

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:  
Molekulární biologie a biochemie organismů  
Studijní obor:  
Speciální chemicko-biologické obory



**Šimon Vobruba**

Lekce z přírody – příprava hybridních bioaktivních látek  
Lessons from nature – preparation of hybrid bioactive compounds

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze dne

.....

Šimon Vobruba

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Jiřímu Janatovi za vedení bakalářské práce, Tomáši Bakalovi za pomoc a cenné rady i všem ostatním, kteří mě podporovali při psaní práce i při studiu, především mé rodině.

Abstrakt.....	5
Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod.....	8
2 Základní pojmy.....	9
2.1 Sekundární metabolity.....	9
2.2 Horizontální genový transfer.....	9
3 Vznik sekundárních metabolitů a směry jejich evoluce.....	10
3.1 Důvod vzniku sekundárních metabolitů.....	10
3.2 Původ enzymů zajišťujících biosyntézu sekundárních metabolitů.....	11
3.3 Konvergence sekundárních metabolitů.....	12
3.3.1 Konvergence na cíl.....	12
3.3.2 Konvergence ke stejné molekulární struktuře.....	13
4 Genové shluky.....	14
4.1 Umístění genových shluků pro biosyntézu antibiotik.....	14
4.2 Příčiny vzniku genových shluků.....	14
5 Evoluce a změny genových shluků.....	18
5.1 Změny genů a genových shluků.....	18
5.1.1 Polyketid syntázy.....	19
5.1.2 Neribozomální peptidsynthetasy.....	20
5.1.3 Mutace.....	20
5.1.4 Intragenové přestavby.....	21
5.2 Spojování shluků do „supershluků“.....	22
5.2.1 Spojení shluků synergických sekundárních metabolitů.....	22
5.3 Splynutí podshluků a vznik hybridní molekuly.....	23
5.3.1 Struktura linkosamidů.....	23
5.3.2 Přenos podshluku pro syntézu PPL.....	25
5.3.2.1 Změna substrátové specifity kondenzačního enzymu.....	26
5.3.3 Přenos jednotlivých genů.....	27
6 Tvorba modifikovaných i nových antibiotik genovým inženýrstvím.....	28
6.1 Modifikace shluků pro biosyntézu PK a NRP.....	28
6.1.1 Přemístění domén.....	29
6.1.2 Výměna modulů.....	29
6.1.3 Změna počtu modulů.....	29
6.2 Modifikace genů kódujících biosyntézu linkosamidů.....	30
6.2.1 Strukturní prvky linkosamidů významné pro antibakteriální účinek.....	30
6.2.2 Modifikace existujících sekundárních metabolitů.....	30
6.2.3 Tvorba hybridních látek.....	31
7 Závěr.....	33
8 Seznam použité literatury.....	34

## **Abstrakt**

Sekundární metabolity jsou biologicky aktivní látky, produkované především mikroorganismy. Zpravidla nejsou nezbytné pro přežití produkujících mikroorganismů, nicméně ovlivňující jejich fyziologii a mikrobiální ekologii. Mnoho z nich je využíváno ve farmacii, biologii a chemii. Tato práce shrnuje poznatky o původu a směru vývoje sekundárních metabolitů. Důležitou vlastností genů kódujících sekundární metabolity je jejich organizace do shluků. Mezi popsané mechanismy modifikací genových shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů patří mutace genů či intragenové přestavby. Ty se v přírodě výrazně projevují v evoluci shluků, kódujících sekundární metabolity s modulárním typem syntézy. Může však také docházet k fúzi genových podshluků rozdílného původu za vzniku komplexních shluků kódujících biosyntézu hybridní látky. Tyto hybridní shluky obsahují geny pocházející ze shluků různých sekundárních metabolitů. Podobná evoluční událost pravděpodobně nastala i v případě biosyntézy dvou modelových skupin přírodních látek - linkosamidů a pyrrolbenzodiazepinů. Analogické principy využívá i genové inženýrství pro cílené modifikace biosyntetických genových shluků, za účelem konstrukce producentů účinnějších biologicky aktivních látek. V práci jsou uvedeny příklady takových úprav, a to jak u látek ze skupin neribozomálních peptidů a polyketidů, tak i u linkosamidů, spolu s potenciálními možnostmi budoucích modifikací.

### **Klíčová slova:**

Sekundární metabolity, evoluce, genové shluky, polyketidy, neribozomální peptidy, linkosamidy

## **Abstract**

Secondary metabolites are biologically active compounds produced mainly by microorganisms. They are not essential for survival of producing strains, however, they significantly affect their physiology and ecology. They are frequently used in pharmacology, biology and chemistry. The present work describes the current state of knowledge concerning origin and evolution of secondary metabolites. The secondary metabolites biosynthetic genes are usually organised in clusters. The basic mechanisms of secondary metabolite gene clusters modification are gene mutations or intragenic rearrangements. These mechanisms are typically involved in natural evolution of gene clusters coding for secondary metabolites with modular type of biosynthesis. The subclusters of different origin can also fuse to form a new hybrid compound biosynthetic gene cluster. Similar evolutionary event probably occurred also in case of biosynthesis of two model groups of natural compounds – lincosamides and pyrrolbenzodiazepines. Analogous approaches are used in genetic engineering to construct producers of new more efficient bioactive compounds. Examples of such genetic modifications of gene clusters involved in the biosynthesis of compounds from nonribosomal peptides, polyketides and lincosamides groups are described. Possible future modifications of compounds from these groups are also discussed.

### **Keywords:**

Secondary metabolites, evolution, gene clusters, polyketides, nonribosomal peptides, lincosamides

## Seznam použitých zkratk

HGT	Horizontální genový transfer
$\beta$ -LS	$\beta$ -laktamsynthetasa
AS-B	Asparaginsynthetasa třídy B
rRNA	Ribozomální RNA
PK	Polyketidy
PKS	Polyketidsynthasa
NRP	Neribozomální peptidy
NRPS	Neribozomální peptidsynthetasa
AT	Acyltransferasová doména
KS	Ketosynthasová doména
T	Thiolační doména
ACP	Acyl přenášejíci protein
TE	Thioesterasová doména
KR	Ketoreduktasová doména
DH	Dehydratasová doména
ER	Enoylreduktasová doména
C	Kondenzační doména
A	Adenylační doména
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
PCP	Peptidyl přenášejíci protein
MTL	Methylthiolinkosamid
TCA	Thiocelestoamidin
PPL	4-propyl-L-prolin
NDLS	N-demethyllinkosamidsynthetasa
PBD	Pyrolobenzodiazepiny
<i>lmb</i>	Biosyntetický gen pro linkomycin
<i>lmr</i>	Rezistenční gen pro linkomycin
DEBS	6-deoxyerythronolide B-synthasa
BULIN	4'-butyl-4'-depropylkomycin
PELIN	4'-pentyl-4'-depropylkomycin

# 1 Úvod

Vzhledem k rostoucímu průměrnému věku lidské populace, i k rozšiřování rezistence k aktuálně používaným antibiotikům mezi patogeny, ve společnosti stále roste potřeba nových antibiotik i dalších léčiv.

Historicky byly právě sekundární metabolity neobyčejně bohatým zdrojem nových bioaktivních molekul pro farmakologický průmysl. A i v současnosti má většina antibiotik používaných v medicíně svůj původ v sekundárním metabolismu nebo jsou to semisyntetické deriváty těchto látek (Clardy et al., 2006).

Přes to všechno není sekundární metabolismus, na rozdíl od drah metabolismu primárního, zdaleka tak prozkoumaný, a tak stále poskytuje možnosti k novým objevům a jejich praktickému využití (Demain, 1998). V současnosti přinesla velké možnosti identifikace genů i celých genových shluků, kódujících biosyntetické enzymy mnoha sekundárních metabolitů. Tím se otevřela cesta k objasnění vzniku sekundárních metabolitů a vývoje jejich současné complexity. Právě poznání jejich obrovské variability, metabolického potenciálu bakterií v této oblasti, by mohlo ukázat cestu k modifikacím genů zodpovědných za jejich syntézu. Tyto genetické úpravy pak mohou vést ke vzniku upravených a potenciálně i účinnějších sekundárních metabolitů nebo ke tvorbě zcela nových hybridních látek.



## 2 Základní pojmy

### 2.1 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou látky produkované v buňkách při snížení růstové rychlosti na konci exponenciální a během stacionární fáze, při vyčerpání důležité živiny nebo po přijetí induktoru (Demain, 1998). Nejsou bezpodmínečně nutné pro růst a reprodukci mikroorganismu, ale ovlivňují jeho fyziologii a hrají důležitou úlohu v mikrobiální ekologii. Zajišťují jak interakce mezi mikroorganismy, např. ovlivněním jejich růstového cyklu (Straight et al., 2006) nebo produkcí látek inhibujících růst (Chang and Weisblum, 1967), ale také interakce mezi mikroorganismy a mnohobuněčnými organismy (Gilturmes et al., 1989; Haeder et al., 2009; Long, 1996).

Mnoho sekundárních metabolitů je využíváno v různých oblastech biologie, farmacie, chemie nebo zemědělství jako antibiotika, protinádorové látky, insekticidy, imunosupresory nebo herbicidy. Nejvýznamnějšími z nich jsou antibiotika, látky usmrcující nebo inhibující růst mikroorganismů ve svém okolí.

Předními producenty antibiotik jsou vláknité houby a bakterie, mezi nimi v první řadě grampozitivní *Actinobacteria* a jejich největší rod *Streptomyces*. V jejich genomu se nachází velké množství genů kódujících proteiny s neesenciální funkcí, jakými jsou např. regulační či transportní proteiny, nutriční enzymy zajišťující degradaci komplexních biopolymerů či právě sekundární metabolity. Jejich produkce je adaptací těchto bakterií k životnímu prostředí. Streptomycety žijí převážně v půdě, kde jsou vysoce kompetitivní podmínky a velké množství stresových faktorů - chemických, fyzikálních i biologických. Navíc jsou nepohyblivé, takže se stresu nemohou vyhnout a musí na nové podmínky zareagovat a přizpůsobit se jim (Bentley et al., 2002).

### 2.2 Horizontální genový transfer

Horizontální genový transfer (HGT) je způsob přenosu genetické informace mezi organismy jiným směrem než z mateřské buňky na dceřinou. Existují tři základní způsoby horizontálního genového transferu – transformace, transdukce a konjugace. Horizontálním genovým transferem se většinou nepřenášejí geny pro základní molekulární procesy, jako je replikace DNA, transkripce nebo translace, ale například geny zajišťující virulenci, biosyntézu sekundárních metabolitů nebo rezistenci (Ochman et al., 2000).

### 3 Vznik sekundárních metabolitů a směry jejich evoluce

I přes obrovské množství a komplexitu existujících sekundárních metabolitů (Walsh and Fischbach, 2010) byly mezi nimi objeveny některé společné znaky, především v oblastech jejich evolučního vzniku, původu a směrů vývoje.

#### 3.1 Důvod vzniku sekundárních metabolitů

Mnoho známých sekundárních metabolitů má funkci, která poskytuje jejich produkčnímu organismu selekční výhodu, například při mezidruhové kompetici, při mikrobiální diferenciaci nebo při transportu kovů. Existuje ale také skupina sekundárních metabolitů, u kterých nebyla nalezena žádná biologická aktivita nebo byla nalezena aktivita, která se nedala spojit s žádnou selekční výhodou pro producenta (Challis and Hopwood, 2003).

Vysvětlení této situace je možné pomocí dvou přístupů k evoluci sekundárních metabolitů.

Prvním je takzvaný „funkcionalistický pohled“. Ten tvrdí, že všechny sekundární metabolity musí mít funkci, protože jinak by byly geny nebo genové shluky zodpovědné za jejich syntézu eliminovány negativní selekcí (Jenke-Kodama and Dittmann, 2009). Množství metabolitů s nevysvětlenými funkcemi připisuje zatím pouze lidské neznalosti (Pichersky et al., 2006). Pokud by totiž tyto látky žádnou funkci neměly, množství genetického materiálu i samotné komplexní biochemické dráhy zajišťující jejich syntézu by příliš snižovaly fitness producenta (Williams et al., 1989).

Existují však i studie, které tomuto pohledu odporují. Byl proveden výzkum analyzující metabolom 98 kmenů bakterie *Myxococcus xanthus*, pocházejících ze 78 lokalit po celém světě, zahrnující však i vzorky odebrané jen ve vzdálenosti 20 cm od sebe. Výsledkem bylo zjištění velkých rozdílů ve skladbě sekundárních metabolitů, produkovaných kmeny z jednotlivých stanovišť. Ze 40 sledovaných látek bylo 11 nalezeno jen v jednom nebo dvou vzorcích a naopak jen 6 látek bylo produkováno více než 80% kmenů. Tato diverzita byla pozorována i u kmenů *M. xanthus* odebraných v přírodě jen několik desítek centimetrů od sebe (Krug et al., 2008). Je těžko představitelné, že by všechny tyto látky měly specifickou funkci a vznikly pozitivní selekcí. Tato pozorování se dají pravděpodobněji vysvětlit tak, že se biosyntetický aparát, zajišťující syntézu těchto sekundárních metabolitů, vyvinul k vytvoření chemické diverzity (Jenke-Kodama and Dittmann, 2009).

Právě tento názor zastává „procesualistický pohled“, který říká, že důležitější než produkt je samotný proces tvorby sekundárních metabolitů, zajišťující metabolickou diverzitu (Jenke-Kodama and Dittmann, 2009). Tento koncept se dá nalézt i v práci Firn and Jones (2000). Navrhují model, podle kterého je vysoko afinitní, reversibilní, nekovalentní interakce mezi ligandem a proteinem (biomolekulární aktivita) vzácná a vznikne jen, pokud má ligand správnou molekulární konfiguraci pro interakci s komplexní 3D strukturou proteinu. Oproti menšině sekundárních metabolitů s biomolekulární aktivitou jich má mnoho aktivitu biologickou. Jsou funkční, pokud jsou testovány proti celému organismu, obsahujícímu tisíce potenciálních cílů, které mohou mít inhibovány relativně neefektivně. Proto postulují, že je pro organismus produkující tyto sekundární metabolity prospěšné, pokud při evoluci metabolických drah dosáhne vzniku a udržení chemické diverzity za minimální cenu. To později umožní postupný vznik právě biomolekulární aktivity (Challis and Hopwood, 2003; Firn and Jones, 2000). Základním smyslem sekundárního metabolismu je tak podle nich poskytnout biosyntetický rámeček, mnohem méně fixovaný a flexibilnější než primární metabolismus. To umožní organismům rychle se vyrovnávat s neustále se měnícím prostředím.

Hlavním argumentem proti „procesualistickému pohledu“ je, že zaměření vývoje sekundárních metabolitů na samotný proces a ne na produkty, naznačuje, že by zde evoluce mířila k „budoucímu potenciálu“ a ne k okamžitému zisku. To by odporovalo evoluční teorii (Pichersky et al., 2006).

### **3.2 Původ enzymů zajišťujících biosyntézu sekundárních metabolitů**

Enzymy podílející se na biosyntéze sekundárních metabolitů jsou velmi často homologní s enzymy, které jsou součástí drah primárního metabolismu. Vznikly tedy pravděpodobně duplikací genů syntetizujících tyto enzymy a pak jejich postupnou divergencí na nový substrát nebo i na novou funkci. Jako v případě ATP/Mg<sup>2+</sup> dependentního enzymu  $\beta$ -laktamsynthetasy ( $\beta$ -LS), který zajišťuje tvorbu čtyřčlenného  $\beta$ -laktamového kruhu klavulanové kyseliny, inhibitoru  $\beta$ -laktamas. (Bachmann et al., 1998).  $\beta$ -LS vykazuje velkou sekvenční homologii s asparaginsynthetasou třídy B (AS-B) z bakterie *Escherichia coli*. Příbuznost  $\beta$ -LS a AS-B je dokázána také strukturní podobností obou enzymů, které sdílejí mnoho sekundárních i terciárních struktur, včetně vzdálených N- a C-terminálních domén (Miller et al., 2001).

### 3.3 Konvergence sekundárních metabolitů

Přestože existuje mnoho způsobů, kterými se mohou sekundární metabolity měnit, jejich vývoj často směřuje podobným směrem. Selektivní tlak může vést nepříbuzné enzymy ke katalyzování stejné reakce. Stejně tak mohou vznikat podobně působící sekundární metabolity z celých nepříbuzných genových shluků. U evolučně nepropojených sekundárních metabolitů může dojít ke konvergenci na cíl, kterým může být molekula, biochemický proces nebo funkce v cílovém organismu, a dokonce i ke konvergenci vedoucí ke stejné molekulární struktuře několika sekundárních metabolitů (Fischbach, 2009).

#### 3.3.1 Konvergence na cíl

Jedním z cílů, na které působí mnoho antibiotik je ribozom, což je ribonukleoprotein, skládající se z rRNA a proteinů, který zajišťuje tvorbu nových peptidů. Prokaryotní ribozom se skládá z 30S a 50S podjednotky. Právě 50S podjednotka je místem působení několika různých antibiotik. Chloramfenikol, klindamycin, erythromycin, clarithromycin a roxithromycin, se všechny váží na 23S rRNA uvnitř peptidyl transferasového místa i když konkrétní mechanismus blokace prodlužování peptidického řetězce se u nich liší (Schlunzen et al., 2001). Mimo ně se na peptidyl transferasovou doménu váží také streptograminy skupiny A i B (Barriere et al., 1998). To je důkazem odděleného vývoje několika různých antibiotik, která ovšem výsledně působí na stejné místo v cílové buňce, což ukazuje na evoluční úspěšnost této strategie.

Druhou možností konvergence sekundárních metabolitů na cíl je vznik stejné funkce u dvou sekundárních metabolitů, produkovaných jedním organismem. Jedná se o látky, které nejsou evolučně příbuzné, jejich genové shluky nejsou propojeny, ale mají podobnou nebo dokonce stejnou biologickou aktivitu.

Příkladem mohou být siderofory, malé molekuly s vysokou afinitou k železu, produkované organismy v prostředí s malým množstvím rozpustného železa, jakými jsou půda nebo mořská voda. Bakterie uvolňují siderofory, vázající ionty  $Fe^{3+}$ , a poté je pomocí aktivního transportu přijímají zpět z vnějšího prostředí.

*Streptomyces coelicolor* ovšem produkuje minimálně dva strukturně odlišné, nepříbuzné siderofory desferrioxamin a coelibactin (Bentley et al., 2002). Důvodem produkce těchto látek může být schopnost některých kompetujících organismů, které desferrioximinu nesyntetizují, vycítávat z okolního prostředí ferrioxaminové komplexy s navázaným železem a ty pak dále využívat. Takovéto organismy vyvíjely na nepohyblivé

streptomycety velký selekční tlak. Proto se u nich vyvinul, nebo byl přijat horizontálním transferem, další genový shluk, zajišťující biosyntézu coelichelinu, který je buňkami selektivně rozpoznáván a přenášen odlišným transportním systémem než desferrioxamin. Tím došlo k adaptaci na vysoce kompetitivní prostředí v jejich okolí (Challis and Hopwood, 2003).

Dalším případem pak je produkce více antibiotik jedním mikroorganismem. Ta v tomto případě působí na organismy v okolí producenta, ale nemají v jejich buňkách shodnou cílovou molekulu, jen funkci. Jediný kmen aktinomycet *Micromonospora carbonacea* tak produkuje dvě nepříbuzná antibiotika (Puar et al., 1998), která se vážou na odlišná místa na ribozomu cílové buňky. Jsou jimi evernimicin, komplexní oligosacharidové antibiotikum vážící se k 23S rRNA a k ribozomálnímu proteinu L16 (Belova et al., 2001), a chloramphenicol, který se váže do jednoho ze dvou míst nedaleko peptidyl transferasového centra (Hansen et al., 2003). Důvodem jejich tvorby jedním organismem je zamezení vzniku rezistence u cílového organismu (Fischbach, 2009).

### **3.3.2 Konvergence ke stejné molekulární struktuře**

Konvergence sekundárních metabolitů, produkovaných odlišnými biochemickými drahami, se nemusí objevovat jen mezi bakteriemi, ale i mezi různými říšemi organismů. Gibereliny jsou rostlinné růstové hormony. Mimo rostliny jsou však identické molekuly produkovány také houbami např. *Gibberella fujikuroi* a bakteriemi. Velké odlišnosti v biochemické dráze pro jejich syntézu u hub a rostlin však ukazují, že se obě dráhy vyvinuly samostatně, čemuž nasvědčuje i to, že v genomu rostlin jsou biosyntetické geny rozptýleny, zatímco v genomu bakterií jsou tyto geny poskládány do shluků typických pro sekundární metabolity (Bomke and Tudzynski, 2009). Biochemická dráha pro jejich syntézu v bakteriích je zatím neznámá. Rovněž funkce giberelinů v bakteriích, ale i houbách zůstává stále neobjasněna. Gibereliny produkované buňkami hub však pravděpodobně působí extracelulárně, což se předpokládá především kvůli jejich vysoké produkci některými druhy (např. právě *Gibberella fujikuroi*) a velmi efektivní sekreci (Hedden et al., 2001; Hedden and Thomas, 2012).

## 4 Genové shluky

Genové shluky jsou skupiny úzce funkčně propojených genů, které společně zajišťují biosyntézu sekundárních metabolitů, někdy také regulaci dané biosyntetické dráhy a rezistenci ke konečnému produktu dráhy (Osbourn, 2010). Takováto organizace genů se vyskytuje především u vláknitých hub (Hoffmeister and Keller, 2007) a bakterií (Bentley et al., 2002; Omura et al., 2001). Většina regulace produkce sekundárních metabolitů pak probíhá na úrovni transkripce.

### 4.1 Umístění genových shluků pro biosyntézu antibiotik

Nejčastěji jsou u bakterií genové shluky umístěny na chromozomu. U mnoha kmenů streptomycet se však vyskytují i obří lineární plazmidy o délce až 1800 kb, které mohou nést geny kódující řadu antibiotik, například pro methylenomycin produkovaný *Streptomyces coelicolor* (Kinashi and Shimajimurayama, 1991). Lineární plazmidy také mohou urychlovat šíření a evoluci shluků pro biosyntézu antibiotik pomocí konjugačního přenosu. Následně může docházet k transferu celých shluků nebo jejich částí mezi chromosomem a plazmidem pomocí crossing-overu a tím k jejich změnám (Kinashi, 2011).

Na lineárním chromozomu streptomycet jsou genové shluky pro syntézu sekundárních metabolitů umístěny především na variabilních ramenech spolu s geny pro další adaptivní funkce. Geny kódující esenciální funkce jako je DNA replikace, transkripce nebo translace jsou naopak umístěny ve střední části chromozomu (Bentley et al., 2002). I v rozmístění genů pro sekundární metabolity na chromozomech streptomycet jsou ovšem jisté rozdíly. V subtelomerické oblasti chromozomu se nachází většina mobilních elementů a dochází zde k častějším genovým duplikacím a přestavbám. Zde jsou proto umístěny shluky zajišťující biosyntézu specifických a unikátních sekundárních metabolitů pro daný bakteriální druh, zatímco blíže ke středu chromozomu jsou geny s běžnějšími a rozšířenějšími produkty (Ikeda et al., 2003).

### 4.2 Příčiny vzniku genových shluků

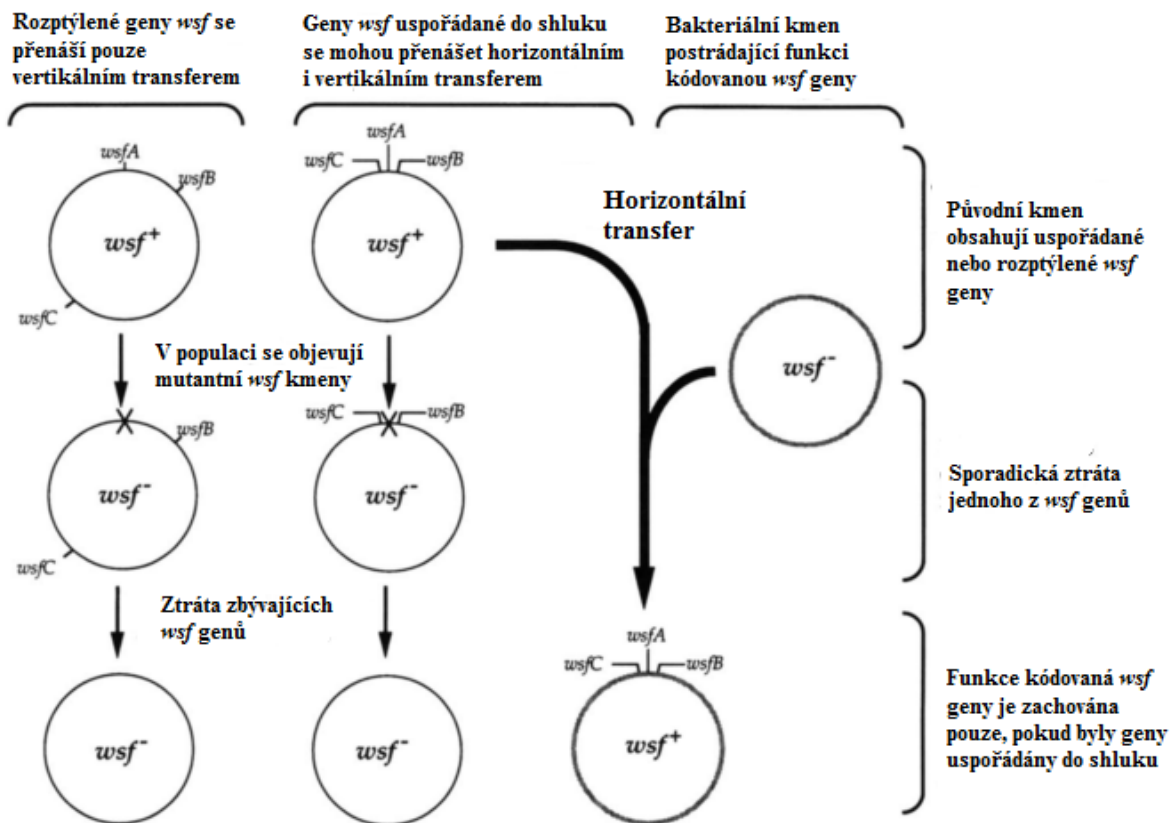
Přestože uspořádání funkčně příbuzných genů do shluků poskytuje bakteriím různé výhody, jako je možnost koregulace genů kódujících jednotlivé enzymy jedné metabolické

dráhy, jsou to možná pouze důsledky jejich uspořádání, ne příčiny (Lawrence, 1999; Lawrence and Roth, 1996).

Důvod uspořádání genů do shluků spíše může vysvětlit teorie sobeckého operonu. Podle ní je takováto organizace přínosná především pro geny samotné, ovšem ne nutně i pro hostitelský organismus (Lawrence and Roth, 1996).

Na sekundární metabolity nepůsobí stále stejný selekční tlak. Za určitých podmínek nebo ve specifickém prostředí nemusí jejich tvorba poskytovat buňce žádnou selekční výhodu. V takovém období se mohou v genech pro biosyntézu těchto sekundárních metabolitů hromadit mutace. Tyto geny poté mohou přijít o svou funkci a mohou být ztraceny genetickým driftem. Při ztrátě jednoho jsou poté z genomu odstraněny i ostatní geny kódující enzymy stejné biosyntetické dráhy, protože ty mohou poskytovat buňce selekční výhodu, jen když jsou přítomny všechny najednou.

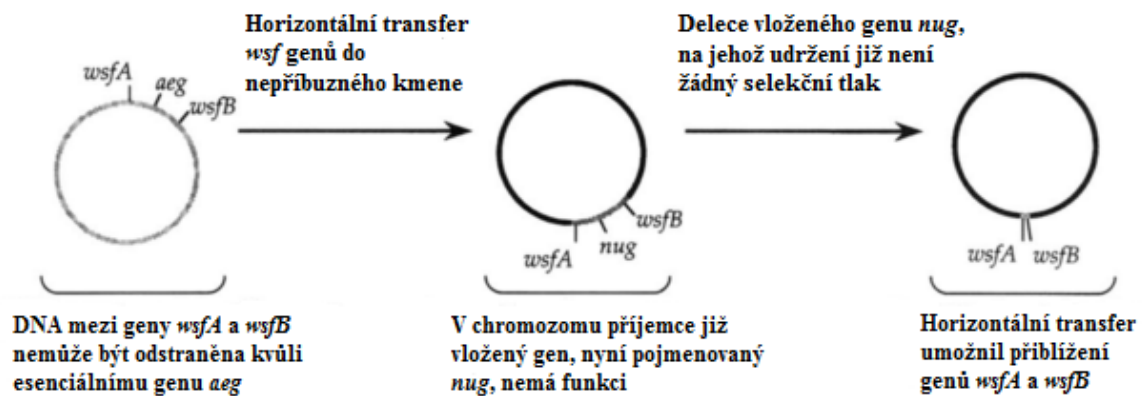
Pokud jsou ovšem geny uspořádány ve shluku, mohou být ještě před svou ztrátou společně přeneseny pomocí horizontálního genového transferu do nového organismu (Obr. 1). V případě, že by byly rozmístěny po bakteriálním chromozomu, by toto nebylo možné, z důvodů omezené velikosti úseku DNA, který může být najednou přenášen pomocí HGT. Z pohledu genů je tak uspořádání do shluků cestou, jak se vyhnout evoluční ztrátě a navíc se rozšířit do organismů, které jimi kódovaný metabolit neprodukují (Lawrence, 1999; Lawrence and Roth, 1996).



Obr. 1: Model přenosu genových shluků. Kruhy reprezentují bakteriální chromozomy. *wsfABC* jsou geny kódující enzymy jedné biosyntetické dráhy. K nim odpovídající fenotyp (*wsf*<sup>+</sup> nebo *wsf*<sup>-</sup>) je uprostřed každého kruhu. Převzato z Lawrence and Roth, 1996

Navíc se tímto způsobem mohou odstraňovat i nesouvisející geny vložené do shluku. Pokud je celý biosyntetický shluk přenesen pomocí HGT do nového hostitele, není již na udržení vloženého genu vyvíjen žádný selekční tlak, i když v původním hostiteli mohl být tento gen esenciální, a tak může být odstraněn (Obr. 2) (Lawrence, 1999; Lawrence and Roth, 1996).





Obr. 2: Odstranění nesouvisejících genů vložených do biosyntetického shluku. Kruhy reprezentují bakteriální chromozomy. *wsfAB* jsou geny kódující enzymy jedné biosyntetické dráhy. *aeg* je esenciální gen. *nug* je gen, který již v novém hostiteli nemá funkci. Převzato z Lawrence and Roth, 1996

## 5 Evoluce a změny genových shluků

Shluky zajišťující biosyntézu sekundárních metabolitů jsou jedny z nejrychleji se vyvíjejících částí genomu a představují ideální oblast pro výzkum genomové plasticity a mechanismů adaptivní evoluce (Osbourn, 2010).

Jejich vysoká evoluční rychlost je dána částečně krátkou generační dobou bakteriálních producentů (Lenski and Travisano, 1994), jejich častým přenosem horizontálním transferem (Lawrence and Roth, 1996), ale i umístěním v genomu bakterií.

Neustálé rychlé změny struktury i funkce sekundárních metabolitů, přinášející jejich producentům významnou výhodu v měnícím se prostředí i vůči ostatním organismům, mohou probíhat několika různými způsoby.

Jednou variantou jsou změny na úrovni samotných genů a genových shluků, které se velmi výrazně projevují na skupinách sekundárních metabolitů s modulárním typem syntézy. Druhou skupinu tvoří změny, kterých se účastní několik shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů, především spojováním celých shluků a spolupůsobení vznikajících sekundárních metabolitů. Speciálním typem změn je pak tvorba hybridních sekundárních metabolitů (Fischbach et al., 2008).

### 5.1 Změny genů a genových shluků

Jedněmi z nejrychleji se vyvíjejících sekundárních metabolitů jsou skupiny polyketidů (PK) a neribozomálních peptidů (NRP). Tyto látky jsou syntetizovány multimodulárními enzymy (o velikosti 200-2000 kDa) - polyketidsynthasami (PKS) a neribozomálními peptidsynthetasami (NRPS) (Cane and Walsh, 1999).

Polyketidy a neribozomální peptidy vznikají z jednoduchých prekurzorů, z nichž některé se vyskytují i v primárním metabolismu, a které jsou kondenzovány do velkých molekul. Každý modul PKS i NRPS se skládá z několika domén a je zodpovědný za začlenění jednoho stavebního bloku do rostoucího řetězce. Počet a pořadí modulů určuje, které monomery a v jakém pořadí budou inkorporovány (Fischbach and Walsh, 2006). Příkladem farmaceuticky využívaných polyketidů mohou být antibiotikum erythromycin nebo imunosupresant rapamycin (Ginolhac et al., 2005), u neribozomálních peptidů to jsou například antibiotika penicilin nebo vankomycin (Fischbach and Walsh, 2006).

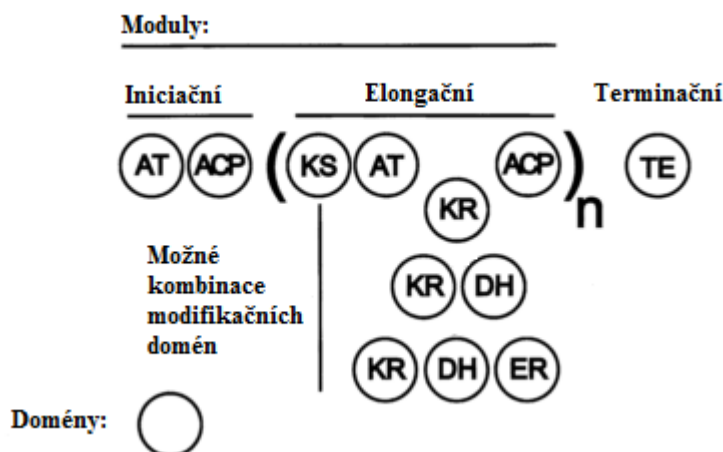
### 5.1.1 Polyketid syntázy

Existují polyketidsyntasy několika typů, z nichž nejdůležitějšími jsou Typ I a Typ II. PKS Typu I mají modulovou stavbu, kde je v biosyntéze každý modul využit pouze jednou. Ty jsou analogické k NRPS a práce se jimi bude dále zabývat. U PKS Typu II je používán jeden modul opakovaně a vznikající řetězec je připojen ke stále stejné doméně (Fischbach and Walsh, 2006).

V PKS Typu I jsou tři typy modulů – iniciační, elongační a terminační. Každý elongační modul PKS obsahuje minimálně dvě katalytické domény zodpovědné za reakce vedoucí ke tvorbě řetězce a jednu doménu fungující jako přenašeč. 1. Acyltransferasová doména (AT) rozpoznává prekurzory, v případě PKS jsou to nejčastěji acetyl-CoA, malonyl-CoA nebo methylmalonyl-CoA. 2. Ketosynthasová doména (KS) zajišťuje tvorbu C-C vazby a kondenzaci polyketidového řetězce s nově připojovaným prekurzorem. 3. Thiolační doména (T), tvořená acyl přenášečím proteinem (ACP), na kterou se váže vznikající řetězec.

V iniciačním modulu pak chybí kondenzační (KS) doména a terminační modul obsahuje navíc thioesterasovou doménu (TE), uvolňující vznikající polyketid z PKS.

Moduly mohou navíc obsahovat až tři domény upravující prekurzor zařazený AT doménou. Jsou to ketoreduktasová (KR), dehydratasová (DH) a enoylreduktasová (ER) doména (Fischbach and Walsh, 2006).



Obr. 3: Znárodnění organizace PKS Typu I. PKS Typu I se většinou skládají z iniciačního modulu následovaného n elongačními moduly a terminačním modulem. Elongační moduly mohou obsahovat až tři modifikační domény. Označení domén: KS – ketosynthasová, AT – acyltransferasová, ACP – acyl přenášečící protein, KR – ketoreduktasová, DH – dehydratasová, ER – enoylreduktasová a TE - thioesterasová

Převzato z Ginolhac et al., 2005

Přítomnost nebo nepřítomnost modifikační domén v jednotlivých modulech, změna specifity monomer aktivujících domén a změna pořadí samotných modulů účastnících se biosyntézy jsou z největší části zodpovědné za variabilitu polyketidů, ale i neribozomálních peptidů. (Fischbach et al., 2008).

### 5.1.2 Neribozomální peptidsynthetasy

NRPS mají analogický modulární princip syntézy jako PKS Typu I. Nezbytnou součástí každého elongačního modulu jsou tři domény – kondenzační (C), adenylační (A) a thiolační (T). Adenylační doména slouží k rozpoznávání prekurzorů, kterými jsou v případě NRPS proteinogenní i neproteinogenní aminokyseliny. Prekurzor je zde aktivován na aminoacyl-AMP za spotřeby ATP. Kondenzační doména zprostředkovává tvorbu peptidové vazby mezi vznikajícím peptidem a aktivovaným prekurzorem. Na thiolační doménu tvořenou peptidyl přenášejícím proteinem (PCP) je thioesterovou vazbou připojen prodlužovaný peptidyl. Terminační modul zde opět většinou obsahuje thioesterasovou doménu, i když u NRPS existuje i alternativní TE-nezávislá cesta uvolnění řetězce (Fischbach and Walsh, 2006).

Také v jednotlivých modulech NRPS se mohou vyskytovat modifikační domény, které upravují vznikající neribozomální peptid. Jsou to například oxidasová doména, methyltransferasová doména nebo aminotransferasová doména (Fischbach and Walsh, 2006).

### 5.1.3 Mutace

Nejjednodušší a nejčastější cesta, kterou se mohou měnit biosyntetické geny, je prostřednictvím mutací.

Mutace v genech kódujících jednotlivé enzymy biosyntetické dráhy sekundárních metabolitů mohou přinést změnu funkce těchto enzymů, jejich specifity nebo vést i k jejich inaktivaci.

Příkladem projevu inaktivující mutace na biosyntézu sekundárního metabolitu může být biosyntéza polyketidu FK520 (askomycinu). Ten je produkován bakteriemi *Streptomyces hygroscopicus* a má imunosupresivní a antifungální účinky. PKS zajišťující tvorbu tohoto metabolitu obsahuje dva moduly se stejnými modifikačními doménami – ketoreduktasovou a dehydratasovou. V prvním modulu jsou obě dvě funkční, ale ve druhém došlo k mutaci v DH doméně, což vedlo k její inaktivaci. Oba moduly tak, i přes shodný počet a typ domén, zařazují do výsledné molekuly jiné tří-uhlíkaté zbytky a odlišně tak mění vlastnosti výsledného askomycinu (Wu et al., 2000).

Další příklad diverzity způsobené mutacemi nalezneme u neribozomálních peptidů. Tentokrát se jedná o látky, které vznikly změnami substrátové specifity adenylačních domén. Bakterie *Bacillus subtilis* produkuje skupinu lipopeptidů, příbuzných neribozomálních peptidů, do které patří mimo jiné bacillomycin D (Moyne et al., 2004), iturin A (Garbayjaureguiberry et al., 1978) a mykosubtilin (Peypoux et al., 1986). Všechny tři látky mají zhruba v polovině svých modulů stejné A domény, což vede k začleňování stejných aminokyselin. Ve druhé části se však adenylační domény liší a jsou zařazovány odlišné aminokyseliny (Obr. 4). Jednou z možností vzniku těchto molekul je spolu s přeskupením adenylačních domén i existence společných předchůdců některých skupin A domén, u kterých poté došlo mutacemi k divergenci specifit, což vedlo až ke změně produktu (Fischbach et al., 2008). Tomu nasvědčuje vysoká příbuznost A domén začleňujících serin a threonin nebo asparagin a aspartát (Moyne et al., 2004).



Obr. 4: Mutace a divergence substrátové specifity A domén. Mutacemi a přeskupením adenylačních domén vznikla diverzita mezi NRP z rodiny iturinů. Černě jsou vyznačeny aminokyseliny společné pro všechny tři molekuly. Barevně jsou značeny odlišně zařazované aminokyseliny. Převzato z Fischbach et al., 2008

#### 5.1.4 Intragenové přestavby

Dalším způsobem evoluce sekundárních metabolitů na této úrovni jsou intragenové přestavby. Ty mají největší vliv na sekundární metabolity s modulárními typy syntézy. Jednou z možných intragenových přestaveb je duplikace, v případě PKS duplikace jednotlivých modulů.

Ta se vyskytuje u genů kódujících syntézu mykolaktonu u bakterií *Mycobacterium ulcerans*. PKS, tvořící tento toxin, se skládá ze tří proteinů - MLSA1, MLSA2 a MLSB, přičemž proteiny MLSA1 a MLSB jsou s velikostí 1,8 MDa a 1,2 MDa největšími proteiny

nalezenými v živých buňkách. Mezi porovnatelnými doménami každého z 16 modulů této PKS je obrovská sekvenční podobnost. Zatímco běžně se podobnost mezi doménami ze stejné PKS pohybuje mezi 40-70%, u dehydratasových, enoylreduktasových a ketoreduktasových domén mykolactonové PKS je to přes 98%. V rámci tří typů acyltransferasových domén (dvě s predikovanou specifitou k malonátu a jedna k methylmalonátu) je vzájemná podobnost dokonce 100%. Nejpravděpodobnějším vysvětlením takových shod je vznik genů kódujících proteiny MLSA1, MLSA2 a MLSB genovou duplikací z jednoho původního menšího genu (Stinear et al., 2004).

Existují i páry proteinů tvořících PKS, které se liší přítomností nebo absencí modulu. Ty vznikly intragenovou delecí nebo inzercí. Takovým případem jsou látky spinosyn produkovaný bakterií *Saccharopolyspora spinosa* a butenyl-spinosyn tvořený *Saccharopolyspora pogona*. Geny kódující jejich PKS mají 94% podobnost nukleových kyselin s jednou výjimkou. Tou je dodatečný modul v sekvenci pro PKS syntetizující butenyl-spinosyn. Ten způsobuje začlenění dalšího monomeru do jeho postranního řetězce a tím jeho prodloužení o dva uhlíky oproti spinosynu (Hahn et al., 2006).

## 5.2 Spojování shluků do „supershluků“

Díky evoluci nebo horizontálnímu transferu se často v genomu jednoho organismu vyskytuje více genových shluků zajišťujících syntézu sekundárních metabolitů. Tyto shluky mohou být časem genomovými přestavbami přesunuty vedle sebe a mohou se spojit v jeden „supershluk“. Toto uspořádání shluků spolupůsobících sekundárních metabolitů může být výhodné jak pro producenta, protože usnadňuje koregulaci, tak i pro geny samotné, protože umožňuje horizontální transfer celého „supershluku“ (Fischbach, 2009).

### 5.2.1 Spojení shluků synergických sekundárních metabolitů

U některých producentů se vyvinuly sekundární metabolity, které mají v součinnosti vyšší účinek proti kompetitorům, než by byl prostý součet jejich jednotlivých antibiotických aktivit.

Příkladem může být společná produkce  $\beta$ -laktamových antibiotik a klavulanové kyseliny bakterií *Streptomyces clavuligerus*. Rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům je zajištěna  $\beta$ -laktamasami, které štěpí peptidickou vazbu v  $\beta$ -laktamovém kruhu antibiotika a brání mu v působení na cílové enzymy syntetizující peptidoglykan (Jacoby and Munoz-Price,

2005; Liras, 1999). Tento způsob rezistence je velmi rozšířený mezi většinou gramnegativních bakterií ale i některými grampozitivními bakteriemi např. stafylokoky.  $\beta$ -laktamasy však mohou být inhibovány klavulanovou kyselinou. Spoluprodukcí klavulanové kyseliny a  $\beta$ -laktamového antibiotika tak bakterie obnovují funkčnost antibiotika i proti rezistentním kompetitorům produkujícím  $\beta$ -laktamasy (Lee et al., 2003).

U *Streptomyces clavuligerus*, *S. jumonjinensis*, a *S. katsurahamanus* jsou dokonce genové shluky, zajišťující biosyntézu klavulanové kyseliny a  $\beta$ -laktamového antibiotika cefamycinu, fúzovány v jeden supershluk. I když je každá z těchto látek produkována odlišnou biochemickou drahou z jiných prekurzorů (Ward and Hodgson, 1993). Navíc je biosyntéza obou metabolitů regulována stejným genem *ccaR* umístěným v cefamycinovém shluku (PerezLlarena et al., 1997).

Klavulanová kyselina má příbuzné počáteční biosyntetické kroky se sekundárním metabolitem klavamem, který ovšem nemá funkci inhibitoru  $\beta$ -laktamas. A zatímco klavamy i cefamycinová antibiotika jsou produkována některými druhy bakterií jak společně, tak samostatně, klavulanová kyselina je vždy syntetizována pouze s cefamycinem (Jensen and Paradkar, 1999). To ukazuje, že schopnost syntetizovat klavulanovou kyselinu se vyvinula v bakterii produkující klavamy i cefamycin v reakci na vznik rezistence zajišťované  $\beta$ -laktamasami v jejím okolí (Challis and Hopwood, 2003).

### 5.3 Splynutí podshluků a vznik hybridní molekuly

Při spojování menších genových shluků, které se vyskytovaly v genomu samostatně nebo tvořily podshluky ve větším útvaru, mohou vznikat zcela nové genové shluky. Jde o formu chemické inovace, při které splývají vzdálené metabolické dráhy umožňující vznik nových typů strukturní diverzity mezi sekundárními metabolity (Fischbach et al., 2008). Tyto změny shluků zajišťujících biosyntézu sekundárních metabolitů budu prezentovat na malé, ale zajímavé skupině antibiotik – linkosamidech.

#### 5.3.1 Struktura linkosamidů

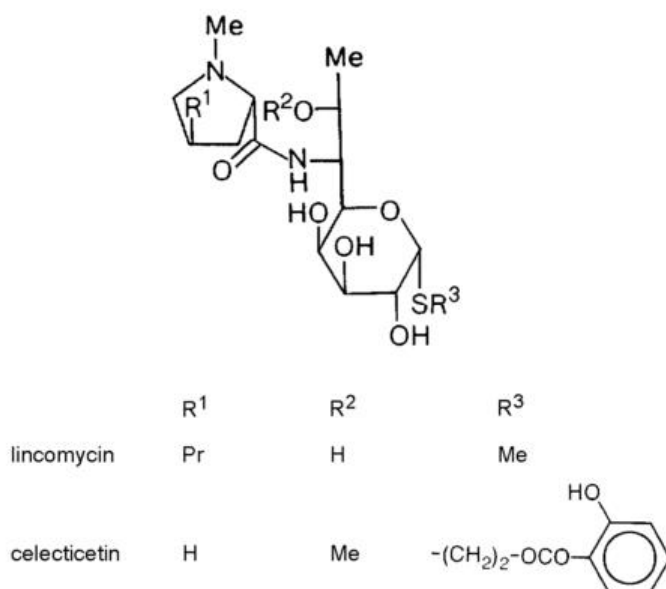
Linkosamidy jsou příkladem skupiny sekundárních metabolitů, u které v přírodě došlo nejen ke splynutí dvou podshluků, ale i k přesunu jednotlivých genů, a dokonce i genového segmentu. Patří mezi ně linkomycin produkováný především druhem *Streptomyces*

*lincolnensis* (Bergy et al., 1963) a celesticetin nalezený ve *Streptomyces caelestis* (Hoeksema et al., 1955).

V cílových buňkách mnoha grampozitivních bakterií, jako jsou stafylokoky a streptokoky, blokuje linkomycin syntézu proteinů. Interaguje s 23S rRNA v A a P místě v 50S podjednotce ribozomu, čímž brání prodlužování vznikajícího peptidu (Schlunzen et al., 2001).

Linkosamidy se skládají z aminocukerné a aminokyselinové složky. Aminocukernou částí je v případě linkomycinu methylthiolinkosamid (MTL) a u celesticetinu thiocelestoamidin (TCA), které se ovšem liší jen jednou methylační modifikací. U celesticetinu je pak navíc ještě k aminocukerné části dvouuhlíkatým řetězcem připojen salicylát. Aminokyselinovou složku tvoří u celesticetinu prolin, proteinogenní aminokyselina, která je volně dostupná v buňce. Oproti tomu aminokyselinovým prekurzorem linkomycinu je 4-propyl-L-prolin (PPL) (Obr. 5). PPL vzniká přeměnou L-tyrosinu a příslušná biosyntetická dráha je kódovaná geny linkomycinového shluku (Chung, 1997).

Spojení aminokyselinové a aminocukerné části amidovou vazbou zajišťuje enzym N-demethyllinkosamidsynthetasa (NDLS). Tento oligomerní enzym je nejdůležitějším, ale zároveň také nejméně objasněným krokem biosyntézy (Chung, 1997; Koběrská, 2010).



Obr. 5: Struktura linkosamidů. Převzato z Čermák et al., 2007



### 5.3.2 Přenos podshluku pro syntézu PPL

Biosyntetická dráha PPL sdílí společné rysy s biosyntetickou drahou dihydropyrrolové složky některých sekundárních metabolitů ze skupiny pyrrolbenzodiazepinů (PBD). PBD jsou biologicky aktivní látky s antibiotickou a protinádorovou aktivitou, složené z anthranilátových a dihydropyrrolových prekurzorů, které jsou poté kondenzovány neribozomální peptidsynthetasou. A právě biosyntéza dihydropyrrolové složky u sibiromycinu, anthramycinu a tomaymycinu sdílí několik kroků s biosyntetickou drahou PPL (Hu et al., 2007; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b).

Tato analogie naznačuje horizontální přenos genů a fúzi biosyntetického shluku původního prolin-inkorporujícího linkosamidu se shlukem jednoho z PBD a vznik hybridního antibiotika linkomycinu. Další důkazy pak poskytuje následující analýza genomu producentů linkosamidů i PBD.

Při sekvenování 35 kbp dlouhého linkomycinového biosyntetického shluku bylo nalezeno 26 genů potřebných pro jeho biosyntézu (*lmb*) a tři geny (*lmr*) zajišťující rezistenci (Koběrská et al., 2008; Peschke et al., 1995). Z těchto 26 genů je šest zodpovědných za biosyntézu PPL (*lmbB1*, *lmbB2*, *lmbX*, *lmbY*, *lmbA* a *lmbW*) a mají své homology i v PBD shlucích pro syntézu anthramycinu (Hu et al., 2007) a sibiromycinu (Li et al., 2009b). Shluk pro biosyntézu dalšího PBD tomaymycinu má pak pět homologních genů (Li et al., 2009a). Zároveň tyto geny kódující biosyntézu PPL nemají homology v biosyntetickém shluku celesticetinu, jehož aminokyselinová část je tvořena prolinem (Čermák et al., 2007).

Shodná je částečně i organizace těchto genů mezi jednotlivými shluky produkujícími PBD a linkomycin. Jak v linkomycinovém shluku, tak v trojici shluků pro biosyntézu výše uvedených PBD, jsou dvě překrývající se dvojice genů. U linkomycinu jsou to geny *lmbB1-lmbB2* a *lmbY-lmbX*, u PBD pak jejich homology. Jejich rozmístění ve shluku je už ovšem odlišné. U PBD tvoří kompaktní podshluk, zatímco u linkomycinu jsou genové páry na opačných koncích shluku (Hu et al., 2007; Koběrská et al., 2008; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b).

Právě rozdíl v uspořádání, spolu s odděleným přenosem genů *lmbA* a *lmbW* a celkovou nízkou homologií genů v linkomycinu a PBD (Hu et al., 2007; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b), ukazuje na dlouhou dobu, která uběhla od vzniku tohoto hybridního antibiotika (Koběrská, 2010).

### 5.3.2.1 Změna substrátové specifity kondenzačního enzymu

Ve chvíli kdy byly přijaty geny pro syntézu PPL do linkosamidového biosyntetického shluku, muselo následně dojít ke změně substrátové specifity kondenzačního enzymu zajišťujícího spojení aminocukerné části a nově získaného prekurzoru PPL (Koběrská, 2010). Tuto změnu by měl potvrzovat rozdíl mezi geny kódujícími kondenzační enzymy. Při biosyntéze linkomycinu je jako substrát rozeznáván především PPL, zatímco při produkci celesticetinu je to prolin.

Za syntézu čtyř podjednotek NDLS jsou pravděpodobně zodpovědné čtyři geny (*ccbC/lmbC*, *ccbD/lmbD*, *ccbE/lmbE* a *ccbF/lmbF*), tvořící kompaktní podshluk v biosyntetických shlucích obou linkosamidů. Liší se jen vzájemnou orientací genů *ccbF-ccbE* a *lmbF-lmbE* a umístěním v biosyntetickém shluku daného antibiotika. Funkce proteinů CcbC/LmbC a CcbE/LmbE byly předpovězeny pomocí srovnání jejich sekvence s proteiny v programu BLAST pro vyhledávání homologií. Pár CcbC/LmbC je součástí rodiny samostatných adenylačních domén a měl by rozeznávat a aktivovat aminokyselinový prekurzor. U proteinů CcbE/LmbE je na základě podobnosti předpokládána katalytická funkce (tvorba amidové vazby) v NDLS. Na druhou stranu sekvence proteinového páru CcbD/LmbD je zcela unikátní a nemá homologii s žádným proteinem v databázi. Poslední dvojice proteinů CcbF/LmbF vykazuje nejnižší vzájemnou podobnost ze všech 4 homologních párů (39%) a má podobnost s několika aminotransferasami v databázi. To naznačuje interakci s aktivovanou aminokyselinou, kterou je u linkomycinu PPL a u celesticetinu prolin (Čermák et al., 2007; Koběrská, 2010).

Pátou podjednotkou enzymu NDLS je peptidyl-přenášející protein (PCP). Ten ovšem není kódován samostatným genem, ale 5' terminální částí genu *lmbN* linkomycinového shluku a 3' terminální částí genu *ccbZ* celesticetinového shluku. Zbývající části obou genů se jinak účastní syntézy aminocukerné části linkosamidů. Tato struktura genů je důsledkem přesunu genového segmentu mezi sousedícími dvojicemi genů *ccbN-ccbZ* a *lmbN-lmbZ*. Jestli však má tato změna nějaký funkční význam, není dosud prokázáno (Koběrská, 2010).

Srovnání genů kódujících kondenzační enzymy ve shlucích obou linkosamidů, ukázalo, že k adaptaci na nový substrát PPL došlo beze změn ve složení podjednotek NDLS. Rozpoznání a aktivace nové aminokyselinové složky bylo umožněno mutacemi v genech kódujících jednotlivé podjednotky NDLS, především pak v genu *lmbC*, kódujícím adenylační doménu (Kadlčík, v přípravě).

### 5.3.3 Přenos jednotlivých genů

Poslední vlastností evoluce sekundárních metabolitů prokazatelnou porovnáním linkomycinového a celesticetinové biosyntetického shluku je výrazně vyšší frekvence přenosu samostatných genů než celých genových podshluků. Po srovnání obou shluků je vidět, že žádný z trojice genů kódujících rezistenci k linkomycinu (*lmrA*, *lmrB* a *lmrC*) v linkomycinovém shluku (Koběrská et al., 2008; Peschke et al., 1995) nemá společný evoluční počátek s genem *ccr1*, jediným předpokládaným genem pro rezistenci v celesticetinovém shluku (Koběrská, 2010). Stejně tak nemá v celesticetinovém shluku žádný protějšek jediný předpokládaný regulační gen v linkomycinovém shluku *lmbU* ani gen kódující methyltransferasu *lmbG*. Naopak s linkomycinovými geny nemá žádnou evoluční příbuznost gen *ccb4*, kódující O-methyltransferasu v celesticetinovém shluku (Koběrská, 2010). To ukazuje na jejich samostatný přenos do porovnávané dvojice linkosamidových biosyntetických shluků.

## **6 Tvorba modifikovaných i nových antibiotik genovým inženýrstvím**

Neustálá potřeba nových antibiotik, způsobená především rostoucí rezistencí původců infekčních onemocnění, vedla k vytvoření několika možných způsobů získávání nových účinných látek (Bode et al., 2002).

Klasický přístup zahrnující izolaci mikroorganismů, především bakterií a hub, kultivaci, extrakci a izolaci přírodních látek již přestává být účinný. Hlavními problémy jsou časté znovuobjevování již známých látek a případné překrytí účinku nové látky již prozkoumaným antibiotikem. Sekvenování genomů bakteriálních producentů antibiotik však ukázalo, že obsahují mnohem více potenciálních biosyntetických shluků než shluků již známých sekundárních metabolitů (Scherlach and Hertweck, 2009; Winter et al., 2011). Produkty těchto kryptických shluků nejsou syntetizovány nebo byly přehlédnuty za standardních fermentačních a detekčních podmínek, ale představují obrovský zdroj dalších potenciálních antibiotik. Snahy o spuštění exprese těchto látek za pomoci biochemických metod či nových kultivačních podmínek, jejich izolace s využitím bioinformatických predikcí struktur, ale i heterologní exprese sekundárních metabolitů v lépe prostudovaných bakteriálních kmenech jsou cestami k novým sekundárním metabolitům (Baltz, 2010; Corre and Challis, 2009; Scherlach and Hertweck, 2009).

Dalším možným způsobem mohou být chemické modifikace, které často produkují účinnější nebo lidským tělem lépe přijímané látky než přírodní produkty, ale zároveň je většinou jejich výroba výrazně nákladnější (Magerlein, 1971). Poslední variantou je produkce modifikovaných nebo hybridních antibiotik přímo bakteriemi díky genetickým úpravám biosyntetických shluků nebo přenosu genů mezi jednotlivými shluky. Při těchto postupech se využívají mechanismy, probíhající v přírodě při evoluci sekundárních metabolitů, které nás inspirují k různým způsobům genetických úprav.

### **6.1 Modifikace shluků pro biosyntézu PK a NRP**

NRPS a PKS jsou, díky své modulární stavbě, vhodnými biosyntetickými aparáty, využitelnými pro tvorbu modifikovaných látek. Stejně jako v přírodě mohou být i genetickými manipulacemi přemísťovány, vkládány nebo odstraňovány geny kódující domény či celé moduly. Tím vzniknou NRPS a PKS syntetizující zcela nové sekundární

metabolity. Nicméně i při použití těchto metod skončilo mnoho experimentů neúspěšně, především kvůli nízkým výtěžkům požadovaného produktu nebo nefunkčním hybridním enzymům (Giessen and Marahiel, 2012).

### 6.1.1 Přemístění domén

Úspěšné přesunutí genu kódujícího TE doménu bylo provedeno ve shluku pro 6-deoxyerythronolide B-synthasu (DEBS) z bakterie *Saccharopolyspora erythraea*. Tato PKS syntetizuje aglykonové jádro antibiotika erythromycinu A. DEBS je tvořena 3 proteiny, kdy je na C-konci třetího z nich umístěna TE doména, která cyklizuje vznikající polyketid a uvolňuje jej z DEBS. Ta byla v rámci pokusu přemístěna na C-konec prvního proteinu. To vedlo k předčasnému ukončení syntézy a tvorbě zkráceného triketidu, místo původního polyketidu, skládajícího se ze 7 stavebních jednotek. Přemístění TE domény by mohlo být obecně používanou metodou pro produkci polyketidů se specifickou délkou (Cortes et al., 1995).

### 6.1.2 Výměna modulů

Ve studii zabývající se antibiotikem spiramycinem, produkovaným bakterií *Streptomyces ambofaciens*, byla demonstrována výměna genů pro celý modul PKS. Geny kódující první modul spiramycinové PKS, který obsahuje AT doménu, ACP a neaktivní KS doménu, byly nahrazeny geny pro počáteční modul tylosinové PKS. Rekombinantní PKS produkovala hybridní antibiotikum, do kterého byla na začátku zařazována tří-uhlíkatá stavební jednotka z tylosinu, místo dvou-uhlíkaté, vyskytující se běžně ve spiramycinu (Kuhstoss et al., 1996).

### 6.1.3 Změna počtu modulů

Stejně jako evoluční mechanismy nejsou ani genetické modifikace omezeny jen na úpravy modulů, ale může se měnit i jejich počet.

Tak tomu bylo v případě bakterií *Bacillus subtilis* produkovaného antibiotika surfaktinu. In-frame delecí genů pro celý leucin-zařazující modul v jeho biosyntetickém shluku bylo dosaženo produkce upravené molekuly. Surfaktin běžně obsahuje cyklický heptapeptid, v produktu modifikované NRPS je však pouze cyklický hexapeptid. Zajímavé je, že TE doména této NRPS byla na závěr syntézy schopna vytvořit makrolakton i se zmenšenou velikostí kruhu (Mootz et al., 2002).

## 6.2 Modifikace genů kódujících biosyntézu linkosamidů

Linkosamidy jsou podstatně menší skupinou antibiotik než polyketidy nebo neribozomální peptidy. Přesto se jedná o významnou skupinu látek, jejíž zástupci se využívají v klinické praxi, a je proto zajímavá z hlediska přípravy odvozených látek s vylepšenými účinky. Nové deriváty linkosamidů lze připravit pomocí modifikací biosyntetických genů, chemickou syntézou nebo chemickými úpravami původní struktury. Důležitou kapitolou je také zvýšení produkce finálních látek nebo jednotlivých meziproductů pomocí genetických manipulací (Magerlein, 1971; Ulanová et al., 2010).

### 6.2.1 Strukturní prvky linkosamidů významné pro antibakteriální účinek

Při genetických modifikacích je jedním z cílů připravit látky s vyššími antibakteriálními účinky, než má původní sekundární metabolit. V případě linkomycinu byla již v sedmdesátých letech chemickou syntézou připravena řada derivátů, u kterých byla testována jejich antibakteriální účinnost, a které tak ukazují potenciálně nejvýhodnější cíle pro tvorbu modifikovaných a hybridních látek (Magerlein, 1971).

Byly nalezeny tři pozice, ve kterých mají změny struktury linkomycinu největší vliv na antibakteriální účinek. Jednou z nich je pozice C-7, jejíž chlorací vzniká jediný v praxi používaný semisyntetický derivát linkomycinu – klindamycin. Druhou důležitou částí linkomycinu je propylový boční řetězec v pozici C-4'. Při chemické syntéze 4'-alkyl-4'-depropyl-linkomycinů docházelo ke zvyšování účinnosti s rostoucí délkou řetězce. Nejvyšší antibakteriální aktivita pak byla zjištěna u pentylu a hexylu v trans konformaci. Třetí důležitou pozicí je N-1'. Zde byl chemickou syntézou připraven 1'-demethyl-linkomycin. Ten má sice pouze 2% antibakteriální účinek ve srovnání s linkomycinem, pokud je ovšem současně chlorován v pozici C-7, vzniká 1'-demethylklindamycin s vyšší antibakteriální aktivitou, než má klindamycin.

Největší efekt, a to nejen antibakteriální, ale i antimalarický (proti *Plasmodium berghei*) pak má 1'-demethyl-4'-depropyl-4'-pentylklindamycin, látka kombinující všechny tyto modifikace (Magerlein, 1971).

### 6.2.2 Modifikace existujících sekundárních metabolitů

Kvůli nákladnosti výše popsaných chemických syntéz se hledají způsoby, jak tyto látky, se známými antibakteriálními účinky, připravovat pomocí metod genového inženýrství.

Prvním krokem k biosyntéze látek modifikovaných v pozici C-4' může být delece genu *lmbX* v bakterii *Streptomyces lincolnensis*, která vede k přerušení syntézy linkomycinového prekurzoru PPL. Této mutace bylo využito k mutasyntetické přípravě 4'-butyl-4'-depropyllinkomycinu (BULIN) a 4'-pentyl-4'-depropyllinkomycinu (PELIN), kdy byl mutantní kmen kultivován v přítomnosti prekurzorů 4-butyl-L-prolinu nebo 4-pentyl-L-prolinu. Při následných testech antimikrobiální aktivity obou produktů vůči sbírce bakteriálních kmenů vykazoval PELIN vyšší účinnost než BULIN (Ulanová et al., 2010). Produkce těchto látek ukázala mimo jiné také rozšířenou substrátovou flexibilitu kondenzačního enzymu NDLS, který byl schopen rozeznat a aktivovat i látku s delším postranním řetězcem (Kadlčík, v přípravě).

Takto syntetizovaný 4'-pentyl-4'-depropyllinkomycin lze chlorovat za vzniku 4'-pentyl-4'-depropylklindamycinu. I přes vyšší finanční náročnost spojenou se syntézou prekurzoru 4-pentyl-L-prolinu by byla tato metoda levnější než chemická syntéza celé látky (Ulanová et al., 2010).

Další oblast výzkumu má za cíl inaktivaci genu, kódujícího methyltransferasu, která katalyzuje metylaci 1'-demethyllinkomycinu v pozici N-1' na linkomycin (Chung, 1997; Najmanová et al., v přípravě). Produkt by pak mohl sloužit k přípravě účinnějších derivátů klindamycinu, jako je např. 1'-demethylklindamycin (Magerlein, 1971).

### 6.2.3 Tvorba hybridních látek

V budoucnosti by se genetické úpravy linkosamidových sluků nemusely omezovat jen na tvorbu modifikovaných sloučenin, ale mohla by být produkována i úplně nová hybridní antibiotika. Jejich shluky by obsahovaly geny pocházející ze sluků kódujících biosyntézu různých sekundárních metabolitů.

Jedním z možných míst, na která by se mohl tento výzkum zaměřit, je aminokyselinová složka linkomycinu. Počáteční kroky biosyntézy PPL jsou shodné s těmi, jež se uplatňují i při vzniku dihydropyrrolové složky PBD. Tvorba této části molekuly PBD pak ale pokračuje dalšími reakcemi, které už nejsou součástí biosyntetické dráhy PPL (Hu et al., 2007; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b). Právě geny pro enzymy katalyzující tyto reakce by mohly být přeneseny do linkomycinového shluku. Tím by došlo k modifikaci aminokyselinové složky a tvorbě nových hybridních antibiotik. Zároveň s tím by však musel být upraven kondenzační enzym, aby akceptoval nové prekurzory.

Hypoteticky by mohlo dojít i k připojení čtyř genů, kódujících salicylátovou podjednotku celesticetinu, k linkomycinovému shluku (Koběrská, 2010). Vznikající látka by měla mít nahrazen methyl, který je substituentem u linkomycinu, salicylátem, který se vyskytuje ve struktuře celesticetinu (Obr. 5). U tohoto produktu však nebyla provedena chemická syntéza a testování. Nelze proto odhadnout antibiotický účinek hybridní molekuly, na rozdíl od látek uvedených v předchozí kapitole.



## 7 Závěr

Díky identifikaci a prozkoumání struktury řady genových shluků, kódujících biosyntézu sekundárních metabolitů, bylo objeveno mnoho molekulárních mechanismů, zajišťujících jejich rychlý vývoj. Patří mezi ně mutace v jednotlivých genech, intragenové přestavby i přeskupení celých genových shluků. Tyto změny mají největší účinek u genových shluků pro sekundární metabolity s modulárním způsobem syntézy. U polyketidů i neribozomálních peptidů jsou přestavby genů kódujících domény i celé moduly zodpovědné za velkou část jejich diverzity. Mimo tyto změny však může docházet i ke splývání celých genových shluků pro různé sekundární metabolity, což vede k tvorbě zcela nových látek, jako tomu bylo v případě linkosamidů.

Všechny tyto postupy, ke kterým dochází přirozenou cestou, mohou být inspirací pro genetické modifikace biosyntetických shluků. U enzymů syntetizujících polyketidy či neribozomální peptidy bylo provedeno mnoho pokusů měnících strukturu či počet jejich modulů a tím i složení a vlastnosti produkované látky.

Úpravy linkosamidů jsou zatím většinou kombinovány s chemickou syntézou prekurzorů, jako v případě mutasyntetické přípravy 4'-alkyl-4'-depropyl-linkomycinů. V budoucnu by však mohly být produkovány nové hybridní látky pomocí kombinace genů pocházejících z biosyntetických shluků různých antibiotik. Možnými kandidáty jsou na to linkomycinový shluk spolu s geny kódujícími úpravy dihydropyrrolových složek některých PBD.

## 8 Seznam použité literatury

Bachmann, B.O., Li, R.F., and Townsend, C.A. (1998). beta-Lactam synthetase: A new biosynthetic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9082-9086.

Baltz, R.H. (2010). *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37, 759-772.

Barriere, J.C., Berthaud, N., Beyer, D., Dutka-Malen, S., Paris, J.M., and Desnottes, J.F. (1998). Recent developments in streptogramin research. *Current Pharmaceutical Design* 4, 155-180.

Belova, L., Tenson, T., Xiong, L.Q., McNicholas, P.M., and Mankin, A.S. (2001). A novel site of antibiotic action in the ribosome: Interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3726-3731.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.

Bergy, M., Herr, R., and Mason, D. (1963). Antibiotic lincolnensis and method of production (US patent 3,086,912).

Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R., and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* 3, 619-627.

Bomke, C., and Tudzynski, B. (2009). Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70, 1876-1893.

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

Čermák, L., Novotná, J., Sagová-Marečková, M., Kopecký, J., Najmanová, L., and Janata, J. (2007). Hybridization analysis and mapping of the celesticetin gene cluster revealed genes shared with lincomycin biosynthesis. *Folia Microbiologica* 52, 457-462.

Challis, G.L., and Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14555-14561.

Chang, F.N., and Weisblum, B. (1967). Specificity of lincomycin binding to ribosomes. *Biochemistry* 6, 836-&.

Chung, S.-T. (1997). Fermentation, Biosynthesis, and Molecular Genetics of Lincomycin. In *Biotechnology of Antibiotics* (Marcel Dekker), pp. 165-187.

- Clardy, J., Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology* 24, 1541-1550.
- Corre, C., and Challis, G.L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural Product Reports* 26, 977-986.
- Cortes, J., Wiesmann, K.E.H., Roberts, G.A., Brown, M.J.B., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1995). Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* 268, 1487-1489.
- Demain, A. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1, 259-264.
- Firn, R.D., and Jones, C.G. (2000). The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular Microbiology* 37, 989-994.
- Fischbach, M.A. (2009). Antibiotics from microbes: converging to kill. *Current Opinion in Microbiology* 12, 520-527.
- Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews* 106, 3468-3496.
- Fischbach, M.A., Walsh, C.T., and Clardy, J. (2008). The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4601-4608.
- Garbayjaureguiberry, C., Roques, B.P., Delcambe, L., Peypoux, F., and Michel, G. (1978). NMR conformational study of iturin-A, an antibiotic from bacillus subtilis. *Febs Letters* 93, 151-156.
- Giessen, T.W., and Marahiel, M.A. (2012). Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *Febs Letters* 586, 2065-2075.
- Gilturmes, M.S., Hay, M.E., and Fenical, W. (1989). Symbiotic marine-bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246, 116-118.
- Ginolhac, A., Jarrin, C., Robe, P., Perriere, G., Vogel, T., Simonet, P., and Nalin, R. (2005). Type I polyketide synthases may have evolved through horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Evolution* 60, 716-725.
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., and Spiteller, D. (2009). Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4742-4746.
- Hahn, D.R., Gustafson, G., Waldron, C., Bullard, B., Jackson, J.D., and Mitchell, J. (2006). Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33, 94-104.

- Hansen, J.L., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2003). Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology* 330, 1061-1075.
- Hedden, P., Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., and Tudzynski, B. (2001). Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 319-331.
- Hedden, P., and Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* 444, 11-25.
- Hoeksema, H., Crum, G.F., and Devries, W.H. (1955). Isolation and purification of celesticetin. *Antibiotics annual*, 837-841.
- Hoffmeister, D., and Keller, N.P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports* 24, 393-416.
- Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C.M., Zazopoulos, E., and Bachmann, B.O. (2007). Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology* 14, 691-701.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21, 526-531.
- Jacoby, G.A., and Munoz-Price, L.S. (2005). Mechanisms of disease: The new beta-lactamases. *New England Journal of Medicine* 352, 380-391.
- Jenke-Kodama, H., and Dittmann, E. (2009). Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. *Phytochemistry* 70, 1858-1866.
- Jensen, S.E., and Paradkar, A.S. (1999). Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 75, 125-133.
- Kadlčík, S. (v přípravě). Adaptation of L-proline adenylation domain to rare substrate 4-propyl-L-proline in evolution of lincosamide antibiotics.
- Kinashi, H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *Journal of Antibiotics* 64, 19-25.
- Kinashi, H., and Shimajimurayama, M. (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces-coelicolor*. *Journal of Bacteriology* 173, 1523-1529.
- Koběřská, M. (2010). Komparativní analýza shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu. Dizertační práce. In Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie (Praha).
- Koběřská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelínková, M., Ulanová, D., Man, P., Flieger, M., and Janata, J. (2008). Sequence Analysis and Heterologous Expression of the Lincomycin Biosynthetic Cluster of the Type Strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiologica* 53, 395-401.

- Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G.J., and Muller, R. (2008). Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3058-3068.
- Kuhstoss, S., Huber, M., Turner, J.R., Paschal, J.W., and Rao, R.N. (1996). Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase. *Gene* 183, 231-236.
- Lawrence, J. (1999). Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 642-648.
- Lawrence, J.G., and Roth, J.R. (1996). Selfish operons: Horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* 143, 1843-1860.
- Lee, N., Yuen, K.Y., and Kumana, C.R. (2003). Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 63, 1511-1524.
- Lenski, R.E., and Travisano, M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification - a 10,000-generation experiment with bacterial-populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6808-6814.
- Li, W., Chou, S.C., Khullar, A., and Gerratana, B. (2009a). Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster for Tomaymycin, an SJG-136 Monomeric Analog. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2958-2963.
- Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., and Gerratana, B. (2009b). Biosynthesis of Sibiromycin, a Potent Antitumor Antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2869-2878.
- Liras, P. (1999). Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins - Cephamycins produced by Actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 75, 109-124.
- Long, S.R. (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885-1898.
- Magerlein, B.J. (1971). Modification of lincomycin. *Advances in applied microbiology* 14, 185-229.
- Miller, M.T., Bachmann, B.O., Townsend, C.A., and Rosenzweig, A.C. (2001). Structure of beta-lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagine. *Nature Structural Biology* 8, 684-689.
- Mootz, H.D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. (2002). Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *Journal of the American Chemical Society* 124, 10980-10981.
- Moyne, A.L., Cleveland, T.E., and Tuzun, S. (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *Fems Microbiology Letters* 234, 43-49.

Najmanová, L., Kutějová, E., and Polan, M. (v přípravě). Characterization of N-demethyl lincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ, pp. 7.

Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., *et al.* (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12215-12220.

Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics* 26, 449-457.

PerezLlarena, F.J., Liras, P., RodriguezGarcia, A., and Martin, J.F. (1997). A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: Amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *Journal of Bacteriology* 179, 2053-2059.

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

Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C., and Michel, G. (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Journal of Antibiotics* 39, 636-641.

Pichersky, E., Sharkey, T.D., and Gershenzon, J. (2006). Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge? *Trends in Plant Science* 11, 421-421.

Puar, M.S., Chan, T.M., Hegde, V., Patel, M., Bartner, P., Ng, K.J., Pramanik, B.N., and MacFarlane, R.D. (1998). Sch 40832: A novel thiostrepton from *Micromonospora carbonacea*. *Journal of Antibiotics* 51, 221-224.

Scherlach, K., and Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7, 1753-1760.

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

Stinear, T.P., Mve-Obiang, A., Small, P.L.C., Frigui, W., Pryor, M.J., Brosch, R., Jenkin, G.A., Johnson, P.D.R., Davies, J.K., Lee, R.E., *et al.* (2004). Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1345-1349.

Straight, P.D., Willey, J.M., and Kolter, R. (2006). Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of surfactants in raising aerial structures. *Journal of Bacteriology* 188, 4918-4925.

Ulanová, D., Novotná, J., Smutná, Y., Kameník, Z., Gazak, R., Šulc, M., Sedmera, P., Kadlčík, S., Plháčková, K., and Janata, J. (2010). Mutasyntesis of Lincomycin Derivatives with Activity against Drug-Resistant Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 927-930.

Walsh, C.T., and Fischbach, M.A. (2010). Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules. *Journal of the American Chemical Society* 132, 2469-2493.

Ward, J.M., and Hodgson, J.E. (1993). The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a super-cluster in 3 *Streptomyces*. *Fems Microbiology Letters* 110, 239-242.

Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., and Rahman, S.K. (1989). Why are secondary metabolites (natural-products) biosynthesized. *Journal of Natural Products* 52, 1189-1208.

Winter, J.M., Behnken, S., and Hertweck, C. (2011). Genomics-inspired discovery of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology* 15, 22-31.

Wu, K., Chung, L., Reville, W.P., Katz, L., and Reeves, C.D. (2000). The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251, 81-90.