templátech (pozitivních kontrolách), které představovaly: vzorky chromozomální DNA modelových kmenů *S. lincolnensis* a *S. albus*, geny pro A-domény NRPS, které byly součástí kosmidu (pLK6- obsahuje sekvenci *lmbC* a pPOR4- obsahující sekvenci *por21*) a samotný kompletní gen *lmbC*. Na základě prorovnění vybraných sekvencí *in silico* byla stanovena předpokládaná velikost fragmentu v rozmezí cca 650- 700 bp (fragment ze sekvence *lmbC* (Koběřská et al., 2008) měl délku 687bp).

V první serii testů byla použita kombinace primerů UNI2f a UNI2r a/b s Taq purple DNA polymerázou a pLK6 a pPOR 4 jako templátem. PCR reakce probíhala v gradientovém cycleru při teplotách nasedání primerů 40°C, 46°C a 50°C (Obr. 14). Jako aditivum byl v reakční směsi použit hovězí sérový albumin (BSA). Amplifikace fragmentu ze směsi s betainem byla opakovaně neúspěšná, a proto tento premix pro další testování již nebyl používán.

Pro elektroforetickou kontrolu bylo použito 10 µl PCR reakce.

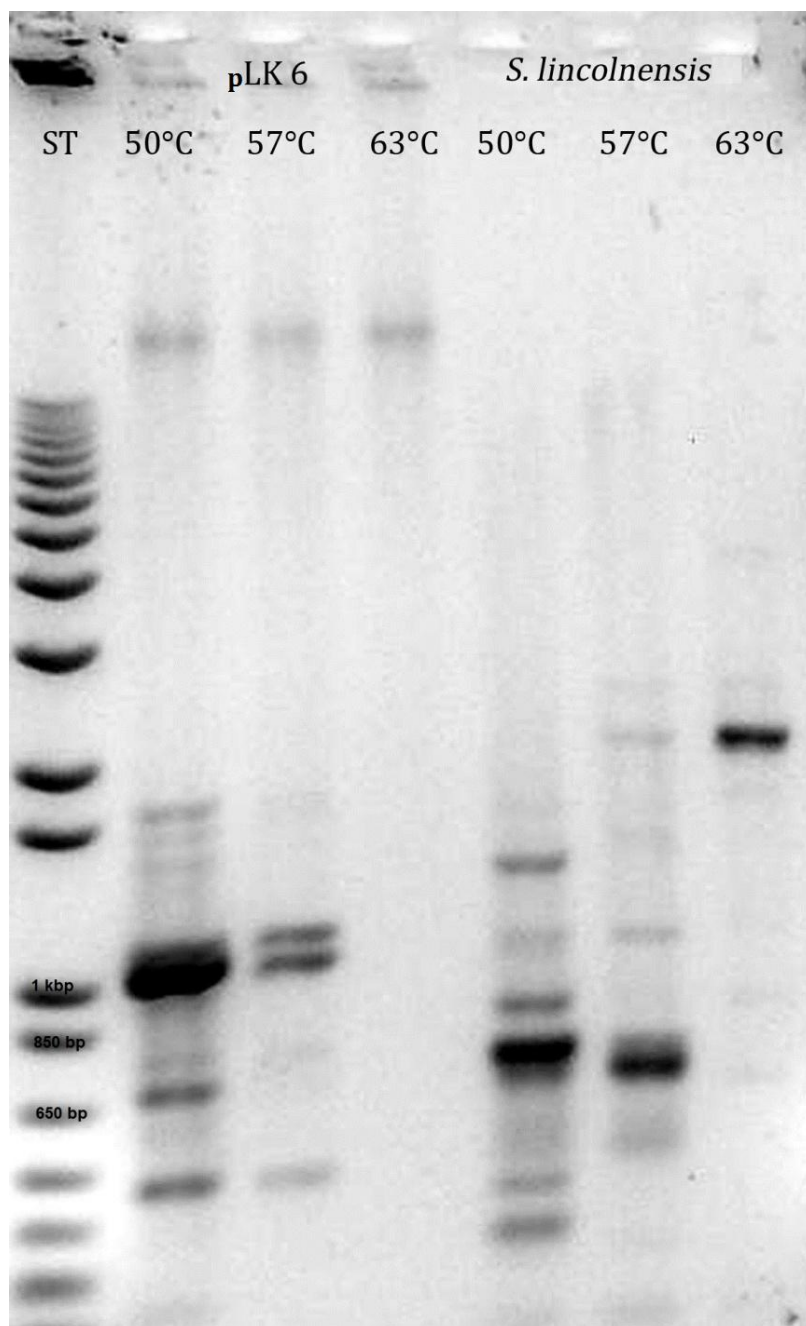
Obrázek 14: DNA fragmenty amplifikované z primerů UNI2f a UNI2r a/b při teplotách nasedání primerů: 40°C, 46°C a 50°C. Templátová DNA: pLK 6 a pPOR 4.



Z obrázku je patrné, že zvolené teplotní rozmezí bylo příliš nízké, bylo tak amplifikováno široké spektrum fragmentů.

Dalším krokem tak bylo zvýšení teplot nasedání primerů a jako templát byla používána i chromozomální DNA modelového kmene *S. lincolnensis* (Obr.15).

Obrázek 15: DNA fragmenty amplifikované z primerů UNI2f a UNI2r a/b při teplotách nasedání primerů: 50°C, 57°C a 63°C. Templátová DNA: pLK 6 a chromozomální DNA *Streptomyces lincolnensis*.



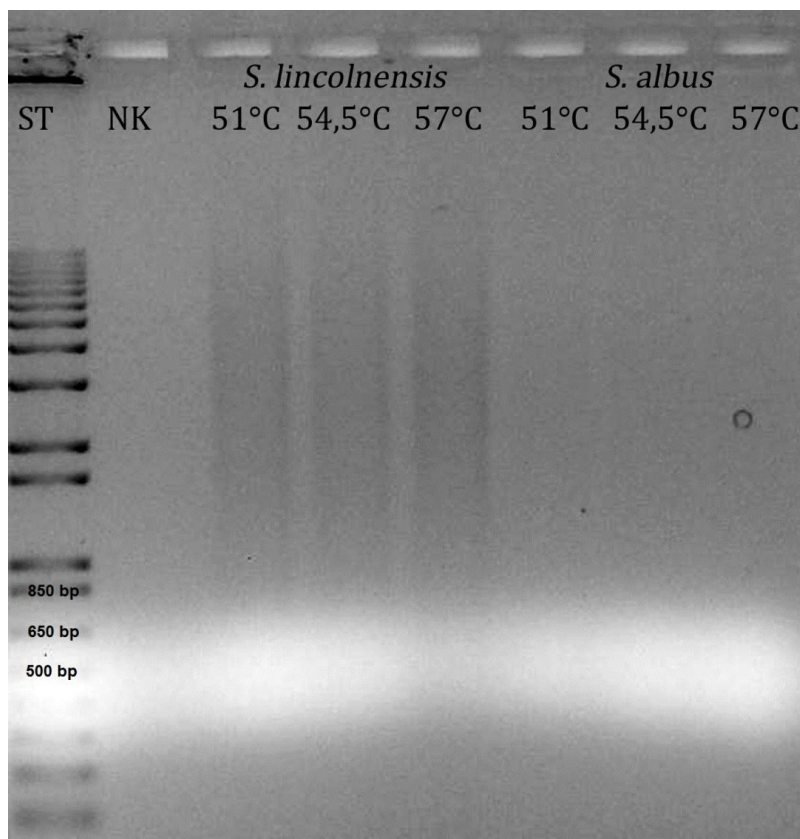
Ukázalo se, že vhodná teplota nasedání primeru během PCR reakce, bude v rozmezí 50°C-57°C. Díky změně podmínek se výrazně zvýšil počet fragmentů v očekávaném rozmezí velikostí 650- 680 bp a ubyly nespecifické produkty větší než 850pb.

Změna fontu! Sjednotit! Pro zvýšení specifity PCR amplifikace fragmentů byl také optimalizován primer UNI2f, byly tak navrženy primery UNIAf a UNIBf.

Tyto primery byly testovány opět s Taq purple DNA polymerázou při teplotách 51°C, 54,5°C a 57°C. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s kombinací UNIAf a UNI2r a/b při teplotě nasedání 57 °C. Tato kombinace primerů umožňuje amplifikovat očekávaný fragment ze vzorků chromozomální DNA *S. lincolnensis* i *S. albus*. Dále byl tedy proto testován jen primer UNIAf, nicméně UNIBf bude využit spolu s UNIAf při identifikaci A-domén v půdních izolátech aktinomycet, neboť je specifický pro jinou skupinu A-domén (viz. Tab. 13). UNIBf se od UNIAf liší na jedenácté pozici od 5'konce, kde je místo cytosinu guanin. Tato změna bazí má za následek, že při testování standardů bylo pomocí PCR s primerem UNIBf amplifikováno výrazně menší množství fragmentů očekávané délky, nicméně v přírodních vzorcích půdních izolátů tomu může být naopak.

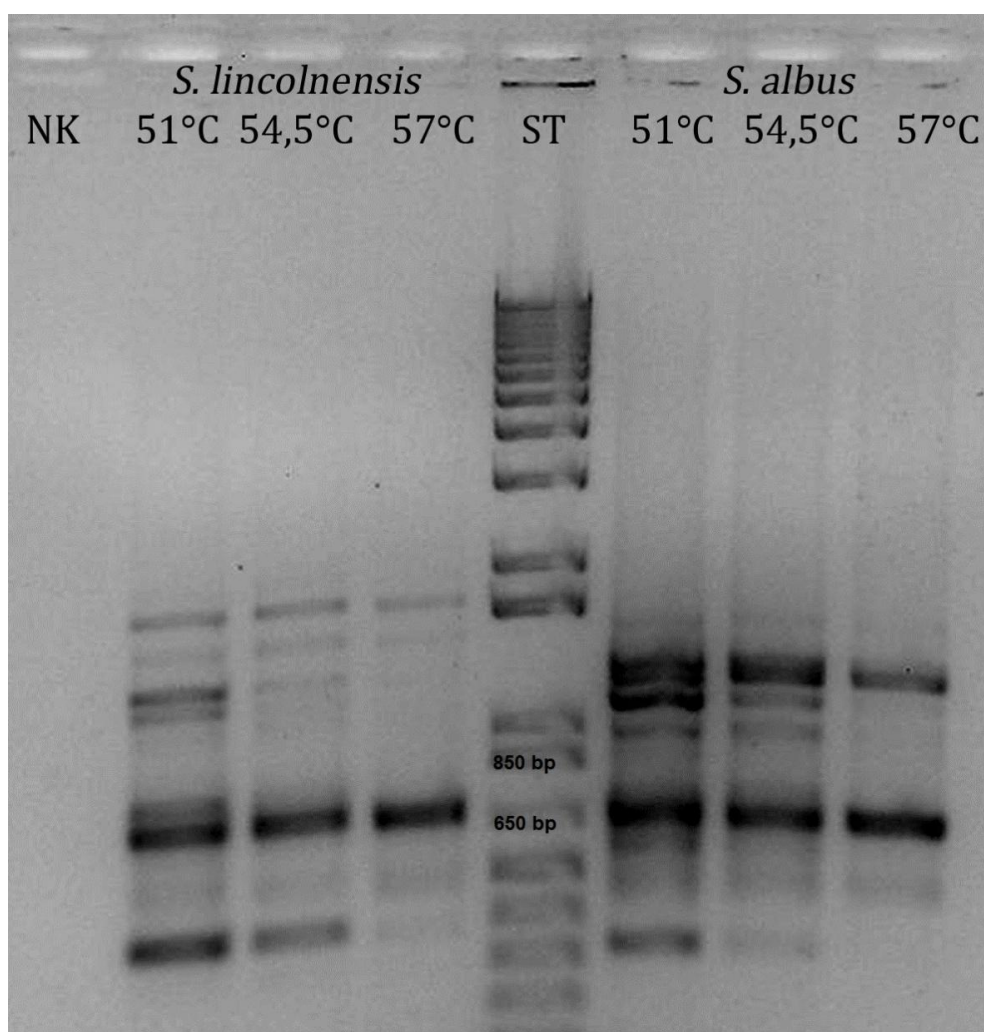
Kromě nových kombinací primerů byly také testovány různé DNA polymerázy. První z nich byla One Taq DNA polymeráza spolu s pufrem pro GC bohaté obtížně amplifikovatelné úseky DNA. Při použití tohoto enzymu však nebyl zaznamenán žádný pozitivní výsledek (Obr. 16)

Obrázek 16: Výsledky PCR při použití OneTaq DNA polymerázy a primerů UNIAf a UNI2r a/b při teplotách nasedání primerů: 51°C, 54,5°C a 57°C. Templátová DNA: chromozomální DNA *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces albus*. ST= standard (1kb PLUS DNA ladder), NK= negativní kontrola.



Další polymerázou použitou pro PCR reakci byla Supreme NZYTaq polymeráza. Podmínky PCR reakce byly stejné, jako u předchozích. Při 57°C, na rozdíl od nižších teplot, byl poměrně specificky amplifikován fragment velký cca 650bp z obou chromozomálních DNA (Obr. 17).

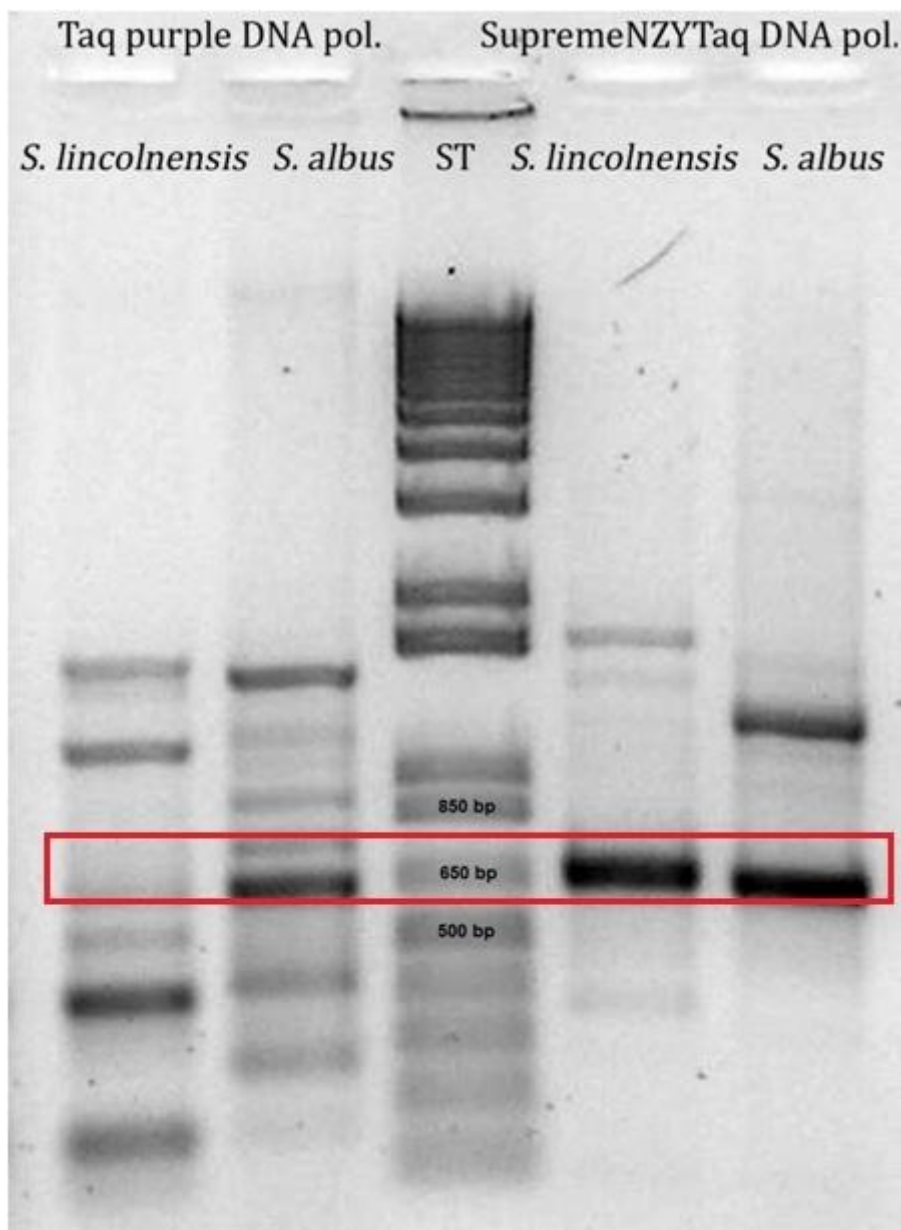
Obrázek 17: DNA fragmenty amplifikované za použití Supreme NZYTaq polymerázy z primerů UNIAf a UNI2r a/b při teplotách nasedání primerů: 51°C, 54,5°C a 57°C. Templátová DNA: chromozomální DNA *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces albus*. ST= standard (1kb PLUS DNA ladder), NK= negativní kontrola.



Pro posouzení specifity PCR reakce se Supreme NZYTaq DNA polymerázou byly porovnány PCR produkty s těmi, které pocházely z PCR reakce využívající Taq purple DNA polymerázu (Obr. 18).

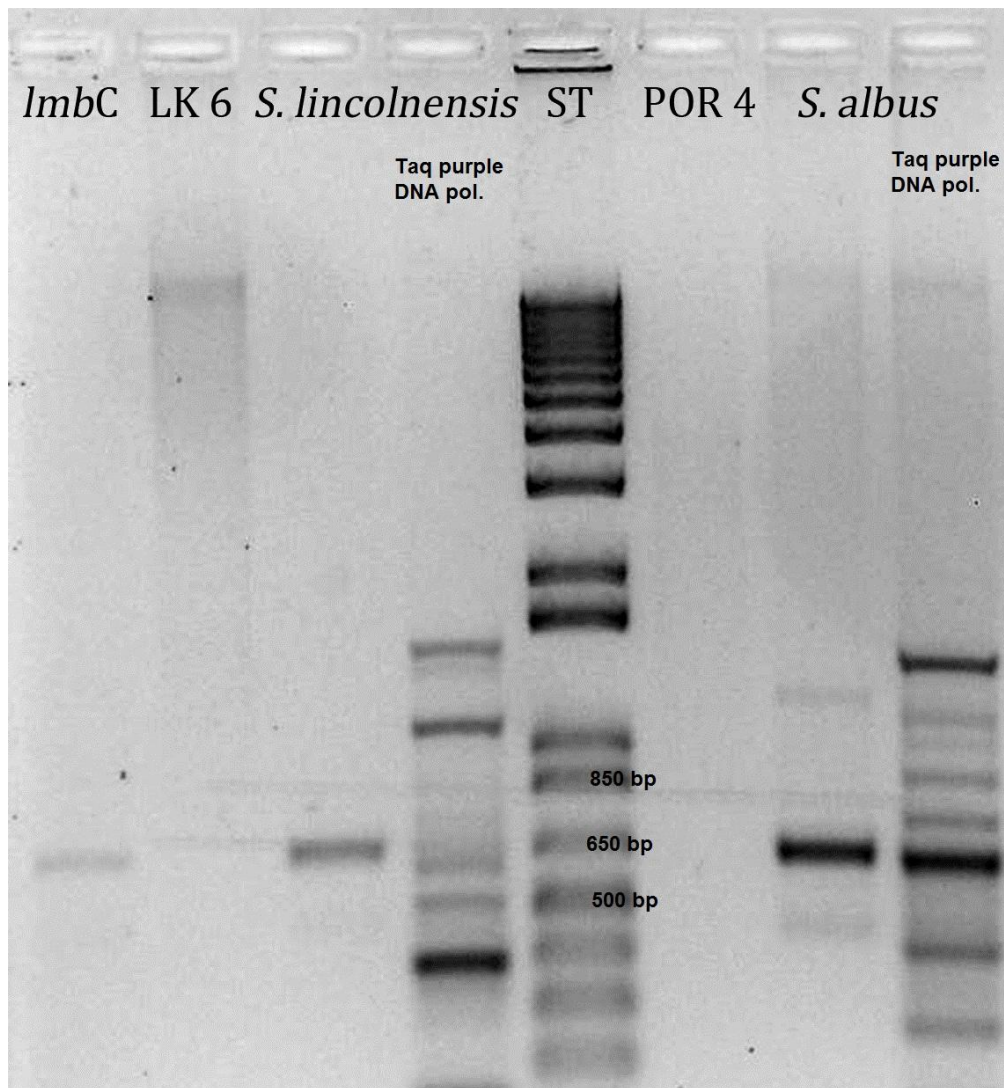
Z obrázku je patrné, že při stejných podmínkách reakce bylo dosaženo vyšší specifity a lepšího výtěžku fragmentu o velikosti cca 650bp při PCR se Supreme NZY Taq polymerázou. Červeně je vyznačeno rozmezí velikostí fragmentů, které byly porovnávány.

Obrázek 18: Porovnání účinnosti a specifity Taq purple polymerázy a Supreme NZY Taq polymerázy při PCR amplifikaci fragmentu DNA.



Posledním krokem bylo ověření účinnosti Supreme NZYTaq polymerázy během PCR z různých DNA templátů (*lmb C*, pLK6, ch DNA *S. lincolnensis* a *S. albus*, pPOR4)(Obr. 19). Navíc byly na gel naneseny, pro porovnání výtěžku PCR amplifikace úseku z templátových chromozomálních DNA, i vzorky PCR s Taq purple DNA polymerázou.

Obrázek 19: Testování Supreme NZYTaq polymerázy.



Podářilo se amplifikovat fragment o velikosti odpovídající 650bp z chDNA *S. lincolnensis* a *S. albus*. Pro porovnání byly do dráhy 4 a 8 naneseny vzorky produktů PCR s Taq purple DNA polymerázou. Podobně velký fragment je i ve vzorku, kde byl templátem samostatný gen *lmb C*. To naznačuje, že by fragment amplifikovaný z chDNA *S. lincolnensis* měl obsahovat i úseky *lmb C*. Z kosmidů však nebyly amplifikovány žádné fragmenty.

5. Diskuze

Sbíрку půdních izolátů, jež bude sloužit v budoucnu jako zdroj genetické informace pro PCR- vyhledávání přítomnosti genů vyžitelých pro tvorbu látek odvozených od linkomycinu, bylo nutno nejprve uspořádat a vyloučit duplicitní kmeny. Za tímto účelem byla vybrána finančně i časově optimální taxonomická metoda využívající porovnávání sekvencí fragmentů 16 S r-DNA jednotlivých izolátů. Pro amplifikaci byl zvolen přibližně 750 pb dlouhý úsek 16 S r-DNA zahrnující vysoce variabilní oblasti V1 (nukleotidy 69–99), V2 (nukleotidy 137–242), V3 (nukleotidy 433–497) a V4 (nukleotidy 576–682) (číslování nukleotidů podle Brosius et al., 1978). Dle Chakravorty et al. (2007) právě oblasti V2 a V3 (spolu s V6) vykazují maximální míru heterogenity a jsou proto vhodné pro určování bakteriálního rodu půdních bakterií.

Doposud se nám podařilo získat sekvence úseku 16S r-DNA z 538 izolátů. Jejich porovnání umožnilo identifikovat 51 skupin izolátů (což reprezentuje 297 kmenů), které obsahovaly duplicitní kmeny. Takovéto skupiny izolátů jsou často tvořeny kmeny izolovanými ze stejných lokalit, což je očekávaný výsledek (varianty půd O a L, s přídavkem linkomycinu či bez něj, lze pro účely tohoto srovnání opomenout, neboť se jedná o stejnou lokalitu (O nebo L) s různě velkým selekčním tlakem přidaného antibiotika). U skupin, kde tomu tak není (např. skupiny 7 a 23), to může být způsobeno tím, že ještě nebyly identifikovány další duplicitní kmeny ze stejné půdy.

Z tabulky 14B je patrné, že z půd s označením O a L byly izolovány duplicitní kmeny s mnohem vyšší četností. Tento jev je způsoben tím, že izoláty z půd O a L v celé sbírce tvoří cca 45,7% všech kmenů, ale také tím, že se často jedná o rezistentní duplicitní kmeny, které byly několikrát izolovány z dané půdy, která byla pouze ošetřena různou dávkou linkomycinu.

Dalších 241 izolátů bylo označeno jako unikátní, neboť z nich izolovaný zvolený úsek sekvencí 16 S r-DNA nevykazoval stoprocentní identitu s ostatními. Pro snížení pravděpodobnosti chybného určení duplicity byla v rámci každé skupiny provedena i kontrola vzhledu kolonií jednotlivých izolátů a zástupci jednotlivých morfologických variant byli vybráni pro izolaci chromozomální DNA, se kterou se bude dále pracovat. Kolega Z. Kameník zároveň stanovuje metodou UPLC produkční profily sbírkových kmenů. Také tato

informace bude po zpracování brána v potaz při zařazování kmenů do pracovního souboru pro vyhledávání genů kódujících NRPS.

Následujícím krokem bylo taxonomické zařazení jednotlivých izolátů na úrovni rodu. Zvolená metoda neumožňovala bližší taxonomické zařazení, pro nějž by byly vhodnější metody DDH a případně MLST. Je také nutno říci, že i když se internetové genové databáze neustále rozšiřují, stále ještě zdaleka neobsahují veškeré informace, které by umožnily určit bakteriální druh s úplnou jistotou. Pro účely této práce byla nicméně tato přesnost naprosto dostačující.

U 538 kmenů, z nichž byly získány sekvence úseku 16S r-DNA, byl tedy určen bakteriální rod a zcela podle očekávání drtivá většina zástupců patřila k rodu *Streptomyces*, který v běžných půdních společenstvech tvoří jednu z nejpočetnějších skupin aktinomycet. Bakterie patřící k rodům spadajícím do jiného bakteriálního kmene jsou ve sbírce zahrnuty, jelikož se je nepodařilo předběžně identifikovat klasickými taxonomickými metodami. Proto je na ně nahlíženo, jako na kontaminace (př. *Bacillus*, *Staphylococcus*).

V případě 39 kmenů, kde byl výsledek koloniové PCR opakovaně negativní, bylo nezbytné provést izolaci chromozomální DNA. Zároveň byla chDNA izolována i z vybraných již vytříděných kmenů. Tato DNA bude v budoucnu využita jako templát pro PCR-vyhledávání genů kódujících A-domény NRPS, případně jakýchkoli dalších vybraných genových aktivit (předpokládáme například vyhledávání genů pro halogenázy, které by mohly být využity pro přípravu chlorovaných derivátů linkomycinu, o kterých je známo, že mají širší spektrum účinku než linkomycin A, lépe se vstřebávají a mohou mít i antiprotozoální účinky (viz klindamycin)).

Izolace chDNA byla prováděna z malého objemu buněk pomocí komerční soupravy, ale vzhledem k rozmanitosti povrchových struktur, houževnatosti buněčných a spórových obalů a přítomnosti nejrůznějších produktů metabolismu s různými inhibičními vlastnostmi, nebyl vždy výtěžek dostačující. Bylo proto nutné izolaci chDNA i několikrát opakovat, což bylo zejména časově náročné.

V současnosti je k dispozici chDNA z 234 kmenů, což pokrývá všechny identifikované skupiny kmenů a značnou část kmenů unikátních.

Hlavním cílem této práce pak bylo navržení degenerovaných primerů, pomocí nichž by bylo možno metodou PCR amplifikovat specifický úsek A-domén NRPS, což by umožnilo

určit přítomnost genů pro NRPS v daném izolátu. Byla tedy navržena sada degenerovaných primerů, která vycházela z překladu aminokyselinové sekvence konzervovaných míst vybraných A-domén NRPS, které byly dostupné v databázích proteinů.

První testovaná sada primerů (UNI2f a UNI2r a/b) měla umožnit amplifikaci úseku o velikosti cca 680 bp (určeno dle sekvence genu *lmb C*, jehož produktem je adenylační doména aktivující PPL pro kondenzaci s cukernou složkou v biosynéze linkomycinu).

Byla provedena optimalizace podmínek reakce, nicméně částečně uspokojivého výsledku bylo dosaženo pouze pro templáty chDNA. U vzorků, jejichž templátem pro PCR byla kosmidová DNA s příslušným genem pro A-doménu, sice optimalizace vedla ke zvýšení specifity ve prospěch fragmentu očekávané velikosti, ale ke znatelně lepšímu výtěžku fragmentu nikoliv.

Z toho lze vyvozovat, že z ch DNA byly amplifikovány i úseky jiných A-domén, než těch, jejichž gen byl součástí kosmidů (vzorky pLK 6 a pPOR 4).

Pro účely vyhledávání neznámých A-domén NRPS však nebyl výsledek PCR reakce dostatečně robustní. Příčinou problému mohl být primer UNI2f, 15 bazí dlouhý oligonukleotid, který obsahuje značné množství degenerací a nespecificky párujících inozinových bazí. Tudíž bylo přistoupeno k jeho modifikaci, za účelem zvýšení specifity nasednutí na templátovou DNA.

Při modifikaci UNI2f, se proto již vycházelo z nukleotidových sekvencí zvolených úseků genů pro vybrané A-domény, se kterými by měl nový primer specificky párovat. Tímto způsobem vznikly primery UNIAf a UNIBf.

V kombinaci s UNI2r a/b byla specifita i výtěžek PCR reakce vyšší v porovnání s výsledky PCR z primerů UNI2f a UNI2r a/b (Obr. 16).

Stále však nedosahoval uspokojivých parametrů.

Novým impulzem proto bylo zjištění, že výtěžek PCR může být významně ovlivněn použitím DNA polymerázy, která je schopna lépe využít krátkých primerů. Oba používané primery jsou totiž poměrně krátké (15 nukleotidů), a jak vyplývá z práce Isenbargera *et al.* (2008), nemusela by to být pro použitou Taq polymerázu dostatečně dlouhá sekvence. Isenbarger *et al.* používali S-Tbr DNA polymerázu, která byla schopna specificky amplifikovat úsek DNA z primerů o délce 12 bazí s velmi dobrým výtěžkem.

Tento enzym, ačkoli autor uvádí katalogové číslo, nebyl nikdy komerčně vyráběn a je tedy bohužel nedostupný (konzultace se zástupci firmy Finnzymes, producentem citované DNA polymerázy). Nicméně tato zkušenost nás vedla k tomu, abychom vyzkoušeli i jiné DNA polymerázy, speciálně upravené pro amplifikaci úseků genů z GC bohatých oblastí.

První z nich byla One Taq DNA polymeráza, která se ovšem, za stejných podmínek jako Taq purple DNA polymeráza, neosvědčila (Obr. 17). Dalším enzymem byla Supreme NZYTaq polymeráza. Ta se ukázala být vhodným nástrojem pro PCR při zvolených podmínkách (Obr. 18). To bylo ověřeno i porovnáním spekter fragmentů vzniklých činností Taq purple DNA polymerázy a Supreme NZYTaq polymerázy (Obr. 19). Avšak podobně jako Taq purple DNA polymeráza ani tento enzym nebyl během PCR schopen signifikantně amplifikovat očekávaný fragment z templátu ve formě kosmidu (Obr. 20). To naznačuje, že z ch DNA se nejspíše amplifikují fragmenty jiných A-domén, než jen těch, které jsou součástí kosmidů. Vzhledem k předpokládanému počtu biosyntetických shluků v jednom genomu (20-30) se jedná o očekávaný výsledek.

6. Závěr

- ▶ Celkem bylo uspořádáno metodou porovnávání sekvencí úseku 16S r-DNA 538 izolátů, což tvoří 2/3 sbírky. 297 kmenů bylo rozděleno na základě identity sekvence z nich izolovaných fragmentů 16 S r- DNA do 51 skupin. 241 kmenů bylo samostatných, tzn., neměly identické sekvence úseku 16 S r- DNA s jinými izoláty.
- ▶ Všech 538 izolátů bylo taxonomicky určeno na úroveň rodu. Ve sbírce tak byly identifikováni zástupci aktinomycet rodu: *Nocardia* (4x(+2 duplicitní)), *Nocardioides* (1x), *Rhodococcus* (2x), *Promicromonospora* (2x), *Kribbella* (4x), *Amycolatopsis* (1x) a *Streptomyces* (273x (+243 duplicitních)). Byly také identifikovány 3 rody proteobakterií: *Variovorax* (1x), *Methylobacterium* (1x) a *Tetrathiobacter* (1x(+1 duplicitní)). Jeden izolát patřil k rodu *Staphylococcus* a jeden k rodu *Bacillus*.
- ▶ Izolováno bylo 234 chromozomálních DNA, což pokrývá všech 51 identifikovaných skupin s duplicitami a značnou část kmenů unikátních, které byly doposud identifikovány.
- ▶ Byly navrženy degenerované primery UNIAf a UNI2r a/b, umožňující během PCR reakce poměrně specificky amplifikovat fragmenty genů pro A-domény z chromozomální DNA modelových kmenů *S. lincolnensis* a *S. albus* za použití Supreme NZYTaq polymerázy. UNIBf primer bude spolu s UNIAf využit pro PCR vyhledávání genů kódujících A-domény NRPS v genomech sbírkových kmenů.

7. Přehled literatury

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schä ffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 3389–3402

Argoudelis, A. D., Fox, J. A. a Mason, D. J. (1965): Studies on the Biosynthesis of Lincomycin. II. Antibiotic U-11,973, N-Demethyl Lincomycin*., *Biochemistry*, **4** (4), 710-713

Arima, K., Kosaka, M., Tamura, G., Imanaka, H. a Sakai, H. (1972): Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of tomaymycin., *J. Antibiot.*, **25** (8), 437-44

Baltz R. H. (1998): Genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces., *Trends Microbiol.*, **6**(2), 76-83

Bates, H. M., Kuenzig, W. a Watson, W. B. (1969): Studies on the Mechanism of Action of Anthramycin Methyl Ether, A New Antitumor Antibiotic., *Canc. Res.*, **29**, 2195-2205

Bérdy, J. (2005): Bioactive Microbial Metabolites., *J. Antibiot.*, **58**, 1–26

Brahme, N. M., Gonzalez, J. E., Rolls, J. R., Hessler, E. J., Mizensak, S. a 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 lincomycin A and B., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7873–7878

Brosius, J., J., L., Palmer, J., P., Kennedy a H., F., Noller (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4801-4805

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. a Brick, P. (1997):Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.*, **16**, 4174 - 4183

Čermák, L., Kopecký J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková K., Ságová-Marečková, M. (2008): Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Appl. Soil Ecol.*, **40**, 348-358

Davies, J. (2007): Microbes have the last word., *Eur. Mol. Biol. Org. Rep.*, **8(7)**, 616–621

Demain, A. a Fang, A. (2000): History of Modern Biotechnology,(ed. Fichter, A.). (*Springer*, Berlin), Vol. **1**, 2-39

Demain, A. L. (1998): Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.*, **1** (4), 259-264

Demain, A. L. (1999): Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms., *App.Micro.Bio.*, **52** (4), 455-463

Du, L., Chen, M., Sanchez, C. a Shen, B. (2000): An oxidation domain in the BlmIII nonribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti- tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 171-175

Fischbach, M. A. a Walsh, C. T. (2006):Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms., *Chem. Rev.*, **106**, 3468-3496

Flårdh, K. a Buttner, M. J. (2009): *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 36-49

Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J.,

Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., Swings, J. (2005): Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**(9),733-739

Gontang, E. A., Gaude^{ncio}, S. P., Fenical, W. a Jensen, P. R. (2010): Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria., *Appl. Environ. Microbiol.*, **76** (8), 2487–2499

Griffith, K. S., Lewis, L. S. a Mali, S. et al. (2010): Treatment of Malaria in the United States: A Systematic Review., *J. Am. Med. Assoc.*, **297**(20),2264-2277

Hoeksema, H. (1968): Celesticetin. V. Structure of celesticetin., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 755–757

Hoeksema, H., Bannister, B., Birkenmeyer, R. D., Kagan, F., Magerlein, B. J., MacKellar, F. A., Schroeder, W., Slomp, G. a Herr, R. R. (1964): Chemical studies on lincomycin. 1. The structure of lincomycin., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4223–4224

Hoeksema, H., Crum, G. F. a DeVries, W. H. (1955): Isolation and purification of celesticetin., *Antibiot. Ann.*, **2**, 837–841

Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kjeser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. a Schrepf, H. (1985): Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual., *The John Innes Foundation*, Norwich

Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C. M., Zazopoulos, E. a Bachmann B.O.(2007): Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*., *Chem. Biol.*, **14**, 691-701

Hurley, L. H. (1980): Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin., *Acc. Chem. Res.*, **13** (8), 263–269

Hutchinson, C. R. (1998): Combinatorial biosynthesis for new drug discovery., *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**(3), 319-329

Chakravorty, S., D., Helb, M., Burday, N., Connell a D., Alland (2007): A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria., *J. Microbiol. Methods.*, **69**, 330-339

Challis, G. L. (2008):Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiol.*, **154**, 1555–1569

Challis, G. L. a Hopwood, D. A. (2003): Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species., *Proc. Natl. Acad. Sci.(PNAS)*, **100**, S. 2, 14555-14561

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. a Omura, S. (2003): Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*., *Nature Biotechnology*, **21**(5), 526-531

Isenbarger, T. A., Finney, M., Rios-Velazquez, C., Handelsman. J. a Ruvkun, G. (2008): Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 840–849

Itoh, J., Watabe, H. O., Ishii, S., Gomi, S., Nagasawa, M., Yamamoto, H., Shomura, T., Sezaki, M. a Kondo, S. (1988): Sibanomicin, a new pyrrolo[1,4]-benzodiazepine antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp., *J. Antibiot.*, **41**, 1281–1284

Joshi, N. (1999): Oral antibiotics: are the old still gold?, *Hosp. Pract. (Minneap)*., **34** (11), 117

Khosla, C. a Zawada, R. J. X. (1996): Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis., *Trends Biotechnol.*, **14** (9), 335-341

Kleinkauf, H. a von Döhren, H. (1975): A nonribosomal system of peptide biosynthesis., *Eur. J. Biochem.*, **236**, 335-351

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

Kohn K., W. (1975): Antibiotics Volume III: Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents (J. W. Corcoran, F. E. Hahn eds.). Springer, New York, 3-11

Konz, D. a Marahiel, M. A. (1999): How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.*, **6**, 39–48

Lautru, S. a Challis, G. L. (2004): Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiol.* , **150**, 1629–1636

Leimgruber, W., Stefanović, V., Schenker, F., Karr, A. a Berger, J.(1965): Isolation and Characterization of Anthramycin, a New Antitumor Antibiotic., *J. Am. Chem. Soc.*, **87** (24), 5791–579

Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., a Gerratana, B. (2009a): Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic., *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2869–2878

Li, W., Chou, S., Khullar, A., a Gerratana, B. (2009b): Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog., *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2958–2963

Ludwig, W. a Schleifer, K. H. (1994): Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis., *FEMS Microbiolo. Rev.*, **15**, 155-173

MacLeod, A. J., Ross, H. B., Ozere, R. L., Digout, G. a van Rooyen, C. E. (1964): Lincomycin: A New Antibiotic Active Against Staphylococci and Other Gram-Positive Cocci., *Can. Med. Assoc. J.*, **91**(20), 1056–1060

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997): Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis., *Chem. Rev.*, **97**, 2651-2673

Menzella, H. G. a Reeves, C. D. (2007): Combinatorial biosynthesis for drug development., *Curr. Opin. Microbiol.*, **10** (3), 238-245

Metzger, W., Mordmüller, B., Graninger, W., Bienzle, U., a Kremsner, P. G. (1995): High efficacy of short-term quinine-antibiotic combinations for treating adult malaria patients in an area in which malaria is hyperendemic., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**(1), 245–246

Miller, W. a Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 3389–3402

Moore, B. S., Hopke, J. N. (2001): Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway., *Chem. BioChem.*, **2**(1), 35-38.

Mootz, H. D. a Marahiel, M. A. (1997): The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains., *J. Bacteriol.*, **179**, 6843-6850

Mootz, H. D., Schwarzer, D. a Marahiel, M.A. (2002): Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biochem.*, **3**, 490-504

Oancea, S. (2010): An Overview of Conventional and Alternative Strategies for Developing New Antibacterial Agents., *Acta Chim. Slov.*, **57**, 630–642

Oliynyk, M., Brown, M. J. B., Cortés, J., Staunton, J. a Leadlay, P. F. (1996): A hybrid modular polyketide synthase obtained by domain swapping., *Chem. Biol.*, **3**(10), 833-839

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. a Hattor, M. (2001): Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites., *Proc. Natl. Acad. Sci.(PNAS)*, **98**,12215-12220

Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H. Z. a Piepersberg, W. (1995): Molecular characterization of the lincomycin production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11., *Mol. Microbiol.*, **16**, 1137–1156

Sakai, M., Matsuka, A., Komura, T., Kanazawa, S.(2004): Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *J. Microbiol. Methods.*, **59**, 81–89

Shen, B. (2000): Biosynthesis of aromatic polyketides., *Curr. Top. Chem.*, **209**, 1-51

Shen, B. (2003): Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigm., *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**, 285–295

Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. a Franceschi, F. (2001): Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria., *Nature*, **413**, 814-821

Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. a Edwards Jr., J. E. (2004): Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Clin. Infect. Dis.*, **38** (9), 1279-1286

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

Spížek, J. a Tichý, P. (1995): Some aspects of overproduction of secondary metabolites., *Folia microbiol.*, **40** (1), 43-50

Spížek, J., Novotná, J. a Řezanka, T. (2004): Lincosamides: Chemical Structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance and Applications., *Adv. Appl. Microbiol.*, **56**, 121-154

Stachelhaus, T. a Marahiel, M. A. (1995): Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA., *J. Biol. Chem.*, **270**, 6163-6169

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. a Marahiel, M. A. (1999): The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **6** (8), 493-505

Staunton, J. a Weissman, K. J. (2001): Polyketide biosynthesis: a millennium review., *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 380-416

Tarkka, M. a Hampp, R. (2008): Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions., *SECONDARY METABOLITES IN SOIL ECOLOGY*, Soil Biology, **14**, II, 107-126

Tandler, M. D. a Korman, S. (1963): "Refuin" a Non-Cytotoxic Carcinostatic Compound Proliferated by a Thermophilic Actinomycete., *Nature*, **199**, 501

Ulanová, D., Novotná J., Smutná, Y., Kameník, Z., Gažák, R., Šulc, M., Sedmera, P., Kadlčík, S., Plháčková, K. a Janata, J. (2010): Mutasyntesis of lincomycin derivatives with activity against drugresistant staphylococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **54** (2), 927- 930

von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. a Zocher, R. (1997): Multifunctional peptide

synthetases. *Chem. Rev.*, **97**, 2675-2705

Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. a Leitner, E. (1994): The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.*, **26**, 120-125.

Weber, T. a Marahiel, M. A. (2001): Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, **9**(1), 3-9

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

Yim, G., Wang, H. H. a Davies, J. (2007): Antibiotics as signalling molecules., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **362** (1483), 1195–1200