

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Daniela Urbanová

Analýza genového shluku kódujícího biosyntézu manumycinového antibiotika U-62162
a způsoby jeho modifikace.

Analysis of the biosynthetic gene cluster encoding biosynthesis of the manumycin antibiotic
U-62162, and the ways of its modification.

Diplomová práce

Školitel: Ing. Miroslav Petříček, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 12. 8. 2014

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. za milé přijetí, trpělivost, odborné vedení a mnoho cenných rad během experimentální části i při sepisování práce.

Děkuji Mgr. Kateřině Petříčkové, PhD. za milé přijetí, mnoho cenných rad i praktickou pomoc během experimentální části práce.

Děkuji svým rodičům za jejich všestrannou podporu a povzbuzování během vypracovávání této práce.

Abstrakt

Bakterie rodu *Streptomyces* jsou největšími producenty antibiotik mezi mikroorganismy. Malou skupinou těchto látek jsou manumycinová antibiotika. Jejich antibiotické účinky nejsou příliš významné, zato vykazují biologické vlastnosti, které mají potenciál pro využití například v léčbě zánětů, nádorů či Alzheimerovy choroby. Struktura manumycinových látek je tvořena centrální jednotkou, na kterou se váže horní a spodní polyketidový řetězec, na konci spodního řetězce je pak většinou připojená tzv. C₅N jednotka. Látka U-62162 produkovaná *Streptomyces verdensis* se od ostatních členů manumycinové skupiny výrazně odlišuje strukturou spodního řetězce, který je zcela nasycený a postrádá C₅N jednotku. Genový shluk kódující biosyntézu U-62162 byl osekvenován a u identifikovaných ORF byly navrženy proteinové produkty. Heterologní exprese tohoto shluku ukázala, že některé geny pro syntézu horního řetězce jsou kódovány na jiném místě chromozomu. Inserční inaktivací genu *vrdER* bylo potvrzeno, že za nasycenost spodního řetězce je zodpovědná enoylreduktáza. Biosyntézy se naopak zřejmě neúčastní DSBA oxidoreduktáza, jejíž gen je na kraji tohoto shluku. Vložení genů pro syntézu C₅N jednotky nemělo za následek vznik derivátů s touto jednotkou připojenou na spodní řetězec, ať nasycený nebo nenasyčený. Příčina neúspěšného připojování není zatím objasněna.

Klíčová slova: streptomycety, *Streptomyces verdensis*, manumycinová antibiotika, U-62162, biosyntéza, polyketidy, enoylreduktáza, C₅N jednotka

Abstract

Streptomyces is the largest antibiotic-producing genus in the microbial world. Manumycin-type antibiotics are a small group of its metabolites. Their antibiotic activities are not very important but they show biological properties which can be potentially used e. g. to treat inflammation, cancer or Alzheimer's disease. The structure of manumycin compounds is formed by a central unit with connected upper and lower polyketide chain. The lower chain is mostly terminated by so called C₅N unit. The substance U-62162 produced by the strain *Streptomyces verdensis* differs significantly from the other members of the manumycin-type metabolites in the structure of the lower chain which is fully saturated and lacking the C₅N unit. The U-62162 biosynthetic gene cluster was sequenced and functions of identified open reading frames were deduced. Heterologous expressions of the cluster showed some genes required for the biosynthesis of the upper chain to be encoded on a different part of the chromosome. The insertional inactivation of the *vrdER* gene confirmed the enoylreductase to be responsible for the saturation of the lower chain. DSBA oxidoreductase, which gene is located at the edge of the cluster, is probably not involved in the biosynthesis. The insertion of genes for the biosynthesis of the C₅N unit did not result in a formation of derivatives with the unit attached to the lower chain, whether saturated nor unsaturated. The cause of the failed attachment is not yet understood.

Keywords: streptomyces, *Streptomyces verdensis*, manumycin antibiotics, U-62162, biosynthesis, polyketides, enoylreductase, C₅N unit

Obsah

Abstrakt	3
Klíčová slova	3
Obsah	4
Seznam zkratk	5
1. Úvod.....	6
2. Cíle práce	7
3. Přehled literatury.....	8
3.1. Bakterie rodu <i>Streptomyces</i>	8
3.1.1. Sekundární metabolity streptomycet	9
3.2. Manumycinová antibiotika	10
3.2.1. Struktura manumycinových antibiotik.....	11
3.2.2. Biologická aktivita manumycinových antibiotik	14
3.2.3. Antibiotikum U-62162	19
3.2.4. Biosyntéza manumycinových antibiotik.....	20
3.3. Biosyntéza polyketidových látek.....	25
3.3.1. Biosyntéza mastných kyselin u bakterií.....	25
3.3.2. Biosyntéza polyketidů	26
3.3.3. Pomocné enzymy PKS	27
4. Materiál a metody.....	32
4.1. Materiál	32
4.1.1. Bakteriální kmeny.....	32
4.1.2. Vektory a plazmidy	34
4.1.3. Kultivační média.....	37
4.1.4. Roztoky přidávané do médií	40
4.1.5. DNA oligonukleotidy, velikostní standardy a próby	40
4.1.6. Enzymy, protilátky a standard U-62162	42
4.1.7. Pufry a roztoky	42
4.2. Metody	48
4.2.1. Metody izolace DNA.....	48
4.2.2. Metody další práce s DNA	51
4.2.3. Metody transformace buněk plazmidovou DNA	57
4.2.4. REDIRECT [®] technologie	58
4.2.5. Analytické a separační metody	64
5. Výsledky	67
5.1. Sekvence genového shluku kódujícího syntézu U-62162.....	67
5.1.1. Sekvenování kosmidu pSV8.....	67
5.1.2. Identifikace ORF v genovém shluku U-62162	68
5.2. Přenos a heterologní exprese genového shluku pro biosyntézu U-62162 v geneticky upravených kmenech	68
5.2.1. Příprava kosmidu obsahujícího celý genový shluk U-62162.....	70
5.2.2. Přenos kosmidu pSV5_all do <i>S. lividans</i> K4-114 a <i>S. coelicolor</i> M512.....	71
5.2.3. Extrakce a analýza antibiotik produkovaných heterologními hostiteli	72
5.3. Delece genů <i>vrDER</i> a <i>vrDDS</i> v genovém shluku U-62162 ve <i>S. verdensis</i>	73
5.3.1. Delece <i>vrDDS</i> a <i>vrDER</i> v pSV5 a pSV1 a jejich přenos do <i>S. verdensis</i>	74
5.3.2. Ověření delece <i>vrDDS</i> a <i>vrDER</i> ve <i>S. verdensis</i>	75
5.3.3. Analýza produkovaných antibiotik.....	76
5.4. Vložení genů pro biosyntézu C ₅ N jednotky do <i>S. verdensis</i> Δ <i>vrDER</i> a do původního kmene	78
5.4.1. Vložení genů <i>asuD1</i> – <i>asuD3</i> do <i>S. verdensis</i> a <i>S. verdensis</i> Δ <i>vrDER</i>	78
5.4.2. Analýza produkovaných antibiotik.....	79
6. Diskuze.....	81
7. Souhrn	87
8. Seznam použité literatury.....	88

Seznam zkratek

3,4-AHBA	3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina
ACP	„Acyl Carrier Protein“
AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
ALAS	5-aminolevulát syntáza
ALA	5-aminolevulát
ArCP	„Aroyl Carrier Protein“
ASA	L-aspartát-4-semialdehyd
CHC-CoA	cyklohexylkarbonyl-CoA
CLF	„Chain-Lenght Factor“
CoA	koenzym A
DH	dehydratáza
DHA/DHAP	dihydroxyaceton/dihydroxyacetonfosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DTE	dithioerythriol
DTT	dithiothreitol
ER	enylreduktáza
FAS	syntáza mastných kyselin
FRT	místa rozeznávaná FLP rekombinázou
ICE	kaspáza 1 (interleukin-1- β -konvertující enzym)
IKK	I κ B kináza
IL	interleukin
KR	ketoreduktáza
KS	β -ketoacyl-ACP syntáza
MAT	malonyl-CoA:ACP transacyláza
mFAS	savčí syntázy mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
NBD	nukleotid-vazebná doména
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKS	polyketid syntáza
PLP	pyridoxalfosfát
RE	restrikční endonukleáza
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
ToF	doba letu („Time of Flight“)
ToF-MS	„Time of Flight“ hmotnostní spektrometrie
UHPLC-DAD	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
YFG	gen našeho zájmu (your favorite gene)

1. Úvod

Bakterie patří mezi nejrozšířenější skupiny organismů na světě. Podle odhadů žije na Zemi kolem 5×10^{30} jedinců patřících k 10^7 až 10^9 druhům, z nichž většina nám však zůstává zatím neznámá (SCHLOSS a HANDELSMAN 2004). Bakterie najdeme ve všech prostředích - ve vodě, v půdě, ve vzduchu, uvnitř či na povrchu mnohobuněčných organismů. Jsou schopné žít ve zcela extrémních podmínkách – v nejvyšších vrstvách atmosféry, v solných jezerech, ve vroucích vodách horkých gejzírů i v arktickém ledu.

Bakterie jsou pro lidi velice významnou skupinou organismů a to nejen kvůli patogenním vlastnostem některých z nich. Nacházejí uplatnění v mnoha oblastech, například v potravinářském, farmaceutickém, textilním či papírenském průmyslu nebo v ochraně životního prostředí. Jedním z využitelných produktů získaných z bakterií jsou sekundární metabolity. Ty, na rozdíl od primárních metabolitů, nejsou nezbytné pro přežití bakterií, nicméně jedincům poskytují různé výhody například v konkurenčním boji či v nehostinných podmínkách. Významnými producenty těchto metabolitů jsou bakterie rodu *Streptomyces*. Podle odhadů produkují tisíce různých druhů těchto látek, z nichž nejvýznamnější je jistě skupina antibiotik. Streptomycety jsou největšími producenty antibiotik mezi mikroorganismy, syntetizují asi 70 % všech dosud známých antibiotik, z nichž některá již našla svá uplatnění v humánní medicíně a zvěrolékařství.

Malou skupinou antibiotik produkovaných streptomycetami jsou manumycinová antibiotika, která mají díky svým antibakteriálním, protizánětlivým a kancerostatickým účinkům velký potenciál pro využití v medicíně. Jedná se o malé molekuly, tvořené centrálním šestičlenným kruhem, tzv. mC_7N jednotkou, na kterou jsou napojeny dva polyketidové řetězce – horní a spodní. Horní řetězec se liší délkou, větvením a množstvím dvojných vazeb mezi jednotlivými typy antibiotik a je z velké části zodpovědný za specifické biologické vlastnosti manumycinů. Spodní řetězec je mnohem více konzervovaný a u většiny známých látek se jedná o šestiuhlíkatý trien (syntetizovaný jako triketid), případně osmiuhlíkatý tetraen. U naprosté většiny zatím známých manumycinových látek se na konec tohoto řetězce váže pětiuhlíkatá kruhová jednotka, tzv. C_5N .

Výjimečným členem této skupiny antibiotik, co se týče struktury, je látka zvaná U-62162. Je zatím jediným známým manumycinovým antibiotikem, které má zcela redukovaný spodní řetězec, navíc bez C_5N jednotky. Absence dvojných vazeb je zřejmě způsobena přítomností enzymu, který se nevyskytuje v klasterech pro syntézu ostatních manumycinových látek. Protože biosyntéza těchto polyketidových řetězců probíhá obdobným způsobem jako syntéza všech ostatních polyketidových látek, můžeme předpokládat, že za nasycenost vazeb je zodpovědný enzym příbuzný známým enoyl reduktázám. Nabízí se také otázka, zda existuje souvislost mezi absencí C_5N jednotky a redukovaným řetězcem. Jinými slovy, zda by enzym, připojující C_5N jednotku, byl schopen rozeznat také redukovaný spodní řetězec U-62162 a jednotku na něj připojit, nebo zda je závislý na přítomnosti dvojných vazeb případně na určité délce spodního řetězce.

Dále by bylo dobré ověřit, zda se na biosyntéze U-62162 nějakým způsobem podílí také enzym homologní se skupinou DSBA oxidoreduktáz, jehož gen se nachází na kraji genového shluku kódujícího biosyntézu tohoto antibiotika.

Porovnání biologických aktivit přírodních a vytvořených mutantních antibiotik může pomoci k porozumění role různých částí molekul v těchto aktivitách. Identifikace funkce a specifity jednotlivých enzymů účastnících se syntézy manumycinových antibiotik je důležitá pro možnost následných specifických modifikací těchto látek, vedoucích k vylepšení jejich biologických vlastností a následném využití v humánní medicíně.

2. Cíle práce

- Sekvence části genového shluku kódujícího enzymy biosyntézy antibiotika U-62162 a identifikace genů
- Heterologní exprese genového shluku pro biosyntézu U-62162 v *Streptomyces coelicolor* a *Streptomyces lividans*
- Disrupce genu pro enoyl reduktázu a pro DSBA oxidoreduktázu v genovém shluku pro biosyntézu U-62162, analýza produkovaných metabolitů, testy biologických aktivit
- Vložení genů pro syntézu C₅N jednotky do mutantního a původního kmene, analýza produkovaných metabolitů, testy biologických aktivit

3. Přehled literatury

3.1. Bakterie rodu *Streptomyces*

Organizmy jsou často pojmenovávány podle některé ze svých specifických vlastností. Název *Streptomyces* můžeme přeložit z řečtiny jako „řetízkové houby“. Přestože na první pohled jsou tyto organizmy opravdu podobné nižším houbám, jedná se o bakterie patřící do čeledi *Streptomycetaceae*, řád *Actinomycetales*. Jsou vláknité, grampozitivní a obligátně aerobní. Jejich největším rezervoárem je provzdušněná půda, nicméně najdeme je i na jiných místech, jako je například mořské dno, sladké vody nebo povrch rostlin a těla živočichů a člověka v případě patogenních druhů (např. *Streptomyces somaliensis* a *S. sudanensis* u lidí; *S. caviscabies* a *S. ipomoeae* u rostlin). Díky své schopnosti využívat široké spektrum zdrojů uhlíku (včetně chitinu, škrobu, pektinu, ligninu a jiných) jsou často součástí přírodních mikrobiálních společenstev, které kolonizují a degradují organický materiál.

Jak už vyplývá z jejich názvu, většina streptomycet má vláknitý růst a tvoří komplexní vegetativní substrátová mycelia. Ty produkují reprodukční mycelia – větvené vzdušné hyfy, které diferencují v řetízky spór. Exospóry streptomycet jsou méně odolné než endospóry, nicméně dokáží buňky ochránit například před vysycháním během nepříznivých půdních podmínek. Disperzi spór je zajištěn přenos bakterií do nových lokalit.

Vzdušné hyfy se vyvíjejí na úkor vegetativního mycelia. Vylučují proteázy a další enzymy, které u buněk v substrátovém myceliu vyvolávají morfologické a biochemické změny vedoucí ke smrti. Biomasa zaniklých buněk je pak využita na podporu růstu vzdušných hyf a sporulaci. V této fázi vývoje je kolonie poměrně zranitelná, neboť lyzující mycelium může být snadno napadené a přerostlé jinými mikroorganismy. To je zřejmě jeden z důvodů, proč během této fáze dochází k produkci sekundárních metabolitů, mezi kterými hrají významnou roli antibiotika. Téměř všechna známá antibiotika jsou produkována právě během fáze formování vzdušných mycelií. Předpokládá se, že díky svým schopnostem inhibovat enzymy a různé buněčné procesy slouží k ochraně kolonií proti přerůstání jinými organismy (CHATER a kol. 2010; MIGUÉLEZ a kol. 1999).

Genom streptomycet je tvořen jedním lineárním chromozomem s geny uspořádanými do centrální oblasti a dvou ramen. Centrální oblast je vysoce konzervovaná a kóduje naprostou většinu esenciálních proteinů. Zhruba uprostřed se v ní nachází *oriC*. Po stranách centrální oblasti leží nestejně dlouhá ramena (BENTLEY a kol. 2002). Genom je neobvykle velký, jeho velikost se pohybuje většinou v rozmezí 8 – 10 Mbp. Pro srovnání genom *Escherichia coli* (K-12) má pouze 4,6 Mbp. První kompletně osekvenovaný genom (8,67 Mbp) bakterie tohoto rodu byl publikován v roce 2002 (BENTLEY a kol. 2002) a patří bakterii *Streptomyces coelicolor* kmen A3(2). V době osekvenování byl pokládán za genom s největším počtem genů ze všech bakterií. Předpokládalo se, že obsahuje 7 825 genů kódujících proteiny. Genom streptomycet je výjimečný také zastoupením GC párů – jejich množství se pohybuje okolo 70 % (u *E. coli* je to přibližně 50 %) (BENTLEY a kol. 2002).

3.1.1. Sekundární metabolity streptomycet

Bakterie rodu *Streptomyces* produkují tisíce různých sekundárních metabolitů, které se liší svými vlastnostmi i velikostí. V genomu každé z těchto bakterií lze nalézt desítky různých genových shluků kódujících sekundární metabolity. Ty nejsou nepostradatelné pro růst a reprodukci buněk, ale je pravděpodobné, že mnohé z nich dodávají svým producentům unikátní vlastnosti, které jim pomáhají v konkurenci s okolními mikroorganismy včetně blízce příbuzných streptomycet.

Zajímavým sekundárním metabolitem je těkavý geosmin (bicyklický alkohol $C_{12}H_{22}O$), který bakteriím dodává specifický „zemitý“ zápach (GERBER a LECHEVALIER 1965). Dále například bialaphos produkovaný *S. hygrosopicus* a *S. viridochromeogenes*, působící jako přírodní herbicid (BAYER a kol. 1972). Mnohé streptomycety produkují enzymy degradující přírodní polymery (amylázy, dextranázy, pektinázy, proteázy, lipázy) a řada druhů tvoří pigmenty.

Nicméně nejvýznamnější skupinou sekundárních metabolitů jsou bezesporu antibiotika. Rod *Streptomyces* je největší rod v mikrobiálním světě produkující antibiotika. Podle matematického odhadu se předpokládá, že bakterie tohoto rodu produkují více než 100 000 různých antimikrobiálních látek (WATVE a kol. 2001). Z tohoto množství je ale zatím známá jen velmi malá část. První antibiotikum produkované tímto rodem – streptothricin - bylo objeveno v roce 1942 (WAKSMAN a WOODRUFF 1942, citováno podle WAKSMAN 1943). Zhruba v osmdesátých letech 20. století začalo systematické vyhledávání nových látek s antibiotickými vlastnostmi syntetizovaných bakteriemi rodu *Streptomyces* v přírodních izolátech, kterých je díky tomu v dnešní době známo již několik tisíc.

Mnohé z objevených látek jsou potenciálně využitelné v medicíně a to nejen díky svým antibakteriálním účinkům. Řada z nich vykazuje další významné vlastnosti. Proti plísním působí například nystatin (produkovaný bakterií *Streptomyces noursei*), amphotericin B (*S. nodosus*) a natamycin (*S. natalensis*). Protinádorové účinky má migrastatin (*S. platensis*), který inhibuje metastázi rakovinných buněk (SHAN a kol. 2005). V chemoterapii jsou používány bleomyciny (*S. verticillus*), které způsobují zlomy v DNA (HECHT 2000). Skupina avermectinů (*S. avermitilis*) vykazuje antihelmintické vlastnosti (BURG a kol. 1979).

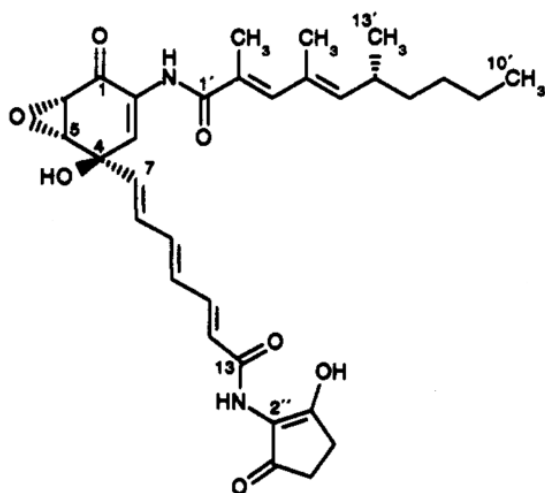
Největší skupinou jsou látky s antibakteriálními účinky. Mnohé z nich se používají v humánní medicíně a zvěrolékařství, případně ve vědeckém výzkumu. Jsou to například chloramphenicol (*S. venezuelae*), daptomycin (*S. roseosporus*), fosfomycin (*S. fradiae*), lincomycin (*S. lincolnensis*), neomycin (*S. fradiae*), puromycin (*S. alboniger*), streptomycin (*S. griseus*), tetracyklin (*S. rimosus*, *S. aureofaciens*), kanamycin (*S. kanamyceticus*), erytromycin (*S. erythraeus*) a chlortetracyklin (*S. aureofaciens*). Streptomycin byl díky své schopnosti inhibovat proteosyntézu (SPEYER a kol. 1962) dlouho používán pro léčbu tuberkulózy (HINSHAW a FELDMAN 1946).

3.2. Manumycinová antibiotika

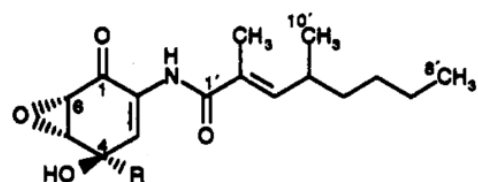
Manumycinová antibiotika jsou malá skupina sekundárních metabolitů produkovaná výhradně zástupci bakterií rodu *Streptomyces*. Členové této skupiny sdílejí podobnou strukturu molekul a biologické a chemické vlastnosti. Podle způsobu syntézy a struktury se řadí mezi polyketidové látky. Název manumycinových antibiotik je odvozen od prvního objeveného antibiotika této skupiny – manumycinu A (BUZZETTI a kol. 1963, citováno podle ZEECK a kol. 1987). Ten je produkován bakteriemi *Streptomyces parvulus* Tü 64, které byly získány z půdního vzorku. Další zástupci byly poté identifikovány během systematického vyhledávání antibiotik v přírodních izolátech. Použity byly metody založené na sledování antibakteriálních vlastností, na inhibici Ras-farnesyltransferáz a kaspázy-1. Několik látek bylo zjištěno pomocí necíleného chemického screeningu. Specifickým přístupem je vyhledávání na základě známé sekvence genu pro ALAS (5-aminolevulát syntázu), který je zcela charakteristický pro syntézu tzv. C₅N jednotky vyskytující se ve struktuře manumycinových antibiotik (viz kap. 3.2.1) (PETŘÍČEK a kol. 2006). V dnešní době tak známe již zhruba čtyři desítky různých manumycinových látek. Novým přístupem jsou uměle připravená antibiotika pomocí metod genového inženýrství a pomocí cíleného podsouvání nových prekurzorů pro syntézu přírodním i modifikovaným bakteriálním kmenům.

Metabolity manumycinového typu jsou produkovány během stacionární růstové fáze a najdeme je buď v myceliu (např. manumycin A, B, kolabomycin A, D) nebo v médiu (např. asukamycin, U-62162). Po izolaci se většinou jeví jako nažloutlý amorfni prášek nestabilní na světle. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje mezi 400 a 600 (manumycin A - 550).

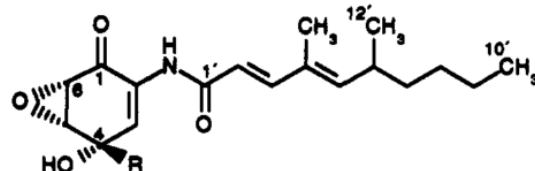
Manumyciny jsou většinou produkovány jako skupina kometabolitů, to znamená, že jeden kmen produkuje více než jeden typ manumycinového metabolitu. Tyto kometabolity se mezi sebou obvykle liší pouze ve struktuře horního řetězce. Tak je tomu například u manumycinů A, B a C (Obr. 1) produkovaných *Streptomyces parvulus* Tü64 (ZEECK a kol. 1987; SATTLER a kol. 1993), manumycinů E, F a G produkovaných *Streptomyces* sp. WB-8376 (SHU a kol. 1994) nebo TMC-1 A, B, C a D syntetizovaných *Streptomyces* sp. A-230 (KOHNO a kol. 1996). Některé kometabolity se liší pouze v přítomnosti, respektive nepřítomnosti C₅N podjednotky, jako v případě nisamycinu a alisamycinu (Obr. 2) u *Streptomyces* sp. K106 (HAYASHI a kol. 1993, FRANCO a kol. 1991). Jeden z kometabolitů je většinou majoritní, ostatní látky jsou syntetizované v podstatně menším množství a jsou tedy tzv. kongenery (např. manumycin A je majoritní látka, manumyciny B a C jsou kongenery, SATTLER a kol. 1993). Jedním z důvodů vzniku kometabolitů je zřejmě ne zcela specifický výběr prekurzorů během syntézy horního řetězce.



Manumycin A

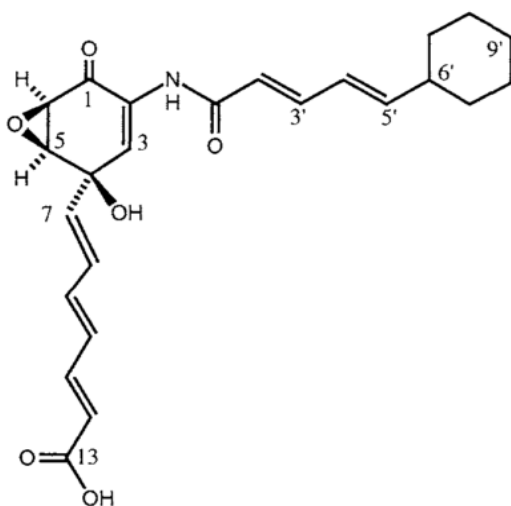


Manumycin B

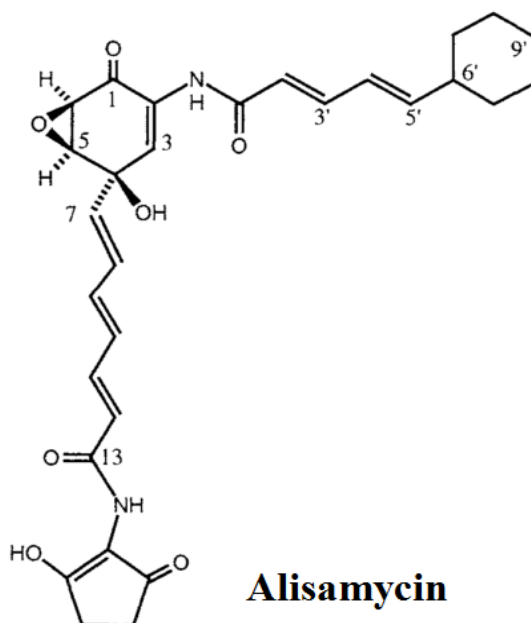


Manumycin C

Obr. 1: Struktura kometabolitů produkovaných *Streptomyces parvulus* Tü64 - manumycinu A, B a C. Substituent „R“ u manumycinu B a C je shodný s tímto substituentem u manumycinu A. Převzato z SATTLER a kol. (1993).



Nisamycin



Alisamycin

Obr. 2: Struktura kometabolitů produkovaných *Streptomyces* sp. K106 – nisamycinu a alisamycinu. Převzato a upraveno z HAYASHI a kol. (1994a).

3.2.1. Struktura manumycinových antibiotik

Charakteristickými strukturními rysy všech členů manumycinové skupiny antibiotik jsou tři jednotky – centrální šestičlenný kruh tzv. mC_7N jednotka a dva na něj vázané polyketidové řetězce – horní a spodní. Většina manumycinů obsahuje také tzv. C_5N podjednotku, která ukončuje spodní řetězec (Obr. 3)

Podjednotka mC_7N je z chemického hlediska 2-amino-4-hydroxycyklohex-2-enon. Je nejvíce konzervovanou strukturou a nejcharakterističtější rysem manumycinové skupiny antibiotik. mC_7N je lokalizována v centru molekuly a je významná svými substituenty, které se na ní váží v poloze *meta*, na což se odkazuje „*m*“ v jejím názvu. Na C2 se amidovou vazbou váže horní řetězec, na C4 je připojen spodní řetězec. Uhlíky pět a šest mohou vázat kyslíkový substituent. Podle druhu substituentu rozdělujeme manumyciny na dva typy. Typ I obsahuje na C5/C6 epoxidovou skupinu (např. asukamycin, Obr. 5). Typ II má na C5 hydroxylovou skupinu (např. manumycin D, Obr. 5) (SATTLER a kol. 1998). Zvláštním typem jsou relativně nedávno objevené chinikomyciny. Chinikomycin A váže na C6 atom chloru a spodní řetězec je navázán přes C5 (Obr. 5) (LI a kol. 2005).

Horní řetězec je zdrojem většiny odlišností mezi manumyciny a jeho struktura nejvíce ovlivňuje vlastnosti daného antibiotika. Je tvořen zbytkem mastné kyseliny, který je přes dusík navázán na mC_7N . Jednotlivé látky se mezi sebou liší v délce řetězce, počtu a umístění dvojných vazeb (zatím známo jedna až pět), počtu a umístění methylací (zatím známo nula až tři) a zakončující skupinou. Ta je dána způsobem syntézy – biosyntetická startovací jednotka horního řetězce se po sestavení molekuly antibiotika stává zakončující skupinou tohoto řetězce. Může jí být různá alifatická nebo alicyklická skupina od methylu až po větvený hexan nebo cyklohexan například u asukamycinu. Podle typu horního řetězce rozlišujeme manumyciny opět na dva druhy. Typ A má lineární polyketidový řetězec (např. kolabomycin D), typ B má větvený horní řetězec (např. manumycin A) (Obr. 5). Dalším zdrojem odlišností je různá stereochemie řetězce. Celkem je nyní známo přes 20 různých horních řetězců.

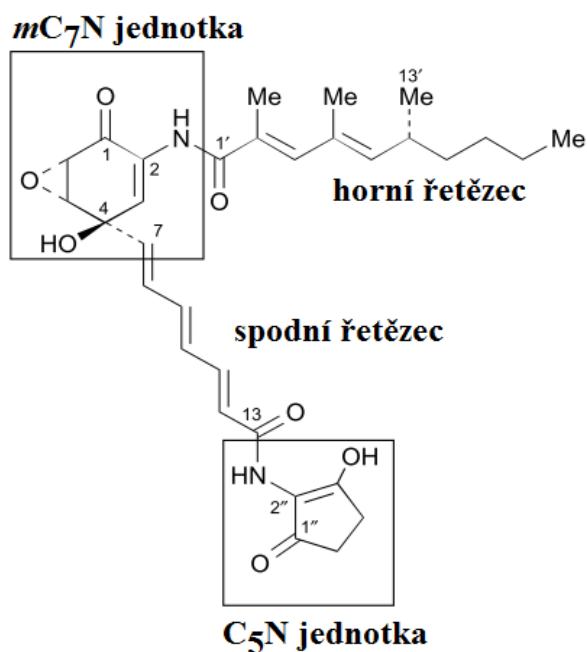
Spodní řetězec je spolu s mC_7N nejvíce konzervovanou strukturou. Většinou je tvořen trienovým šestiuhlíkatým řetězcem (syntetizován jako triketid), jehož dvojně vazby jsou v poloze *trans*. Existují ale také antibiotika s tetraenovým osmiuhlíkatým řetězcem (syntetizované jako tetraketid), např. kolabomycin A a D (GROTE a ZEECK 1988, SATTLER a kol. 1998). Úplnou výjimkou, co se týče struktury spodního řetězce, je antibiotikum U-62162, které má, zatím jako jediné známé, tento řetězec nasycený a navíc syntetizovaný pouze jako diketid. Řadí se proto do samostatné skupiny typu C (SLECHTA a kol. 1982).

Celkem tedy rozdělujeme manumyciny do pěti skupin. Skupina IA (např. asukamycin), IB (např. manumycin A), IIA (např. kolabomycin D), IIB (např. manumycin D) a skupina IC (U-62162) (Obr. 5).

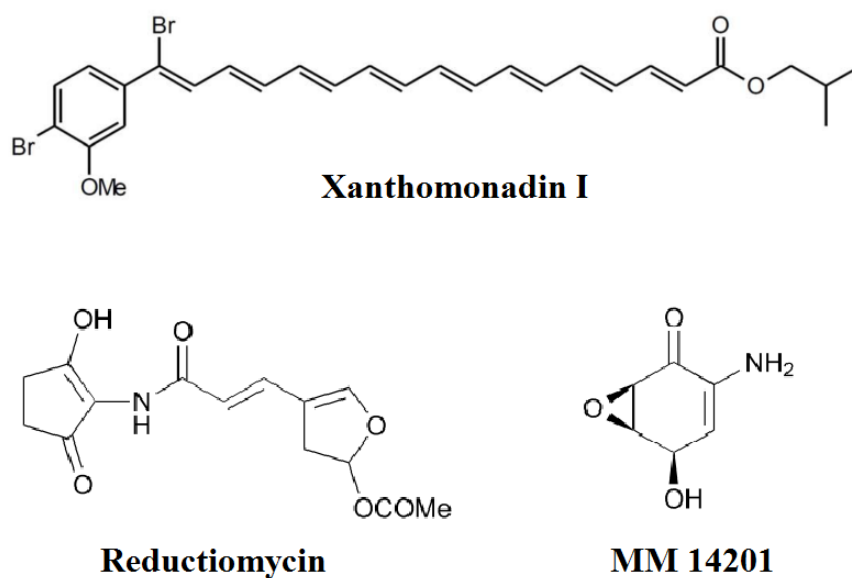
U většiny antibiotik je spodní řetězec zakončen tzv. C_5N jednotkou, která je druhým nejcharakterističtější rysem manumycinových antibiotik. Chemicky se jedná o 2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon, který je ke spodnímu řetězci připojen amidovou vazbou. Tuto strukturu nenajdeme pouze u antibiotik U-62162 (SLECHTA a kol. 1982) a nisamycinu (HAYASHI a kol. 1993), která mají řetězec zakončený karboxylovou skupinou.

Jakkoli jsou výše uvedené strukturální jednotky pro manumyciny typické, vyskytují se také u jiných nemanumycinových látek. mC_7N najdeme například u MM 14201 (Obr. 4), kde ale postrádá navázané substituenty (BOX a kol. 1983). Dále u ansatrienin A a rifamycinu L, u kterých je však syntetizovaná odlišným způsobem (WEBER a kol. 1981; LANCINI a kol. 1969). Polyketidové řetězce jsou součástí mnoha sekundárních metabolitů, jako jsou například xanthomonadiny (Obr. 4) (ANDREWES a kol. 1976) či lipomycin (KUNZE a kol.

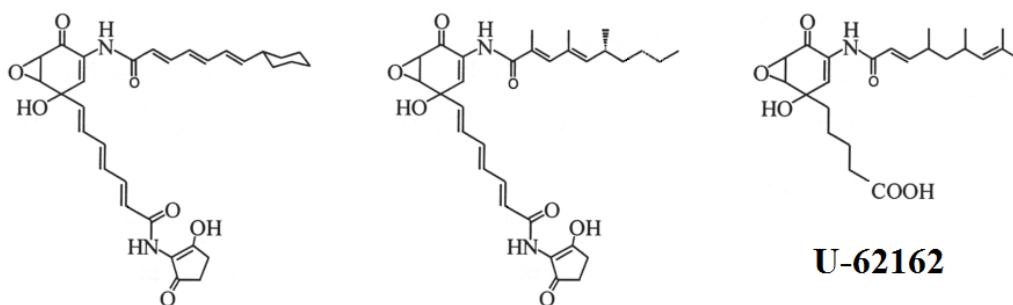
1972). C_5N jednotka se vyskytuje v bafilomycinu B_1 (WERNER a kol. 1984), moenomycinu A (KURZ a kol. 1998) nebo reductiomycinu (Obr. 4) (SHIMIZU a TAMURA 1981).



Obr. 3: Strukturální jednotky manumycinových antibiotik, ukázáno na příkladu manumycinu A. Převzato z SATTLER a kol. (1998).



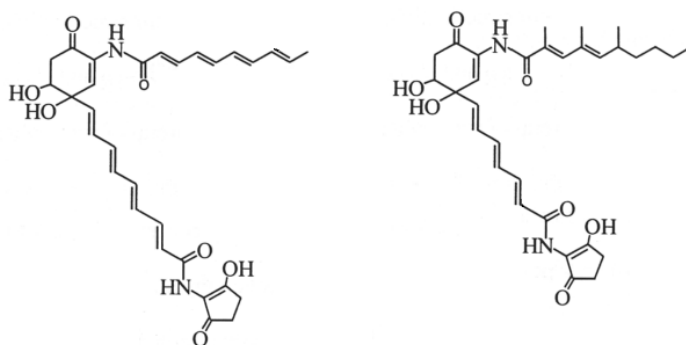
Obr. 4: Struktura látek nemanumycinového typu obsahující jednotky typické pro manumyciny. Xanthomonadin I s polyketidovým řetězcem, reductiomycin s C_5N jednotkou a MM 14201 s mC_7N . Převzato z SATTLER a kol. (1998), SCHÖNER a kol. (2014).



Asukamycin

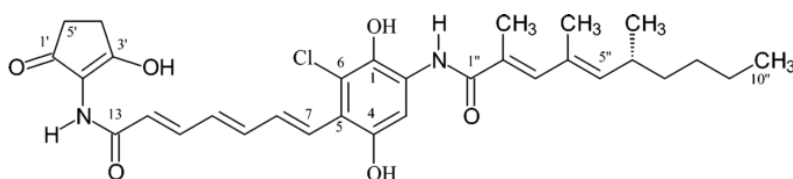
Manumycin A

U-62162



Kolabomycin D

Manumycin D



Chinikomycin A

Obr. 5: Rozdíly ve struktuře manumycinových antibiotik: Typ IA asukamycin, typ IB manumycin A, typ IIA kolabomycin D, typ IIB manumycin D, typ IC U-62162. Zcela nový typ chinikomycin A. Převzato a upraveno z HU (2000) a LI a kol. (2005).

3.2.2. Biologická aktivita manumycinových antibiotik

Skupina manumycinových metabolitů vykazuje široké spektrum biologických aktivit, což je jedním z hlavních důvodů jejich intenzivního studia.

Protinádorové účinky

V roce 1993 se zjistilo, že manumycin A a v menší míře také manumyciny B a C inhibují Ras-farnesyltransferázy (HARA a kol. 1993). Díky tomu se manumycin A stal potenciálním protinádorovým lékem.

Ras proteiny jsou rodina membránových GTP-vázajících proteinů, které hrají klíčovou roli při kontrole a regulaci růstu a dělení buněk. Tyto proteiny jsou aktivní pokud váží GTP, v tomto stavu spouští sérii signálních kaskád vedoucích k buněčné proliferaci. Při vazbě GDP

jsou neaktivní a procesy vedoucí k buněčnému dělení se zastavují. Mutantní Ras proteiny nedokáží hydrolyzovat GTP na GDP a proto jsou neustále v aktivním stavu. Díky tomu dochází k nekontrolovanému buněčnému růstu a dělení vedoucímu ke vzniku nádoru. Z tohoto důvodu se Ras proteiny řadí mezi lidské onkogeny. Mutantní formy *ras* genů jsou mezi nejčastějšími genetickými abnormalitami spojenými s lidskými nádory. Vyskytují se u více než poloviny nádorů tlustého střeva a ve více jak 90% případů nádorů slinivky břišní (GIBBS a kol. 1994).

Pro funkčnost Ras proteinů je nutná řada posttranslačních modifikací. Jednou z prvních a nezbytných je navázání farnesylové skupiny, přes kterou se následně protein váže k membráně. Daný krok je katalyzován enzymem Ras-farnesyltransferázou. Proto se tento enzym stal jedním z cílů v protinádorové léčbě. Pokud by byl zablokován, Ras protein by se nemohl navázat přes farnesylovou skupinu k membráně, nedošlo by k přenosu signálu vedoucímu k proliferaci do buňky a růst nádoru by se zastavil.

Manumycin A inhibuje tento enzym díky přítomnosti epoxidu na *mC₇N* centrální jednotce a díky hornímu řetězci, který má podobnou strukturu jako farnesylpyrofosfát, substrát Ras-farnesyltransferázy. Dochází tedy ke kompetitivní inhibici. Spodní řetězec a *C₅N* jednotka se na této biologické aktivitě nepodílí (HARA a kol. 1993).

Výhodou manumycinu A je také jeho vysoká specifita k farnesyltransferázám oproti geranyl-geranyltransferázám, podílejících se v buňkách rovněž na prenylaci, které rozeznává až při 40× vyšší koncentraci. Díky tomu nedochází k poškození zdravých buněk (HARA a kol. 1993).

Skrze inhibici Ras-farnesyltransferáz manumycin A blokuje proliferaci například lidských buněk hepatocelulárního karcinomu (NAGASE a kol. 1996). Osvědčil se také v kombinaci s hypericinem (fotoaktivovatelný pigment z *Hypericum perforatum* – třesalky tečkované), neboť zvyšuje jeho antiproliferační a apoptotické působení na buňky adenokarcinomu. Kombinovaná léčba redukuje množství farnesylovaného i nefarnesylovaného Ras proteinu více než léčba jen jednou z těchto látek (SAČKOVÁ a kol. 2011).

Manumycin A by mohl být používán také v prevenci rakoviny tlustého střeva, která je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním v České republice. Shluky zvětšených slizničních krypt (ACF) jsou jednou z prvních pozorovatelných změn v tlustém střevě ukazujících na zvýšené riziko vzniku karcinomu. Časem se mohou vyvíjet v léze a posléze rakovinu. ACF mají velmi často mutace Ras proteinů. Manumycin A díky svému působení na farnesyltransferázy dokáže efektivně snižovat počet ACF a je proto kandidátem na chemoprevenci kolorektálního karcinomu (TSUDA a kol. 2013).

Manumycin A také zvyšuje cytotoxický efekt paclitaxelu (inhibitoru depolymerizace tubulinu) na buňky anaplastického karcinomu štítné žlázy. Na některé typy těchto nádorových buněk dokonce efektivně působí i samostatný manumycin A. Cytotoxický účinek obou látek byl potvrzen také *in vivo* na myších a nebyla zaznamenána žádná mortalita ani morbidita způsobená tímto léčením (YEUNG a kol. 2000). Manumycin A a paclitaxel indukují v buňkách apoptózu tím, že způsobují přesun proteinů Bax z cytosolu do mitochondrií. Následuje vylití cytochromu *c* a spuštění kaspázové kaskády vedoucí k programované buněčné smrti (PAN a kol. 2005a).

V lidských buňkách rakoviny slinivky a osteosarkomu manumycin A indukuje strukturální změny charakterizované jako autofagie. V cytoplazmě jsou rozeznatelné autofagosomy, které zřejmě vznikají jako důsledek inhibice farnesyltransferáz. Zatím není zřejmé, zda autofagie vyvolaná chemoterapeutickými léčivými rakovinné buňky chrání nebo naopak zabíjí. Může se ale jednat o alternativní buněčnou smrt (PAN a kol. 2008).

Manumycin A dokáže vyvolávat smrt nádorových buněk také nezávisle na inhibici farnesyltransferáz. Děje se tak díky indukci produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které nezávisle na kaspázách způsobují dvouvláknové zlomy DNA a tím spouští buněčné odpovědi, které vedou k opravě DNA nebo k buněčné smrti (PAN a kol. 2005b). Tímto způsobem spouští apoptózu v buňkách myeloidní leukemie, kde indikují produkci oxidu dusnatého, který následně způsobuje poškození DNA. Účinek zvyšuje methoxyamin, inhibitor oprav chybných bází DNA. Vzniklá poškození DNA jsou tak méně opravovaná a snadněji dochází ke spuštění apoptózy (SHE a kol. 2005).

Nicméně další výzkumy ukázaly, že manumycinem A stimulované ROS mohou působit také skrze kaspázy. Dokáží spustit kaspázovou kaskádu a defosforylovat a štěpit některé proteiny signálních kaskád vedoucích k proliferaci buněk (např. Akt, Raf, Mek) a to celé nezávisle na inhibici Ras (SEARS a kol. 2008).

Působení manumycinu A na buňky glioblastomu, nej malignějšího gliomu mozku, přineslo další zajímavé poznatky. Manumycin A v těchto buňkách indukuje apoptózu zvýšením produkce ROS. Nicméně potlačení produkce ROS ochránilo buňky před manumycinem-indukovanou inhibicí Ras. To by mohlo znamenat, že k inhibici Ras manumycinem A dochází následkem zvýšené hladiny ROS (DIXIT a kol. 2009).

Manumycin A dokáže vyvolat také neapoptotickou a neautofagickou cytoplazmatickou vakuolizační smrt. Tento jev byl pozorován v buňkách triple-negativního karcinomu prsu, který má silné antiapoptotické mechanismy a patří díky tomu mezi nejagresivnější a nejhůře léčitelné nádory prsu. Cytoplazmatická vakuolizační smrt zřejmě nastává vyvoláním stresu v endoplazmatickém retikulu expresí s mikrotubuly-asociovaného proteinu LC3 a proteinu p62. Pozitivním faktem pro případné použití v terapeutické praxi je, že tato smrt je indukována pouze v nádorových buňkách a ne v normálních savčích epiteliálních buňkách (SINGHA a kol. 2013).

Je zřejmé, že o působení manumycinu A v buňkách máme zatím jen útržkovité poznatky a že se jedná o velmi komplexní a složitý děj.

Kromě manumycinu A působí cytotoxicky na několik nádorových buněčných linií také antibiotika TMC1 A, B, C a D a manumycin D. Potlačují růst například buněk rakoviny tlustého střeva a vaječníků, promyelocytické leukemie a epitheloidního sarkomu. Nicméně v porovnání s manumycinem A je jejich aktivita nižší (KOHNO a kol. 1996). Asukamycin působí toxicky na několik buněčných linií lidské myeloidní leukemie a astrocytomů a jeho účinek je spojený s aktivací kaspáz 8 a 3 (SHIPLEY a kol. 2009). Slabou protinádorovou aktivitu proti některým rakovinným buňkách vykazuje také alisamycin (FRANCO a kol. 1991), kolabomycin (GROTE a kol. 1988) a manumyciny E, F a G (SHU a kol. 1994).

Protizánětlivé účinky

Manumycin A inhibuje uvolňování IL-1 β a IL-6 z buněk monocytů a makrofágů a snižuje transkripci mnoha prozánětlivých genů (STRIZ a kol. 2013). Manumycinová antibiotika EI-1511-3, EI-1511-5, EI-1625-2, manumycin A, B, G, U-56,407, *ent*-alisamycin a kolabomycin E vykazují inhibiční efekt na kaspázu 1 (dříve interleukin-1 β -konvertující enzym (ICE)) *in vitro*, přičemž největší efekt vykazuje EI-1511-3. Interleukin 1 (IL-1) je cytokin sekretovaný aktivovanými monocyty nebo makrofágy, který hraje důležitou roli ve stimulaci zánětlivých odpovědí. Existuje ve dvou isoformách – IL-1 α a významnější IL-1 β . IL-1 β vzniká jako neaktivní prekurzor a dozrává proteolytickým štěpením katalyzovaným enzymem ICE. ICE se také podílí na sekreci IL-1 β z buněk. EI-1511-3, EI-1511-5 a EI-1625-2 inhibují uvolňování IL-1 β ze stimulovaných monocytů a makrofágů (linie THP-1) ale zároveň nepůsobí na tyto buňky cytotoxicky. U kolabomycinu E bylo objeveno, že blokuje nejen uvolňování IL-1 β ale také IL-6, IL-8 a IL-18 (TANAKA a kol. 1996, PETŘÍČKOVÁ a kol. 2014).

Deriváty antibiotik *ent*-alisamycin, manumycin G, U-56,407, EI-1511-3 a EI-1511-5 s delecí spodního řetězce vykazují stejný inhibiční potenciál k ICE jako původní látky (testováno na vyizolovaném enzymu), ale jejich schopnost inhibovat sekreci IL-1 β z buněk je řádově 10 \times nižší. Tyto výsledky naznačují, že spodní řetězec nepřispívá k inhibici ICE, ale napomáhá průniku antibiotik do buněk (TANAKA a kol. 1996).

Výše zmíněná antibiotika jsou díky těmto svým vlastnostem potenciálně použitelná jako protizánětlivé léky. Jejich výhodami jsou snadná produkce a malá velikost molekul.

Novější výzkumy stále zřetelněji potvrzují existující úzké spojení mezi zánětlivými procesy v buňkách a onkogenezi. Jedním ze spojovacích mostů je zřejmě transkripční faktor NF- κ B, který mimo jiné aktivuje transkripci genů kódujících proteiny zapojené v imunitních a zánětlivých odpovědích a kontrole buněčného růstu (BALDWIN 1996). Proto také manumycin A v některých případech potlačuje zároveň zánětlivou odpověď i onkogenezi. Děje se tak například díky schopnosti manumycinu A blokovat aktivitu I κ B kinázy β (IKK β). TNF α a interleukiny aktivují multimerní I κ B kinázový (IKK) komplex. Ten je složený z kináz IKK α a IKK β a proteinového „lešení“ IKK γ (zvaného též NEMO). IKK β je hlavní kináza regulující aktivitu transkripčních faktorů NF- κ B a to tak, že fosforyluje jejich inhibitor (např. I κ B α), který je následně degradován v proteasomu. Dojde k uvolnění NF- κ B, jeho přesunu do jádra, vazbě na DNA a aktivaci genové exprese. Manumycin A podporuje vznik stabilních dimerů IKK β a jejich disociaci z adaptorového proteinu IKK γ /NEMO. IKK β tak ztrácí svou funkci, nedojde k degradaci inhibitorů NF- κ B a aktivaci NF- κ B dráhy. Tím je inhibován vznik zánětu případně nádoru (BERNIER a kol. 2006).

Onkogenezi a zánětlivou odpověď významně propojuje také HIF-1 α . Tento protein je spolu s HIF-1 β součástí heterodimerického transkripčního faktoru HIF-1. HIF-1 v buňkách reguluje odpověď na hypoxii, ale je aktivován i při normoxii jako reakce na působení IL-1 β a prozánětlivých cytokinů. Zvýšená hladina IL-1 β a zvýšená exprese HIF-1 α byla detekována v mnoha různých nádorových buněčných liniích. IL-1 β se účastní dějů spojených s angiogenezi, vznikem metastáz a růstem nádoru. Indukci HIF-1 α cytokinem IL-1 β v nádorových buňkách při normoxii zprostředkovává Ras protein (SHARMA a kol. 2011). Manumycin A díky své

schopnosti inhibovat Ras ruší IL-1 β indukovanou aktivaci HIF-1 α a tím i prozánětlivou a onkogenní reakci. HIF-1 α je považován za jeden z nejdůležitějších cílů v protinádorové léčbě, proto se i manumycin A stává v tomto léčebném přístupu potenciálně využitelný (SHARMA a kol. 2012).

Antibakteriální účinky

Antibakteriální účinky manumycinových antibiotik jsou jejich nejdéle známou vlastností. Manumycin A, první objevené antibiotikum této skupiny, byl nalezen při cíleném vyhledávání nových přírodních látek právě na základě antibakteriálních vlastností (BUZZETTI a kol. 1963). Většina manumycinů typu I (tzn. s epoxidem na mC_7N) vykazuje *in vitro* antimikrobiální aktivity vůči gram-pozitivním bakteriím. Jsou to například alisamycin (FRANCO a kol. 1991), asukamycin (OMURA a kol. 1976), kolabomycin (GROTE a kol. 1988), manumyciny E, F a G (SHU a kol. 1994), nisamycin (HAYASHI a kol. 1994b), U-56,407 (BRODASKY a kol. 1983) a U-62162 (SLECHTA a kol. 1982). Nicméně ne všechny vykazují tyto vlastnosti také *in vivo* a pokud je vykazují, jejich účinnost není příliš vysoká. Z toho důvodu nejsou antibakteriální účinky manumycinů z hlediska praktického využití příliš zajímavé.

Většina těchto antibiotik byla testována také na gram-negativních bakteriích, nicméně nebyly zjištěny žádné významné účinky. Zatím jediná známá výjimka byla popsána u manumycinu A. Ten dokáže efektivně bránit infekci lidských granulocytů gram-negativní bakterií *Anaplasma phagocytophilum* způsobující lidskou granulocytární anaplasmózu. K léčbě dokonce postačuje koncentrace manumycinu pouze 0,01 μ M, což je 100 \times méně než koncentrace užívaná v protinádorových studiích (XIONG a RIKIHISA 2011).

Manumyciny typu II (tzn. s hydroxylovou skupinou na mC_7N) - manumycin D, TMC-1A, B, C a D - naproti tomu nevykazují žádné účinky proti gram-pozitivním ani gram-negativním bakteriím (KOHNO a kol. 1996). Z toho důvodu se předpokládá, že za antibakteriální účinky manumycinů je z velké části zodpovědný oxiran na C5/C6 mC_7N jednotky. To potvrzují také pokusy s asukamycinem a jeho deriváty postrádajícími epoxid. Deriváty nevykazují žádné antibakteriální účinky vůči *S. aureus* (RUI a kol. 2013). Role C₅N jednotky v této aktivitě není zatím objasněná, nicméně se zdá, že C₅N není zcela nezbytná. Antimikrobiální účinky vykazují i látky bez C₅N, přičemž platí pravidlo, že čím hydrofobnější substituent je na konci spodního řetězce, tím menší antimikrobiální aktivitu má. Pokud je zde například vázán cyklohexyl místo skupiny COOH, je antibiotikum 25 \times méně účinné (HAYASHI a kol. 1994b). Celkový mechanismus působení manumycinů proti bakteriím však zatím zůstává neznámý.

Ostatní

Některé manumyciny vykazují také insekticidní vlastnosti. Manumycin A inhibuje vývoj hmyzu řádu *Lepidoptera* (motýli) a *Coleoptera* (brouci) a má repelentní efekt na jejich larvy. Mírně koncentrovaný roztok manumycinu A má insekticidní efekt na vajíčka a larvy běláška zelného a sluněčka *Epilachna varivestis* (ZEECK a kol. 1987).

Proti plísním působí manumycin A (ZEECK a kol. 1987), alisamycin inhibuje *Piriculatia oryzae* a *Botrytis cinerea*, které způsobují škody v zemědělství (FRANCO a kol. 1991). Asukamycin vykazuje slabou aktivitu proti *Trichophyton mentagrophytes* způsobující

plíseň kůže (OMURA a kol. 1976). Slabě inhibičně působí také nisamycin proti *Aspergillus niger* a *Fusarium oxysporum* (HAYASHI a kol. 1994b).

Asukamycin působí také proti kokcidii *Eimeria tenella*, která napadá kura domácího a způsobuje vážné onemocnění střev, které může vést k úmrtí. Krmení kuřat tímto antibiotikem redukuje mortalitu nakažených zvířat (OMURA a kol. 1976).

Manumyciny A, B a C působí jako reversibilní nekompetitivní inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), čímž se stávají potenciálními léčivy Alzheimerovy choroby (AD). Pro tuto jejich vlastnost je nezbytná epoxidová skupina na mC₇N jednotce. AD je degenerativní porucha centrálního nervového systému, při které dochází k postupné demenci. Možnou příčinou této nemoci je pokles cholinergních funkcí v bazálních gangliích a kůře mozku. Zlepšení cholinergních funkcí je jedním z terapeutických přístupů pro kontrolu AD. Lze toho dosáhnout například inhibicí AChE. AChE katalyzuje hydrolýzu hlavního neurotransmiteru acetylcholinu v cholinergních synapsích mozku a autonomního nervového systému. Tím ukončuje aktivitu acetylcholinu a přenos signálu. Inhibice tohoto enzymu brání degradaci acetylcholinu a ten zůstává déle dostupný. Inhibitory AChE jsou zatím jedinou skupinou léčiv schválených v současné době k léčbě Alzheimerovy choroby (ZHENG a kol. 2007).

3.2.3. Antibiotikum U-62162

Antibiotikum U-62162 bylo poprvé popsáno roku 1982 (SLECHTA a kol. 1982), přesto o něm byly publikovány zatím pouhé dvě práce. Toto antibiotikum je produkováno půdními bakteriemi *Streptomyces verdensis* Dietz, sp. n. (UC-8157), které byly nalezeny během systematického vyhledávání mikrobiálních producentů antibiotik. Jak napovídá druhové jméno, produkují tyto bakterie během sporulace zelený pigment.

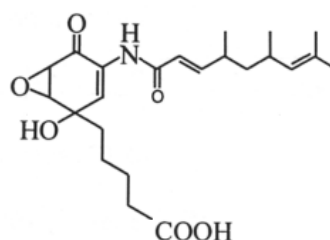
Výše již bylo zmíněno, že struktura antibiotika je zcela výjimečná, je to jediný známý manumycinový zástupce typu IC. Od ostatních antibiotik této skupiny se podstatně liší strukturou spodního řetězce. Ten je nasycený a krátký pouze čtyři uhlíky, navíc chybí C₅N jednotka, místo které je řetězec zakončen karboxylovou skupinou (Obr. 6). Výjimečné je také zakončení horního řetězce s větvením a dvojnou vazbou. Startovací jednotka pro biosyntézu tohoto řetězce zatím nebyla určena, ale podle struktury můžeme navrhnout, že by se mohlo jednat například prenyl, což by bylo mezi manumyciny také ojedinělé.

U-62162 je bakteriemi produkován během fermentace do média. Na rozdíl od ostatních antibiotik u něj nebyly zatím nalezeny žádné kometabolity. K maximální produkci dochází již po 24 hodinách, zatímco u ostatních manumycinů je nejvyšší koncentrace pozorována po 72 hodinách fermentace. U-62162 je vysoce nestálé v pH vyšším než 8, je amorfní a bezbarvé. Jeho relativní molekulová hmotnost je 419,51 (SLECHTA a kol. 1982).

U-62162 inhibuje růst některých gram-pozitivních bakterií *in vitro*. Nejúčinněji působí na *Staphylococcus aureus*, které inhibuje při minimální koncentraci 1 µg/ml. Dále relativně efektivně inhibuje *S. faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *P. maguns* a *P. aerogenes*. Účinek na *S. aureus* byl otestován také *in vivo* na myších experimentálně infikovaných touto bakterií. Nicméně ani při nejvyšší testované koncentraci 8 mg/kg/den během standardního CD₅₀ testu nebyl pozorován žádný ochranný účinek antibiotika proti infekci (SLECHTA a kol. 1982).

Toto antibiotikum zatím nebylo testováno na protizánětlivé ani protinádorové účinky. Podle dosavadních informací se zdá, že na těchto účincích se zřejmě nejvíce podílí horní řetězec. U U-62162 je tento řetězec větvený a částečně nasycený, čímž se trochu podobá farnesyly. Díky tomu by antibiotikum mohlo být schopno, podobně jako manumycin A, inhibovat Ras-farnesyltransferázu a tím působit protinádorově a protizánětlivě. Tuto hypotézu je však nutné ověřit biologickými testy.

Druhá práce věnující se antibiotiku U-62162 popisuje jeho první syntézu *in vitro* a bližší informace o stereochemii molekuly (ALCARAZ a TAYLOR 1998).



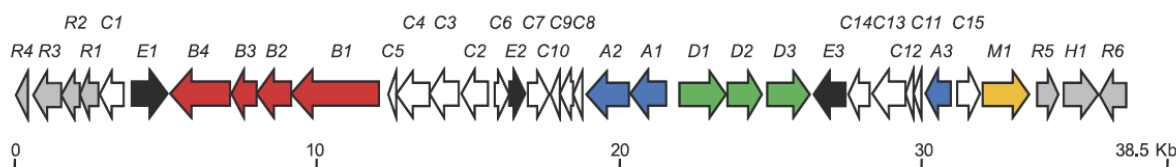
U-62162

Obr. 6: Struktura antibiotika U-62162. Převzato a upraveno z HU (2000).

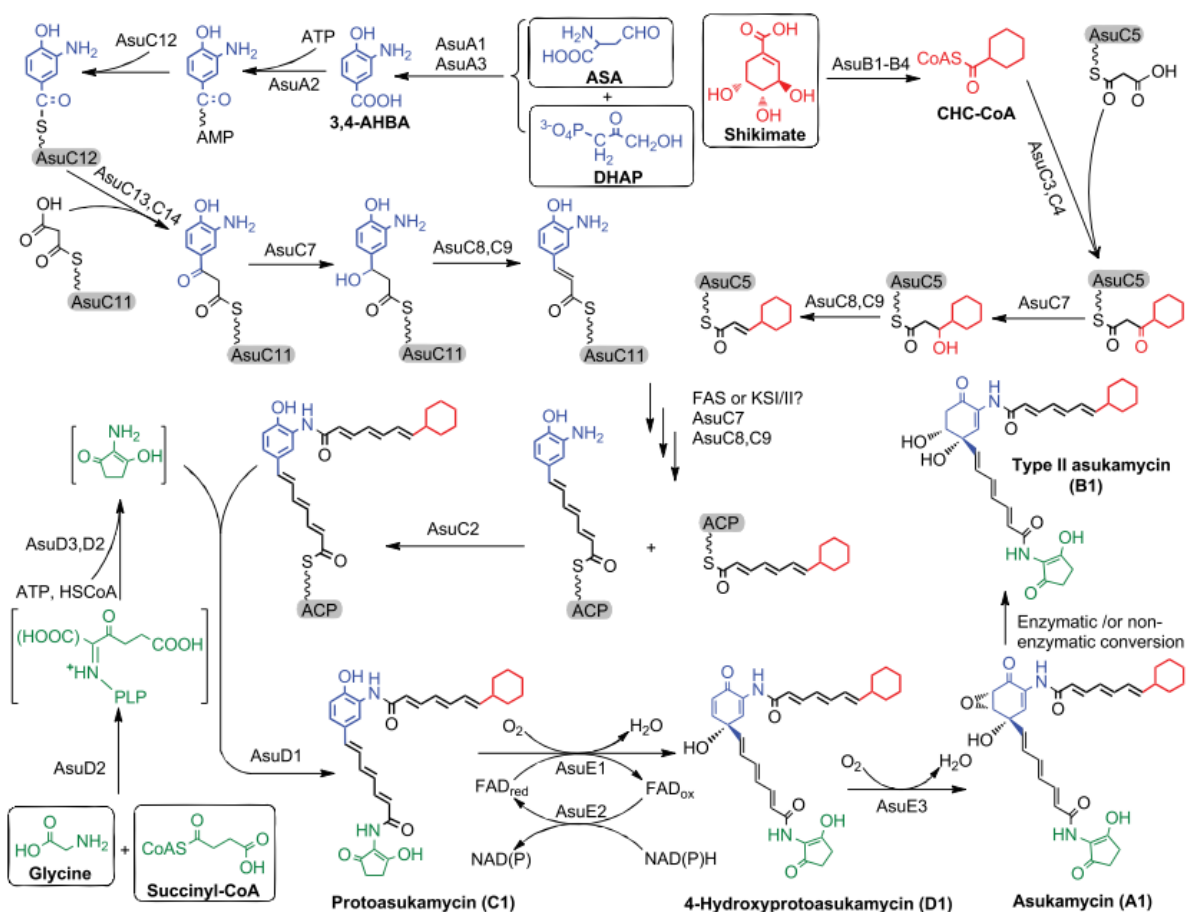
3.2.4. Biosyntéza manumycinových antibiotik

Biosyntéza manumycinů začíná syntézou mC_7N jednotky, na které následně dochází k syntéze spodního řetězce. Poté se naváže horní řetězec, který byl nasynthetizován zvlášť (THIERICKE a kol. 1990). U většiny antibiotik následuje připojení C_5N na konec spodního řetězce. Poslední reakcí v syntéze je oxidace mC_7N jednotky nejdříve na C4 za vzniku hydroxy skupiny a poté na C5 a C6, kde vzniká epoxid (HU a FLOSS, 2004), který je u některých antibiotik následně redukován na hydroxid na C5.

Způsob biosyntézy je zatím popsán u asukamycinu, manumycinu A a kolabomycinu. V případě asukamycinu je znám celý genový shluk kódující geny pro syntézu antibiotika a u většiny genů je navržena jejich funkce, která je u mnohých také experimentálně ověřena. Celý genový shluk je dlouhý 63 922 bp (sekvence a anotace GenBankTM č. GQ926890) a obsahuje 36 otevřených čtecích rámců pojmenovaných jako *asu* geny. Předpokládané geny jsou rozděleny do osmi skupin podle funkce – skupina A, B, C, D, E, H, M a R (Obr. 7) (RUI a kol. 2010). Navržené schéma biosyntézy asukamycinu je zobrazeno na Obr. 8.



Obr. 7: Otevřené čtecí rámce identifikované v genovém shluku kódujícím geny pro biosyntézu asukamycinu. Geny jsou rozděleny do 8 skupin podle jejich předpokládané funkce. Skupina A: biosyntéza 3,4-AHBA a adenylace; skupina B: CHC-CoA biosyntéza; skupina C: skládání polyketidového řetězce; skupina D: biosyntéza C_5N jednotky; skupina E: oxygenace; skupina R: regulace transkripce; AsuM1: exportní protein. Převzato z RUI a kol. (2010).



Obr. 8: Navrhovaná biosyntetická dráha asukamycinu. Shikimate – šikimová kyselina. Převzato z RUI a kol. (2010).

Biosyntéza mC_7N podjednotky

Prekurzorem mC_7N podjednotky je kyselina 3-amino-4-hydroxybenzoová (3,4-AHBA) (GOULD a kol. 1996), která vzniká kondenzací a následnou cyklizací L-aspartát-4-semialdehydu (ASA) a dihydroxyacetonu nebo dihydroxyacetonfosfátu (DHA/DHAP). ASA pochází z Krebsova cyklu, zdrojem DHA/DHAP je trióza (THIERICKE a kol. 1990, SUZUKI a kol. 2006).

Při biosyntéze asukamycinu jsou za vznik mC_7N jednotky zodpovědné geny ze skupiny A. Vznik 3,4-AHBA z prekurzorů katalyzují produkty genů *asuA1* a *asuA3*. Hotová 3,4-AHBA je poté proteinem AsuA2 aktivována adenylací uhlíku karboxy skupiny za přítomnosti ATP. Vzniklá vysokoenergetická vazba je využita pro navázání na specifický ArCP protein (Aroyl Carrier Protein), kterým je v případě asukamycinu AsuC12 (RUI a kol. 2010, RUI a kol. 2013).

Biosyntéza spodního řetězce

Syntéza spodního řetězce probíhá přímo na vzniklé 3,4-AHBA vázané na acyltransferázu (ACP), která ji dopraví ke ketosyntáze. Samotná syntéza probíhá mechanismem odpovídajícím syntéze aromatických polyketidů a polypeptidů pomocí PKS II systému. Je iniciována vazbou malonyl-ACP thioesteru na 3,4-AHBA enzymem

ketosyntázou. Ketoreduktáza redukuje karbonylovou skupinu na hydroxyskupinu. Dehydratáza odštěpí vodu a vzniká dvojná vazba (THIERICKE a kol. 1990, HOPWOOD 1997). Tento mechanismus se opakuje, u většiny manumycinů třikrát, u kolabomycinu čtyřikrát, v případě U-62162 pravděpodobně pouze dvakrát. Ve většině případů tedy po třech opakováních vzniká 7-(3-amino-4-hydroxyphenyl)-hepta-2,4,6-trienová kyselina ACP thioester. U antibiotika U-62162 dochází navíc během opakování k redukcí dvojných vazeb zřejmě enoyl reduktázou za vzniku nasyceného spodního řetězce.

V případě syntézy asukamycinu do reakce vstupuje 3,4-AHBA vázaná na AsuC12, kterou tento nosič dopraví ke KSI/II polyketid syntáze AsuC13. Ta katalyzuje spojení kyseliny s malonylem pravděpodobně vázaným na ACP AsuC11 asociovaným s KSI/II. Vzniklou karbonylovou skupinu redukuje ketoreduktáza AsuC7. AsuC8 a AsuC9 jsou blízce příbuzné dehydratázám HadC a HadA, které tvoří funkční heterodimery. Jsou proto pravděpodobně zodpovědné za dehydrataci a vznik dvojných vazeb. Počet opakování celého procesu na polyketid syntáze a tím i délku spodního řetězce reguluje AsuC14 (CLF – chain-length factor) (RUI a kol. 2010, PETŘÍČKOVÁ a kol. 2014).

Biosyntéza horního řetězce

Jednotlivé manumycinové látky se nejvíce liší ve struktuře horního řetězce, jedna z odlišností je v zakončení. To je dáno startovací jednotkou, na které syntéza horního řetězce začíná. Mohou jí být větvené karboxylové kyseliny vznikající z větvených aminokyselin transaminací a oxidativní dekarboxylací, které jsou následně vázané na CoA, jako například isobutyryl-CoA pocházející z valinu (při biosyntéze manumycinu G a E), 3-methylbutyryl-CoA z leucinu (biosyntéza U-56,407) nebo 2-methylbutyryl-CoA z isoleucinu (EI-1511-5). Syntéza může také začít na acetyl-CoA (např. manumycin A) a cyklohexylkarbonyl-CoA (asukamycin a alisamycin) syntetizovaném z šikimové kyseliny (HU 2000).

Přidáním různých cykloalkylkarboxylových kyselin do média *S. nodosus* subsp. *asukaensis*, producenta asukamycinu, lze dosáhnout produkce nových antibiotik s daným cykloalkylem na konci horního řetězce. Současně pozorujeme také vznik nových mastných kyselin, které jsou zakončené uměle přidaným cykloalkylem (Obr. 9). To dokazuje, že polyketid-syntáza horního řetězce asukamycinu a syntáza větvených mastných kyselin (fatty acid synthase – FAS) sdílí stejnou selektivitu, co se týče kvality nikoli kvantity, pro startovací jednotky (HU a FLOSS 2006). Mutace KS III katalyzující kondenzaci startovací jednotky s malonyl-ACP u asukamycinu má za následek konec tvorby asukamycinu, nicméně stále zůstává nízká hladina produkce kongenerů, které se od asukamycinu liší pouze startovací jednotkou. To je zřejmě způsobeno účastí buněčné syntázy mastných kyselin FabH. Dochází tedy k propojení drah syntézy polyketidů a mastných kyselin (RUI a kol. 2010). V bakteriích produkujících asukamycin dochází také k tomu, že startovací jednotka horního řetězce asukamycinu – cyklohexylkarbonyl-CoA – je využívána také FAS a inkorporována do mastných kyselin za vzniku ω -cyklohexyl mastných kyselin. Tento jev je výjimečný, protože produkt sekundárního metabolismu je využíván dráhou primárního metabolismu, přičemž většinou platí opak (HU a FLOSS 2006).

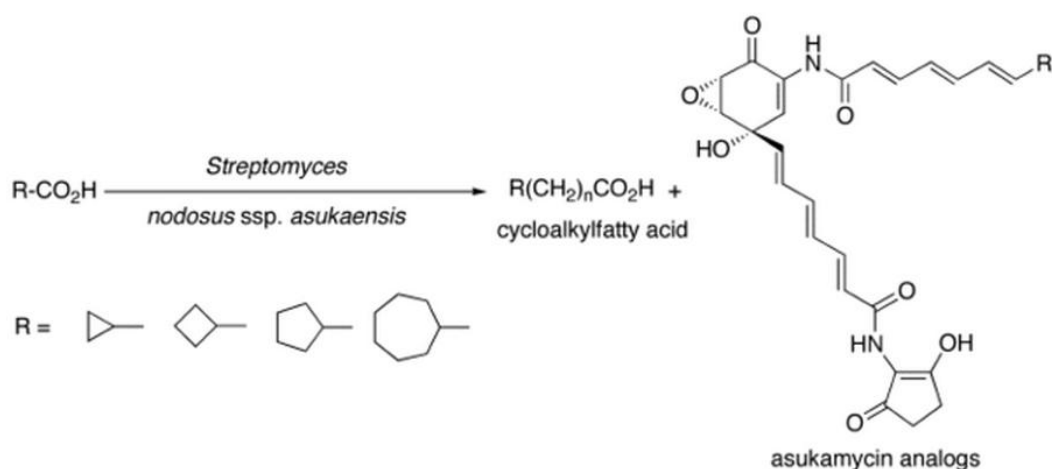
Syntéza horního řetězce probíhá klasickou polyketidovou syntézou katalyzovanou KSI/II ale liší se u manumycinů typu A (lineární řetězec) a typu B (větvený řetězec). Pro syntézu typu A zřejmě existuje více různých ACP acyltransferáz, které rozeznávají a váží

různé cyklické a větvené karboxylové kyseliny. Z množství vznikajících kongenerů doprovázejících syntézu konkrétního antibiotika je zřejmé, že specifita acyltransferáz ke konkrétní startovací jednotce není stoprocentní. Naopak ketosyntáza manumycinů typu A používá pouze malonyl-CoA, kterým prodlužuje startovací jednotku a rostoucí horní řetězec. V případě syntézy typu B váže ACP acyltransferáza pouze butyryl-CoA, zato ketosyntáza přijímá methylmalonyl-CoA stejně jako malonyl-CoA, díky čemuž mohou vznikat větvení horního řetězce. Předpokládá se proto, že manumyciny typu A a B jsou produkované různými druhy polyketid-syntáz (THIERICKE a kol. 1990, HU 2000).

Po vazbě malonyl-CoA, případně methylmalonyl-CoA na startovací jednotku dochází k redukci a dehydrataci stejným mechanismem a pravděpodobně i pomocí stejných enzymů jako při syntéze spodního řetězce. Celý proces se opakuje dvakrát až pětkrát podle druhu vznikajícího antibiotika. V případě TMC-1B, TMC-1D a U-62162 (KOHNO a kol. 1996, SLECHTA a kol. 1982), které uprostřed horního řetězce obsahují nasycenou vazbu, je navíc nutná aktivita enoyl reduktázy. Vzniklý horní řetězec je amidovou vazbou připojen na 3-amino skupinu 3,4-AHBA s navázaným spodním řetězcem.

Startovací jednotkou pro syntézu horního řetězce asukamycinu je cyklohexylkarbonyl-CoA (CHC-CoA), který vzniká z šikimové kyseliny aktivitou proteinů AsuB1-B4. Mutant *asuB1* nevytváří asukamycin, zato má třikrát zvýšenou produkci kongenerů lišících se od asukamycinu pouze v zakončení horního řetězce (RUI a kol. 2010). CHC-CoA kondenzuje s malonylem vázaným na ACP, kterým je AsuC5. Reakce dává vznik meziproduktu 3-cyklohexyl-3-oxopropanoyl-ACP. Je katalyzována zřejmě heterodimerem AsuC3/AsuC4. Tyto proteiny obsahují vazebné místo pro CoA a konservovanou Cys-His-Asn katalytickou triádu. Jejich geny jsou homologní k bakteriálním ketosyntázám III a FabH (RUI a kol. 2010).

Po kondenzaci následuje redukce a dehydratace katalyzovaná stejnými enzymy jako při syntéze spodního řetězce, tedy AsuC7 a AsuC8/AsuC9. Proces se třikrát opakuje, nicméně KSI/II nutná pro druhé a třetí kolo prodlužování zatím není známá. V úvahu připadá také zapojení buněčných FabB syntáz mastných kyselin. Hotový horní řetězec je připojen amidovou vazbou k 3,4-AHBA se spodním řetězcem činností enzymu AsuC2, patřícímu do N-acyl transferázové rodiny (RUI a kol. 2010).



Obr. 9: Vznik nových derivátů asukamycinu a nových mastných kyselin po přidání cykloalkylkarboxylových kyselin k producentu asukamycinu *S. nodosus* subsp. *asukaensis*. Převzato z HU a FLOSS (2006).

Biosyntéza C₅N podjednotky

Podjednotka C₅N je syntetizována nezávisle na ostatních částech molekuly antibiotika. Jejímí prekurzory jsou aminokyselina glycin a kyselina jantarová pocházející z Krebsova cyklu. Dekarboxylační kondenzace sukcinyl-CoA a glycinu katalyzovaná enzymem PLP-dependentní 5-aminolevulát syntázou (ALAS) dává vzniknout 5-aminolevulátu (ALA). Ten je poté přes ALA-AMP meziproduct přeměněn na ALA-CoA činností acyl-CoA ligázy. ALAS dále katalyzuje zacyklení ALA-CoA, čímž vzniká C₅N. C₅N je poté pomocí ATP-dependentní amid syntázy připojen amidovou vazbou ke spodnímu řetězci (THIERICKE a kol. 1990, ZHANG a kol. 2010). Fakt, že k vazbě C₅N podjednotky dochází až po navázání horního řetězce, potvrzuje skutečnost, že kmen *Streptomyces* sp. K106 produkuje antibiotika alisamycin a nisamycin, které se od sebe odlišují pouze přítomností, respektive nepřítomností C₅N podjednotky (HAYASHI a kol. 1994a).

Na tvorbě C₅N podjednotky během syntézy asukamycinu se podílí geny ze skupiny D. AsuD2 je příbuzný ALAS, významně se od nich liší pouze přítomností Ser⁸³ místo jinak striktně konzervovaného Thr⁸³. Tento serin je pro funkčnost AsuD2 nezbytný. AsuD3, acyl-CoA ligáza, je společně s AsuD2 zodpovědná za vznik C₅N podjednotky. AsuD1 je blíže příbuzný amid-syntázám a váže C₅N podjednotku na konec spodního řetězce (RUI a kol. 2010)

Antibiotika, která nenesou C₅N podjednotku (nisamycin, U-62162), mají spodní řetězec zakončený karboxylovou skupinou.

Oxidativní úpravy vzniklé molekuly

Po složení všech podjednotek dochází k poslednímu kroku syntézy, kterým je oxidace mC₇N podjednotky. Dochází k ní na dvou místech této podjednotky – na C4 vzniká hydroxylová skupina a na C5/C6 epoxid, případně na C5 hydroxyl. Kyslík používaný pro tyto reakce pochází z atmosférického kyslíku. Dvěma oddělenými monooxygenázovými reakcemi vzniká antibiotikum typu I, tedy s epoxidovou skupinou na C5/C6 (THIERICKE 1990). Ke vzniku manumycinů typu II s hydroxylem na C5 je nutná další enzymatická či neenzymatická přestavba.

Po složení jednotlivých podjednotek v průběhu syntézy asukamycinu vzniká tzv. protoasukamycin, který je dále oxygenován. Těchto reakcí se účastní geny ze skupiny E. AsuE1, jednodílná flavin-dependentní monooxygenáza, pomocí FAD_{red} katalyzuje první monooxygenázovou reakci, jejímž produktem je 4-hydroxyprotoasukamycin. Pro plnou funkčnost AsuE1 je nezbytný protein AsuE2, který je homologní k flavin reduktáze. Redukuje oxidovaný FAD a poskytuje tak FAD_{red} pro další oxidativní reakce. AsuE3 katalyzuje epoxidaci 4-hydroxyprotoasukamycinu, kdy dojde k nahrazení dvojné vazby mezi C5/C6 epoxidovou skupinou a vzniká asukamycin (RUI a kol. 2010, RUI a kol. 2013).

Regulace biosyntézy manumycinových antibiotik

Genové klastry kódující biosyntézu antibiotik obsahují jeden nebo více regulačních genů, jejichž produkty kontrolují aktivitu biosyntetických genů. V případě asukamycinu byly takové geny nalezeny na krajích genového shluku a byly zařazeny do skupiny R, *asuR1* - *asuR6* (RUI a kol. 2010). *asuR1* a *asuR5* jsou pro biosyntézu asukamycinu zcela nezbytné.

Uměle zvýšená exprese *asuR1*, *asuR2*, *asuR3* a *asuR4* ve *S. nodosus* vede až ke 14-násobnému zvýšení produkce asukamycinu (XIE a kol. 2012).

3.3. Biosyntéza polyketidových látek

3.3.1. Biosyntéza mastných kyselin u bakterií

Biosyntéza polyketidových látek, tedy i horního a spodního řetězce manumycinových antibiotik, probíhá v principu stejně jako biosyntéza mastných kyselin.

Pro biosyntézu mastných kyselin (MK) využívají bakterie a rostliny vysoce konzervovanou skupinu enzymů nazývanou syntázy mastných kyselin typu II (FAS – Fatty Acid Synthase). Jedná se o sadu individuálních enzymů, kde každý je kódovaný unikátním genem. Ústřední roli v syntéze hraje protein ACP (Acyl Carrier Protein), který po celou dobu syntézy nese meziproducty reakcí navázané pomocí thioesterové vazby na konec své prostetické skupiny. ACP thioester se pak stává substrátem pro všechny enzymy FAS typu II. Principem syntézy je kondenzace malonylových (výjimečně i jiných) podjednotek se startovací jednotkou a v následujících cyklech s prodlužujícím se řetězcem (Obr. 10).

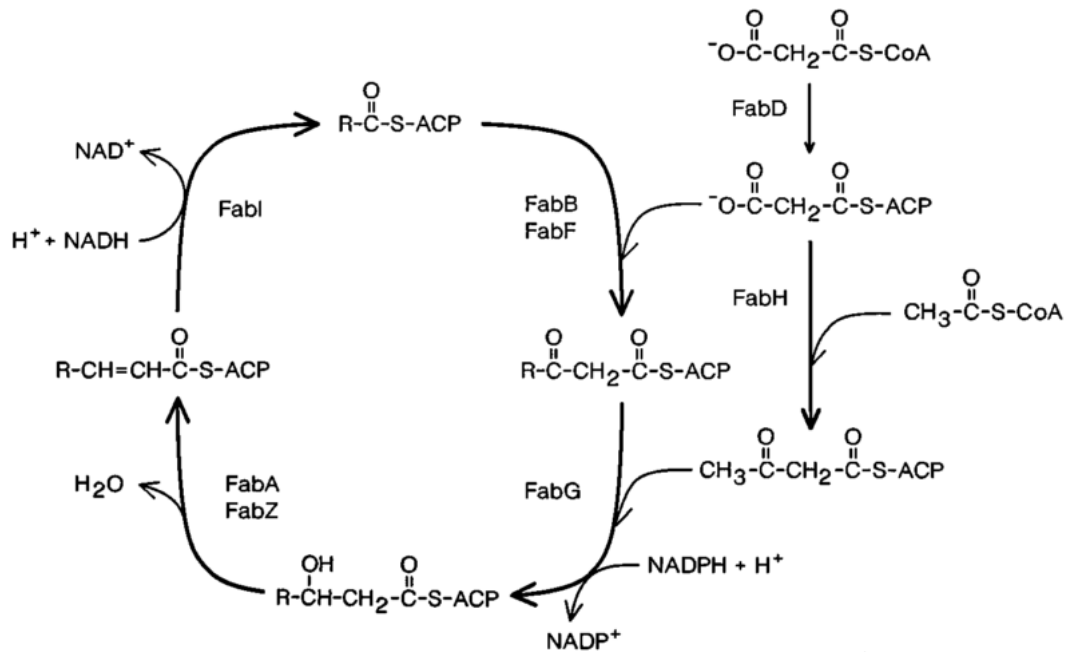
Prvním krokem biosyntézy MK je karboxylace acetyl-CoA na malonyl-CoA katalyzovaná enzymem acetyl-CoA karboxyláza (Acc) (LI a kol. 1993). Vzniklá malonylová skupina je přenesena z CoA na ACP působením malonyl-CoA:ACP transacylázy (MAT), která se u *E. coli* nazývá FabD (HARDER a kol. 1974). Startovací jednotka acetyl-CoA je navázána pomocí acyl transferázy z CoA na enzym β -ketoacyl-ACP syntázu (KS) (FabH), který katalyzuje její kondenzaci s prodlužovací jednotkou malonyl-ACP za uvolnění CO₂. FabH je odlišný od KS používaných pro kondenzaci během elongace a to zejména svojí vysokou afinitou ke CoA thioesterům v porovnání s acyl-ACP (JACKOWSKI a ROCK 1987). Acyl-ACP mají na tuto syntázu inhibiční efekt, čímž je zajištěna negativní zpětná vazba pro syntézu MK (HEATH a ROCK 1996a). FabH různých organismů se liší specifitou k substrátu a určují tak typ vznikajících mastných kyselin. U organismů produkujících nevětvené MK mají tyto syntázy vysokou selektivitu pro acetyl-CoA. FabH bakterií produkujících větvené MK rozeznávají širší spektrum substrátů, například isovaleryl-CoA, isobutyryl-CoA nebo 2-methylbutyryl-CoA. Větvené MK ovlivňují fluiditu membrán (CHOI a kol. 2000).

Po kondenzaci prodlužovací a startovací jednotky následuje redukce vzniklého β -ketoacyl-ACP ketoreduktázou (KR) FabG patřícím do proteinové rodiny dehydrogenáz a reduktáz krátkých řetězců. Pro tuto reakci je nutný NADPH (JÖRNVALL a kol. 1995). β -hydroxyacyl-ACP je poté dehydratován enzymy FabA a FabZ (DH), které se od sebe liší afinitou k různě dlouhým a nasyceným, resp. nenasyceným β -hydroxyacyl-ACP (HEATH a ROCK 1996b). FabA kromě dehydratace může také katalyzovat isomerizaci vzniklého *trans*-2-enoyl-ACP na *cis*-3-enoyl-ACP, který je následně použit pro syntézu nenasycených mastných kyselin (LEESONG a kol. 1996).

Posledním krokem syntézy je redukce *trans*-2-enoyl-ACP NADH-dependentní enoylreduktázou (ER) FabI (BERGLER a kol. 1994). Acyl ACP může poté vstoupit do dalšího kola elongace, kde bude opět prodloužen o dva uhlíky. V tom případě dojde k jeho navázání z ACP na ketosyntázu FabB nebo FabF a ke kondenzaci s další prodlužovací

jednotkou malonyl-ACP a opakování celého cyklu (CRONAN a kol. 1969). Jakmile je dosaženo požadované délky acylu, acyl-ACP thioesteráza uvolní vzniklý řetězec z ACP a to ve formě mastné kyseliny nebo acylesteru (JIANG a CRONAN 1994).

Syntéza mastných kyselin u hub a obratlovců je zajišťována FAS typu I. Ten je, na rozdíl od FAS II, tvořen jedním velkým modulárním proteinem, jehož jednotlivé domény reprezentují různé katalytické funkce – acyl transferázovou, KS, ACP, KR, DH a ER.



Obr. 10: Biosyntéza mastných kyselin. Převzato z HEATH a ROCK (1996b).

3.3.2. Biosyntéza polyketidů

Polyketidy jsou velkou skupinou látek rozmanitých struktur, které sdílí stejný způsob biosyntézy. Patří mezi sekundární metabolity produkované prokaryotními i eukaryotními organismy a zastávají mnoho rozmanitých úloh.

Biosyntéza je zajišťována polyketid-syntázami a probíhá postupným připojováním zbytků karboxylových kyselin k vznikajícímu uhlovodíkovému řetězci. Startovací jednotky jsou velmi různorodé – od acetyl-CoA, butyryl-CoA, isobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA a propionyl-CoA až po cyklické jednotky jako je cyklohexyl-CoA, benzyl-CoA, fenylacetyl-CoA nebo 3,4-AHBA (MOORE a HERTWECK 2002). Prodlužovacími jednotkami mohou být malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA, ethylmalonyl-CoA a další. Každá jednotka prodlouží lineární uhlovodíkovou kostru o dva uhlíky, přičemž β uhlík nese keto-skupinu. Odtud název těchto metabolitů „polyketidy“. Keto-skupina může být ihned po navázání redukována na hydroxyl, který může být dále dehydratován za vzniku dvojné vazby. Ta je případně dále redukována enoyl reduktázou. Na α uhlíku mohou být navázané různé substituenty, podle toho, z které kyseliny je daná stavební jednotka odvozena, nejčastěji jsou to methyl nebo ethyl. Strukturální variabilitu zvyšuje také chiralita a délka řetězce. Po sestavení uhlovodíkové kostry dochází často k dalším úpravám, jako je formování aromatických,

etherových nebo makrolidových kruhových systémů, přidání methylových skupin, terpenů nebo cukerných zbytků. Díky tak vysoké variabilitě struktur je nutné velmi přesné naprogramování polyketid syntáz (HOPWOOD a SHERMAN 1990).

Rozdíl mezi biosyntézou mastných kyselin a polyketidů je hlavně v substrátové specifitě zapojených enzymů, která je u polyketidů mnohem širší. Jejich syntázy rozeznávají různé startovací i prodlužovací jednotky. To je také důvod vzniku tolika rozličných látek. Další rozdíl je v úpravách prodlužovacích jednotek. U MK vždy proběhne redukce keto-skupiny a dehydratace a téměř pokaždé také redukce na alkyl. Naproti tomu u polyketidů nemusí proběhnout žádná z těchto reakcí.

Pro polyketidové látky, stejně jako pro ostatní sekundární metabolity, platí, že geny kódující enzymy jejich biosyntetické dráhy jsou fyzicky propojené a organizované do genových shluků (MARTIN a GIL 1984).

Polyketid syntázy (PKS) se po vzoru FAS historicky dělily na dvě skupiny – PKS I a PKS II. Nedávno přibyla nová skupina PKS III. PKS I (zvaná také modulární PKS) je multifunkční enzym tvořený jednotlivými moduly, kde každý modul je použit pouze jednou a katalyzuje sadu konkrétních reakcí tvořících jeden cyklus elongace. Typickými produkty těchto syntáz jsou makrolidy, polyethery a polyeny (SHEN 2003).

Typ II (iterativní PKS) jsou multienzymatické komplexy, v nichž každý enzym katalyzuje jednu reakci. Enzymy jsou během syntézy řetězce používány opakovaně (iterativně). Typickými produkty těchto syntáz jsou většinou polycyklické aromatické bakteriální polyketidy, jako např. actinorhodin nebo doxorubicin (KHOSLA a kol. 1999). Minimální počet enzymů, nutných pro syntézu tohoto typu, je čtyři – ketosyntáza (KS typu I/II), tzv. chain-length factor (CLF) (reguluje délku vznikajícího řetězce), ACP a malonyl-CoA:ACP transacyláza (MAT). Tato MAT je u *E. coli* shodná s MAT (FabD) používanou pro biosyntézu MK. Jedná se tedy o enzym využívaný jak primárním, tak sekundárním metabolismem (CARRERAS a KHOSLA 1998). Čtyři výše uvedené enzymy se souhrnně nazývají „minimální PKS“ a jsou zodpovědné za syntézu základní polyketidové kostry. Ta je po dosyntetizování do plné délky upravena pomocnými a tzv. tailoring enzymy (DAS a KHOSLA 2009).

Třetí skupina (PKS podobné syntáze chalkonu) jsou homodimerní enzymy fungující jako iterativní kondenzační enzymy. Syntetizují mono či bicyklické aromatické polyketidy jako je flavolin. Na rozdíl od PKS I a II jsou jejich substrátem volné CoA thioestery bez účasti ACP (MOORE a HOPKE 2001).

3.3.3. Pomocné enzymy PKS

Syntézy polyketidů se kromě nezbytných enzymů, definovaných jako minimální PKS, účastní další enzymy. Jejich souhrnný název a rozdělení se v literatuře poněkud liší. V tomto souhrnu převezmu dělení podle DAS a KHOSLA (2009). Pomocné PKS enzymy rozeznávají substrát vázaný na ACP. Jsou to např. ketoreduktáza (KR), dehydratáza (DH), enoylreduktáza (ER), aromatáza/cykláza, cykláza. Tzv. tailoring enzymy pracují s volnými difuzními substráty. Patří mezi ně např. glykosyltransferáza, methyltransferáza, acyltransferáza, halogenáza a carbamoyl transferáza (DAS a KHOSLA 2009, OLANO a CARMEN 2010).

Zde se zaměřím na redukující pomocné enzymy, tj. KR, DH a ER a z nich převážně na enolreduktázu, kterou jsem se zabývala v praktické části práce.

Ketoreduktáza

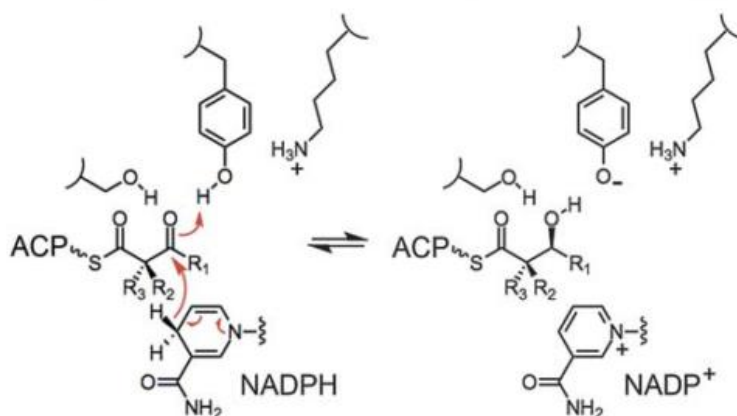
Ketoreduktázy jsou první enzymy účastníci se redukce polyketidového řetězce, přeměňují keton na sekundární alkohol za účasti kofaktoru NADPH. V případě modulární PKS erythromycinu (a zřejmě i ostatních modulárních PKS) je KR tvořena dvěma poddoménami – strukturální a katalytickou – podobnými enzymům z nadrodiny dehydratáz/reduktáz krátkých řetězců (SDR – short-chain dehydrogenase/reductase). Obě poddomény mají strukturu tzv. Rossmann fold. Funkcí strukturální KR je zřejmě stabilizovat katalytickou poddoménu (KEATINGE-CLAY 2006).

V případě modulární PKS větvených metabolitů acyltransferázová doména přenese (2*S*)-methylmalonylovou skupinu na ACP, následuje kondenzace, při které polyketid-syntáza změni stereochemii uhlíku C2 prodlužovací jednotky, takže vzniká (2*R*)-2-methyl-3-ketoacyl, který je následně rozeznán ketoreduktázou (KR) (CAFFREY 2003).

KR dělíme na tři skupiny: typ A vytváří (*S*) stereochemii hydroxylové skupiny, produktem typu B je hydroxyl (*R*) stereochemie. Typ C postrádá schopnost redukovat keto-skupiny. Mezi typem A a B lze rozlišit podle konzervovaného tzv. LDD motivu, který se nachází pouze u typu B. Pokud substrát obsahuje substituent na C α , můžeme KR rozdělit do podskupin podle orientace tohoto substituentu v molekule produktu. Typ A1 a B1 vytváří α -substituenty (*R*) stereochemie, typ A2 a B2 vytváří konformaci (*S*) (CAFFREY 2003).

Katalytické místo KR je tvořené konzervovanou katalytickou triádou – tyrosin, serin, lysin – která se nachází i u ostatních členů enzymatické nadrodiny SDR. Výměna tyrosinu za fenylalanin *in vivo* zcela ruší funkci KR. Výměna serinu za alanin a lysinu za glutamovou kyselinu *in vivo* má za následek vznik směsi redukovaných a neredukovaných produktů. Během redukce zřejmě dojde k aktivaci β -keto skupiny polyketidu postranním řetězcem katalytického tyrosinu a serinu. Následně NADPH 4-pro-*S* hydrid napadne karbonyl a kyslík přijme proton z tyrosinu, který je stabilizován lysinem (Obr. 11) (REID a kol. 2003, KEATINGE-CLAY 2012).

KR typu C postrádají katalytický tyrosin nebo NADPH-vazebný motiv a předpokládá se, že fungují jako epimerázy. K epimerizaci dochází katalyzovanou enolizací a následnou samovolnou tautomerizací na keto formu (KEATINGE-CLAY 2007).



Obr. 11: Mechanismus ketoredukce KR. Hydrid NADPH napadá C β substrátu, tyrosin s pomocí serinu poskytuje vodík kyslíku. Tyrosinový anion je stabilizovaný lysinem. Převzato z KEATINGE-CLAY (2012).

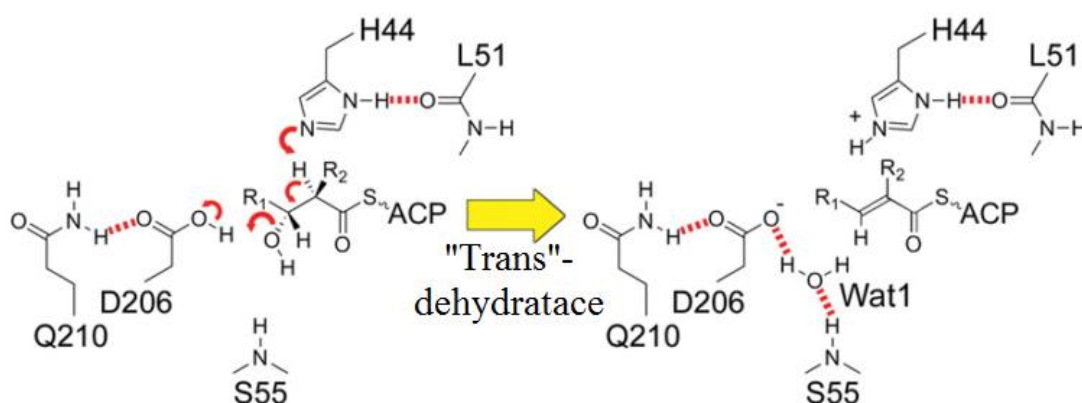
Dehydratáza

Po redukci na ketoreduktáze přechází β -hydroxyacylový meziproduct na dehydratázu (DH), kde dojde k eliminaci vody za vzniku dvojné vazby mezi α a β uhlíkem ve většině případů v konformaci *trans*.

DH se v případě erythromycinu (a zřejmě i v případě ostatních modulárních PKS) nachází ve formě dimeru, jejichž N-konce navazují na didoménu ketosyntázy a acyltransferázy. C-konce sousedí s ketoreduktázovými doménami. V místě předpokládaného kontaktu s ACP se nachází konzervovaný arginin, jehož mutace má za následek snížení produkce polyketidů *in vivo*. Toto uspořádání je velmi podobné prostorovému rozložení domén syntáz mastných kyselin u savců (KEATINGE-CLAY 2008, MAIER a kol. 2006).

Katalytické místo se nachází pouze na jednom monomeru, nejedná se tedy o homodimer a dimerizace není pro katalýzu nezbytná. Aktivní místo je z části tvořeno konzervovaným dvojitým „hotdog-fold“. Nezbytné pro katalýzu jsou histidin (H44) a asparagová kyselina (D206). Prostorová orientace H44 je držena van der Waalovými silami přilehlého prolinu a vodíkovou vazbou s lysinem (L51). Poloha katalytického aspartátu je určena vodíkovým můstkem s glutaminem (Q210). Histidin váže vodík z α -uhlíku, aspartát dodává proton hydroxylové skupině na β -uhlíku, což má za následek uvolnění molekuly vody a vznik *trans*-dvojné vazby (Obr. 12) (KEATINGE-CLAY 2008).

Přestože ve většině případů vzniká *trans*-dvojné vazby, přítomnost *cis*-dvojných vazeb v polyketidech není výjimkou. Některé z nich vznikají činností „tailoring“ enzymů, mnohé však mají svůj původ již v dehydratázových doménách. Obecně platí, že konformace dvojné vazby je určena typem ketoreduktázy, která předchází DH. KR typu B tvoří meziproducty s (*R*) stereochemií hydroxylové skupiny, z nichž vznikají *trans*-dvojné vazby. Produkty KR typu A mají stereochemii (*S*). Aby se mohl takový meziproduct správně nastavit do aktivního místa DH, je nutná rotace řetězce o 120° kolem C_α - C_β . Díky takové konformaci pak po dehydrataci vzniká *cis*-dvojná vazba. Nicméně i toto pravidlo má své výjimky, takže jsou již známé KR typu B, kde po dehydrataci vzniká *cis*-dvojná vazba (KWAN a kol. 2011).



Obr. 12: Mechanismus dehydratace na dehydratáze PKS erythromycinu. Katalytický histidin (H44) stabilizovaný leucinem (L51) odebrá vodík z α -uhlíku. Katalytický aspartát (D206), propojený vodíkovým můstkem s glutaminem (Q210), poskytuje vodík hydroxylové skupině na C_β . Dojde k odštěpení molekuly vody (Wat1), která je stabilizovaná aspartátem a serinem (S55). Převzato z KEATINGE-CLAY (2008).

Enoylreduktáza

Přestože v polyketidech často zůstávají zachované dvojné vazby generované dehydratázami, jejich odstranění není výjimkou. K tomu dochází na enoylreduktázách (ER), které stereoselektivně redukují *trans*- α,β -dvojné vazby. ER modulárních PKS patří do acyl-CoA reduktázové proteinové rodiny náležející do nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz středně dlouhých řetězců (MDR – medium-chain dehydrogenase/reductase). Do stejné rodiny patří také enoylreduktáza savčích FAS (mFAS) (PERSSON a kol. 2008). Naopak funkční analogy těchto enzymů u bakteriálních FAS patří do nadrodiny alkohol dehydrogenáz/reduktáz krátkých řetězců (SDR – short-chain alcohol dehydrogenase/reductase) (KIM a kol. 2011).

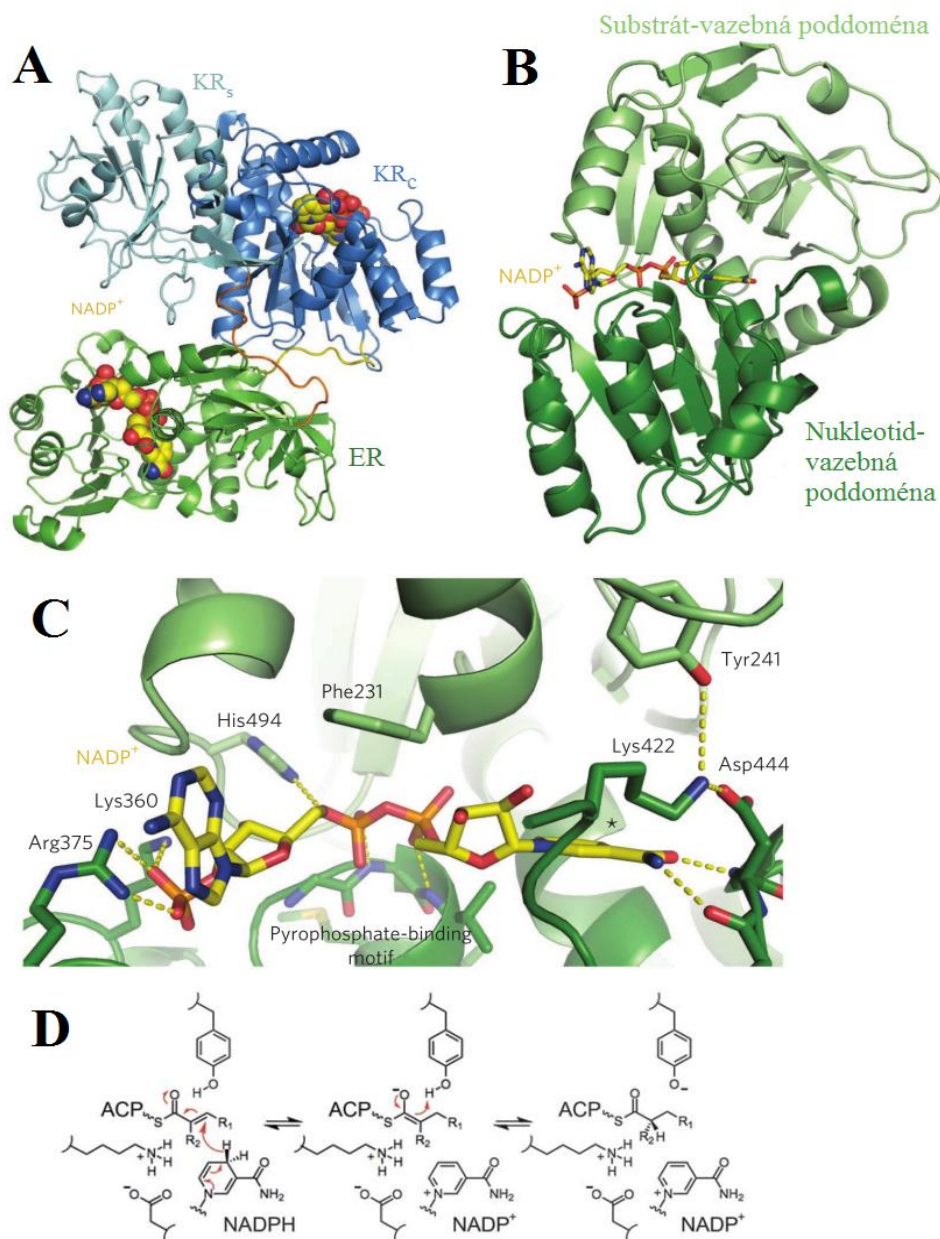
ER je na rozdíl od většiny ostatních modulárních enzymů monomerní. Je složena ze dvou charakteristických MDR poddomén – substrát-vazebné a nukleotid-vazebné (NBD – nucleotide-binding domain). Substrát-vazebná poddoména je tvořena dvěma β -listy (celkem z 9 β -řetězců) obklopenými čtyřmi α -helixy. Nukleotid-vazebnou doménu tvoří tzv. Rossmann fold (Obr. 13B). Doména s funkcí ER (ER_D) je vložena mezi dvěma doménami ketoreduktázy (Obr. 13A). C-konec strukturální domény ketoreduktázy navazuje na N-konec ER_D, spojení tvoří tzv. N-terminální spojka. C-konec ER_D se přes tzv. C-terminální spojku napojuje na N-konec katalytické domény KR. N-terminální spojka je velmi podobná těm u mFAS, nicméně C-terminální spojka je mnohem kratší (8 aminokyselin proti 29 u mFAS v případě ER_D z druhého modulu PKS spinosynu; dále uváděná konkrétní čísla budou pro tento příklad ER_D). Kontaktní plocha mezi ER_D a KR doménami je asi o 50% větší u PKS než u mFAS (ZHENG a kol. 2012).

Aktivní místo enzymu se nachází v zářezu mezi nukleotid-vazebnou a substrát vazebnou poddoménou. Redukce dvojných vazeb je závislá na NADPH. To se váže do aktivního místa, kde je pyrofosfátová část stabilizována konzervovaným pyrofosfát-vazebným motivem (GGVGM) nacházejícím se na NBD. Konzervovaný lysin (K360) a arginin (R375) tvoří solné můstky s adenosinfosfátem. S koenzymem také interagují např. fenylalanin (P231) a histidin (H494) ze substrát-vazebné domény (Obr. 13C). Díky těmto interakcím je 4-pro-*R* hydrid NADPH držen v takové poloze, ve které je schopen atakovat C _{β} *trans*- α,β -nenасыceného polyketidového substrátu, na který se váže za vzniku enolátového meziprojektu. C _{α} tohoto meziprojektu přijímá proton z obecné kyseliny, čímž je dokončena redukce dvojných vazeb (Obr. 13D) (ZHENG a kol. 2012, MAIER a kol. 2008).

V případě, že má substrát substituent na C _{α} , může mít vzniklý produkt na tomto uhlíku konfiguraci (*R*) i (*S*). Pro ustanovení (*S*) konfigurace je nezbytný tyrosin (Y241) umístěný v aktivním místě v blízkosti předpokládané polohy dvojných vazeb polyketidu. Mutace této aminokyseliny má za následek vznik produktů s konfigurací (*R*). Nicméně změna valinu na tyrosin na odpovídající pozici u ER_D, která přirozeně katalyzuje vznik (*R*) konfigurace, nemá za následek vznik produktu s (*S*) konfigurací. Je tedy zřejmé, že na ustanovení stereochemie se podílí další místa (KWAN a kol. 2008).

Snaha identifikovat konkrétní aminokyseliny, které jsou nezbytné pro redukci dvojných vazeb, byla zatím neúspěšná. Bylo vytvořeno několik mutant aminokyselin ve vytipovaných místech, nicméně všechny byly s větší či menší účinností dále schopné redukce. Nejvíce byla katalýza ovlivněna mutací lysinu (L422), který leží naproti výše zmiňovanému tyrosinu (Y241). Tyto aminokyseliny jsou od sebe vzdáleny jen 5 Å a obě se nachází ve vhodné poloze pro protonaci C _{α} substrátu během redukce. Předpokládá se tedy, že v případě

ER_D, kde je přítomný tyrosin, je tato aminokyselina zodpovědná za protonaci substrátu. Role lysinu je pak zřejmě snižovat p*K*_a hydroxylové skupiny tyrosinu a tím tuto reakci usnadňovat. V nepřítomnosti tyrosinu je za protonaci zodpovědný lysin. Nicméně i ten je evidentně nahraditelný zatím neidentifikovanou bází. Další konzervovanou aminokyselinou aktivního místa je aspartát (D444) nacházející se pouze 6 Å od nikotinamidového hydridu. Zřejmě se podílí na stabilizaci meziprojektu případně pomáhá při vazbě substrátu (MAIER a kol. 2008, KWAN a kol. 2008, KWAN a kol. 2010)



Obr. 13: Enoylreduktáza druhého modulu PKS spinosynu. A: Krystalická struktura strukturální (KR_s) a katalytické (KR_c) domény ketoreduktázy, mezi kterými je vložena enoylreduktázová doména (ER_D). Barevné kuličky znázorňují polohu kofaktoru NADP⁺. B: Detailní struktura ER_D složená z dvou poddomén, mezi kterými se nachází NADP⁺. C: Detail interakce konzervovaných aminokyselin aktivního místa s navázaným kofaktorem NADP⁺. Na přilehlé NBD se nachází konzervovaný pyrofosfát-vazebný motiv (Pyrophosphate-binding motif). Hvězdička značí pozici 4-pro-*R* hydridu NADPH během redukce. Místo je obklopeno tyrosinem (Tyr241), lysinem (Lys422) a aspartátem (Asp444) důležitými pro katalýzu. D: Navržený mechanismus redukce substituovaného substrátu. NADPH hydrid napadá C_β, vzniklému enolátovému meziprojektu dodává v případě vzniku (*S*) konfigurace proton tyrosin. U ER_D, kde tyrosin není přítomný, je tato funkce zajištěna lysinem. Převzato z ZHENG a kol. (2012), KEATINGE-CLAY (2012).

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Bakteriální kmeny

Escherichia coli SURE[®] (Stratagene)

Genotyp: *endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10]*

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v LB tekutém médiu při 37 °C na třepačce (220 rpm). Případně na LB agarovém médiu při 37 °C.

Kmen byl používán pro klonovací metody využívající plasmidové vektory. Umožňuje využití tzv. modrobílé selekce díky přítomnosti funkční β-galaktosidázy. Naopak postrádá geny kódující enzymy štěpící DNA, enzymy pro rekombinaci DNA a endonukleázu. Díky tomu je kvalita izolované DNA výrazně lepší. Je rezistentní ke kanamycinu a tetracyklinu.

Escherichia coli ET12567/pUZ8002 (MacNEIL a kol. 1992)

Genotyp: *dam_13::Tn9(Cmr) dcm_6 hsdM*

Kmen poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v LB tekutém médiu při 37 °C na třepačce (220 rpm). Případně na LB agarovém médiu při 37 °C.

Kmen byl používán jako donor při mezidruhové konjugaci. Díky mutacím genů pro methylázy je tento kmen deficiентní v methylaci DNA. To umožňuje jeho využití při přenosu vektorů z *E. coli* do streptomycet, které mají restriční systém pro metylovanou DNA (např. *Streptomyces coelicolor* A(3)2). Je rezistentní k chloramfenikolu a tetracyklinu.

Plazmid pUZ8002 je odvozen od RK2, ale má mutaci v *oriT*. Díky tomu umožňuje přenos vloženého kosmidu do streptomycet ale sám je přenášen s tisíckrát menší účinností než původní plazmid RK2. Nese rezistenci ke kanamycinu.

Escherichia coli DH5α (CHEREPA NOV 1995)

Genotyp: *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Kmen poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v LB tekutém médiu při 37 °C na třepačce (220 rpm). Případně na LB agarovém médiu při 37 °C.

Kmen byl používán v rámci REDIRECT[®] technologie pro klonovací metody využívající plasmidové vektory. Kmen umožňuje použití tzv. modrobílé selekce díky přítomnosti funkční β-galaktosidázy. Naopak postrádá geny zapojené v přestavbách a delecii DNA. Je rezistentní k tetracyklinu.

Escherichia coli BW25113/pIJ790 (DATSENKO a WANNER 2000)

Genotyp: *lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBA-D_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}*

Kmen poskytl: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v LB tekutém médiu při 30 °C nebo 37 °C na třepačce (220 rpm). Případně na LB agarovém médiu při 30 °C nebo 37 °C.

Kmen byl používán v rámci REDIRECT[®] technologie pro klonovací metody využívající plasmidové vektory. Je odvozen od *E. coli* K-12 mutací několika různých genů. Díky vysoké frekvenci homologní rekombinace se využívá pro vkládání lineárních fragmentů do plazmidů. Plazmid pIJ790 obsahuje λ RED (gam, bet, exo) funkce, které zajišťují výrazně vyšší frekvenci rekombinace lineární DNA. Pokud na kosmidu vloženém do těchto buněk nebudou prováděny další narušení genů, kultivujeme buňky při 37 °C, kdy dochází ke ztrátě plazmidu pIJ790. Plazmid nese rezistenci k chloramfenikolu.

Streptomyces coelicolor M512 (FLORIANO a BIBB 1996)

Genotyp: SCP1⁻ SCP2⁻ Pg1⁺ $\Delta redD$ $\Delta actII$ -ORF4

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován v tekutém médiu YEME a YEME se sacharózou při 28 °C na třepačce (220 rpm) v prolamovaných Erlenmayerových baňkách. Dále na MS agaru při 28 °C.

Kmen je odvozen od M145 (odstraněná tvorba antibiotika methylenomycinu) vnesením dalších mutací v regulačních genech nutných pro syntézu antibiotik undecylprodigiosin a actinorhodin. Kmen byl používán pro heterologní expresi genového shluku pro biosyntézu antibiotika U-62162.

Streptomyces lividans K4-114 (ZIERMANN a BETLACH 1999)

Genotyp: $\Delta pro-2$ $\Delta str-6$ SLP2⁻ SLP3⁻ *act::ermE*

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován v tekutém médiu YEME a YEME se sacharózou při 28 °C na třepačce (220 rpm) v prolamovaných Erlenmayerových baňkách. Dále na MS agaru při 28 °C.

Kmen postrádá většinu genového shluku pro biosyntézu actinorhodinu, čímž je zabráněno interferenci tohoto metabolitu s polyketidy produkovanými heterologní expresí. Dále obsahuje mutace zvyšující efektivitu transformace a umožňující vkládání methylované DNA. Kmen byl používán pro heterologní expresi genového shluku pro biosyntézu U-62162.

Streptomyces lividans TK24 (HOPWOOD a kol. 1983)

Genotyp: $\Delta str-6$ SLP2⁻ SLP3⁻

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován v tekutém médiu YEME a YEME se sacharózou při 28 °C na třepačce (220 rpm) v prolamovaných Erlenmayerových baňkách. Dále na MS agaru při 28 °C.

Kmen postrádá oba přirozené plazmidy SPL2 a SPL3, což snižuje riziko interference těchto plazmidů s vloženými plazmidy a následné mylné interpretace získaných výsledků. Kmen byl použit pro uložení streptomycetového plazmidu pAS9A1.

Streptomyces verdensis Dietz, sp. n. (UC-8157)

Kmen poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomyket, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v tekutém médiu YEME se sacharózou, pro produkci antibiotik v médiu pro *S. verdensis*, při 28 °C na třepače (220 rpm) v prolamovaných Erlenmayerových baňkách. Dále na GYM agarovém médiu nebo na MS agaru při 28 °C.

Tento kmen je přírodní producent antibiotika U-62162. Byl používán pro genové manipulace s geny pro biosyntézu U-62162.

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633 (Difco™, BD)

Kmen poskytl: Ing. Stanislav Pospíšil, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomyket, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v TSB tekutém médiu při 37 °C na třepače (220 rpm). Po 24 hodinách vzniká suspenze endospór. Případně na nutrient agaru při 37 °C.

Kmen byl používán pro biologické testy přítomnosti antimikrobiálních látek. *B. subtilis* je gram-pozitivní bakterie. Díky tomu je vhodný pro detekci přítomnosti manumycinových antibiotik, neboť ty mají vůči této skupině bakterií výraznou antimikrobiální aktivitu (naopak vůči gram-negativním nemají téměř žádné účinky). *B. subtilis* tvoří endospóry. Suspenzi endospór lze jednoduše uchovávat po dlouhou dobu při 4 °C.

4.1.2. Vektory a plazmidy

pBT340 (DATSENKO a WANNER 2000)

Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomyket, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plazmid pBT340 nese teplotně senzitivní FLP rekombinázu a je teplotně senzitivní pro replikaci (dochází k ní při 30 °C). Během kultivace při 42 °C dochází k syntéze FLP rekombinázy a zároveň ke ztrátě plazmidu (CHEREPANOV a WACKERNAGEL 1995). Obsahuje ampicilinovou a chloramfenikolovou rezistenci.

Plazmid byl použit pro vytvoření „in-frame“ delece genové kazety obklopené FRT místy v rámci metody REDIRECT[®].

pIJ778 (GUST a kol. 2002 – REDIRECT[®] protokol)

Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomyket, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plazmid vznikl vložením kazety pro genovou disrupci do EcoRV míst pBluescript SK II (+). Disrupční kazeta obsahuje spectinomycinovou a streptomycinovou rezistenci a *oriT*. Je ohraničena FRT místy, rozeznávanými FLP rekombinázou (Obr. 16). Fragment vzniklý

štěpením enzymy *EcoR* I *Hind* III byl použit jako templát pro PCR reakci. Plazmid kóduje rezistenci k ampicilinu.

pBluescript SK (+) (Stratagene)

Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Komerčně dostupný plazmid uzpůsobený vkládání DNA pomocí restrikčních enzymů. Umožňuje modrobílou selekci úspěšné inzerce. Byl použit pro sekvenaci vložených fragmentů. Kóduje rezistenci k ampicilinu.

pMS17

Vektor poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plazmid obsahuje *oriT*, gen kódující rezistenci k apramycinu, *tetR* transkripční regulátor a intergační oblast z fága ϕ C31. Díky tomu je schopen se přenést konjugací do streptomycet. Byl použit pro přenos DNA z *E. coli* ET12567 do streptomycet a následnou integraci do genomu (Obr. 14)

pAS9A1

Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Základem plazmidu je pIJ622 (KIESER – nepublikovaná data), do kterého byl vložen *Sac* I fragment DNA ze *S. nodosus* subsp. *asukaensis* obsahující geny *asuD1* – *asuD3* kódující biosyntézu C₅N podjednotky u asukamycinu. Plazmid kóduje rezistenci k thiostreptonu (Obr. 14)

pSL-TRA-INT-cos

Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plazmid vznikl z vektoru pSL1180, do kterého byly vloženy fragmenty z pMS17 s geny umožňujícími konjugaci a integraci do genomu a s apramycinovou rezistencí. Dále byla vložena bakteriofágová *cos* sekvence z plazmidu SuperCos 1. Plazmid byl použit pro konstrukci kosmidu schopného konjugativního přenosu do streptomycet a následné integrace do genomu. Kóduje ampicilinovou rezistenci (Obr. 14)

pSV BEV

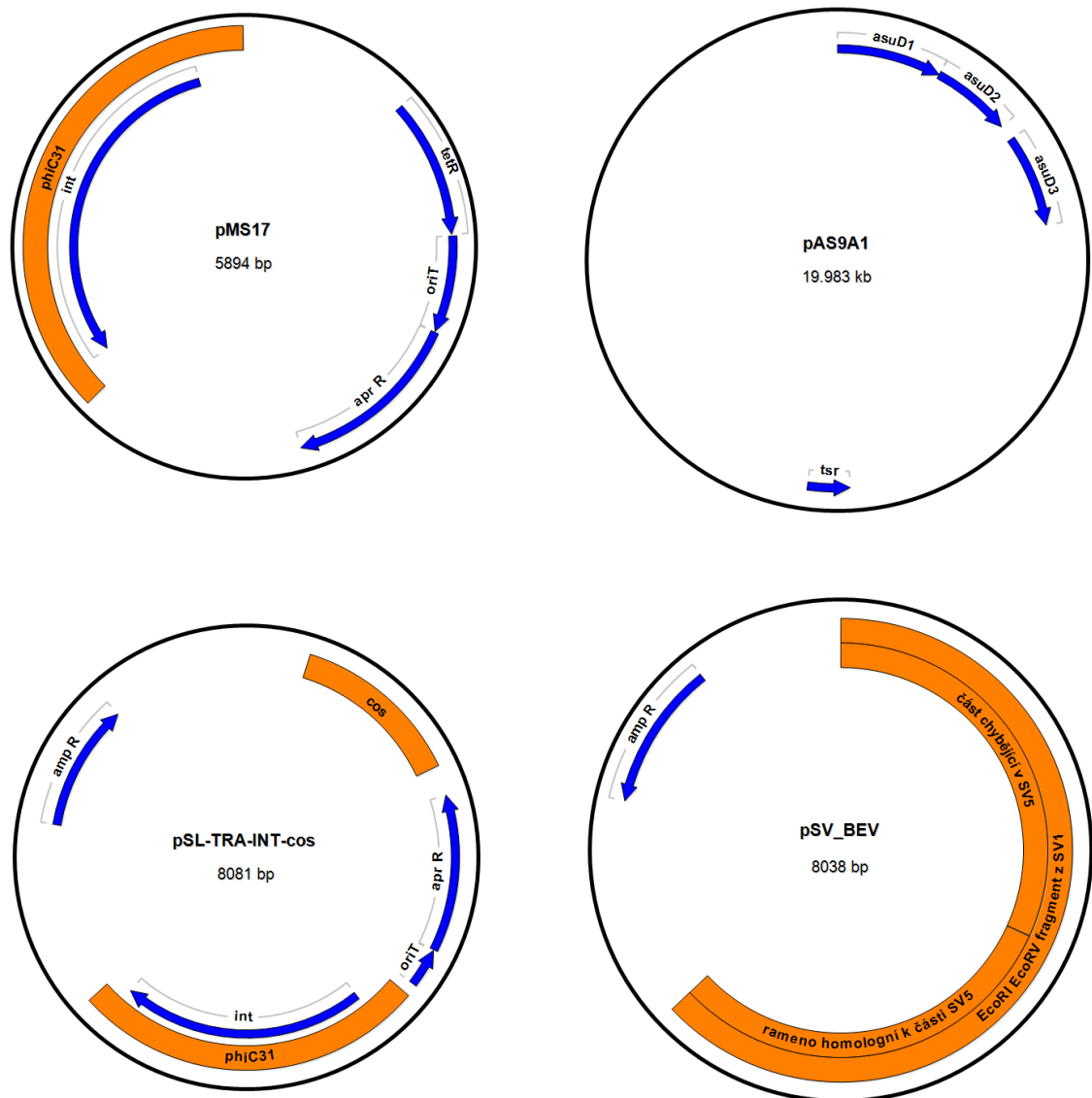
Vektor poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Základem plazmidu je pGEM[®]-7Zf(+), do kterého byl vložen fragment *Bam*HI *Eco*R V z pSV1. Tento fragment je asi 5,1 kpb dlouhý a tvoří konec pSV1 (na Obr. 18 je vlevo). Byl použit pro doplnění chybějící části genomu U-62162 v kosmidu pSV5. Plazmid kóduje ampicilinovou rezistenci (Obr. 14)

pSV1, pSV5, pSV8

Vektory poskytl: Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Plazmidy obsahují části genomové knihovny *S. verdensis*, kde se nachází genový shluk pro biosyntézu U-62162 (Obr. 18). Základem vektorů je SuperCos 1 (Stratagene) kódující bakteriofágový promotor obklopený unikátními klonovacími místy, *ori*, rezistenci k neomycinu a ampicilinu a *cos* sekvenci rozeznatelnou bakteriofágem při balení do fágových partikulí.



Obr. 14: Plazmidy pMS17, pAS9A1, pSL-TRA-INT-cos a pSV_BEV vytvořené v naší laboratoři a používané v této práci. *phiC31* - intergační oblast z fága ϕ C31; *int* - integráza; *tetR* - *tetR* transkripční regulátor; *oriT* - počátek replikace při kongugativním přenosu; *ampR* - gen kódující rezistenci k apramycinu; *asuD1* - *asuD3* - geny z genomového shluku kódujícího biosyntézu asukamycinu, kódují geny pro biosyntézu C₅N jednotky; *tsr* - gen kódující rezistenci k thioestreptonu; *ampR* - gen kódující rezistenci k ampicilinu; *cos* - sekvence ze SuperCos 1 kódující *cos* rozeznávanou sekvenci; *EcoRI EcoRV fragment z SVI* - sekvence získaná z kosmidu pSV1 štěpením RE *EcoR* I a *EcoR* V.

4.1.3. Kultivační média

Není-li uvedeno jinak:

- jedná se o procenta vypočtená na základě poměru hmotnost/objem, tj. w/v
- pro přípravu roztoků byla použita destilovaná voda
- pro úpravu pH byly použity 2M vodné roztoky HCl a NaOH
- roztoky byly sterilované v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

Tekutá kultivační média

GYM médium

0,4%	glukóza (D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner)
0,4%	kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
1%	sladový extrakt (Malt Extract, OXOID)
0,1%	NZ amin A (NZ Amine [®] Type A, WAKO)
0,2%	NaCl
0,3% (v/v)	OB soli
pH 7,3	

OB soli:

0,166%	CuSO ₄ ×5H ₂ O
0,25%	FeSO ₄ ×7H ₂ O
0,12%	MnSO ₄ ×5H ₂ O
0,5%	CaCl ₂ ×2H ₂ O
0,3%	ZnSO ₄ ×7H ₂ O

Roztok skladujeme v tmavé láhvi.

LB (Lennox broth) médium

1%	trypton (Tryptone, OXOID)
0,5%	kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5%	NaCl
pH 7,2 – 7,4	

LB (Lennox broth) médium s glukózou

1%	trypton (Tryptone, OXOID)
0,5%	kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5%	NaCl
0,1%	glukóza (D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner)
pH 7,2 – 7,4	

SOB

20%	trypton (Tryptone, OXOID)
5%	kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5%	NaCl
2,4%	MgSO ₄

0,186% KCl
pH 7,0

po sterilizaci přidáme sterilní roztok:

2,5M MgCl₂×6H₂O na výslednou koncentraci 10mM

SOC

2% trypton (Tryptone, OXOID)
0,5% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,058% NaCl
0,019% KCl
pH 6,9 – 7,1

po sterilizaci přidáme sterilní roztoky:

2M Mg²⁺ (1M MgCl₂×6H₂O a 1M MgSO₄×7H₂O) na výslednou koncentraci 20mM
2M roztok glukózy (D-glukosa monohydrát p.a.) na výslednou koncentraci 20mM

YEME (Yeast Extract – Malt Extract) médium

0,3% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5% pepton (Neutralised bacteriological peptone, OXOID)
0,3% sladový extrakt (Malt Extract, OXOID)
1% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner)
pH 7,2

po sterilizaci přidáme sterilní roztok:

2,5M MgCl₂×6H₂O na výslednou koncentraci 5mM

YEME (Yeast Extract – Malt Extract) médium se sacharózou

0,3% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5% pepton (Neutralised bacteriological peptone, OXOID)
0,3% sladový extrakt (Malt Extract, OXOID)
1% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner)
34% sacharóza (Sacharosa p.a., Lach-Ner)
pH 7,2

po sterilizaci přidáme sterilní roztok:

2,5M MgCl₂×6H₂O na výslednou koncentraci 5mM

Médium pro *S. verdensis* (SLECHTA a kol. 1982)

1,5% melasa (Třtinová melasa, Perfektra s.r.o.)
0,2% kyselina L-glutamová (CHEMAPOL Group a. s.)
0,5% pepton (Neutralised bacteriological peptone, OXOID)
0,2% NaCl
0,5% CaCO₃

pH 7,2

po sterilizaci přidáme sterilní roztok:

50% glukóza na výslednou koncentraci 0,5%

TSB médium

3% směs tryptonu a sójové mouky (Tryptone Soya Broth, OXOID)

Kultivační média s agarem

GYM agar

0,4% glukóza (D-glukosa monohdrát p.a., Lach-Ner)

0,4% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)

1% sladový extrakt (Malt Extract, OXOID)

0,1% NZ amin A (NZ Amine[®] Type A, Wako)

0,2% NaCl

0,3% (v/v) OB soli (viz GYM médium)

2% agar (Agar bacteriological No.1, OXOID)

pH 7,3

LB (Lennox broth) agar

1% trypton (Tryptone, OXOID)

0,5% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)

0,5% NaCl

2% agar (Agar bacteriological No.1, OXOID)

pH 7,2 – 7,4

MS (Mannitol Soya flour) agar

2% agar (Agar bacteriological No.1, OXOID)

2% mannitol (D-mannit p.a., Lach-Ner)

2% sójová mouka (Sójová mouka odtučněná hladká, Eko produkt)

rozpuštěné ve vodovodní vodě

po sterilizaci přidáme sterilní roztok:

2,5M MgCl₂×6H₂O na výslednou koncentraci 10mM

Výživný (nutrient) agar

2,8% výživný agar (Nutrient agar, OXOID)

0,5% agar (Agar bacteriological No.1, OXOID)

4.1.4. Roztoky přidávané do médií

Antibiotika

Antibiotika	Zásobní roztok (mg/ml)	Výsledná konc. v médiu (µg/ml)
Ampicilin	100	100
Apramycin	100	50 nebo 100
Carbenicilin	100	100
Chloramfenikol	25 ve 100% EtOH	25
Kanamycin	50	50
Spectinomycin	100	50 nebo 100
Tetracyklin	25	12,5 nebo 25
Thiostrepton	60 v DMSO	30

Pokud není uvedeno jinak, jsou antibiotika rozpuštěna v destilované vodě.

Roztoky jsou skladovány při -20 °C.

Ostatní:

IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)

zásobní roztok: 23,83 mg/ml tj. 100mM (v dH₂O)

skladování: -20 °C

výsledná koncentrace používaná v médiu: 48 µg/ml tj. 0,2mM

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactoside)

zásobní roztok: 20 mg/ml (v N,N-dimethylformamidu)

skladování: -20 °C

výsledná koncentrace používaná v médiu: 40 µg/ml

Kyselina nalidixová

zásobní roztok: 25 mg/ml (v 0,3M NaOH)

skladování: -20 °C

výsledná koncentrace používaná v médiu: 0,5 µg/ml

4.1.5. DNA oligonukleotidy, velikostní standardy a próby

DNA oligonukleotidy (Generi biotech)

CLF-right

5' - GGC CAG GCG GTA CAG GTG – 3'

CLF-left

5' - GTG GTG TCC GCC TTC AAC - 3'

vrDS-R

5' - CCC GCA CTC ACC CAC GAC GCC GGG GAC GTG CGC CGC TCA TGT AGG
CTG GAG CTG CTT C - 3'

vrDS-F

5' - GTT GAA TAA ACG ACA TGT GTT GAA TAA CTT GAG GGG ATG ATT CCG
GGG ATC CGT CGA CC - 3'

vrdER-R

5' - GCT GAG CGG GTC GGG GGG AGA GCG GGG TGC GTG CGC TCA TGT AGG
CTG GAG CTG CTT C - 3'

vrdER-F

5' - GTC CGT CGC CCC GGC CGG CCC GGT CGG AGG TGT GCG GTG ATT CCG
GGG ATC CGT CGA CC - 3'

vrdYY-right

5' - GCC CGG TGG TGC TCT ACA - 3'

vrdYY-left

5' - AGG ATC AGC ACG GTC AGC - 3'

M13 forward

5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'

M13 reverse

5' - GAA ACA GCT ATG ACC ATG - 3'

HemA1 (směs oligonukleotidů vytvořená na základě aminokyselinové sekvence)

5' - GTS TGG TGY TCS/RGS AAC GAC TAC CTC - 3'

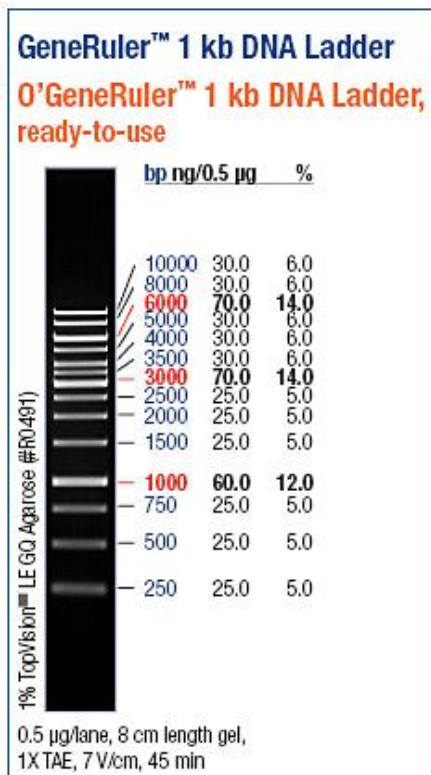
HemA3 (směs oligonukleotidů vytvořená na základě aminokyselinové sekvence)

5' - GTA CAT SCC SAC SGC GTG SAC CTC GCT - 3'

vysvětlivky: S – C/G; Y – C/T; R – A/G

DNA velikostní standard:

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10000 bp, Thermo Scientific (Obr. 15)



Obr. 15: DNA velikostní standard používaný pro gelovou elektroforézu. Převzato z <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-ready-to-use-250-to-10000-bp/>

DNA próba „Gene Ruler“

Próbu poskytla: Mgr. Kateřina Petříčková, PhD. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Neradioaktivně značená DNA próba připravená standardní metodou (viz kap. 4.2.2).
Templátová DNA pro značení je DNA velikostní standard.

4.1.6. Enzymy, protilátky a standard U-62162

RNAza A

zásobní roztok: 1 mg/ml (v dH₂O)

zásobní roztok 10 min vaříme při 100 °C

skladování: -20 °C

výsledná koncentrace používaná v roztocích: 20 µg/ml

DNA ligáza

T4 DNA ligase (5 U/µl), Thermo Scientific

AP-konjugát

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (150 U, 200 µl), Roche

Restrikční endonukleázy

Thermo Scientific: *EcoR* I, *Hind* III, *Eco32* I (= *EcoR* V), *Asc* I, *Mlu* I, *Not* I, *Bsp1407* I (= *BsrG* I), *BamH* I, *Xho* I, *Sgs* I (= *Asc* I), *Eco105* I (= *SnaB* I), *Bgl* II, *Ecl136* II, *Sac* I

Roche: *Spe* I, *Xba* I, *Cla* I, *Nsi* I

New England Biolabs: *Msc* I, *Cla* I

Aktivita: 10 U/µl

Standard antibiotika U-62162

Standard poskytl: Ing. Stanislav Pospíšil, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Antibiotikum U-62162 bylo extrahované ze *S. verdensis* Dietz, sp. n. (UC-8157) (viz kap. 4.2.5). Následně bylo přečištěné: extrahované dichlormethanem, rozdělené na tenkovrstevné chromatografii (silikagel, CH₂Cl₂ : MeOH v poměru 100 : 5), rozdělené na gelové chromatografii (Sephadex-LH-20, methanol), preparativní TLC (heptan : octan ethylnatý : methanol 5 : 4 : 1) a nakonec detekováno pod UV světlem.

Po přečištění bylo získáno 10 mg antibiotika U 62162, které bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu. Na biologický test bylo používáno 0,5 µl tohoto standardu, na focení TLC 5 µl.

4.1.7. Pufry a roztoky

Kyselý fenol-chloroform

5 g	fenol
5 ml	chloroform
1 ml	dH ₂ O

5 mg 8-hydroxychinolin
skladujeme v tmavé lahvi při 4 °C

Neutrální fenol-chloroform

Roztok kyselého fenol-chloroformu vytřepeme 10 minut s 1M Tris-HCl (pH 8,8) o objemu polovičním k objemu fenol-chloroformu. Necháme ustát, poté odstraníme horní vodnou fázi. Vytřepeme 10 minut s 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) o polovičním objemu. Necháme ustát a odstraníme téměř všechnu horní vodnou fázi (zbylá malá vrstvička této fáze chrání roztok fenol-chloroformu před přístupem vzduchu).

Składujeme v tmavé lahvi při 4 °C.

STET pufr

8% sacharóza (Sacharosa p.a., Lach-Ner)
5% triton X-100 (Roth)
50mM EDTA, pH 8,0 (Chelaton 3 dihydrát p.a., Lach-Ner)
50mM Tris-HCl, pH 8,0 (Trizma[®] base, Sigma)
roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

TE pufr

10mM Tris-HCl (Trizma[®] base, Sigma[®]), pH 8,0 upravené 35% HCl
1mM EDTA (Chelaton 3 dihydrát p.a., Lach-Ner), pH 8,0 upravené krystalky NaOH
roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

Roztok nukleotidů dNTP

2mM dATP
2mM dCTP
2mM dGTP
2mM dTTP
skladování v -20 °C

2× YT médium

1,6% trypton (Tryptone, OXOID)
1% kvasničný extrakt (Yeast Extract, OXOID)
0,5% NaCl
roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

Roztok I pro izolaci kosmidové ccc DNA

50mM Tris-HCl, pH 8,0 (Trizma[®] base, Sigma)
10mM EDTA (Chelaton 3 dihydrát p.a., Lach-Ner)
roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

Roztok II pro izolaci kosmidové ccc DNA

200mM NaOH
1% SDS (Lauryl sulfate, Sigma[®])

roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

Roztok III pro izolaci kosmidové ccc DNA

3M K-acetát, pH 5,5

roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

TESLR

25mM Tris-HCl, pH 8,0

25mM EDTA, pH 8,0

0,3M sacharóza (Sacharosa p.a., Lach-Ner)

roztok sterilujeme v autoklávu (121 °C, 30 min, 101,5 kPa)

těsně před každým použitím přidáme:

2 mg/ml lysozym

5 µl/ml zásobního roztoku Rnázy A

NaOH/SDS

0,3M NaOH

2% SDS

Pufry pro restrikční endonukleázy Thermo Scientific

10× koncentrovaný pufr O:

výsledná koncentrace: 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37°C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, 100mM NaCl

10× koncentrovaný pufr R:

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl (pH 8,5 při 37°C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, 100mM KCl

10× koncentrovaný pufr Tango:

výsledná koncentrace: 33mM Tris-acetát (pH 7,9 při 37 °C), 10mM Mg-acetát, 66mM K acetát, 0,1 mg/ml BSA

10× koncentrovaný pufr BamH I

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl (pH 8,0 při 37 °C), 5mM MgCl₂, 100mM KCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA

10× koncentrovaný pufr EcoR I

výsledná koncentrace: 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA

10× koncentrovaný pufr Ecl136 II, Sac I

výsledná koncentrace: 10mM Bis-Tris propan-HCl (pH 6,5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA

Pufry pro restrikční endonukleázy Roche

10× koncentrovaný pufr B:

výsledná koncentrace: 10mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM 2-merkaptoethanol
výsledné pH 8,0 při 37 °C

10× koncentrovaný pufr H:

výsledná koncentrace: 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTE
výsledné pH 7,5 při 37 °C

Pufry pro restrikční endonukleázy New England Biolabs

10× koncentrovaný pufr 3

výsledná koncentrace: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,9 při 25 °C

10× koncentrovaný pufr 4

výsledná koncentrace: 50mM K-acetát, 20mM Tris-acetát, 10mM Mg-acetát, 1mM DTT, pH 7,9 při 25 °C

BSA (Bovine Serum Albumin)

BSA je skladované v roztoku 20mM KPO₄, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% glycerol, pH 7,0 při 25 °C

10× koncentrovaný T4 DNA ligační pufr (10× T4 DNA Ligase Buffer) (Thermo Scientific)

400mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM ATP (pH 7,8 při 25 °C)

Komerční sada pro přípravu DNA neradioaktivně značené sondy

DIG-High Prime labeling mixture 5× conc. (Roche):

5× koncentrovaná směs pro náhodné primery:

1 U/μl Klenow polymeráza

značící složka

1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP

0,35 mM DIG-11-dUTP (nestabilní v alkalickém prostředí)

5× stabilizovaný reakční pufr v 50% (v/v) glycerolu

Komerční sada pro izolaci chromozomální DNA ze *Streptomyces*: Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Cell Lysis Solution

Nuclei Lysis Solution

Protein Precipitation Solution

RNase Solution - RNáza A 4 mg/ml (v DNA Rehydration Solution)

DNA Rehydration Solution – 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA (pH 8,0)

všechny roztoky skladujeme při pokojové teplotě

Komerční sada pro izolaci plazmidové DNA z *E. coli*: JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed)

G1 (Cell Suspension) - 50mM Tris/HCl (pH 8,0), 10mM EDTA, 100 µg/ml RNasaA, skladujeme ve 4 °C

G2 (Cell Lysis) - 200mM NaOH, 1% SDS (w/v)

G3 (Neutralization/Binding) – obsahuje octan a guanidin hydrochlorid

G4 (Wash) – obsahuje NaCl, EDTA, Tris-HCl, před použitím přidat 140 ml 100% ethanol

GX (Wash) – obsahuje octan, guanidin hydrochlorid, EDTA, před použitím přidat 80 ml 100% ethanol

kromě G1 roztoky skladujeme při pokojové teplotě

NEW WASH promývací roztok

100mM NaCl

1mM EDTA

50% (v/v) ethanol

10mM Tris-HCl (pH 7,5)

Roztok NaI

1. Rozpustíme 450 g NaI v 250 ml destilované vody (nasycený roztok při pokojové teplotě)
2. Pufrujeme 20mM Tris roztokem, pH 7,5
3. Přefiltrujeme a přidáme 1 g Na₂SO₃
4. Skladujeme v tmavé lahvi při +4 °C

Glass milk (skelné mléko)

1. Rozpustíme 400 g skelného prachu v 800 ml destilované vody
2. Mícháme 60 min, necháme 90 min stát
3. Supernatant stočíme (13300×g, 10 min při pokojové teplotě)
4. Sediment rozpustíme v 200-300 ml destilované vody
5. Přidáme HNO₃ do 50% koncentrace, přivedeme téměř k varu a zchladíme
6. Sediment 4-6 krát promyjeme destilovanou vodou; neutralizujeme na pH 7,0
7. Uschováme jako 50% suspenzi v destilované vodě při +4 °C

50× koncentrovaný TAE pufr (zásobní roztok pro agarózovou elektroforézu)

2M Tris

1M kys. octová

50mM EDTA (pH 8,0)

6× koncentrovaný nanášecí vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu

0,25% bromfenolová modř (w/v)

30% glycerol (w/v)

5× TAE pufr

Depurifikační roztok pro „Southern blotting“:

0,25M HCl

Denaturační roztok pro „Southern blotting“:

1,5M NaCl

0,5M NaOH

Neutralizační roztok pro „Southern blotting“:

1M Tris

2M NaCl

pH 7,5

20× SSC – transferový pufr pro „Southern blotting“

3M NaCl

0,3M citronan sodný

pH 7,0

Hybridizační roztok

5× roztok SSC

0,5% blokovací činidlo (Blocking Reagent, Roche)

0,1% N-laurylsarcosin, sodná sůl

0,02% SDS

rozpouštíme asi 1 h při 70 °C

Promývací pufr 1 pro hybridizaci

2× SSC

0,1% SDS

Promývací pufr 2 pro hybridizaci

0,1× SSC

0,1% SDS

Pufr 1 pro imunologickou detekci

100mM Tris

150mM NaCl

pH 7,5 (k úpravě byla použita koncentrovaná HCl)

Pufr 2 pro imunologickou detekci

0,5% blokační činidlo (Blocking Reagent, Roche)

rozpouštíme asi 1 h při 70 °C v pufru 1 pro imunologickou detekci

Pufr 3 pro imunologickou detekci

100mM Tris

100mM NaCl
50mM MgCl₂
pH 9,5

Barvicí roztok pro imunologickou detekci

Do 10 ml barvicího roztoku pro imunologickou detekci přidáme:

- 45 µl NBT-roztok (75 mg/ml nitroblue-tetrazoliová sůl v 70% (v/v) dimethylformamidu, skladujeme v -20 °C)
35 µl X-fosfát (50 mg/ml 5 bromo 4 chloro 3 indolyl fosfát v dimethylformamidu, skladujeme při -20 °C)

4.2. Metody

4.2.1. Metody izolace DNA

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pro ds-sekvenování „boiling“ lyzí

(SAMBROOK A RUSSELL 2001)

1. 1,5 ml LB média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme jednou kolonií bakterie *E. coli*, kultivujeme přes noc při 37 °C na třepačce (220 rpm)
2. Na stolní centrifuze stočíme kulturu (14000 × g, 30 s při pokojové teplotě)
3. Supernatant odebereme a ve zbytku kapaliny rozpustíme pelet
4. Přidáme 300 µl pufru STET s 200 µg rozpuštěného lysozymu; důkladně promícháme
5. Inkubujeme 10 minut v ledu
6. Zavřené mikrozkušavky inkubujeme 2 min při 100 °C
7. Stočíme (16000 × g, 25 min při 4 °C)
8. Odebereme vrchních 200 µl do nové zkumavky a přidáme k nim 200 µl isopropanolu; srážíme 30 min v -20 °C
9. Stočíme (16000 × g, 10 min při 4 °C)
10. Supernatant promyjeme dvakrát 200 µl ethanolu (-20 °C), mezi promytími stočíme (16000 × g, 2 min při 4 °C)
11. Petel necháme vyschnout, poté ho rozpustíme v 50 µl TE pufru s 1 µl zásobního roztoku RNázy A
12. Plasmidovou DNA skladujeme při 4 °C

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí sady JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, Spin Column Technique, GENOMED

1. 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme jednou kolonií bakterie *E. coli*, kultivujeme při 37 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. Kulturu stočíme (6380 × g, 7 min při pokojové teplotě)
3. Odebereme důkladně všechen supernatant
4. Pelet rozpustíme v 250 µl roztoku G1
5. Přidáme 250 µl roztoku G2 a promícháme otáčením mikrozkušavky, nepoužíváme vortex!
6. Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě

7. Přidáme 350 μ l roztoku G3 a promícháme otáčením mikrozkuřavky dokud nezískáme homogenní suspenzi, nepoužíváme vortex!
8. Směs stočíme (14000 \times g, 10 min při pokojové teplotě)
9. Umístíme JETQUICK stáčekí kolonku do 2ml přijímací zkuřavky, supernatant z předchozího kroku přelejeme do kolonky
10. Stočíme (14000 \times g, 1 min při pokojové teplotě), proteklou tekutinu vylejeme
11. *Dodatečný krok při izolaci plazmidů z bakterií bohatých na nukleázy*: do kolonky přidáme 500 μ l pufru GX a stočíme (14000 \times g, 1 min při pokojové teplotě), proteklou tekutinu vylejeme
12. Přidáme 500 μ l pufru G4 a stočíme (14000 \times g, 1 min při pokojové teplotě), proteklou tekutinu vylejeme
13. Znovu stočíme (14000 \times g, 1 min při pokojové teplotě)
14. Stáčekí kolonku umístíme do mikrozkuřavky a přímo doprostřed matrix přidáme 75 μ l TE pufru (pro vyšší koncentraci DNA můžeme TE pufr předeřhřát na 65-70 $^{\circ}$ C a po přidání do kolonky nechat stát 1 min; případně můžeme přidat pouze 50 μ l TE pufru)
15. Stočíme (14000 \times g, 2 min při pokojové teplotě)
16. Získaný roztok DNA skladujeme při 4 $^{\circ}$ C

Izolace kosmidové ccc DNA (John Inner Centre)

1. 1,5 ml LB média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme jednou kolonií bakterie *E. coli*, kultivujeme při 37 $^{\circ}$ C přes noc na třepače (220 rpm)
2. Na stolní centrifuze stočíme kulturu (14000 \times g, 30 s při pokojové teplotě), supernatant odebereme
3. Pelet rozpustíme v 100 μ l Roztoku I pro izolaci kosmidové ccc DNA
4. Okamžitě přidáme 200 μ l Roztoku II pro izolaci kosmidové ccc DNA, promícháme obracením mikrozkuřavky 10 \times
5. Okamžitě přidáme 150 μ l Roztoku III pro izolaci kosmidové ccc DNA, promícháme obracením mikrozkuřavky 5 \times
6. Stočíme (14000 \times g, 5 min při pokojové teplotě)
7. Supernatant okamžitě přelijeme do nové mikrozkuřavky s 400 μ l fenol-chloroformu, mícháme 2 min na vortexu
8. Stočíme (14000 \times g, 5 min při pokojové teplotě)
9. Horní fázi přeneseme do nové mikrozkuřavky s 600 μ l 2-propanolu; mikrozkuřavky necháme stát v ledu 10 minut
10. Stočíme (14000 \times g, 5 min při pokojové teplotě), pelet promyjeme 200 μ l 75% ethanolu
11. Stočíme (14000 \times g, 5 min při pokojové teplotě), pelet necháme vyschnout při pokojové teplotě
12. Pelet rozpustíme v 50 μ l TE pufru, skladujeme v -20 $^{\circ}$ C

Izolace plazmidové DNA ze streptomycet alkalickou lyzí a fenolovou precipitací (KIESER 1984)

1. 8 ml YEME nebo GYM média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme streptomycetovými spórami, kultivujeme při 28 °C 2 až 5 dní na třepačce (220 rpm)
2. Kulturu stočíme (8100 × g, 5 min při pokojové teplotě), supernatant důkladně slijeme
3. Pelet rozpustíme v 500 µl TESLR a inkubujeme 30 min při 37 °C
4. Přidáme 250 µl NaOH/SDS a promícháme na vortexu, inkubujeme 15 min při 70 °C
5. Mikrozkušavky necháme zchladnout pod 37 °C, přidáme 80 µl kyselého fenol chloroformu
6. Důkladně promícháváme na vortexu dokud není fenol-chloroform zcela rozptýlen jako bílá emulze
7. Stočíme (14000 × g, 10 min při pokojové teplotě)
8. Supernatant (asi 700 µl) přeneseme do nové mikrozkušavky obsahující 50 µl nepufrovaného 3M Na-acetátu a přidáme 450 µl isopropanolu, promícháme otáčením mikrozkušavky
9. Stočíme (14000 × g, 10 min při pokojové teplotě), odebereme všechnen supernatant
10. Pelet rozpustíme v 70 µl TE pufru
11. Přidáme 14 µl nepufrovaného 3M K-acetátu a 14 µl kyselého fenol-chloroformu, rozptýlíme důkladným promícháváním na vortexu
12. Mikrozkušavku zchladíme na ledu a stočíme (16000 × g, 5 min při 4 °C)
13. Horní vodnou fázi (asi 77 µl) přeneseme do nové mikrozkušavky obsahující 56 µl nepufrovaného 3M K-acetátu a 630 µl TE pufru
14. Přidáme 460 µl isopropanolu a promícháme otáčením mikrozkušavky
15. Stočíme (14000 × g, 5 min při pokojové teplotě), odstraníme všechnen supernatant
16. Pelet promyjeme 1,2 ml 70% ethanolu (-20 °C), stočíme (14000 × g, 5 min při pokojové teplotě) a odstraníme supernatant
17. Pelet (DNA) rozpustíme v 150 µl TE pufru, přidáme 150 µl 5M NH₄-acetát, promícháme
18. Stočíme (14000 × g, 10 min při pokojové teplotě), supernatant přeneseme do nové mikrozkušavky
19. Přidáme 660 µl 100% ethanolu, promícháme a stočíme (14000 × g, 10 min při pokojové teplotě), supernatant odstraníme
20. Pelet promyjeme 1 ml 70% ethanolu, stočíme (14000 × g, 5 min při pokojové teplotě)
21. Odstraníme tekutinu, pelet necháme vyschnout při pokojové teplotě
22. Pelet rozpustíme v 50 µl TE pufru a skladujeme při 4 °C

Izolace chromozomální DNA ze streptomycet pomocí sady Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega

1. 10 ml YEME nebo GYM média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme streptomycetovými spórami, kultivujeme při 28 °C 2 až 5 dní na třepačce (220 rpm)
2. 1,5 ml narostlé bakteriální kultury stočíme (14000 × g, 2 min při pokojové teplotě), supernatant důkladně odebereme
3. Pelet rozpustíme v 480 µl 50mM EDTA
4. Přidáme 120 µl roztoku lysozymu (5 mg/ml dH₂O), pipetou promícháme

5. Inkubujeme při 37 °C dle bakteriálního kmene 5 až 30 minut, tak aby byly buňky těsně před lyzí
6. Stočíme (14000 × g, 4 min při pokojové teplotě), supernatant důkladně odebereme
7. Přidáme 600 µl Nuclei lysis solution, pelet opatrně rozpustíme
8. Inkubujeme 5 min v 80 °C, občas jemně promícháme
9. Po zchladnutí přidáme 3 µl RNA solution, promícháme otočením mikrozkuřavky 5×
10. Inkubujeme 15 až 60 min v 37 °C
11. Po zchladnutí přidáme 200 µl Protein precipitation solution, alespoň 20 s důkladně promícháváme na vortexu
12. Inkubujeme 5 min v ledu
13. Stočíme (14000 × g, 3 min při pokojové teplotě)
14. Odebereme supernatant obsahující DNA do čisté mikrozkuřavky, přidáme 600 µl isopropanolu (99%)
15. Mikrozkuřavkou otáčíme dokud nevidíme bílé klubičko sražené DNA
16. Stočíme (14000 × g, 2 min při pokojové teplotě)
17. Pelet promyjeme 600 µl 75% ethanolu (-20 °C)
18. Stočíme (14000 × g, 2 min při pokojové teplotě)
19. Pelet necháme vyschnout
20. Přidáme 100 µl DNA rehydration solution, inkubujeme 1 hod v 65 °C, jednou za 15 min jemně promícháme
21. DNA skladujeme ve 2-8 °C

Izolace celkové DNA z buněk *E. coli* pro koloniovou PCR

1. Čerstvě narostlou větší kolonii *E. coli* setřeme a resuspendujeme párátkem v 50 µl dH₂O
2. Suspenzi inkubujeme 5 min při 100 °C
3. Stočíme (14000 × g, 1 min při pokojové teplotě)
4. Pro reakci PCR použijeme 1 – 2 µl supernatantu

4.2.2. Metody další práce s DNA

Fenol-chloroformová extrakce DNA

1. K roztoku DNA přidáme neutrální fenol-chloroform v objemu 0,5- až 2-násobek objemu roztoku
2. Promícháváme na vortexu 20 s
3. Stočíme (16000 × g, 10 min při 4 °C)
4. Odebereme vodnou fázi obsahující DNA a přeneseme do čisté mikrozkuřavky
5. DNA přesrážíme metodou Srážení DNA ethanolem

Srážení DNA ethanolem

1. K roztoku DNA přidáme Na-acetát (3M, pH 6,5) v objemu rovném desetině objemu roztoku DNA
2. Dále přidáme 100% ethanol (-20 °C) v objemu rovném 2,5 násobku objemu roztoku DNA

3. Srážíme minimálně 1 h v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo přes noc v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. Stočíme ($16000 \times \text{g}$, 15 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
5. Supernatant odstraníme, k peletu přidáme $300\text{ }\mu\text{l}$ 75% ethanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
6. Stočíme ($16000 \times \text{g}$, 15 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
7. Ethanol vylijeme, pelet necháme vyschnout
8. Pelet DNA rozpustíme v TE pufru nebo dH_2O

Měření koncentrace DNA

- Roztok DNA naředíme vodou stonásobně
- Měříme absorbanci při 260 nm (absorbční maximum DNA) na spektrofotometru (Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom) v přiložených kyvetách Q (Ultrospec Cells, Q, LKB Biochrom)
- Jako blank použijeme $100\times$ naředěný roztok, ve kterém je daná DNA rozpuštěná
- Koncentraci DNA vypočítáme na základě vztahu: když $A_{260} = 1$ pak $c = 0,05\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Pro zjištění čistoty DNA (přesněji kontaminaci proteiny) měříme také absorbanci při 280 nm (absorbční maximum proteinů)
- Čistotu DNA určíme na základě vztahu A_{260}/A_{280} , pro čistou DNA platí, že podíl se pohybuje mezi 1,8 – 2,0

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Štěpení DNA bylo prováděno restrikčními endonukleázami a pufrů s nimi dodávanými. Restrikční směs měla většinou celkový objem $10\text{ }\mu\text{l}$ a byla tohoto složení:

1 μl	roztoku DNA (0,1 – 3 μg DNA)
1 μl	pufru
0,5 μl	restrikční endonukleázy
8 μl	dH_2O

Doba štěpení byla 1,5 hodiny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro štěpení dvěma restrikčními endonukleázami současně byl zvolen pufr, jehož složení se nejvíce blížilo složení ideálních pufrů obou enzymů.

Ligace DNA (SAMBROOK A RUSSELL 2001)

DNA po fenol-chloroformové extrakci a přesrážení ethanolom vysušíme a k peletu přidáme:

10 μl	$10\times$ koncentrovaného T4 DNA ligačního pufru (Thermo Scientific)
1 μl	T4 DNA ligázy (Thermo Scientific)
90 μl	dH_2O

Inkubujeme přes noc při $14\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ligázu inaktivujeme inkubací 10 min při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA agarózová elektroforéza v horizontálním uspořádání (SAMBROOK A RUSSELL 2001)

- Agarózový gel: 0,7% - 1% agaróza (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza) v $1\times$ TAE pufru
- Elektroforetický pufr: $1\times$ TAE (připravený ze zásobního $50\times$ koncentrovaného TAE roztoku)

- Nanášení pufr: 6× koncentrovaný nanášecí vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu ve výsledné koncentraci 1×
- Velikostní standard: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 1000 bp (Thermo Scientific)
- Napětí: 5 – 6 V/cm

Po proběhnutí elektroforézy gel barvíme 20 min v roztoku ethidium bromidu (výsledná koncentrace 1 µg/ml). Poté z gelu roztok omyjeme vodou.

DNA zviditelníme nasvícením pod UV světlem (absorbční maximum ethidium bromidu je 300 nm) na transiluminátoru a vyfotíme.

Glass Milk izolace DNA z agarózového gelu (VOGELSTEIN a GILLESPIE 1979)

1. Vyřízneme proužky gelu s izolovaným fragmentem (nebarvené EtBr), zvážíme
2. Přidáme 2-3 ml NaI roztoku na 1 g gelu
3. Inkubujeme při 53 °C dokud se agaróza nerozpustí (max. 5 min), občas promícháme
4. Přidáme 1 µl skelného mléka na 1 µg DNA (minimálně však 5 µl), dobře promícháme
5. Inkubujeme 5-10 min v ledu, občas promícháme
6. Odstředíme ve stolní mikrocentrifuze (14000×g, 15 s při pokojové teplotě)
7. Sediment promyjeme 2-3 krát NEW WASH roztokem (-20 °C), mezi promytími sediment v roztoku rozptýlíme
8. Po posledním promytí ještě jednou krátce odstředíme a odebereme zbytek kapaliny
9. Sediment rozpustíme v 50 µl TE a luhujeme DNA 5-10 min při 53 °C
10. Stočíme (14000×g, 1 min při pokojové teplotě) a odebereme supernatant s vyluhovanou DNA
11. DNA extrahujeme fenol-chloroformem a přesrážíme ethanolem

PCR reakce:

PCR pro ověření integrace pSV_all do genomu *S. coelicolor* a *S. lividans*:

Složení PCR směsi pro ověření genu vrdXC18:

0,5 µl	oligonukleotidu „vrdYY left“
0,5 µl	oligonukleotidu „vrdYY right“
5,0 µl	dNTP (zásobní roztok 2 mM)
3,0 µl	MgCl ₂ (zásobní roztok 25 mM, Top-Bio)
5,0 µl	10× pufr Taq bez Mg ²⁺ (Top-Bio)
0,5 µl	templátové DNA
34,5 µl	dH ₂ O
0,5 µl	Taq DNA polymerázy (500 U, Top-Bio)

polymeráza byla přidána během prvního cyklu při 55 °C

Složení PCR směsi pro ověření genu vrdC14:

0,5 µl	oligonukleotidu „CLF left“
0,5 µl	oligonukleotidu „CLF right“
5,0 µl	dNTP (zásobní roztok 2 mM)
3,0 µl	MgCl ₂ (zásobní roztok 25 mM, Top-Bio)

5,0 µl	10× pufr Taq bez Mg ²⁺ (Top-Bio)
0,5 µl	templátové DNA
2,0 µl	DMSO 100%
32,5 µl	dH ₂ O
0,5 µl	Taq DNA polymerázy (500 U, Top-Bio)

polymeráza byla přidána během prvního cyklu při 55 °C

Průběh cyklů PCR pro vrdXC18 a vrdC14:

1. Denaturace:	99 °C	10 min
2. 30 cyklů:		
Denaturace	94 °C	90 s
Nasedání oligonukleotidů	55 °C	60 s
Prodlužování	72 °C	40 s
3. Dosyntetizování řetězců	72 °C	5 min

Po doběhnutí cyklů byla teplota nastavena na 4 °C.

Na gelovou elektroforézu bylo nanášeno 7 µl PCR směsi po přidání barvičky.

Koloniová PCR

Složení PCR směsi pro ověření vložení pAS9A1 do E. coli – gen asuD2:

12,5 µl	Fast Start Mix (Fast Start PCR Master, Roche)
2,5 µl	10× konc. primer hemA1
2,5 µl	10× konc. primer hemA3
1 - 2 µl	templátová DNA
6,5 µl	dH ₂ O

Průběh reakce PCR pro asuD2 v DNA z E. coli:

1. Denaturace:	95 °C	10 min
2. 10 cyklů:		
Denaturace	95 °C	30 s
Nasedání oligonukleotidů	60 °C	30 s
Prodlužování	72 °C	45 s
3. 25 cyklů:		
Denaturace	95 °C	30 s
Nasedání oligonukleotidů	55 °C	30 s
Prodlužování	72 °C	45 s
4. Dosyntetizování řetězců	72 °C	7 min

Po doběhnutí cyklů byla teplota nastavena na 4 °C.

Složení PCR směsi pro ověření vložení pAS9A1 do chromozomu streptomycet – gen asuD2:

12,5 µl	Fast Start Mix (Fast Start PCR Master, Roche)
2,5 µl	10× konc. primer hemA1
2,5 µl	10× konc. primer hemA3
7,5 µl	dH ₂ O

Místo templátové DNA bylo do směsi párátkem naneseno mikroskopické množství buněk setřených ze streptomycetové kolonie narostlé na misce.

Průběh reakce PCR pro asuD2 v DNA ze streptomycet:

- | | | |
|----------------------------|-------|--------|
| 1. Denaturace: | 95 °C | 10 min |
| 2. 15 cyklů: | | |
| Denaturace | 95 °C | 30 s |
| Nasedání oligonukleotidů | 60 °C | 30 s |
| Prodlužování | 72 °C | 45 s |
| 3. 20 cyklů: | | |
| Denaturace | 95 °C | 30 s |
| Nasedání oligonukleotidů | 55 °C | 30 s |
| Prodlužování | 72 °C | 50 s |
| 4. Dosyntetizování řetězců | 72 °C | 7 min |

Po doběnutí cyklů byla teplota nastavena na 4 °C.

Sekvenování DNA

Sekvence DNA byla prováděna externě ve Středisku sekvenování DNA, MBÚ AV ČR, v.v.i. Pro sekvenaci je používán automatický genetický analyzátor ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems. Použité oligonukleotidy pro sekvenační reakce: M13 forward a M13 reverse (viz kap. 4.1.5)

Přenos DNA fragmentů z agarózového gelu na membránu – Southern blotting (SAMBROOK a RUSSELL 2001)

1. Připravíme nylonovou membránu (IMMOBILON – NY+, Millipore) o velikosti asi 2 mm větší do všech stran než je velikost gelu, s membránou pracujeme v rukavicích
2. Membránu krátce namočíme do vody a poté do 20× SSC
3. Sestavíme vakuový přístroj (XL Vacuum Blotting systém, VacuGene) dle manuálu na vodorovné ploše
4. Na desku přístroje položíme připravenou membránu, na ní igelitovou masku s otvorem asi o 2 mm menším do všech stran než je velikost gelu
5. Na otvor položíme gel tak, aby jamky i okraje gelu ležely na masce
6. Přístroj zapneme, na vakuové pumpě nastavíme tlak 50 cm H₂O sloupce
7. Celý gel převrstvíme depurinačním roztokem a necháme přesávat 10 – 15 min
8. Depurinační roztok z gelu důkladně odsajeme a gel převrstvíme denaturačním roztokem, přesáváme 10 – 15 min
9. Denaturační roztok z gelu důkladně odsajeme a gel převrstvíme neutralizačním roztokem, přesáváme 10 – 15 min
10. Neutralizační roztok z gelu důkladně odsajeme a gel převrstvíme transferovým roztokem (20× SSC), přesáváme 50 min, roztok průběžně doplňujeme
11. Transferový roztok odsajeme, odstraníme gel, masku a membránu a vypneme přístroj
12. Membránu necháme uschnout, poté k ní zafixujeme DNA ozářením 3 min UV světlem na transluminátoru
13. Membránu můžeme na suchém místě uchovávat několik dní

Příprava neradioaktivně značené DNA próby

1. DNA extrahovanou fenol-chloroformem a přesráženou ethanolom rozpustíme v 16 μl dH_2O
2. DNA denaturujeme 10 min při 95 °C
3. Okamžitě mikroskopickou pipetou přeneseme do ledu politého ethanolom
4. Přidáme 4 μl DIG-High Prime, promícháme
5. Necháme značit přes noc při 37 °C
6. Druhý den přidáme 1,6 μl 0,25M EDTA a inkubujeme 10 min při 65 °C
7. Přidáme 2,5 μl 4M LiCl a 75 μl 100% ethanolu (-20 °C)
8. Srážíme DNA v -80 °C 30 min až několik dní
9. DNA stočíme (16000 \times g, 15 min při 4 °C), kapalinu slijeme, přidáme 300 μl 75% ethanolu, stočíme (16000 \times g, 15 min při 4 °C)
10. Pelet DNA vysušíme a poté rozpustíme v 50 μl dH_2O
11. Těsně před použitím prouba denaturujeme inkubací 10 min při 95 °C a okamžitě přidáváme do předehřátého hybridizačního roztoku na značení

Hybridizace fragmentů DNA na nylonové membráně s neradioaktivně značenou DNA proubou a její vizualizace

DNA na membráně byla hybridizovaná s DNA proubou značenou digoxigeninem. Navázaná prouba byla následně detekována anti-DIG protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou (AP-konjugát). Alkalická fosfatáza byla poté zviditelněna reakcí s X-fosfátem v NBT-roztoku za vzniku barevného produktu.

1. Z membrány odstříháme kraje s velikostním DNA standardem, který značíme zvlášť proubou „Gene ruler“ (viz kap)
2. Membrány vložíme do hybridizačních trubic a přidáme 20 ml hybridizačního roztoku na 100 cm^2 (dále budou všechny objemy vztaženy na tuto velikost membrány)
3. Inkubujeme za pomalého otáčení 1 hod při 68 °C v hybridizační pídce (HPOI & HPOI MiniOven, Apollo)
4. Roztok slijeme, přidáme 2,5 ml nového hybridizačního roztoku a předehřejeme na 68 °C
5. Přidáme právě zdenaturovanou DNA prouba a necháme hybridizovat za pomalého otáčení přes noc při 68 °C v hybridizační pídce
6. DNA prouba slijeme a můžeme uschovat v -80 °C pro další použití
7. Membrány dvakrát promyjeme minimálně 50 ml promývacího roztoku 1, 5 min při pokojové teplotě
8. Membrány dvakrát promyjeme minimálně 50 ml předehřátého (68 °C) promývacího roztoku 2, 15 min při 68 °C
9. Membrány asi 1 min promyjeme pufrem 1 pro imunologickou detekci při pokojové teplotě
10. Puf 1 slijeme, různé membrány vložíme do stejné nádoby a přidáme 100 ml puf 2, inkubujeme 30 min na třepačce (Multifunction 3D rotator PS-M3D, Grant-Bio)
11. Puf 2 slijeme a membrány asi 1 min promyjeme pufrem 1

12. Pufř 1 slijeme, přidáme 20 ml pufru 1 se 4 μ l konjugované protilátky (AP-konjugát) (výsledná koncentrace 150 mU/ml), inkubujeme 30 min na třepačce
13. Roztok slijeme, nenavázanou protilátku odstraníme promýváním v pufru 1, dvakrát 15 min na třepačce
14. Membránu 2 min promýváme ve 20 ml pufru 3 na třepačce
15. Pufř 3 slijeme, na membrány nanese 10 ml barvicího roztoku, inkubujeme ve tmě bez hnutí 30 min až 24 hod, podle kvality DNA a próby
16. Reakci zastavíme inkubací v 50 ml TE pufru 5 min
17. Membrány necháme uschnout a poté je oskenujeme, skladujeme je na suchém a temném místě

4.2.3. Metody transformace buněk plazmidovou DNA

Optická denzita buněčných kultur byla měřena na spektrofotometru (Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom) v přiložených kyvetách G (Ultrospec Cells, G, LKB Biochrom) při 600 nm. Jako blank bylo použito čisté médium, ve kterém byla kultivována daná buněčná kultura.

Připrava kompetentních buněk *E. coli* BW25113/pIJ790 pro transformaci teplotním šokem

1. 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme jednou kolonií bakterie *E. coli* BW25113/pIJ790, kultivujeme při 30 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. 150 μ l narostlé kultury zaočkujeme do 15 ml LB nebo SOB média s antibiotiky
3. Kultivujeme ve 30 °C na třepačce (220 rpm) do dosažení OD₆₀₀ ~ 0,4
4. Stočíme (6380 \times g, 5 min při 4 °C)
5. Sediment rozpustíme v 7,5 ml (polovině původního objemu) ledového 0,1M MgCl₂, necháme v ledu stát 30 min
6. Stočíme (6380 \times g, 5 min při 4 °C)
7. Sediment rozpustíme v 1,5 ml ledového 0,1M CaCl₂, necháme v ledu stát minimálně 30 min, ale může být až 24 hod (čím déle, tím větší kompetence buněk je dosaženo)

Transformace buněk *E. coli* BW25113/pIJ790 teplotním šokem

1. Ke 100 μ l kompetentních buněk přidáme 5 μ l roztoku DNA, promícháme a necháme stát na ledu 30 min
2. Inkubujeme 2 min ve 42 °C, poté hned přemístíme do ledu na 45 s až 1,5 min
3. Přidáme 1 ml SOC média, inkubujeme 1 hod ve 30 °C za třepání
4. Celou kulturu vyneseme na LB agar s příslušnými antibiotiky a necháme růst ve 30 °C do dalšího dne

Připrava buněk *E. coli* SURE kompetentních pro elektroporaci (SAMBROOK A RUSSELL 2001)

1. 1,5 ml LB média s tetracyklinem zaočkujeme *E. coli* SURE, kultivujeme při 37 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. 500 μ l narostlé kultury zaočkujeme do 500 ml čistého LB média
3. Kultivujeme ve 37 °C za třepání (220 rpm) do OD₆₀₀ ~ 0,7

4. Kulturu stočíme ve sterilních vychlazených centrifugačních zkumavkách (3073 × g, 15 min při 4 °C) a sediment rozpustíme v 500 ml (v původním objemu kultury) ledové dH₂O, totéž opakujeme ještě jednou
5. Stočíme (3073 × g, 15 min při 4 °C), supernatant důkladně odebereme
6. Buňky rozpustíme v 1 ml ledového 10% glycerolu, rozdělíme do mikrozkušavek po 50 µl
7. Skladujeme při -80 °C

Příprava buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002 kompetentních pro elektroporaci

1. 1,5 ml LB média s glukózou s kanamycinem (25 µg/ml) a chloramfenikolem (25 µg/ml) zaočkujeme *E. coli* ET12567/pUZ8002, kultivujeme při 37 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. 100 µl narostlé kultury zaočkujeme do 10 ml LB média s glukózou s antibiotiky (viz výše)
3. Kultivujeme ve 37 °C za třepání (220 rpm) do OD₆₀₀ ~ 0,7
4. Kulturu stočíme (6380 × g, 5 min při 4 °C) a sediment rozpustíme v 10 ml (v původním objemu kultury) ledové dH₂O, totéž opakujeme ještě jednou
5. Stočíme (6380 × g, 5 min při 4 °C), supernatant vylijeme, v jeho zbytku (cca 100 µl) rozmícháme sediment
6. Buňky držíme na ledu a okamžitě používáme pro elektroporaci

Elektroporace (SAMBROOK A RUSSELL 2001)

1. K 50 µl kompetentních buněk přidáme ledový roztok DNA (přibližně 0,1 ng/µl buněk), promícháme a necháme stát na ledu 10 až 30 min
2. Směs přemístíme do vychlazené elektroporační kyvety a v elektroporátoru provedeme transformaci
3. Ihned přidáme 1 ml SOC média a kultivujeme 1 hod při 37 °C
4. Buňky vysijeme na misku LB agar s příslušnými antibiotiky
5. Výsledkem je přibližně 1×10⁸ transformantů/µg DNA

Nastavení elektroporátoru:

napětí: 2,0 kV

délka pulsu: 99 µs

počet pulsů: 10

šířka mezery v kyvetě: 1 mm

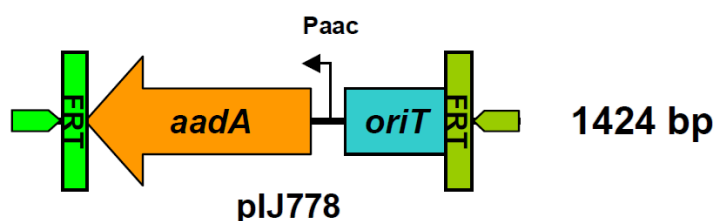
intenzita pole: 20 kV/cm

4.2.4. REDIRECT[®] technologie (PCR-targeting systém in *Streptomyces coelicolor*, John Innes Centre)

Cílem této metody je delece požadovaného genu (dále YFG – your favorite gene) v chromozomu streptomycet. Základem je disruptivní kazeta, která je součástí plazmidu pIJ778, obsahující gen pro rezistenci ke spectinomycinu a *oriT*, oboje obklopené FRT místy (Obr. 16). Tato kazeta je poté po stranách prodloužena pomocí dlouhých PCR primerů o sekvence komplementární ke krajům YFG. Kosmid, obsahující YFG a jeho okolí je vpraven do *E. coli*

BW25113/pIJ790, ve kterých velmi dobře dochází k rekombinacím s lineárním fragmentem. Díky tomu se PCR produkt disrupční kazety, který je do těchto buněk následně vpraven, vloží na místo YFG na kosmidu. Kosmid je poté transformován do buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002, které ho konjugací přenesou do streptomycet. Zde dojde homologní rekombinací k výměně YFG na chromozomu za disrupční kazetu.

Pro dokončení delece je kosmid s disrupční kazetou na místě YFG transformován do buněk *E. coli* DH5 α /BT340, kde dojde k expresi FLP rekombinázy a k vyštěpení kazety mezi FRT místy, místo kazety zbyde pouze „jizva“. Tento kosmid s jizvou je poté transformován do protoplastů streptomycet obsahujících disrupční kazetu na místě YFG. Homologní rekombinací dojde k nahrazení disrupční kazety za jizvu, čímž je delece dokončena. Metody jsou uvedeny pozměněné, podle toho, jak je provádíme v naší laboratoři.



Obr. 16: Disrupční kazeta z pIJ778 získaná po štěpení tohoto plazmidu RE *EcoR* I *Hind* III. *aadA* kóduje gen pro rezistenci ke spectinomycinu a streptomycinu, FRT – FLP rozeznávaná místa, *oriT* – počátek přenosu z RK2, Paac – počátek transkripce genu *aadA*. Převzato z protokolu REDIRECT[®] technologie (John Innes Centre).

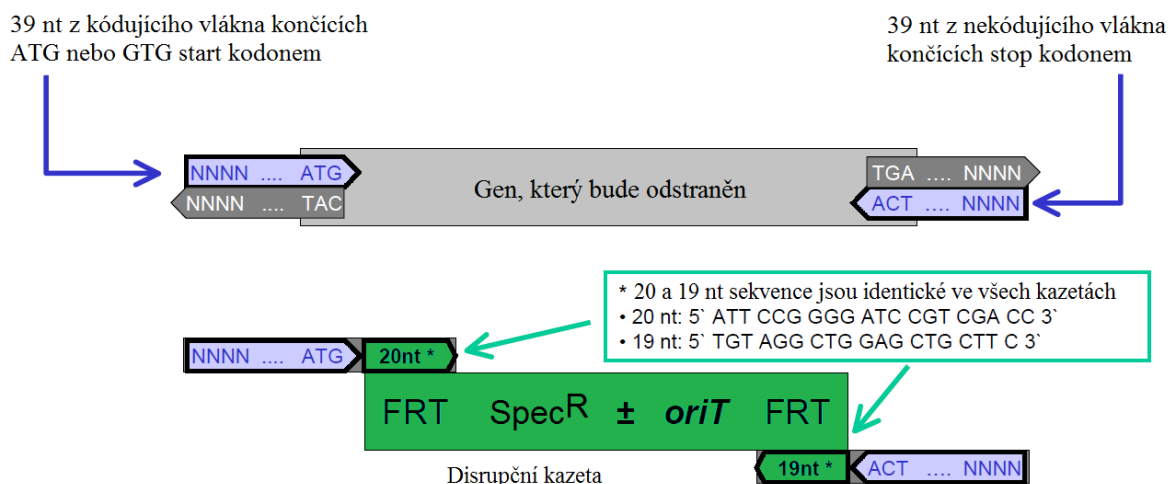
Protokol 1: Přečištění PCR templátu (rezistentní (-*oriT*) kazety)

1. 5 ml LB média s antibiotikem spectinomycin (50 μ g/ml) zaočkujeme *E. coli* DH5 α /pIJ778, kultivujeme při 37 $^{\circ}$ C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. Izolujeme plazmid pIJ778 pomocí sady JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit
3. Naštěpíme vyizolovanou DNA (1,5 hod při 37 $^{\circ}$ C)

40 μ l	plazmidové DNA (přibližně 10 μ g)
10 μ l	pufri B (Roche)
50 μ l	dH ₂ O
3 μ l	restrikční endonukleázy <i>EcoR</i> I (Roche)
3 μ l	restrikční endonukleázy <i>Hind</i> III (Roche)
4. Restrikční směs rozdělíme na elektroforéze (20 \times 20 \times 0,25 cm, 100 ml 1% TAE (1 \times) agarózový gel, 5 V/cm, 2 – 3 hod, 1 \times TAE pufri)
5. Z gelu vyřízneme místo s fragmentem DNA o velikosti 1425 bp a vyizolujeme DNA metodou Glass milk, skladujeme v -20 $^{\circ}$ C

Protokol 2: Navržení dlouhých PCR primerů

Pro každou genovou disrupci jsou nutné dva dlouhé PCR oligonukleotidy (primery) (58 nt a 59 nt). Každý z nich má na 5' konci 39 nt dlouhou sekvenci komplementárních k sekvenci genu, který chceme vydeletovat (v našem případě *vrds* a *vrer*). V případě „forward“ primeru je tato sekvence z kódujícího vlákna našeho genu zájmu, u „reverse“ primeru je z nekódujícího vlákna. Na 3' konci je sekvence komplementární k pravému nebo levému konci disrupční kazety (Obr. 17) (4.1.5).



Obr. 17: Navržení PCR primerů pro delecí genu v čtecím rámci. FRT – FLP rozeznávané místo; Spec^R – gen pro rezistenci ke spectinomycinu; *oriT* – počátek přenosu; nt – nukleotidy. Převzato z protokolu REDIRECT[®] technologie (John Innes Centre).

Protokol 3: PCR namnožení prodloužené disrupční kazety

Reakční podmínky pro PCR:

0,5 µl	„forward“ oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,5 µl	„reverse“ oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,5 µl	templátové DNA (100 ng/µl)
5 µl	10× Taq pufr kompletní (Top-Bio)
4 µl	roztok nukleotidů dNTP (50 µM každého)
2,5 µl	DMSO 100%
1 µl	DNA Taq polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio)
36 µl	dH ₂ O

Cykly PCR reakce:

1. Denaturace:	94 °C	2 min
2. 10 cyklů:		
Denaturace	94 °C	45 s
Nasedání oligonukleotidů	50 °C	45 s
Prodlužování	72 °C	90 s
3. 15 cyklů:		
Denaturace	94 °C	45 s
Nasedání oligonukleotidů	55 °C	45 s
Prodlužování	72 °C	90 s
4. Dosyntetizování řetězců	72 °C	5 min

Po doběhnutí cyklů byla teplota nastavena na 4 °C.

5 µl PCR produktu je použito pro analýzu gelovou elektroforézou. Očekávaná velikost fragmentů je 1503 bp (o 78 bp větší, než velikost disrupční kazety). Zbývající PCR produkt je rozdělen na elektroforéze (10 × 6 × 0,25 cm, 30 ml 1% TAE (1×) agarózový gel, 5 V/cm,

1× TAE pufr) a vyzolován z gelu metodou „Glass milk“. Poté je DNA extrahována fenol-chloroformem a přesrážena ethanolom.

Protokol 4: Zavedení kosmidu do *E. coli* BW25113/pIJ790 teplotním šokem

Plazmid pIJ790 obsahuje gen pro rezistenci k chloramfenikolu a teplotně senzitivní počátek replikace (pro replikaci vyžaduje 30 °C).

1. 2 ml LB média s antibiotikem chloramfenikol (25 µg/ml) zaočkujeme *E. coli* BW25113/pIJ790, kultivujeme při 30 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. Pokračujeme podle návodu přípravy buněk kompetentních pro transformaci teplotním šokem (od bodu 2)
3. Buňky transformujeme metodou teplotního šoku kosmidem
4. Celou kulturu vysijeme na misku LB agar s antibiotiky chloramfenikol (25 µg/ml) a ampicilin (100 µg/ml)
5. Necháme růst přes noc ve 30 °C
6. Úspěšné vložení kosmidu ještě ověříme restričním štěpením kosmidu vyzolovaného z pozitivních kolonií

Protokol 5: Cílení PCR produktu do kosmidu

1. 2 ml LB média s antibiotiky carbenicilin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) a chloramfenikol (25 µg/ml) zaočkujeme *E. coli* BW25113/pIJ790 s vloženým kosmidem, kultivujeme při 30 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. Do 20 ml SOB média s antibiotiky (viz výše) přidáme 200 µl 1M L-arabiny a 200 µl narostlé kultury (tak aby vznikla 1% kultura)
3. Pokračujeme podle návodu přípravy buněk kompetentních pro transformaci teplotním šokem (od bodu 3 – viz kap. 4.2.3)
4. Buňky transformujeme metodou teplotního šoku celým množstvím vyzolovaného PCR produktu
5. Celou kulturu vysejeme na misku LB agar s antibiotiky carbenicilin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml) a spectinomycin (50 µg/ml)
6. Necháme růst přes noc ve 30 °C
7. Druhý den jsou na misce narostlé kolonie různých velikostí. Malé kolonie jsou falešně pozitivní. V tomto stádiu se v jedné buňce nachází společně mutantní i nemutantní kosmid, protože do buňky se pravděpodobně dostalo méně fragmentů PCR než je zde kopií kosmidu. I jen jeden mutantní kosmid na buňku stačí pro rezistenci k antibiotiku. Většinou platí pravidlo, že čím větší je velikost kolonie, tím více mutantních kosmidů je zde přítomných.
8. Zaočkujeme největší z narostlých kolonií, izolujeme kosmid metodou Izolace kosmidové ccc DNA a ověříme správnou rekombinaci PCR fragmentu restričním štěpením (pro restrikci použijeme 4 µl roztoku DNA)

Protokol 6: Přenos mutantního kosmidu do streptomycet

1. Připravíme kompetentní buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 pro elektroporaci dle příslušného návodu (viz kap. 4.2.3)

2. Kompetentní buňky elektroporací transformujeme mutantním kosmidem vyizolovaným z BW25113/pIJ790, všechny buňky vysejeme na misku LB agar s antibiotiky spectinomycin (50 µg/ml) a carbenicilin (100 µg/ml)
3. Necháme růst přes noc ve 37 °C
4. 10 ml LB média s glukózou se spectinomycinem (50 µg/ml), chloramfenikolem (25 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml) zaočkujeme jednou kolonií narostlých bakterií, kultivujeme při 37 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
5. 100 µl narostlé kultury zaočkujeme do 10 ml nového LB média s glukózou s antibiotiky (jako výše)
6. Kultivujeme ve 37 °C za třepání (220 rpm) do OD₆₀₀ ~ 0,4
7. Kulturu stočíme (8100 × g, 5 min při 20 °C) a sediment rozpustíme v 10 ml (v původním objemu kultury) čistého LB média s glukózou abychom odstranili antibiotika, totéž opakujeme ještě jednou
8. Stočíme (8100 × g, 5 min při 4 °C), supernatant vylijeme, sediment rozmícháme asi v 1 ml LB s glukózou
9. Během přípravy buněk *E. coli* připravíme streptomycetové spóry. Na misku s vysporulovanými streptomycetami nalijeme asi 2 ml roztoku 2× YT a jemným přejížděním kličkou po povrchu uvolníme do tekutiny spóry (pro každou konjugaci je potřeba asi 10⁸ spór)
10. Těsně před dokončením přípravy buněk *E. coli* provedeme teplotní šok spór (50 °C, 10 min), necháme vychladnout na stole
11. Smícháme 500 µl suspenze buněk *E. coli* a 500 µl roztoku spór
12. Stočíme (14000 × g, 90 s při pokojové teplotě), vylijeme většinu supernatantu, ve zbytku rozmícháme pelet
13. Celou směs vysejeme na misku MS agar a necháme růst 16 - 20 hod při 28 °C
14. Po dané době přelijeme misku 1 ml dH₂O s roztokem nalidixové kyseliny (výsledné množství 0,5 mg) a spectinomycinem (výsl. množství 1,25 mg), necháme růst 3 až 4 dny při 28 °C
15. Jednotlivé narostlé kolonie streptomycet přeočkujeme do sektorů na misky MS agar s kyselinou nalidixovou (25 µg/ml) a spectinomycinem (50 µg/ml) a zároveň stejné kolonie na misky MS agar s kyselinou nalidixovou (25 µg/ml), spectinomycinem (50 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml), necháme růst 3 až 4 dny při 28 °C
16. Hledáme kolonie kanamycin senzitivní a zároveň spectinomycin rezistentní, neboť to značí, že došlo k vložení disruptční kazety na specifické místo pomocí tzv. „double cross-over“ a nedošlo k integraci celého kosmidu do chromozomu
17. Jednotlivé kolonie kan^S, spec^R přeočkujeme opět na misky MS agar se spectinomycinem a s/bez kanamycinu, necháme růst 3 až 4 dny při 28 °C
18. Narostlé kolonie zaočkujeme do tekutého média YEME se sacharózou nebo GYM se spectinomycinem (50 µg/ml), necháme růst asi 5 dní při 28 °C, poté izolujeme chromozomální DNA (viz kap. 4.2.1)
19. Správnost vložení disruptční kazety ověříme restrikcí štěpením, gelovou elektroforézou, tzv. Southern blotting a následnou hybridizací se značenými DNA próbami

Protokol 7: FLP - zprostředkované vyříznutí disruptční kazety

Disruptční kazeta je lemována FRT místy, rozeznávanými FLP rekombinázi. Exprese FLP rekombináz v *E. coli* odstraní centrální část disruptční kazety (obsahující mimo jiné spectinomycinovou rezistenci) a ponechá na místě „jizvu“ v podobě 81 bp bez stop kodónu.

Buňky *E. coli* DH5 α obsahují teplotně senzitivní plazmid pBT340 (replikuje se při 30 °C) kódující FLP rekombinázu a rezistenci k ampicilinu a chloramfenikolu. Při 42 °C dochází k syntéze FLP rekombinázy a zároveň ztrátě plazmidu.

1. 2 ml LB média s chloramfenikolem (25 $\mu\text{g/ml}$) zaočkujeme *E. coli* DH5 α /BT340, kultivujeme při 30 °C přes noc na třepačce (220 rpm)
2. Do 10 ml LB média s glukózou s antibiotikem (viz výše) přidáme 100 μl narostlé kultury
3. Kultivujeme ve 30 °C za třepání (220 rpm) do $\text{OD}_{600} \sim 0,6$
4. Kulturu stočíme (8100 \times g, 5 min při 4 °C) a sediment rozpustíme v 10 ml ledové 10% glycerolu
5. Stočíme (8100 \times g, 5 min při 4 °C) a sediment rozpustíme v 5 ml ledové 10% glycerolu
6. Stočíme (8100 \times g, 5 min při 4 °C), supernatant vylijeme, v jeho zbytku (cca 100 μl) rozmícháme sediment
7. Smícháme 50 μl suspenze buněk s 2 μl mutantního kosmidu (cca 100 ng) (vyizolovaný z BW25113/pIJ790 z protokolu 5), pokračujeme dle návodu na elektroporaci
8. 100 μl roztoku transformovaných buněk vysejeme na LB agar se spectinomycinem (50 $\mu\text{g/ml}$) a chloramfenikolem (25 $\mu\text{g/ml}$)
9. Necháme růst 2 dny ve 30 °C
10. Jednu z narostlých kolonií rozetřeme na jednotlivé kolonie na novou misku s LB agarem bez antibiotik, necháme růst přes noc ve 42 °C.
11. Na LB agarovou misku se spectinomycinem (50 $\mu\text{g/ml}$) a na misku s kanamycinem (50 $\mu\text{g/ml}$) identicky přeočkujeme pomocí sterilních párátém 30 kolonií narostlých ve 42 °C.
12. Necháme růst přes noc ve 37 °C
13. Klony rezistentní ke kanamycinu ale senzitivní se spectinomycinu značí úspěšné vyštěpení rezistentní kazety. Správnost ověříme ještě restrikcí štěpením vyizolovaného kosmidu

Následující postup (který již nebylo v této práci nutné provést) má za cíl vyměnit disruptční kazetu vloženou ve streptomycetách za „jizvu“ vzniklou vyštěpením této kazety. K tomu dojde homologní rekombinací mezi chromozomem s vloženou kazetou a kosmidem s vyštěpenou kazetou připravenou v protokolu č. 7. Tento kosmid je do streptomycet vpraven transformací protoplastů, které jsou poté selektovány na rezistenci ke kanamycinu, což značí integraci kosmidu do genomu jednoduchým „cross-over“. Následuje přeočkování na medium bez kanamycinu, což umožňuje dalšími homologními rekombinacemi výměnu kazety za „jizvu“ provázenou ztrátou rezistence ke kanamycinu i spectinomycinu.

4.2.5. Analytické a separační metody

Extrakce sekundárních metabolitů ze Streptomyces

Touto metodou získáme extrakt obsahující sekundární metabolity, mezi které patří také manumycinová antibiotika. Mimo nich se zde nachází ale mnoho jiných složek, zvláště buněčné lipidy.

Extrakt se snažíme mít dle možností co nejvíce v chladu a tmě.

1. 80 ml YEME média se sacharózou s příslušnými antibiotiky zaočkujeme sporami a kultivujeme při 28 °C 2 dny na třepače (220 rpm)
2. 8 ml narostlé kultury zaočkujeme do 80 ml YEME média nebo média pro *S. verdensis* s příslušnými antibiotiky, kultivujeme při 28 °C 24 hod na třepače (220 rpm)
3. Kulturu stočíme (3080 × g, 15 min při pokojové teplotě)
4. Supernatant slijeme do skleněné kádinky, dále pracujeme zvlášť se supernatantem a zvlášť s buňkami

Supernatant

- i. V supernatantu rozpustíme NaCl tak, aby vznikl nasycený (asi 5M) roztok
- ii. K roztoku přidáme 1/3 objemu ethylacetátu, třepeme v dělicí nálevce 30 min na reciproční třepače (3006, GFL), rychlost 250 rpm, v chladové místnosti, ve tmě
- iii. Směs stočíme (3080 × g, 15 min při pokojové teplotě)
- iv. Horní ethylacetátovou fázi přeneseme do odpařovací baňky, zazátkujeme a uložíme do -20 °C dokud nebudeme hotovi s prací s buňkami

Sedimentované buňky

- i. K buňkám přidáme aceton v objemu poloviny celkového objemu kultury (v tomto případě tedy 40 ml)
 - ii. Suspenzi třepeme v dělicí nálevce 30 min na reciproční třepače (3006, GFL), rychlost 250 rpm, v chladové místnosti, ve tmě
 - iii. Směs stočíme (3080 × g, 15 min při pokojové teplotě)
 - iv. Supernatant přelijeme do odpařovací baňky a odpařujeme na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150mbar
 - v. Poté, co v baňce zbývá pouze malé množství vodné fáze (nelze odpařit), odpařování ukončíme, ke zbytku kapaliny přidáme 2-3 objemy ethylacetátu a třepeme v dělicí nálevce 30 min na reciproční třepače (3006, GFL), rychlost 250 rpm, v chladové místnosti, ve tmě
 - vi. Směs stočíme (3080 × g, 15 min při pokojové teplotě)
 - vii. Horní ethylacetátovou fázi přidáme do odpařovací baňky obsahující ethylacetátovou fázi z extrakce ze supernatantu
5. Ethylacetátovou fázi odpařujeme do sucha na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150mbar

6. Do suché baňky nalijeme 1,5 ml chloroformu, důkladně opláchneme stěny a přelijeme do malé odparné baňky
7. Odpařujeme (jako výše) dokud v baňce nezůstane asi 150 μ l roztoku, ten přeneseme do vialky z tmavého skla, skladujeme v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Metoda TLC (Thin Layer Chromatography) byla použita pro potvrzení přítomnosti U-62162, neboť toto antibiotikum absorbuje UV světlo o délce 254 nm.

- Mobilní fáze: benzen : aceton v poměru 3 : 2
 - Stacionární fáze: TLC hliníkové fólie 20×20 cm (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)
 - TLC fólie jsou opatřeny anorganickými fluorescenčními indikátory (F₂₅₄), které umožňují UV detekci bezbarvých substrátů. Indikátory fluoreskují při 254 nm. Vzorky, které absorbují UV při 254 nm jsou detekovány díky zhášení fluorescence.
1. Připravíme si TLC fólii (pracujeme s ní v ochranných rukvicích) o takové šířce, aby jednotlivé vzorky mohly být nanášeny minimálně 1,5 cm od bočního okraje a 1,5 cm od sousedního vzorku. Vzorky nanášíme na startovní linii, která je 1,5 cm od spodního okraje.
 2. Pomocí mikrostříkačky Hamilton nanášíme po kapičkách vzorek (acetylát/chloroformový extrakt) na fólii, tak aby vzniklá skvrna měla průměr maximálně 3 mm.
 3. Po zaschnutí skvrn vložíme TLC fólii do vyvíjecí kolony, kam jsme na dno, asi do výšky 1 cm, nalili mobilní fázi. Kolonu přiklopíme skleněným poklopem.
 4. Necháme vyvíjet, dokud mobilní fáze nedosáhne asi 1 cm pod horní okraj TLC fólie. Poté fólii vyjmeme a necháme uschnout na čistém filtračním papíru.
 5. TLC fólii ozáříme UV světlem (254 nm) a vyfotíme.

Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek

Biologický test byl použit pro zjištění přítomnosti biologicky aktivních látek v acetylát/chloroformovém extraktu. Konkrétně se jedná o látky s antibakteriálními účinky vůči gram-pozitivním bakteriím (používaný testovací mikroorganismus – *Bacillus subtilis*).

1. Do čtvercové misky nalijeme vrstvu výživného agaru, necháme ztuhnout. Přelijeme 30 ml výživného agaru se zamíchanými 300 μ l suspenze endospór *B. subtilis*. Necháme ztuhnout.
2. Právě vyvinutou a uschlou TLC desku přiložíme na agar, vymačkáme vzniklé bubliny a necháme 10 min difundovat látky z desky do agaru. Poté desku sejmeme a misky necháme přes noc ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Pokud v našem vzorku byly přítomny antibakteriální látky, vidíme další den na misce inhibiční zóny růstu *B. subtilis* v místech, kde z TLC fólie tyto látky difundovaly do agaru.

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodivého pole a hmotnostní detekcí (UHPLC-DAD-ToF-MS)

Extrakty ze streptomycetových kultur byly analyzovány pomocí UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography). Analyzátor Acquity UPLC System (Waters) je tvořen Acquity UPLC vysokotlakým čerpadlem, Acquity UPLC dávkovačem vzorků, Acquity UPLC kolonovým termostatem, Acquity UPLC DAD detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem LCT Premier XE (Waters) s elektrosprejem (ESI – Electrospray Ionization) a ortogonálně uspořádaným analyzátozem doby letu (ToF – Time of Flight, Waters MS). Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynxTM, verze 4.1 (Waters) (http://www.waters.com/waters/en_US/MassLynx-MS-software/nav.htm?locale=en_US&cid=513662)

UHPLC slouží k separaci jednotlivých složek vzorku. Ty jsou poté analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, která dělí fragmenty látek na základě poměru hmotnost ku náboji. Pomocí programu MassLynxTM je poté k získaným hodnotám navrženo elementární složení analyzovaných látek.

Hodnoty antibiotika U-62162:

Relativní molekulová hmotnost: 419,51

Sumární vzorec: C₂₃H₃₃NO₆

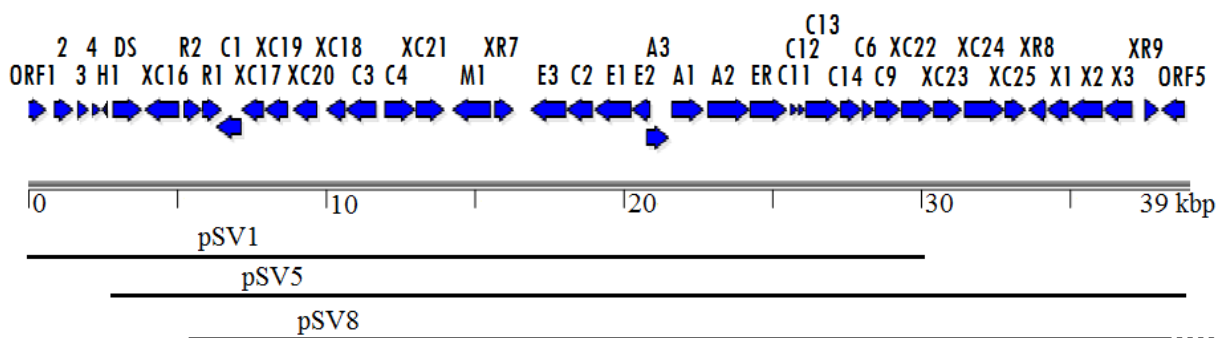
t_R: 9,5 min

5. Výsledky

5.1. Sekvenace genového shluku kódujícího syntézu U-62162

V naší laboratoři byla vytvořena genomová knihovna producenta antibiotika U-62162 *S. verdensis* Dietz, sp. n. (UC-8157) (dále jen *S. verdensis*). Tato knihovna byla uložena do kosmidových vektorů, mezi kterými byly pomocí hybridizace s genem pro AHBA syntázu určeny kosmidy nesoucí části genového shluku pro biosyntézu U-62162. U nich byly vytvořeny restriční mapy, podle kterých byly identifikovány nejvhodnější kosmidy pokrývající velké části předpokládaného genového shluku. Jsou to kosmidy pSV1, pSV5 a pSV8 (Obr. 18).

U kosmidu pSV1 byla určena kompletní sekvence. Chybějící krajní úsek byl sekvenován v kosmidu pSV8. Získané sekvence byly porovnány se známými sekvencemi v databázích a na tomto základě byly předpovězené otevřené čtecí rámce jednotlivých genů. Ty byly dále porovnány s předpokládanými geny kódovanými genovým shlukem pro biosyntézu asukamycinu u *S. nodosus* subsp. *asukaensis*.



Obr. 18: Otevřené čtecí rámce genového shluku pro biosyntézu U-62162 s vyznačenými geny předpovězenými na základě sekvenčních homologií. Přímký pod osou značí části genového shluku obsažené v kosmidech používaných v této práci.

5.1.1. Sekvenování kosmidu pSV8

Z kosmidu pSV8 byl odstraněn fragment mezi *Cla* I místy, který se shodoval s již osekvenovanou částí pSV1. Takto vznikl plazmid pSV8dC, který jsem obdržela. Plazmid byl naštěpen restriční endonukleázou (RE) *Bam*H I (viz kap. 4.2.2), restriční směs byla nanášena na gelovou elektroforézu (viz kap. 4.2.2). Z gelu byly vyizolovány vzniklé fragmenty o velikostech přibližně 900 bp a 1200 bp metodou „glass milk“ izolace (viz kap. 4.2.2). Plazmid pBluescript SK⁺ byl naštěpen RE *Bam*H I a následně inkubován s alkalickou fosfatázou (viz kap. 4.2.2). Poté byl přidán k fragmentům z pSV8dC, směs byla extrahovaná fenol chloroformem a přesrážena ethanolem (viz kap. 4.2.2). Následně byly fragmenty do plazmidu ligovány (viz kap. 4.2.2). Ligační směsi byly transformovány elektroporací do kompetentních buněk *E. coli* SURE (viz kap. 4.2.3) a vysety na misky LB agaru obsahujícího XGAL, IPTG a ampicilin. Pomocí modro-bílé selekce byly vybrány kolonie obsahující plazmidy s vloženými fragmenty. Z těchto kolonií byly izolovány plazmidy metodou „boiling“ lyze (viz kap. 4.2.1) a jejich správnost byla ověřena restričním štěpením *Bam*H I a

následnou gelovou elektroforézou. Správné klony byly znovu izolovány komerční sadou JETQUICK (viz kap. 4.2.1) a předány do Střediska sekvenování DNA, kde byly sekvenovány (viz kap. 4.2.2).

5.1.2. Identifikace ORF v genovém shluku U-62162

Ve spolupráci s Ing. Petříčkem byl sekvenován celý genový shluk U-62162. Získané sekvence byly složeny pomocí programu LaserGene[®] – SeqMan Pro[™] a následně porovnány se známými sekvencemi v databázi Blastx (ALTSCHUL a kol. 1997). (Hledáno podle genetického kódu bakterií a archae, databáze – non-redundant protein sequences, organismus *Streptomyces*). Na tomto základě byly předpovězeny otevřené čtecí rámce (ORF – open reading frame). Jejich umístění v genovém shluku je naznačeno na Obr. 18 včetně genů z bezprostředního okolí. V Tabulka 1 jsou vypsané předpokládané proteinové produkty identifikovaných ORF genového shluku a jejich navrhovaná funkce, uvedeny jsou také případné homologní proteiny ze shluku pro biosyntézu asukamycin.

Geny bezprostředně sousedící se shlukem pro biosyntézu U-62162 jsou nazvány ORF1 – ORF5. Podle sekvenčních podobností kóduje ORF1 integrázu a ORF2, ORF3, ORF4 a ORF5 kódují transpozázy.

5.2. Přenos a heterologní exprese genového shluku pro biosyntézu U-62162 v geneticky upravených kmenech

Kvůli snadnější manipulaci, ověřeným metodickým postupům a nižší produkci jiných sekundárních metabolitů jsme se rozhodli přenést genový shluk pro biosyntézu U-62162 do geneticky modifikovaných streptomycetových producentů.

Protože nebylo jisté, zda kosmid pSV5 obsahuje tento shluk celý, byl vytvořen rekombinantní kosmid vložením 2,55 kpb úseku z levého konce kosmidu pSV1 do pSV5, čímž vznikl kosmid pSV5_all. Ten byl následně přenesen do *Streptomyces lividans* K4-114 a *S. coelicolor* M512. Z kmenů byla extrahována produkovaná antibiotika, která byla analyzována metodami TLC s následným biologickým testem a UHPLC-DAD-ToF-MS. Výsledky ukázaly, že kmeny neprodukují antibiotikum U-62162, nicméně byly přítomné metabolity strukturou odpovídající U-62162 bez horního řetězce.

Z důvodu neúspěšné heterologní exprese bylo nutné dále pracovat s původním přírodním producentem antibiotika – *S. verdensis*.

Tabulka 1: Proteiny genového shluku pro biosyntézu U-62162 a jejich předpokládané funkce. Homologní geny v genovém shluku pro biosyntézu asukamycinu jsou uvedeny v posledním sloupci.

Protein	Počet AK	Předpokládaná funkce	Homolog v asu shluku
VrdA1	366	3,4-AHBA syntáza	AsuA1
VrdA2	476	Adenyláza 3,4-AHBA karboxylové skupiny	AsuA2
VrdA3	258	Kondenzace ASA a DHA/DHAP	AsuA3
VrdC1	288	Fosfopanteteinyl transferáza	AsuC1
VrdC2	298	Arylamin N-acyltransferáza	AsuC2
VrdC3	347	Ketoacyl syntáza III	AsuC3
VrdC4	349	Ketoacyl syntáza III	AsuC4
VrdC6	142	Thioesteráza	AsuC6
VrdC9	294	Acyl dehydratáza	AsuC9
VrdC11	90	KSI/II asociovaný ACP	AsuC11
VrdC12	84	3,4-AHBA ACP	AsuC12
VrdC13	392	Ketoacyl syntáza I/II	AsuC13
VrdC14	245	CLF (chain-length factor)	AsuC14
VrdXC16	391	Acetyl-CoA acetyltransferáza	
VrdXC17	254	3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenáza	
VrdXC18	220	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza	
VrdXC19	266	Enoyl-CoA hydratáza/isomeráza	
VrdXC20	278	Enoyl-CoA hydratáza/isomeráza	
VrdXC21	323	Alkohol dehydrogenáza	
VrdXC22	359	Dehydrogenáza větvených ketokyselin	
VrdXC23	324	Dehydrogenáza větvených α -ketokyselin	
VrdXC24	456	E2 podjednotka dehydrogenázy větvených α -ketokyselin	
VrdXC25	243	Methylmalonyl-CoA mutáza	
VrdER	420	Enoylreduktáza	
VrdE1	422	Monooxygenáza	AsuE1
VrdE2	214	Flavin reduktáza	AsuE2
VrdE3	402	Epoxidáza	AsuE3
VrdM1	433	Přenašeč látek z buňky do okolí	AsuM1
VrdR1	223	Regulace transkripce	AsuR1
VrdR2	206	Regulace transkripce	AsuR2
VrdXR7	219	Regulace transkripce	
VrdXR8	199	Regulace transkripce	
VrdXR9	169	Regulace transkripce	
VrdDS	330	DSBA oxidoreduktáza	
VrdX1	253	Zřejmě hydroláza HAD rodiny	
VrdX2	382	Zřejmě oxidoreduktáza	
VrdX3	334	Zřejmě protein biosyntézy A-faktoru	
VrdH1	63	Hypotetický konzervovaný protein streptomycet	

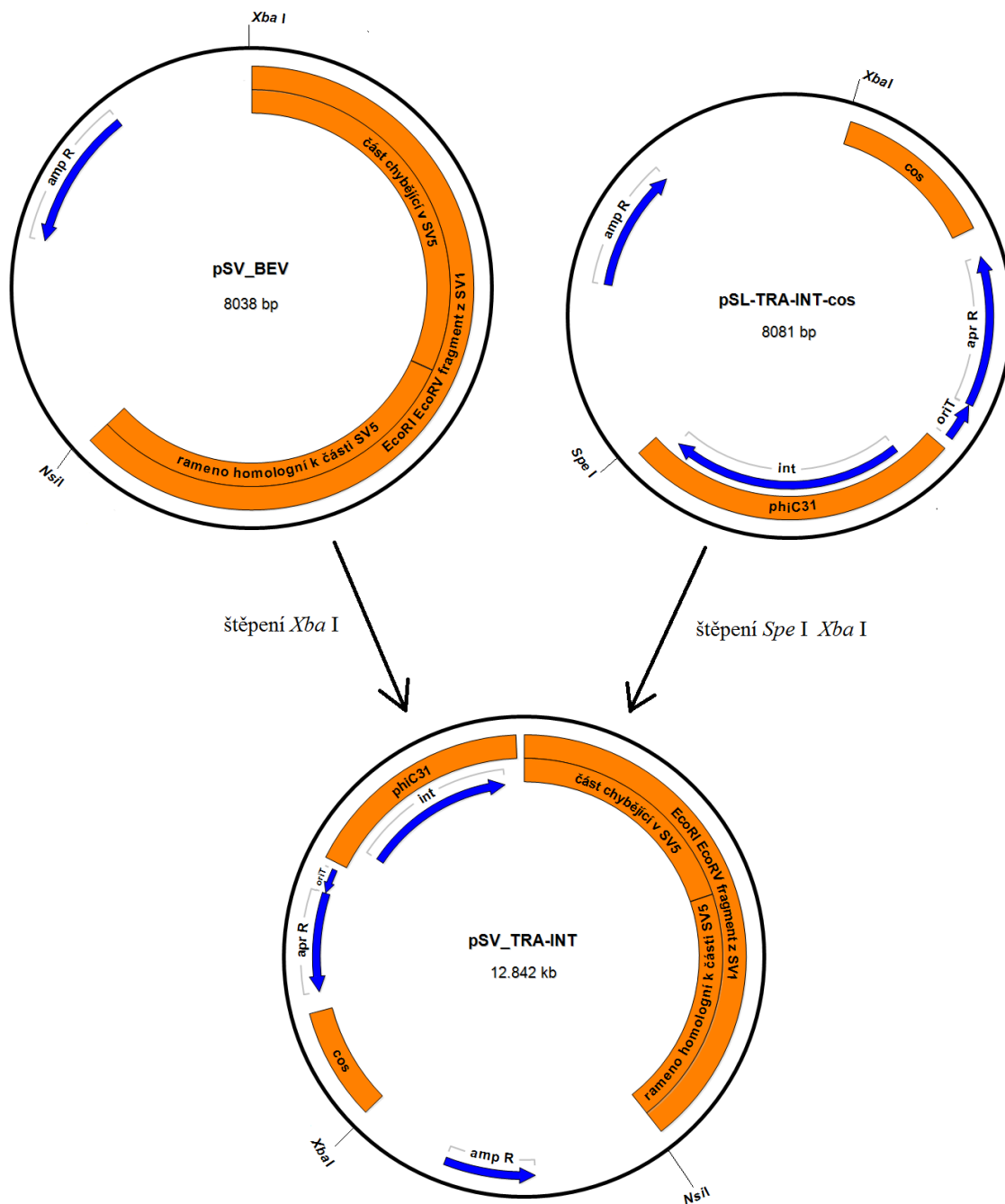
5.2.1. Příprava kosmidu obsahujícího celý genový shluk U-62162

Plazmidy pSL-TRA-INT-cos, pSV_BEV a pSV5 (viz kap. 4.1.2), vytvořené v naší laboratoři, byly metodou elektroporace přeneseny do kompetentních buněk *E. coli* SURE a selektovány na ampicilin. Poté z nich byly komerční sadou JETQUICK izolované namnožené vektory. Jejich správnost byla ověřena restričním štěpením – v případě pSL-TRA-INT-cos směsí RE *Spe* I *Xba* I; pSV_BEV směsí RE *Eco*R I *Hind* III; pSV5 restriktázou *Cla* I.

pSL-TRA-INT-cos byl naštěpen kombinací restriktáz *Spe* I *Xba* I. Směs byla nanášena na gelovou elektroforézu, z gelu byl následně metodou „Glass milk“ vyizolován fragment o velikosti asi 4,8 kpb. pSV_BEV byl naštěpen *Xba* I a následně inkubován s alkalickou fosfatázou. Fragment z pSL-TRA-INT-cos byl přidán k naštěpenému pSV_BEV, DNA byla extrahována fenol-chloroformem a přesrážena ethanolem. Následně byla provedena ligace fragmentu do vektoru, čímž vznikl plazmid pSV_TRA INT (Obr. 19). Ten byl přesrážen ethanolem a metodou elektroporace vpraven do kompetentních buněk *E. coli* SURE. Transformované buňky byly selektovány na apramycin. Plazmid pSV_TRA-INT byl z transformovaných buněk vyizolován komerční sadou JETQUICK a jeho správnost byla ověřena restričním štěpením směsí RE *Hind* III *Xba* I a následně gelovou elektroforézou.

pSV5 byl metodou teplotního šoku transformován do připravených kompetentních buněk *E. coli* BW25113/pIJ790 (viz kap. 4.2.3). Transformované buňky byly selektovány na chloramfenikol a ampicilin. Úspěšné vložení bylo ověřeno izolací pSV5 metodou izolace kosmidové ccc DNA (viz kap. 4.2.1), štěpením *Cla* I a směsí *Cla* I *Xba* I a následnou elektroforézou.

pSV_TRA INT byl naštěpen kombinací RE *Nsi* I *Xba* I. Směs byla nanášena na elektroforézu a následně byl z gelu izolován fragment velikosti přibližně 10 kbp. Ten byl extrahován fenol-chloroformem a přesrážen ethanolem. Následně byl metodou teplotního šoku vpraven do připravených kompetentních buněk BW25113/pIJ790/pSV5, které byly poté selektovány na chloramfenikol, apramycin, kanamycin a carbenicilin. Úspěšná integrace fragmentu do pSV5 homologní rekombinací přes *cos* sekvenci a rameno homologní k části pSV5 byla ověřena izolací kosmidu a restričním štěpením směsí *Eco*R V *Cla* I následované gelovou elektroforézou. Vzniklý kosmid byl pojmenován pSV5_all.



Obr. 19: Příprava plazmidu pSV_TRA-INT. Fragment vzniklý štěpením plazmidu pSL-TRA-INT-cos restriktázami *Spe I Xba I* byl vložen do plazmidu pSV_BEV naštěpeného *Xba I*.

5.2.2. Přenos kosmidu pSV5_all do *S. lividans* K4-114 a *S. coelicolor* M512

Izolovaný kosmid pSV5_all byl přenesen elektroporací do připravených kompetentních buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002. Transformované buňky byly selektovány na apramycin a carbenicilin. Kosmid byl pro kontrolu z buněk izolovaný a naštěpen kombinací RE *Cla I EcoR V*.

Plazmid pSV5_all byl metodou konjugace (viz kap. 4.2.4 protokol 6 s rozdílem, že místo spectinomycinu byl použit apramycin) přenesen z *E. coli* ET12567/pUZ8002/pSV5_all do kmenů *Streptomyces lividans* K4-114 a *S. coelicolor* M512. Ke konjugaci došlo na miskách MS agaru, které byly přibližně po 20 hodinách přelití roztoky nalidixové kyseliny a apramycinu. Po několika přeočkováních na nové misky byly ze selektovaných kmenů izolované chromozomální DNA metodou Wizard® Genomic DNA Purification Kit (viz kap. 4.2.1), u kterých byly následně změřeny koncentrace (viz kap. 4.2.2).

Ověření, zda opravdu došlo ke konjugativnímu přenosu celého kosmidu do streptomycet a k integraci do genomu, bylo provedeno pomocí PCR (viz kap. 4.2.2). Byly použity dvě dvojice primerů. Jeden rozeznávající okolí genu *vrDXC18* nacházejícího se v levé polovině vkládaného shluku (primery *vrDY*-left a *vrDY*-right), druhý rozeznávající gen *vrDC14* v pravé polovině shluku (primery CLF-left a CLF-right) (viz kap. 4.1.5 a 4.2.2). Části PCR směsí byly poté nanášeny na gelovou elektroforézu. Po vyfocení zde byly jasně viditelné pruhy o předpokládané velikosti - 530 bp pro gen *vrDXC18* a 580 bp pro gen *vrDC14* – což dokazuje úspěšný přenos celého shluku.

5.2.3. Extrakce a analýza antibiotik produkovaných heterologními hostiteli

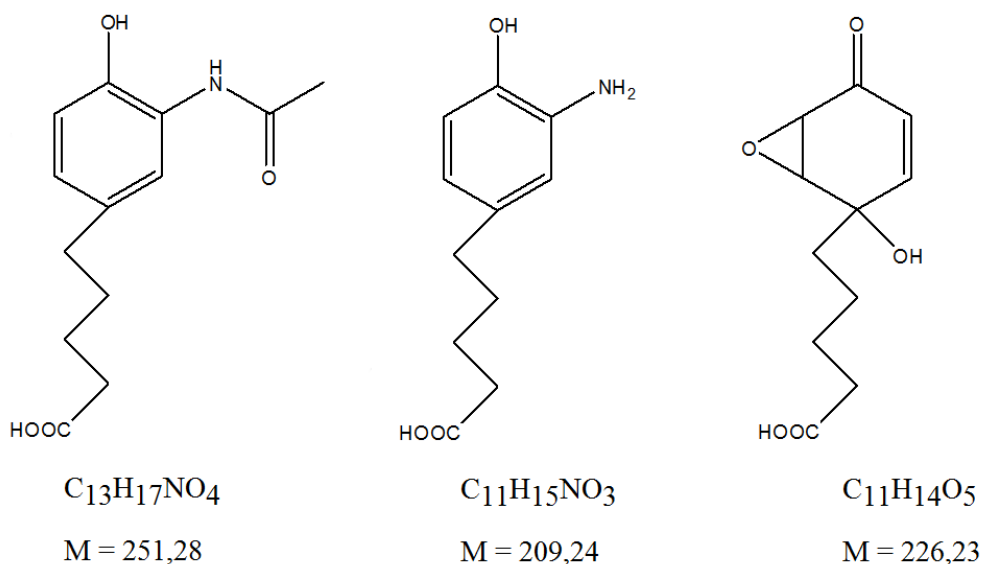
Z vytvořených kmenů *S. lividans* K4-114/pSV5_all a *S. coelicolor* M512/pSV5_all byla extrahována po 72 hodinách fermentace produkovaná antibiotika (viz kap. 4.2.5). Extrahované látky byly analyzovány metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC) (viz kap. 4.2.5). Na desku bylo nanášeno 7 μ l a 0,7 μ l extraktu a 2 μ l koncentrovaného standardu (přečištěný extrakt U-62162 – viz kap. 4.1.6). Celá série byla nanášena dvakrát. Jedna byla vyfocena pod UV světlem a vyhodnocena podle pohyblivosti v porovnání se standardem, druhá byla použita pro biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek (viz kap. 4.2.5). Pro velké množství látek vyextrahovaných společně s předpokládanými antibiotiky nebylo z TLC možné spolehlivě určit, zda k produkci požadované látky dochází. Biologický test vyšel negativně i při nanášení velkého množství extraktu. Jelikož v původní publikaci o U-62162 (SLECHTA a kol. 1982) je u popisu extrakce zaznamenáno, že k nejvyšší produkci antibiotika dochází již po 24 hodinách fermentace, i přestože narostlá biomasa je malá, byla provedena extrakce antibiotik z obou kmenů také po 24 h a 48 h fermentace. Ani v těchto případech však nebyl při biologickém testu zaznamenán žádný antimikrobiální účinek extrahovaných látek.

Pro přesnější určení produkovaných látek byly extrakty (z obou kmenů, po 24, 48 a 72 hodinách fermentace) postoupeny k analýze pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (viz kap. 4.2.5). Touto metodou bylo zjištěno, že dané kmeny neprodukují antibiotikum U-62162. Nicméně byly nalezeny metabolity tomuto antibiotiku blízké. Jejich relativní molekulová hmotnost, navržený sumární vzorec, ToF (doba letu) a plocha píku je zaznamenána v Tabulka 2. Naměřeným hodnotám byly přisouzeny struktury blízké U-62162. Sumárnímu vzorci $C_{11}H_{15}NO_3$ odpovídá struktura U-62162 bez připojeného horního řetězce a oxygenace mC_7N . Podobně, s acylem navázaným na místě horního řetězce, zřejmě vypadá $C_{13}H_{17}NO_4$. Pro $C_{11}H_{14}O_5$ byla navržena poněkud neobvyklá struktura, neboť postrádá NH_2 skupinu na mC_7N a je naopak oxygenována, k čemuž za normálních okolností dochází až na konci biosyntézy

celé molekuly. Kvůli její malé velikosti však nebylo možné takto navrženou strukturu dokázat pomocí následné fragmentace (Obr. 20).

Tabulka 2: Relativní molekulová hmotnost, sumární vzorec, doba letu (ToF) a plocha píků nalezených látek ve vzorcích ze *S. lividans* K4-114/pSV5_all a *S. coelicolor* M512/pSV5_all po délce fermentace 24, 48 a 72 h.

Rel. molekulová hmotnost		226,23	209,24	251,28	
Sumární vzorec		$C_{11}H_{14}O_5$	$C_{11}H_{15}NO_3$	$C_{13}H_{17}NO_4$	
ToF		$t_R = 2,5 \text{ min}$	$t_R = 2,9 \text{ min}$	$t_R = 2,9 \text{ min}$	
Plocha píků [bit/min]	M512	24 h	0	28	446
		48 h	40	19	365
		72 h	65	23	396
	K4-114	24 h	17	57	910
		48 h	53	17	337
		72 h	9	0	4



Obr. 20: Navrhované struktury metabolitů izolovaných z kmenů *S. lividans* K4-114/pSV5_all a *S. coelicolor* M512/pSV5_all.

5.3. Delece genů *vrdER* a *vrdds* v genovém shluku U-62162 ve *S. verdensis*

Pro ověření navrhované enoylreduktázové aktivity produktu genu *vrdER* v biosyntéze spodního řetězce U-62162 byl vytvořen mutantní kmen *S. verdensis* s delecí tohoto genu.

Na kraji genového shluku pro biosyntézu U-62162 se nachází gen *vrdds* s předpokládanou funkcí DSBA oxidoreduktázy. Abychom zjistili, zda tento enzym hraje roli při biosyntéze U-62162 nebo zda již patří do jiné metabolické dráhy, byl vytvořen mutantní kmen *S. verdensis* s delecí tohoto genu.

Disrupční kazety ze stran obklopené sekvencemi komplementárními k okolí genu *vrdER*, respektive *vrdds*, byly pomocí homologní rekombinace vloženy na místa těchto genů v kosmidu pSV5. Ten byl následně konjugací vpraven do *S. verdensis*, kde se disrupční

kazety homologní rekombinací vložily místo genů *vrdER* a *vrdDS* do genomu. Pomocí získané rezistence ke spectinomycinu byly selektovány mutantní kmeny *S. verdensis* Δ *vrdER* a *S. verdensis* Δ *vrdDS* a byla analyzována produkovaná antibiotika. Kmen Δ *vrdER* syntetizuje kromě původního antibiotika také derivát U-62162 lišící se přítomností konjugovaných dvojných vazeb ve spodním řetězci. Antibiotikum produkované kmenem Δ *vrdDS* se nijak neliší od antibiotika syntetizovaného divokým kmenem.

5.3.1. Delece *vrdDS* a *vrdER* v pSV5 a pSV1 a jejich přenos do *S. verdensis*

Delece genů *vrdER* a *vrdDS* byla provedena podle protokolu REDIRECT[®] technologie (viz kap. 4.2.4).

Z kultury *E. coli* DH5 α /pIJ778 byl metodou „boiling“ lyze vyizolován plazmid pIJ778, z kterého byla získána disruptní kazeta obsahující spectinomycinovou rezistenci a *oriT*, obklopené FRT místy (Obr. 16) (viz protokol 1). Dále byly navrženy dlouhé PCR primery (viz protokol 2). Pro gen *vrdER* to byly oligonukleotidy *vrdER*-R a *vrdER*-F, pro gen *vrdDS* primery *vrdDS*-R a *vrdDS*-F (viz kap. 4.1.5). Tyto primery společně s disruptní kazetou, která sloužila v obou případech jako templátová DNA, byly použity pro reakce PCR (viz protokol 3). Vzniklé PCR produkty byly nazvány ER a DS.

Protože se gen *vrdDS* nachází na kraji sekvence vložené v kosmidu pSV5 (Obr. 18), což by mohlo snížit frekvenci homologní rekombinace tohoto místa ve streptomycetách, bylo nutné v tomto případě pracovat s pSV1. Ten byl metodou teplotního šoku transformován do *E. coli* BW25113/pIJ790, selekce proběhla na chloramfenikol a ampicilin (viz protokol 4). Pro kontrolu byl z transformovaných buněk vyizolován, naštěpen *Asc* I a nanesen na elektroforézu.

Přečištěný PCR produkt ER byl transformován do buněk *E. coli* BW25113/pIJ790/pSV5, produkt DS byl transformován do buněk *E. coli* BW25113/pIJ790/pSV1 (viz protokol 5). Selektce v obou případech proběhla na carbenicilin, kanamycin, chloramfenikol a spectinomycin. Kosmidy s rekombinovanými PCR produkty byly izolovány a pro kontrolu naštěpeny. pSV1+DS byl štěpen *Mlu* I a *Not* I, pSV5+ER restriktázami *Bam*H I a *Bsp*1407 I.

pSV1+DS a pSV5+ER byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002, selekce proběhla na spectinomycin a carbenicilin. Z transformovaných buněk byly pro kontrolu izolované kosmidy a štěpeny v případě pSV1+DS restriktázou *Mlu* I, v případě pSV5+ER *Bam*H I. Ověřené kosmidy byly metodou konjugace přenesené z buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002/pSV1+DS resp. /pSV5+ER do *S. verdensis* a byly selektovány klony s disruptními kazetami vloženými na místa genů *vrdDS* a *vrdER* (viz protokol 6). Tyto nové kmeny byly nazvány *S. verdensis* Δ *vrdER* a *S. verdensis* Δ *vrdDS*.

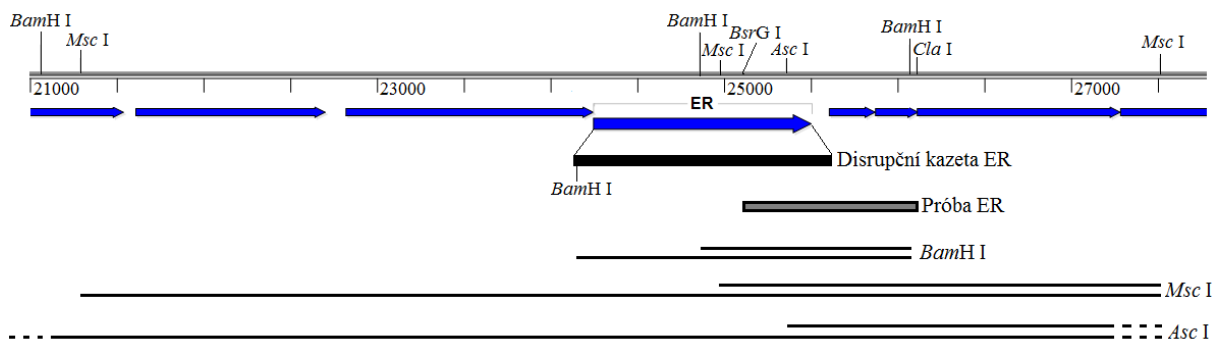
Pro úspěšné dokončení delece je většinou nutné disruptní kazetu, vloženou místo genu, odstranit, neboť může negativně ovlivňovat expresi genů ležících za ní. K tomuto procesu dochází v buňkách *E. coli* DH5 α /BT340 (viz kap. 4.1.1 a 4.1.2) při 42 °C a je zajištěn FLP rekombinázou, která vyštěpí sekvenci mezi FRT místy. Do těchto buněk byly přeneseny kosmidy pSV1+DS a pSV5+ER, bylo indukováno vyštěpení disruptních kazet a selektovány správné klony (viz protokol 7). Tak vznikly kmeny *E. coli* DH5 α /pSV1-FRT Δ DS a *E. coli* DH5 α /pSV5-FRT Δ ER.

5.3.2. Ověření delece *vrddS* a *vrdeR* ve *S. verdensis*

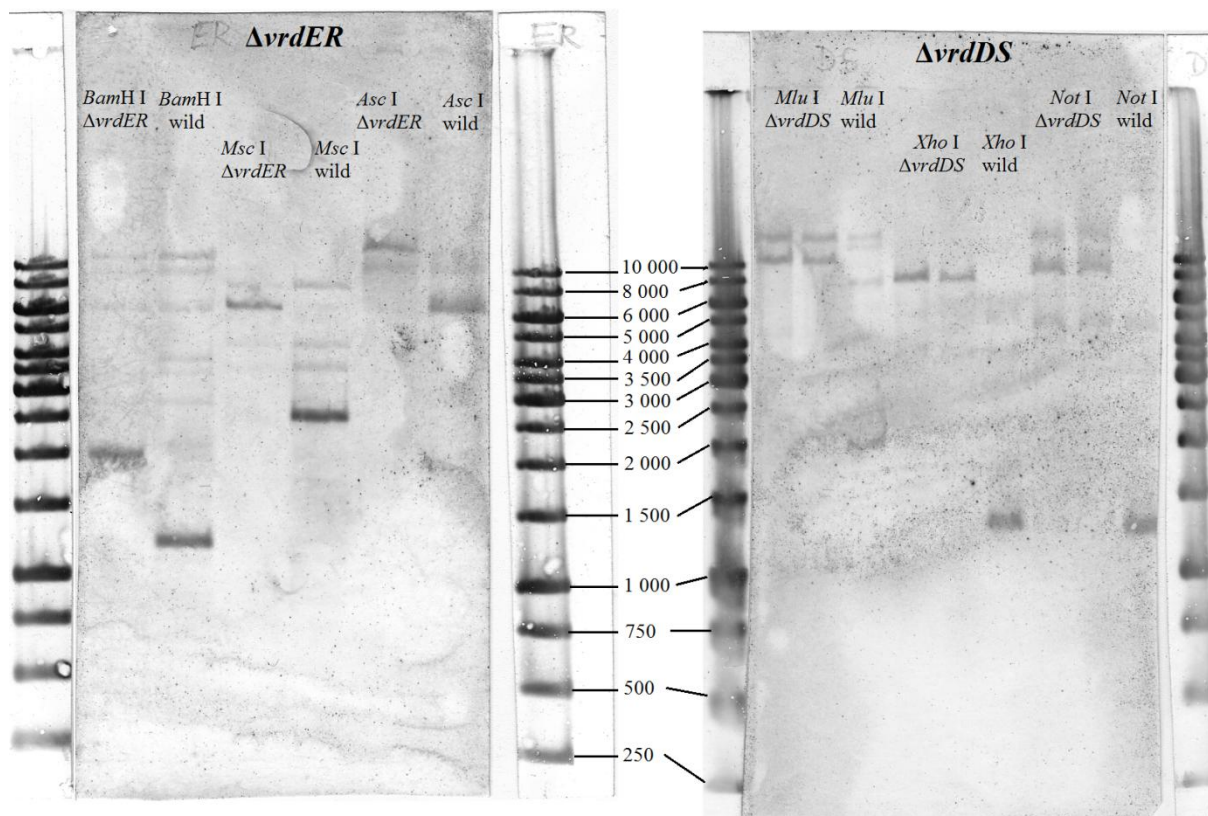
Z kmenů *S. verdensis*, *S. verdensis* $\Delta vrdeR$ a *S. verdensis* $\Delta vrddS$ byla izolovaná chromozomální DNA, u které byla následně změřena koncentrace. DNA z kmene $\Delta vrddS$ byla štěpena *Mlu* I, *Xho* I a *Not* I, z kmene $\Delta vrdeR$ restriktaázami *Bam*H I, *Msc* I a *Asc* I, DNA z divokého kmene byla štěpena RE, kterými byly štěpeny oba mutantní kmeny. Štěpící směsi byly poté nanášeny na gelovou elektroforézu, vždy DNA z mutantního a z divokého kmene štěpené stejnou RE vedle sebe. Rozdělené DNA fragmenty byly přeneseny z gelu na nylonovou membránu (viz kap. 4.2.2).

Pro ověření správného vyměnění genů *vrddS* a *vrdeR* v chromozomu *S. verdensis* za disruptční kazety byly připraveny DNA próby. Ty byly navrženy na rozhraní daných genů a jejich okolí, proto se vázaly na specifické fragmenty DNA v divokém kmeni i mutantních kmenech, ale velikosti rozeznávaných fragmentů se lišily. Próba pro gen *vrdeR* vznikla z pSV5, který byl naštěpen směsí RE *Bsr*G I *Cla* I, požadovaný fragment měl velikost 1001 pb (Obr. 21). Pro gen *vrddS* byl pSV5 naštěpen směsí *Sna*B I *Bgl* II, požadovaný fragment měl 988 pb. Směsi byly nanášeny na elektroforézu a z gelu byly zmíněné fragmenty vyizolovány, extrahovány fenol-chloroformem a přesráženy ethanolom. Fragmenty byly poté rozpuštěny ve vodě a označeny digoxigeninem (viz kap. 4.2.2 Příprava neradioaktivně značené DNA próby).

Připravené DNA próby byly použity pro hybridizaci s nylonovými membránami nesoucími fragmenty chromozomální DNA. Velikostní DNA standard byl značen proubou „gene ruler“ (viz kap. 4.1.5). Hybridizace byla poté zviditelněna imunologickou detekcí digoxigeninu (viz kap. 4.2.2). Získané fragmenty jsou na Obr. 22. Je patrné, že došlo ke změnám velikostí fragmentů a to přesně tak, jak bylo předpovězeno na základě známé DNA sekvence (Obr. 21). Slabě označené proužky jsou zřejmě důsledek nedokonalého štěpení chromozomální DNA případně ne zcela specifické vazby DNA proub.



Obr. 21: Část genového shluku U-62162. Obdélník vyznačuje DNA proubu ER (fragment vzniklý štěpením *Bsr*G I *Cla* I). Disruptční kazeta nahrazující gen *vrdeR* má velikost 1503 bp a z používaných restrikčních míst obsahuje pouze *Bam*H I. Přímkami jsou vyznačené hlavní fragmenty DNA rozeznávané proubou ER. Kratší přímkami značí fragmenty hybridizované v DNA z původního kmene *S. verdensis*. Delší přímkami značí fragmenty rozeznávané v DNA z kmene *S. verdensis* $\Delta vrdeR$, kde *vrdeR* je nahrazené disruptční kazetou ER. Fragmenty *Asc* I jsou příliš dlouhé, proto nejsou na obrázku vyznačené celé. Velikosti fragmentů jsou pro *Bam*H I 1208bp a 2010 bp, pro *Msc* I jsou 2537 bp a 6458 bp, pro *Asc* I 6300 bp a 12895 bp.



Obr. 22: Nylonové membrány s fragmenty chromozomální DNA po hybridizaci s neradioaktivně značenými DNA próbami. $\Delta vrdER$ značí chromozomální DNA z kmene *S. verdensis* $\Delta vrdER$. $\Delta vrdDS$ značí chromozomální DNA z kmene *S. verdensis* $\Delta vrdDS$ (byly použity DNA z dvou mutantních klonů). Wild značí chromozomální DNA z původního kmene *S. verdensis*.

5.3.3. Analýza produkovaných antibiotik

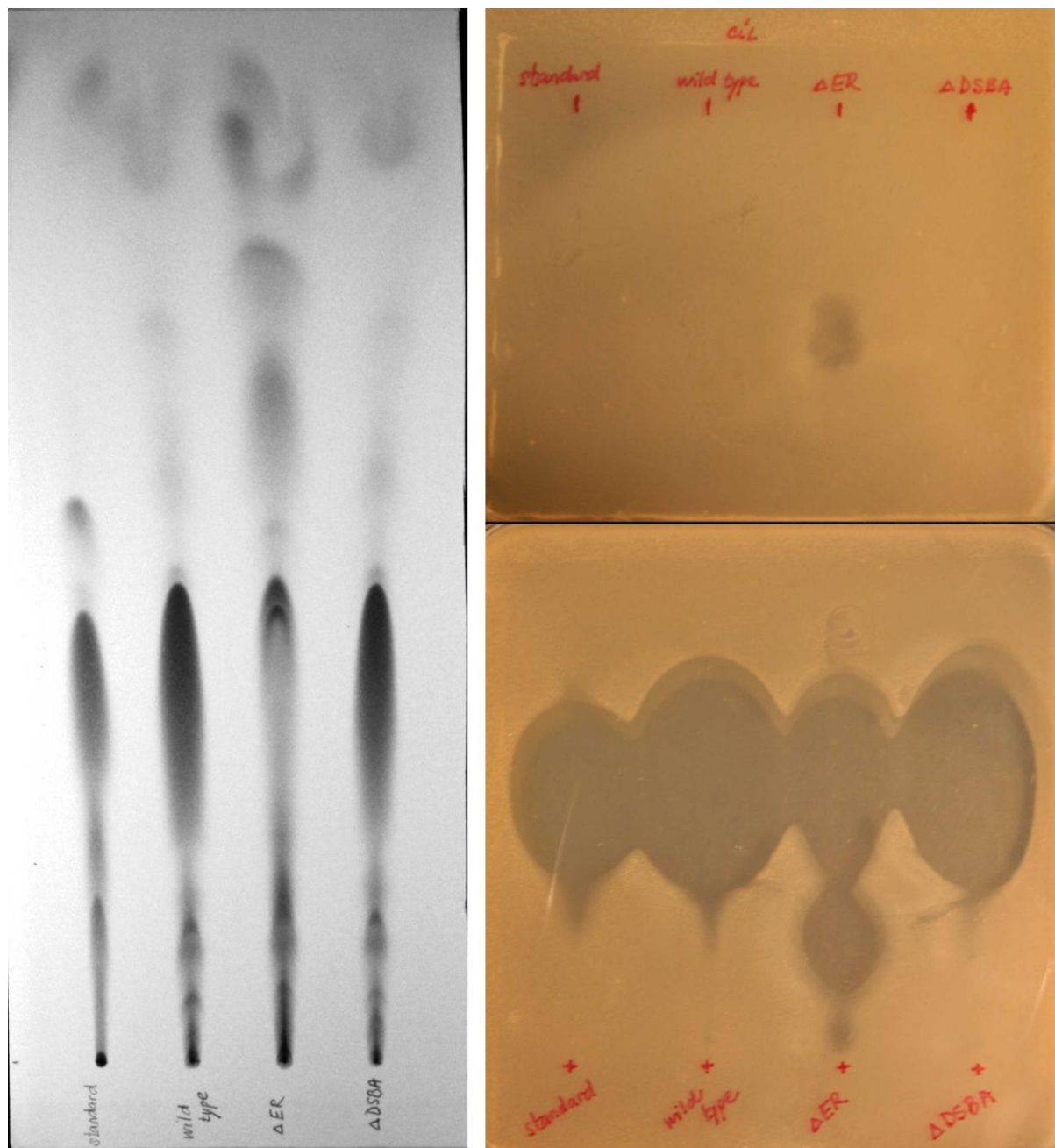
Z ověřených mutantních kmenů a z divokého kmene byla extrahovaná antibiotika. Ta byla analyzovaná dvěma sériemi TLC. První byla ozářena UV světlem a vyfocena (na ní bylo naneseno 5 μ l standardu a 7 μ l ostatních extraktů) (Obr. 23). U obou mutantních kmenů jsou viditelné skvrny ve vzdálenosti odpovídající standardu U-62162. Druhá série byla použita pro biologický test (na tuto sérii TLC bylo naneseno 0,5 μ l standardu, 1 μ l extraktu z divokého kmene, 2 μ l extraktu z kmene $\Delta vrdER$, 1 μ l extraktu z kmene $\Delta vrdDS$). Látky z obou mutantních kmenů způsobují vznik inhibičních zón a to ve stejné vzdálenosti od startu jako standard. Extrakt z kmene $\Delta vrdER$ navíc způsobuje vznik dalších nejméně dvou nových inhibičních zón (Obr. 23).

Podrobnější analýza byla provedena UHPLC-DAD-ToF-MS. Ze získaných dat vyplynulo, že kmen s delecí *vrdER* produkuje předpokládaný derivát antibiotika U-62162 s konjugovanými dvojnými vazbami ve spodním řetězci (Obr. 24). Nicméně produkuje i původní antibiotikum a to zhruba v poměru 3:1 původní ku novému (Tabulka 3). Pro ověření, zda k produkci původního antibiotika nedochází v důsledku kontaminace divokým kmenem, bylo provedeno přečištění kmene přes jednotlivé spóry. Z jediné narostlé spóry pak byla znovu provedena extrakce antibiotika. Výsledek ukázal, že stále dochází i k produkci U-62162. Změnil se pouze poměr píků na 2:1 ve prospěch U-62162. Pro ověření, zda látka s nenasyceným spodním řetězcem nevzniká v určité míře také v divokém kmeni, byla

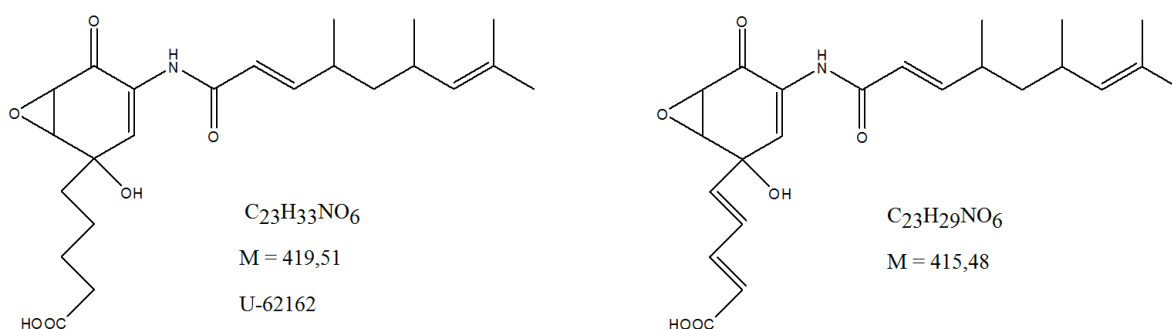
provedena analýza extraktu z tohoto kmene UHPLC-DAD-ToF-MS. Metoda prokázala, že látka $C_{23}H_{29}NO_6$ není tímto kmenem produkována a její přítomnost v kmeni $\Delta vrdER$ je tedy způsobena pouze vytvořenou mutací.

Analýza extrahovaných látek z kmene $\Delta vrdDS$ UHPLC-DAD-ToF-MS neobjevila žádné změny v produkováných manumycinových látkách oproti divokému kmeni.

Protože prokazatelně docházelo k produkci antibiotik v obou mutantních kmenech, nebylo zatím nutné přistupovat k vyštěpování vložených kazet homologní rekombinací s plazmidy pSV1-FRT Δ DS a pSV5-FRT Δ ER z *E. coli* DH5 α .



Obr. 23: Analýza extrahovaných antibiotik. Pořadí vzorků zleva: standard U-62162, extrakt z kmene *S. verdensis*, extrakt z kmene *S. verdensis* $\Delta vrdER$ a extrakt z kmene *S. verdensis* $\Delta vrdDS$. Vlevo je fotografie TLC desky pod UV 254 nm. Všechny extrakty mají hlavní skvnu přibližně v místě kde se nachází u standardu. Vpravo je výsledek biologického testu. Všechny extrakty vykazují antibakteriální vlastnosti. Kmen $\Delta vrdER$ navíc vykazuje další minimálně dvě inhibiční zóny.



Obr. 24: Látky manumycinového typu produkované kmenem *S. verdensis* Δ vr dER .

Tabulka 3: UHPLC-DAD-ToF-MS analýza metabolitů z kmene *S. verdensis* Δ vr dER . Údaje o dvou hlavních produkovaných látkách. ToF – doba letu.

<i>S. verdensis</i> Δ vr dER	Rel. mol. hmotnost	Sumární vzorec	ToF	Plocha píku	Poměr píků
U-62162	419,51	$C_{23}H_{33}NO_6$	tR = 9,62 min	1475 bit/min	3
Derivát	415,48	$C_{23}H_{29}NO_6$	tR = 9,87 min	503 bit/min	1

5.4. Vložení genů pro biosyntézu C_5N jednotky do *S. verdensis* Δ vr dER a do původního kmene

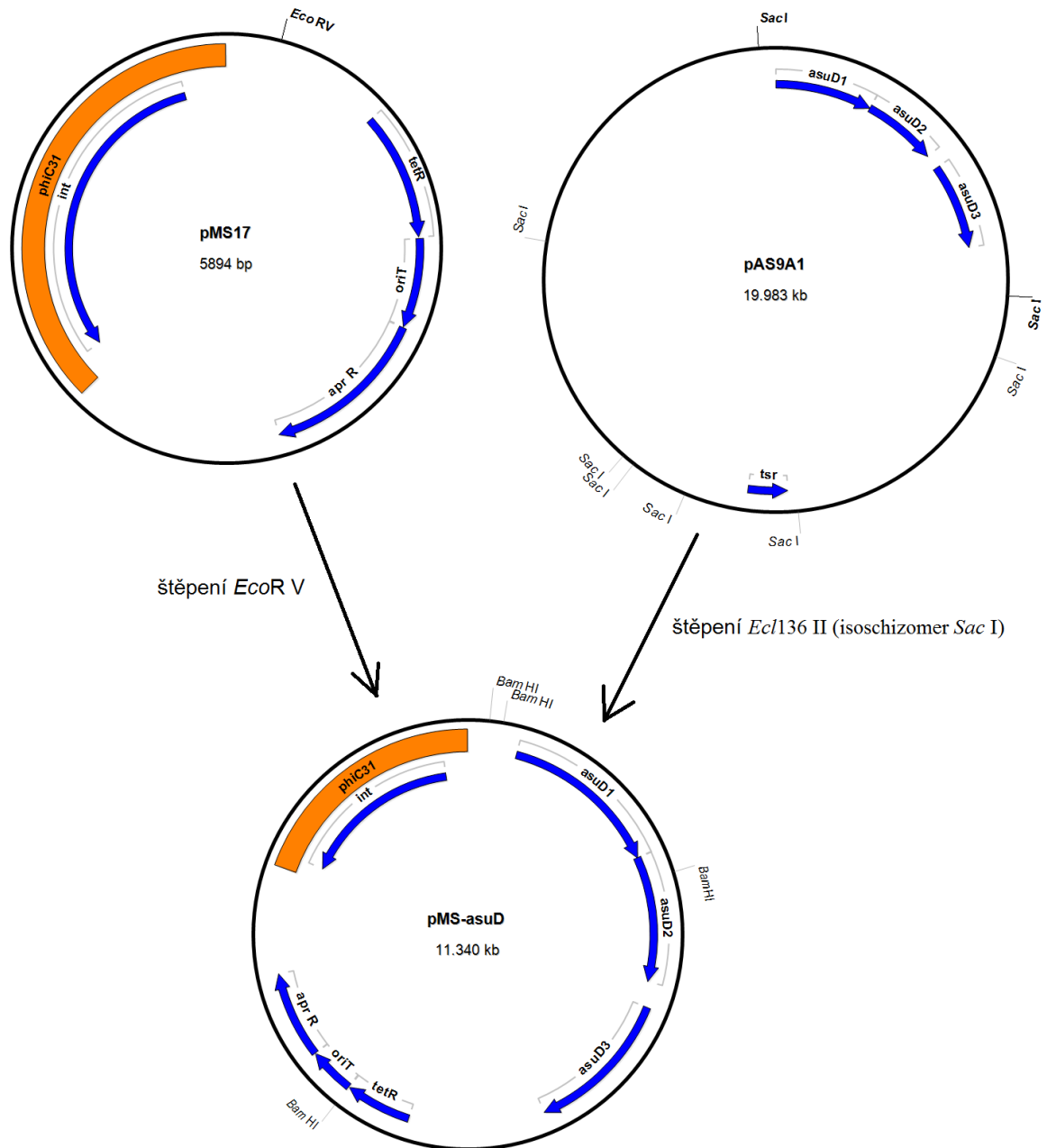
Do vytvořeného mutantního kmene *S. verdensis* Δ vr dER a do původního divokého kmene *S. verdensis* byl přenesen plazmid nesoucí geny kódující biosyntézu C_5N jednotky u asukamycinu, *asuD1* (kóduje amid syntázu), *asuD2* (kóduje 2-oxoamid syntázu) a *asuD3* (kóduje 5-aminolevulát CoA ligázu).

5.4.1. Vložení genů *asuD1* – *asuD3* do *S. verdensis* a *S. verdensis* Δ vr dER

Získaný plazmid pAS9A1 byl vyizolován ze *S. lividans* TK24 metodou izolace plazmidové DNA ze streptomycet (viz kap. 4.2.1). Poté byl naštěpen RE *Ecl136* II (isoschizomer RE *Sac* I štěpící rozeznávaná místa na tupu). Získaný plazmid pMS17 byl naštěpen *Eco32* I (= *EcoR* V) a následně inkubován s alkalickou fosfatázou. Po teplotní inaktivaci fosfatázy byla směs nanášena na elektroforézu a následně byl z gelu vyizolován fragment o velikosti 5,9 kpb. K fragmentu byl přidán naštěpený plazmid pAS9A1, DNA byla extrahovaná fenol-chloroformem a přesrážena ethanolem. Poté byly fragmenty z pAS9A1 ligované do pMS17, vzniklé plazmidy byly transformované elektroporací do kompetentních buněk *E. coli* SURE, které byly selektované na apramycin. Jelikož vzniklo mnoho falešně pozitivních kolonií, byly správné klony, s vloženým fragmentem obsahujícím *asuD1* - *asuD3* geny, vyhledané pomocí koloniové PCR (viz kap. 4.2.2) s primery pro *asuD2* (HemA1 a HemA3) (viz kap. 4.1.5). Správný plazmid byl nazván pMS-asuD (Obr. 25).

pMS-asuD byl elektroporací přenesen do kompetentních buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002, selekce proběhla na apramycin. Pro kontrolu byl plazmid z narostlých kolonií izolován a naštěpen *Bam*HI. pMS-asuD byl přenesen konjugací z *E. coli* ET12567/pUZ8002/pMS-asuD do *S. verdensis* Δ vr dER a *S. verdensis* (viz kap. 4.2.4 pouze

používaná antibiotika se liší – místo spectinomycinu je to pro divoký kmen apramycin, pro kmen $\Delta vrdER$ apramycin a spectinomycin). Správné klony byly ověřeny koloniovou PCR (viz kap. 4.2.1 a 4.2.2) s primery pro gen *asuD2*. Nové kmeny byly pojmenovány *S. verdensis* ASUD a *S. verdensis* $\Delta vrdER$ /ASUD.

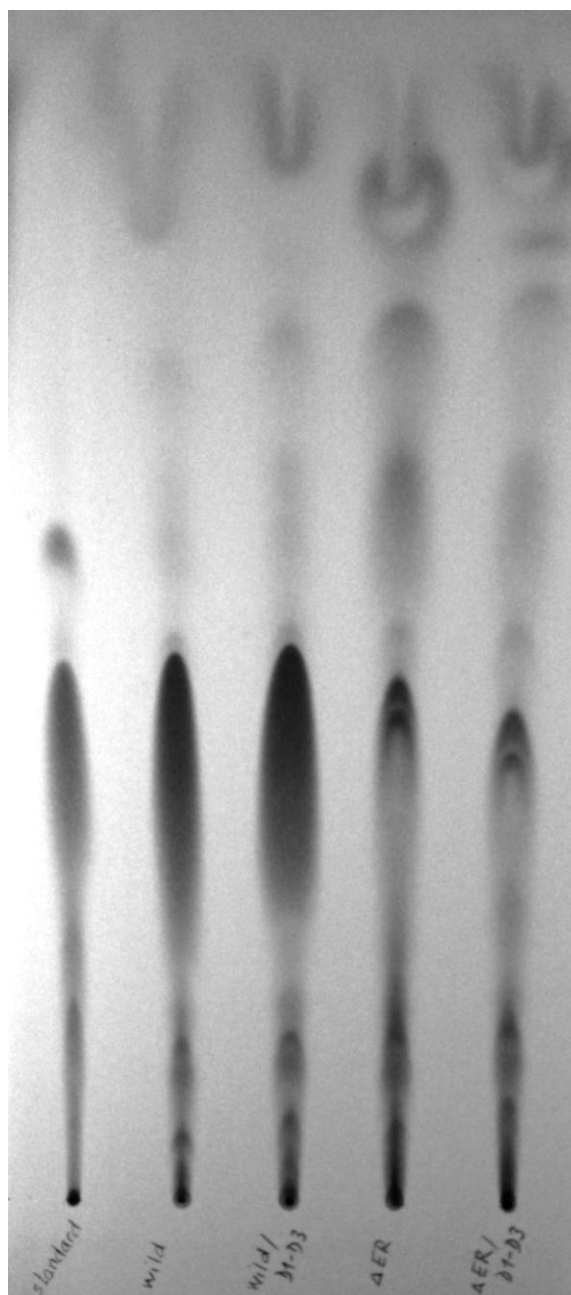


Obr. 25: Příprava plazmidu pMS-asuD. Základem je pMS17 do jehož *EcoR V* místa byl vložen fragment mezi *Sac I* místy z pAS9A1 kódující geny pro syntézu C₅N jednotky.

5.4.2. Analýza produkovaných antibiotik

Z kmenů *S. verdensis* ASUD a *S. verdensis* $\Delta vrdER$ /ASUD byla extrahována antibiotika a analyzována metodou TLC a následným biologickým testem. Pohyblivost jednotlivých skvrn na TLC deskách stejně jako inhibiční zóny na biologickém testu se

přibližně shodovaly mezi *S. verdensis* a *S. verdensis* ASUD a také mezi *S. verdensis* $\Delta vrdER$ a *S. verdensis* $\Delta vrdER/ASUD$ (Obr. 26). Pro podrobnější analýzu byla provedena UHPLC-DAD-ToF-MS. Tato metoda ukázala, že ani v jednom testovaném kmeni se nenachází žádné nové deriváty U-62162 s připojenou C₅N jednotkou. Ve *S. verdensis* ASUD se nachází pouze U-62162 a v *S. verdensis* $\Delta vrdER/ASUD$ je U-62162 a jeho derivát s nenasycených spodním řetězcem.



Obr. 26: TLC deska s nanesenými extrakty z různých kmenů *S. verdensis*. Zleva: standard U-62162, *S. verdensis*, *S. verdensis* ASUD, *S. verdensis* $\Delta vrdER$ a *S. verdensis* $\Delta vrdER/ASUD$.

6. Diskuze

Látka U-62162, patřící do skupiny manumycinových metabolitů, bylo objeveno již v roce 1982, přesto mu zatím bylo věnováno jen minimum pozornosti. Tato látka je velice zajímavá hlavně kvůli své struktuře, která se značně odlišuje od struktur ostatních členů skupiny. Je zatím jediným známým manumycinovým metabolitem, který má nasycený spodní řetězec a navíc dlouhý pouze pět uhlíků. Také horní řetězec je neobvyklý, neboť obsahuje nasycené i nenasyčené vazby a několik větvení. Co se týče biologických vlastností, bylo U-62162 testováno zatím jen na antibiotické účinky, které vykazuje jen minimálně. Struktura horního řetězce však napovídá, že by tato látka mohla, podobně jako manumycin A, působit protizánětlivě a protinádorově, neboť tento řetězec připomíná farnesylový zbytek. Díky tomu by mohlo být U-62162 schopné vázat se na Ras-farnesyltransferázu, inhibovat jí a tím potlačovat dráhy vedoucí k růstu a proliferaci buněk a k indukci prozánětlivých cytokinů.

Aby mohlo být U-62162 v budoucnu dále modifikováno s cílem zlepšit jeho biologické aktivity, je nutné nejdříve porozumět způsobu jeho biosyntézy. Analýza genového shluku pro biosyntézu U-62162, která byla obsahem této práce, přinesla několik nových poznatků o tomto procesu.

Genový shluk U-62162, nalezený v genomu *S. verdensis* podle přítomnosti specifického genu kódujícího enzym podílející se na biosyntéze mC_7N jednotky, byl sekvenován. V získané sekvenci byly určeny ORF, u kterých byly díky porovnání se známými sekvencemi v databázích navrženy proteinové produkty. Nejvíce shod bylo nalezeno s geny z genového shluku pro biosyntézu asukamycinu v *S. nodosus* subsp. *asukaensis*. Tento genový shluk byl již celkem podrobně prozkoumán, proto je známo mnoho o funkcích jednotlivých enzymů a způsobu biosyntézy. Asukamycin byl také úspěšně produkován heterologním hostitelem, do kterého byl přenesen genový shluk, což potvrzuje, že ve shluku se nachází všechny geny nutné pro syntézu antibiotika, případně, že geny, které se účastní biosyntézy a jsou na jiných místech genomu, se běžně vyskytují také u jiných streptomycet (RUI a kol. 2010).

Genový shluk pro biosyntézu U-62162 kóduje všechny geny nutné pro biosyntézu mC_7N jednotky (genová skupina A). To potvrzuje jak porovnání s geny pro syntézu této jednotky u asukamycinu, tak výsledek heterologní exprese shluku pro U-62162, kde vznikaly struktury s touto jednotkou. Ve shluku byly dále nalezeny homology ke všem třem genům zodpovědným u asukamycinu za oxygenaci protoasukamycinu (skupina E). Shoda byla identifikována u proteinu pro export antibiotik ven z buněk (M) a u dvou regulátorů transkripce, kromě kterých byly nalezeny ještě tři regulátory odlišné od těch u asukamycinu (skupina R a XR).

Ze skupiny genů pro syntézu polyketidových řetězců (skupina C) chybí homology ke čtyřem genům této skupiny ze shluku pro asukamycin. Jsou to ACP asociovaný s KS III (AsuC5), ketoreduktáza (AsuC7), acyl dehydratáza (AsuC8) a thioesteráza typu II (AsuC15) (RUI s kol. 2010). Nicméně ve shluku pro U-62162 je množství genů, které nemají homolog u asukamycinu, ale předpokládá se, že se rovněž podílí na syntéze horního a spodního řetězce (skupina XC). Některé z těchto genů by mohly nahrazovat chybějící geny ze skupiny C. Výsledek heterologní exprese genového shluku, kdy vznikaly deriváty U-62162 postrádající horní řetězec, naznačuje, že ve shluku U-62162 se nenachází některé geny podílející se na

syntéze horního řetězce a zároveň obsahuje všechny geny pro vznik spodního řetězce, neboť ten se při heterologní expresi syntetizuje. Protože ketoreduktáza a acyl dehydratáza se, alespoň podle navrženého schématu pro biosyntézu asukamycinu, podílejí na syntéze obou řetězců, je zřejmě jejich funkce nahrazena jinými proteiny nebo enzymy kódovanými mimo genový shluk.

Vzhledem k tomu, že ve shluku pro asukamycin se nachází dvě acyl dehydratázy (AsuC8 a AsuC9) (RUI a kol. 2010), z nichž jedna má homolog u U-62162 (VrdC9), je možné, že jeden přítomný enzym je pro redukci dostačující. Další možností je nahrazení chybějícího proteinu enzymem účastnícím se syntézy mastných kyselin, který se pravděpodobně nachází v původním producentovi stejně jako v kmenech pro heterologní expresi. VrdC9 je homologní k HadB, který při syntéze MK vytváří heterodimer s HadA nebo HadC (RUI a kol. 2010). Jeden z těchto dvou enzymů by tedy mohl vytvářet heterodimer s VrdC9 a podílet na dehydrataci řetězců.

Funkci ketoreduktázy by mohly nahrazovat VrdXC18 (3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza) a VrdXC17 (3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenáza). Homolog VrdXC18 katalyzuje u bakterií přeměnu acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA (JONES a WOODS 1986). Tento enzym byl objeven také ve shluku pro biosyntézu manumycinu A, kde rovněž chybí jiná ketoreduktáza (PETŘÍČKOVÁ – data nepublikována). VrdXC18 je homologní i k některým 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázám, proto je možné, že rozeznává i delší řetězce než je butan a mohl by se účastnit syntézy spodního řetězce, který je nevětvený. VrdXC17 je homologní i k některým 3-hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenázám, proto je možné, že také rozeznává delší řetězce a účastní se redukce větveného horního řetězce. Další variantou je účast ketoreduktázy opět z FAS.

AsuC15 se podílí na uvolňování nežádoucích startovacích jednotek při iniciaci skládání horního řetězce asukamycinu a pro samotnou syntézu antibiotika není nezbytný (RUI a kol. 2010). Jeho absence u U-62162 by proto neměla být příčinou nefunkční biosyntézy horního řetězce.

Poslední protein ze skupiny C u asukamycinu, který chybí u U-62162, je AsuC5 (ACP asociovaný s KS I/II). Jeho funkci zřejmě nemůže nahradit žádný protein ze skupiny XC u U-62162 a protože se zdá být tento ACP nepostradatelný pro první kondenzaci při syntéze horního řetězce, může být právě jeho nepřítomnost příčinou neúspěšné heterologní exprese. Protože je ale struktura horního řetězce U-62162 výrazně složitější než u asukamycinu, jsou pro jeho biosyntézu potřebné enzymy, které se u asukamycinu nenacházejí. Je tedy možné, že ve shluku chybí také některé z těchto „nových“ enzymů, které jsou kódovány na jiném místě genomu *S. verdensis*.

Na větvení horního řetězce se s největší pravděpodobností podílí VrdXC25 katalyzující přeměnu succinyl-CoA na methylmalonyl-CoA, který je poté použit jako prodlužující jednotka v cyklech elongace, ve kterých vznikají větvení. Homologní gen se nachází v genovém shluku pro biosyntézu manumycinu A, jehož horní řetězec je rovněž větvený (PETŘÍČKOVÁ – data nepublikována). Nějakým způsobem se zřejmě na větvení tohoto řetězce u U-62162 podílí také geny vrdXC22, XC23 a XC24, neboť jsou to dehydrogenázy ketokyselin s větvenými řetězci. U bakterií slouží větvené aldehydy, jejichž vznik katalyzují, jako elongační jednotky při syntéze větvených mastných kyselin (KANEDA

1991). U *Streptomyces avermitilis* jsou tyto metabolity používány jako stavební jednotky pro biosyntézu avermectinu (DENOYA a kol. 1995).

Velkou neznámou zůstává, které z genů XC, případně z jiných míst genomu, se účastní skládání startovací jednotky pro biosyntézu horního řetězce a jak tato jednotka vypadá. Zřejmě je dosti neobvyklá, neboť konec horního řetězce obsahuje větvení a dvojnou vazbu. Mohl by jím proto být například prenyl-CoA. Zajímavé je, že u U-62162 zatím nebyly objeveny žádné kongenery. U asukamycinu bylo nalezeno hned 6 dalších látek, u kolabomycinu E tři látky, které se lišily od majoritního antibiotika pouze zakončením horního řetězce (RUI a kol. 2010, PETŘÍČKOVÁ a kol. 2014). Startovací jednotky, které byly v těchto případech použity pro syntézu horního řetězce zřejmě pocházely z biosyntézy větvených mastných kyselin (HU a FLOSS 2006). Žádné takové látky však u U-62162 nalezeny nebyly, což by mohlo být způsobeno například velmi vysokou specifitou KAS III katalyzujících kondenzací první prodlužující jednotky se startovací jednotkou. Naproti tomu u asukamycinu KAS III zodpovídají za vznik většiny kometabolitů s odlišným koncem horního řetězce, pouze malá frakce těchto látek vzniká činností FabH jinak zapojené v syntéze MK (RUI a kol. 2010). Jak je zajištěno, aby se FabH alespoň malou měrou nepodílela také na biosyntéze U-62162 a nedodávala jiné startovací jednotky pro horní řetězec není zatím jasné. Jedním možným vysvětlením je, že další kongenery produkované jsou, jen zatím nebyly objeveny.

Jakou roli hrají v biosyntéze polyketidových řetězců enzymy acetyl-CoA acetyltransferáza (VrdXC16), enoyl-CoA hydratázy/isomerázy (VrdXC19, VrdXC20) a alkohol dehydrogenáza (VrdXC21) zatím není jasné.

Stejně jako v případě asukamycinu i v genomu U-62162 chybí ketosyntáza, která by katalyzovala elongaci horního polyketidového řetězce. U asukamycinu bylo navrženo, že by tuto funkci mohla zastávat syntáza mastných kyselin nebo jiná KS I/II běžně přítomná u streptomycet (RUI a kol. 2010). Totéž by mohlo platit i u U-62162. Další možností je existence celé polyketid syntázy typu I pro biosyntézu horního řetězce mimo genom U-62162, neboť struktura horního řetězce je poměrně složitá a je tedy možné, že na všechny elongační kroky nestačí jediná ketosyntáza.

Biosyntéze spodního řetězce U-62162 se musí účastnit také enoylreduktáza, neboť všechny vazby tohoto řetězce jsou nasycené. Podle sekvence byl předpovězen gen *vrdER*, jehož produkt by mohl být za tyto redukce zodpovědný. Jeho funkce byla potvrzena delecí tohoto genu, kdy vznikl derivát U-62162 s nenasyceným spodním řetězcem. Nicméně *VrdER* je z velké části nahraditelný jiným proteinem, neboť v mutantním kmeni stále převládala produkce nezměněného antibiotika. Tímto zastupujícím enzymem by mohla být například enoylreduktáza FabI z dráhy syntézy mastných kyselin (BERGLER a kol. 1994), neboť vzájemná nahraditelnost jednotlivých enzymů těchto dvou drah již byla několikrát popsána.

Také horní řetězec U-62162 obsahuje nasycenou vazbu, pro jejíž vznik je pravděpodobně také potřeba enoylreduktáza. Tato redukce je však zajištěna jiným enzymem než *VrdER*, neboť delece genu *vrdER* žádným způsobem neovlivnila strukturu horního řetězce.

Na kraji genomu U-62162 se nachází gen *vrdDS*, který zřejmě kóduje DSBA oxidoreduktázu patřící do thiooxidoreduktáz. Tyto enzymy zavádějí

disulfidické můstky do různých proteinů nebo přenášejí thiolové skupiny na elektrofilní substráty. Díky tomu mohou ovlivňovat enzymatické aktivity proteinů či protein-proteinové interakce v komplexech (LIU a kol. 2008). Homolog *vrdds* se nachází v genomu shluku pro biosyntézu kolabomycinu E. Delece tohoto genu (*colC16*) měla za následek specifické zrušení produkce kolabomycinu E, zatímco produkce kongenerů, lišících se od majoritního antibiotika pouze zakončením horního řetězce, zůstala neovlivněna. Je tedy zřejmé, že ColC16 se nějakým způsobem podílí na syntéze horního řetězce. Nicméně u kolabomycinu E, na rozdíl od U-62162, se tento gen nachází hned za geny *colC3*, *colC4* a *colC5*, které katalyzují první reakce syntézy horního řetězce, a zřejmě patří do stejné transkripční skupiny, neboť je orientován stejným směrem jako tyto geny (PETŘÍČKOVÁ a kol. 2014). Naproti tomu *vrdds* se nachází na okraji shluku a je orientován opačně než oba sousední geny. Jeho delece nijak neovlivnila produkci U-62162, což potvrzuje, že se zřejmě syntézy U-62162 neúčastní, nebo alespoň ne za podmínek, za kterých byly pokusy prováděny.

Genový shluk pro biosyntézu U-62162 je obklopen geny kódujícími integrázy a transpozázy. Je tedy pravděpodobné, že celý genový shluk se do *S. verdensis* dostal horizontálním přenosem zřejmě pomocí bakteriofágů.

Deriváty U-62162 bez horního řetězce, syntetizované heterologními producenty, potvrzují hypotézu o posloupnosti skládání jednotlivých podjednotek manumycinů. Totiž, že nejdříve dojde k vytvoření 3,4-AHBA, na které je nasyntetizován spodní řetězec. Horní řetězec vzniká odděleně a na centrální jednotku se připojuje až po dokončení své syntézy. Pokud je tedy nějakým způsobem znemožněna syntéza celého horního řetězce, hromadí meziprodukty složené z *mC₇N* a spodního řetězce, které byly z heterologních producentů extrahovány.

Derivát U-62162, s acylem vázaným místo horního řetězce na *mC₇N*, je struktura, jejíž obdoby byly nalezeny také u asukamycinu a kolabomycinu E. V případě asukamycinu byl derivát asukamycinu s horním řetězcem nahrazeným acylem syntetizován kmenem s delecí genu *asuB1*, který se účastní syntézy cyklohexylkarbonyl-CoA. A dále kmenem s delecí *asuC2*, který katalyzuje připojení horního řetězce k *mC₇N* (RUI a kol. 2010). U kolabomycinu E byla produkce acetylovaného derivátu zaznamenána u kmene s delecí genů *colC3*, *colC4* a *colC5*, které jsou homology genů *asuC3*, *asuC4* a *asuC5* u asukamycinu podílejících se na syntéze horního řetězce (PETŘÍČKOVÁ a kol. 2014). Tyto acetylované deriváty zřejmě vznikají činností buněčné arylamin N-acetyltransferázy, která za normálních podmínek v buňce zajišťuje detoxikaci arylaminu nebo arylhydroxylaminových metabolitů (VINEIS a kol. 1994). V případě poškozené syntézy horního řetězce se v buňce hromadí meziprodukty v podobě *mC₇N* s připojeným spodním řetězcem, které jsou zřejmě ve větší koncentraci považovány za nebezpečné a jsou detoxikovány acetylací.

Struktura třetího derivátu syntetizovaného heterologními producenty ($C_{11}H_{14}O_5$) je zvláštní, neboť neobsahuje NH_2 skupinu na centrální jednotce, která za normálních okolností vzniká již při skládání 3,4-AHBA. Jakým způsobem mohlo dojít k jejímu odštěpení není jasné. Neobvyklé také je, že struktura je plně oxygenovaná, neboť tyto reakce podle hypotézy probíhají až po připojení všech podjednotek antibiotika, tedy horního řetězce na centrální jednotku se spodním řetězcem a případně C_5N podjednotkou. Oxygenované deriváty, které měly na místě horního řetězce přes dusík vázaný acetyl, byly však nalezeny také u kmene

s genovým shlukem pro asukamycin, kde byla provedena delece *asuB1* a u kmene s delecí *asuC2* (RUI a kol. 2010). Oxygenace tedy zřejmě není závislá na přítomnosti horního řetězce. Stále je však třeba brát v úvahu, že struktury látek produkovaných heterologními kmeny byly navrženy pouze na základě UHPLC-DAD-ToF-MS dat a jejich správnost je třeba potvrdit měřením NMR spekter.

Co se týče množství derivátů U-62162 produkovaných v heterologních hostitelích, jednoznačně převládá acetylovaná forma. U kmene *S. lividans* K4-114/pSV5_all je také patrné, že k největší produkci derivátů dochází po 24 hodinách fermentace, s delší fermentací produkce klesá. To odpovídá poznatku uvedenému v prvním článku věnovaném U-62162 (SLECHTA a kol. 1982), že k největší produkci tohoto metabolitu dochází již po 24 hodinách, na rozdíl od většiny ostatních manumycinů, které se dostávají na vrchol produkce až po 72 hodinách.

V genovém shluku pro biosyntézu U-62162 se nenachází žádný z genů kódujících biosyntézu C₅N jednotky u manumycinových látek (u asukamycinu patří tyto geny do skupiny D). Již dříve bylo experimentálně potvrzeno, že geny *asuD1*, *asuD2* a *asuD3* jsou dostatečné pro syntézu a připojení C₅N podjednotky, neboť po vložení těchto genů do *S. lividans* byla tato jednotka připojována ke kyselině ferulové, která byla ke kmeni přidána (RUI a kol. 2010). Zatím však nebylo testováno, jaká je specifita těchto enzymů, zda jsou závislé na přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb ve spodním řetězci nebo délce tohoto řetězce. Z toho důvodu byly geny skupiny D přeneseny do *S. verdensis* a do kmene *S. verdensis* Δ *vrdER*, který produkuje mimo původní antibiotikum také derivát s dvojnými vazbami ve spodním řetězci. Bohužel ani v jednom extraktu z těchto kmenů nebyly nalezeny deriváty U-62162 s připojenou C₅N jednotkou. Příčinou může být, že spodní řetězec U-62162 je, na rozdíl od všech ostatních známých manumycinů, pouze 5 uhlíků dlouhý, vzniká zřejmě jen dvěma polyketidovými kondenzacemi. Všechny ostatní řetězce manumycinů jsou hexatrieny či oktateetraeny. Nicméně kyselina ferulová, na kterou se jednotka připojuje, obsahuje pouze jednu dvojnou vazbu v tříuhlíkatém řetězci. Proto je málo pravděpodobné, že by amid syntáza byla závislá na konkrétní délce řetězce. Možností je, že amid syntáza je závislá na přítomnosti dvojných vazeb v *trans* konformaci a že po delecí enoylreduktázy ve *S. verdensis* z nějakého důvodu vzniká dvojná vazba *cis*, která poté ze sterických důvodů nemůže být enzymem rozpoznána.

Další příčinou by mohlo být, že při syntéze spodního řetězce U-62162 je používán ACP, který enzym připojující C₅N není schopen rozeznat. Zatím není známo, zda amid syntáza interaguje s ACP při připojování, nebo zda je ACP odštěpen ještě před přidáním C₅N. Variantou je také neúspěšná exprese enzymů pro syntézu C₅N jednotky ve *S. verdensis*. Exprese může být blokována buňkou, neboť samotná C₅N je poměrně toxická. Pro vyloučení této možnosti bude třeba ke kmeni *S. verdensis* s vloženými geny *asuD* přidat ferulovou kyselinu. Pokud bude vznikat derivát této kyseliny s vázanou C₅N, není neúspěšná exprese příčinou pozorovaných výsledků.

Nové deriváty U-62162 vzniklé v rámci této práce byly zatím testovány pouze na antibakteriální účinky. Za ty je podle dosavadních poznatků nejvíce zodpovědný oxiran na

centrální jednotce (viz kap. 3.2.2). Extrakty získané z heterologních producentů nevykazují žádné antibakteriální vlastnosti a zároveň dva ze tří derivátů U-62162, které byly v těchto extraktech identifikovány, postrádají oxiran. Tento fakt může nepřímo dokazovat roli této části molekuly v antibakteriálních vlastnostech látek. Třetí derivát z extraktů oxiran podle navržené struktury obsahuje, nicméně je v extraktech zastoupena jen v malém množství a proto je možné, že jeho případné antibakteriální účinky nebyly kvůli malé koncentraci pozorovatelné. Dalším možným vysvětlením je, že, jak již bylo napsáno, je tato struktura jen hypotetická a je proto možné, že se ve skutečnosti v extraktech takto vypadající molekula nenachází. Svou roli v absenci antibakteriálních účinků extraktů z heterologních hostitelů může také hrát chybějící horní řetězec, který by mohl k těmto vlastnostem rovněž přispívat.

Extrakt z kmene s delecí *vrdeR* vytváří při biologickém testu inhibiční zónu na stejném místě jako divoký kmen, i když v o něco menším rozsahu. Kromě této zóny však vytváří ještě další minimálně dvě zóny. Tento výsledek je poněkud neočekávaný, neboť v extraktu byl identifikován kromě původního antibiotika pouze jeden nový derivát, který se liší pouze o 4 vodíky. Nepředpokládá se proto výraznější změna polárních vlastností, na TLC desce by se měl nacházet na stejném místě jako U-62162. Bude proto nutné provést další extrakce, účinnější separace a analýzy, aby bylo zjištěno, které látky jsou za nové inhibiční zóny zodpovědné a zda nový derivát s konjugovanými dvojnými vazbami ve spodním řetězci sám také vykazuje antibakteriální účinky, nebo zda je inhibiční zóna ve stejné vzdálenosti jako zóna standardu výsledkem přítomnosti frakce původního antibiotika.

Poznatky získané v této práci budou rozšířeny další analýzou genového shluku a potvrzením role jednotlivých genů v biosyntéze U-62162. Pochopení tohoto procesu otevře cestu k syntéze modifikovaných antibiotik díky cíleným zásahům do genů biosyntetického shluku. Tyto nové látky mohou mít změněnou aktivitu, lepší fyzikálně-chemické vlastnosti nebo nižší toxicitu.

Dalším důležitým krokem jsou testy protizánětlivých a protinádorových vlastností U-62162 i jeho nového derivátu s nenasyceným spodním řetězcem. Tímto směrem leží zřejmě největší potenciál těchto metabolitů.

7. Souhrn

- Byla dokončena sekvenace genového shluku kódujícího biosyntézu U-62162 ze *Streptomyces verdensis*, byly nalezeny ORF a předpovězeny jejich proteinové produkty.
- Genový shluk pro biosyntézu U-62162 byl přenesen do heterologních producentů, tyto kmeny však danou látku nesyntetizovaly. V extraktech byly nalezeny deriváty U-62162 bez horního řetězce, což naznačuje, že v genovém shluku chybí některé geny účastníci se skládání tohoto řetězce a jsou zřejmě přítomny na jiném místě genomu *S. verdensis*.
- Ve *S. verdensis* byla provedena inserční inaktivace genu *vrdER*, u kterého se předpokládalo, že kóduje enoylreduktázu účastníci se redukce dvojných vazeb během syntézy spodního řetězce. Inaktivace tuto roli potvrdila, nicméně se ukázalo, že enzym je částečně nahraditelný jiným proteinem přítomným v buňce, neboť i po jeho inaktivaci převládala produkce nezměněné látky nad metabolitem s nenasyceným spodním řetězcem.
- Na kraji genového shluku se nachází gen *vrdDS* s předpokládanou funkcí DSBA oxidoreduktázy. Abychom zjistili, zda se tento enzym účastní biosyntézy U-62162, byla provedena jeho inserční inaktivace. Kmen s delecí tohoto genu nicméně dále produkuje pouze U-62162 a proto se zdá, že *vrdDS* již ke genovému shluku nepatří.
- U-62162 postrádá pro manumyciny jinak typickou strukturu, kterou je C₅N jednotka na spodním řetězci. Geny pro biosyntézu C₅N byly vpraveny do *S. verdensis* a do kmene *S. verdensis* Δ *vrdER*. Nicméně ani z jednoho kmene nebyly extrahovány metabolity s touto připojenou jednotkou. Důvodem je možná rozdílná konformace spodního řetězce derivátu U-62162 s dvojnými vazbami oproti ostatním manumycinům, případně odlišný ACP nesoucí tento řetězec během biosyntézy, který není následně rozeznán amid syntázou. Příčinou může být také neúspěšná exprese vložených genů.

8. Seznam použité literatury

- Alcaraz, L., and Taylor, R.J.K. (1998). The first synthesis of the Streptomyces derived antibiotic U-62162. *Chemical Communications*, 1157-1158.
- Altschus, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Andrewes, A.G., Jenkins, C.L., Starr, M.P., Shepherd, J., and Hope, H. (1976). Structure of xanthomonadin 1 - novel dibrominated aryl-polyene pigment produced by bacterium *Xanthomonas juglandis*. *Tetrahedron Letters*, 4023-4024.
- Baldwin, A.S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14, 649-683.
- Bayer, E., Zahner, H., König, W.A., Jessipow, S., Gugel, K.H., Hagele, K., and Hagenmaier, H. (1972). Metabolites of microorganisms 98. Phosphinothricin and phosphinothricinyl-alanylalanine. *Helvetica Chimica Acta* 55, 224-&.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdano-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.
- Bergler, H., Wallner, P., Ebeling, A., Leitinger, B., Fuchsichler, S., Aschauer, H., Kollenz, G., Hogenauer, G., and Turnowsky, F. (1994). Protein ENVM is the NADH-dependent enoyl-ACP reductase (FabI) of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 5493-5496.
- Bernier, M., Kwon, Y.K., Pandey, S.K., Zhu, T.N., Zhao, R.J., Maciuk, A., He, H.J., DeCabo, R., and Kole, S. (2006). Binding of manumycin A inhibits I kappa B kinase beta activity. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2551-2561.
- Box, S.J., Gilpin, M.L., Gwynn, M., Hanscomb, G., Spear, S.R., and Brown, A.G. (1983). Mm 14201, a new epoxyquinone derivative with anti-bacterial activity produced by a species of *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics* 36, 1631-1637.
- Brodasky, T.F., Stroman, D.W., Dietz, A., and Mizsak, S. (1983). U-56,407, a new antibiotic related to asukamycin - isolation and characterization. *Journal of Antibiotics* 36, 950-956.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., *et al.* (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents - producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15, 361-367.
- Buzzetti, F., Zahner, H., Hutter, R., Gaumann, E., Neipp, L., Prelog, V., and Kellerschierlein, W. (1963). Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. 41. Manumycin. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 38, 871-874.
- Caffrey, P. (2003). Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *Chembiochem* 4, 654-657.
- Carreras, C.W., and Khosla, C. (1998). Purification and in vitro reconstitution of the essential protein components of an aromatic polyketide synthase. *Biochemistry* 37, 2084-2088.
- Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T., and Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *Fems Microbiology Reviews* 34, 171-198.
- Cherepanov, P.P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli* - Tc^r and Km^r cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Choi, K.H., Heath, R.J., and Rock, C.O. (2000). Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 182, 365-370.

- Cronan, J.E., Birge, C.H., and Vagelos, P.R. (1969). Evidence for 2 genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *100*, 601-604.
- Das, A., and Khosla, C. (2009). Biosynthesis of Aromatic Polyketides in Bacteria. *Accounts of Chemical Research* *42*, 631-639.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 6640-6645.
- Denoya, C.D., Fedechko, R.W., Hafner, E.W., McArthur, H.A.I., Morgenstern, M.R., Skinner, D.D., Stutzmanengwall, K., Wax, R.G., and Wernau, W.C. (1995). A 2nd branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene-cluster (bkdFGH) from *Streptomyces avermitilis* - its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a bkdF mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *Journal of Bacteriology* *177*, 3504-3511.
- Dixit, D., Sharma, V., Ghosh, S., Koul, N., Mishra, P.K., and Sen, E. (2009). Manumycin inhibits STAT3, telomerase activity, and growth of glioma cells by elevating intracellular reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine* *47*, 364-374.
- Floriano, B., and Bibb, M. (1996). afsR is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* *21*, 385-396.
- Franco, C.M.M., Maurya, R., Vijayakumar, E.K.S., Chatterjee, S., Blumbach, J., and Ganguli, B.N. (1991). Alisamycin, a new antibiotic of the manumycin group .1. Taxonomy, production, isolation and biological-activity. *Journal of Antibiotics* *44*, 1289-1293.
- Gerber, N.N., and Lecheval.Ha (1965). Geosmin an earthy-smelling substance isolated from Actinomycetes. *Applied Microbiology* *13*, 935-938.
- Gibbs, J.B., Oliff, A., and Kohl, N.E. (1994). Farnesyltransferase inhibitors - Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* *77*, 175-178.
- Gould, S.J., Melville, C.R., and Cone, M.C. (1996). 3-amino-4-hydroxybenzoic acid is derived from the tricarboxylic acid cycle rather than the shikimic acid pathway. *Journal of the American Chemical Society* *118*, 9228-9232.
- Grote, R., Zeeck, A., Drautz, H., and Zahner, H. (1988). Metabolic products of microorganisms .244. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus* .1. Isolation, characterization and biological properties. *Journal of Antibiotics* *41*, 1178-1185.
- Gust, B., Kieser, T., and Chater, K.F. (2002). REDIRECT[®] technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. John Innes Centre.
- Hara, M., Akasaka, K., Akinaga, S., Okabe, M., Nakano, H., Gomez, R., Wood, D., Uh, M., and Tamanoi, F. (1993). Identification of Ras-farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 2281-2285.
- Harder, M.E., Ladenson, R.C., Schimmel, S.D., and Silbert, D.F. (1974). Mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive malonyl coenzyme a acyl carrier protein transacylase. *Journal of Biological Chemistry* *249*, 7468-7475.
- Hayashi, K., Nakagawa, M., Fujita, T., Tanimori, S., and Nakayama, M. (1993). Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp K106. *Journal of Antibiotics* *46*, 1904-1907.
- Hayashi, K., Nakagawa, M., Fujita, T., Tanimori, S., and Nakayama, M. (1994a). Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp K106 .2. Structure determination and structure-activity-relationships. *Journal of Antibiotics* *47*, 1110-1115.
- Hayashi, K., Nakagawa, M., and Nakayama, M. (1994b). Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from

- Streptomyces* sp K106.1. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical and biological properties. *Journal of Antibiotics* 47, 1104-1109.
- Heath, R.J., and Rock, C.O. (1996a). Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10996-11000.
- Heath, R.J., and Rock, C.O. (1996b). Roles of the FabA and FabZ beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27795-27801.
- Hecht, S.M. (2000). Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *Journal of Natural Products* 63, 158-168.
- Hinshaw, H.C., and Feldman, W.H. (1946). Streptomycin in treatment of clinical and experimental tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 48, 175-181.
- Hopwood, D.A. (1990). Molecular-genetics of polyketides and its comparison to fatty-acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 24, 37-66.
- Hopwood, D.A. (1997). Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* 97, 2465-2497.
- Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., and Bibb, M.J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology* 129, 2257-2269.
- Hu, Y.D. (2000). The biosynthesis of manumycin type metabolites. University of Washington.
- Hu, Y.D., and Floss, H.G. (2004). Further studies on the biosynthesis of the manumycin-type antibiotic, asukamycin, and the chemical synthesis of protoasukamycin. *Journal of the American Chemical Society* 126, 3837-3844.
- Hu, Y.D., and Floss, H.G. (2006). Starter unit specificity of the asukamycin "upper" chain polyketide synthase and the branched-chain fatty acid synthase of *Streptomyces nodosus* subsp *asukaensis*. *Heterocycles* 69, 133-149.
- Jackowski, S., and Rock, C.O. (1987). Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase, a potential regulator of fatty-acid biosynthesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 262, 7927-7931.
- Jiang, P., and Cronan, J.E. (1994). Inhibition of fatty-acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid-synthesis and release of inhibition by thioesterase action. *Journal of Bacteriology* 176, 2814-2821.
- Jones, D.T., and Woods, D.R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* 50, 484-524.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalezduarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases reductases (SDR). *Biochemistry* 34, 6003-6013.
- Kaneda, T. (1991). Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews* 55, 288-302.
- Keatinge-Clay, A. (2008). Crystal Structure of the Erythromycin Polyketide Synthase Dehydratase. *Journal of Molecular Biology* 384, 941-953.
- Keatinge-Clay, A.T. (2007). A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chemistry & Biology* 14, 898-908.
- Keatinge-Clay, A.T. (2012). The structures of type I polyketide synthases. *Natural Product Reports* 29, 1050-1073.
- Keatinge-Clay, A.T., and Stroud, R.M. (2006). The structure of a ketoreductase determines the organization of the beta-carbon processing enzymes of modular polyketide synthases. *Structure* 14, 737-748.

- Khosla, C., Gokhale, R.S., Jacobsen, J.R., and Cane, D.E. (1999). Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annual Review of Biochemistry* 68, 219-253.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12, 19-36.
- Kim, K.H., Ha, B.H., Kim, S.J., Hong, S.K., Hwang, K.Y., and Kim, E.E. (2011). Crystal Structures of Enoyl-ACP Reductases I (FabI) and III (FabL) from *B. subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 406, 403-415.
- Kohno, J., Nishio, M., Kawano, K., Nakanishi, N., Suzuki, S., Uchida, T., and Komatsubara, S. (1996). TMC-1 A, B, C and D, new antibiotics of the manumycin group produced by *Streptomyces* sp - Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological properties. *Journal of Antibiotics* 49, 1212-1220.
- Kunze, B., Schabach, K., Zeeck, A., and Zahner, H. (1972). Metabolic products of microorganisms .3. Lipomycins .1. Isolation, characterization and first investigations of structure and mechanism of action. *Archiv Fur Mikrobiologie* 86, 147-174.
- Kurz, M., Guba, W., and Vertesy, L. (1998). Three-dimensional structure of moenomycin A - A potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b. *European Journal of Biochemistry* 252, 500-507.
- Kwan, D.H., and Leadlay, P.F. (2010). Mutagenesis of a Modular Polyketide Synthase Enoylreductase Domain Reveals Insights into Catalysis and Stereospecificity. *Acs Chemical Biology* 5, 829-838.
- Kwan, D.H., and Schulz, F. (2011). The Stereochemistry of Complex Polyketide Biosynthesis by Modular Polyketide Synthases. *Molecules* 16, 6092-6115.
- Kwan, D.H., Sun, Y.H., Schulz, F., Hong, H., Popovic, B., Sim-Stark, J.C.C., Haydock, S.F., and Leadlay, P.F. (2008). Prediction and Manipulation of the Stereochemistry of Enoylreduction in Modular Polyketide Synthases. *Chemistry & Biology* 15, 1231-1240.
- Lancini, G.C., Gallo, G.G., Sartori, G., and Sensi, P. (1969). Isolation and structure of rifamycin 1 and its biogenetic relationship with other rifamycins. *Journal of Antibiotics* 22, 369-377.
- Leesong, M., Henderson, B.S., Gillig, J.R., Schwab, J.M., and Smith, J.L. (1996). Structure of a dehydratase-isomerase from the bacterial pathway for biosynthesis of unsaturated fatty acids: Two catalytic activities in one active site. *Structure* 4, 253-264.
- Li, F.C., Maskey, R.P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H.H., Maier, A., Zeeck, A., and Laatsch, H. (2005). Chinikomycins A and B: Isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp isolate M045. *Journal of Natural Products* 68, 349-353.
- Li, S.J., and Cronan, J.E. (1993). Growth-rate regulation of *escherichia-coli* acetyl coenzyme-a carboxylase, which catalyzes the 1st committed step of lipid biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 175, 332-340.
- Liu, M., Zhou, L.J., Xu, A.M., Lam, K.S.L., Wetzel, M.D., Xiang, R.H., Zhang, J.J., Xin, X.B., Dong, L.Q., and Liu, F. (2008). A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18302-18307.
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., and Macneil, T. (1992). Analysis of *streptomyces-avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61-68.
- Maier, T., Jenni, S., and Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 angstrom resolution. *Science* 311, 1258-1262.
- Maier, T., Leibundgut, M., and Ban, N. (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* 321, 1315-1322.
- Martin, J.F., and Gil, J.A. (1984). Cloning and expression of antibiotic production genes. *Bio-Technology* 2, 63-72

- Migueluez, E.M., Hardisson, C., and Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *Journal of Cell Biology* *145*, 515-525.
- Moore, B.S., and Hertweck, C. (2002). Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Natural Product Reports* *19*, 70-99.
- Moore, B.S., and Hopke, J.N. (2001). Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem* *2*, 35-38.
- Nagase, T., Kawata, S., Tamura, S., Masuda, Y., Inui, Y., Yamasaki, E., Ishiguro, H., Ito, T., and Matsuzawa, Y. (1996). Inhibition of cell growth of human hepatoma cell line (Hep G2) by a farnesyl protein transferase inhibitor: A preferential suppression of ras farnesylation. *International Journal of Cancer* *65*, 620-626.
- Olano, C., Mendez, C., and Salas, J.A. (2010). Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports* *27*, 571-616.
- Omura, S., Kitao, C., Tanaka, H., Oiwa, R., Takahashi, Y., Nakagawa, A., Shimada, M., and Iwai, Y. (1976). New antibiotic, asukamycin, produced by streptomyces. *Journal of Antibiotics* *29*, 876-881.
- Pan, J.X., Chen, B., Su, C.H., Zhao, R.Y., Xu, Z.X., Sun, L., Lee, M.H., and Yeung, S.C.J. (2008). Autophagy induced by farnesyltransferase inhibitors in cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* *7*, 1679-1684.
- Pan, J.X., Huang, H.Z., Sun, L.L., Fang, B.L., and Yeung, S.C.J. (2005a). Bcl-2-associated X protein is the main mediator of manumycin A-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *90*, 3583-3591.
- Pan, J.X., She, M.R., Xu, Z.X., Sun, L., and Yeung, S.C.J. (2005b). Farnesyltransferase inhibitors induce DNA damage via reactive oxygen species in human cancer cells. *Cancer Research* *65*, 3671-3681.
- Persson, B., Hedlund, J., and Jornvall, H. (2008). The MDR superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* *65*, 3879-3894.
- Petricek, M., Petrickova, K., Havlicek, L., and Felsberg, J. (2006). Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *Journal of Bacteriology* *188*, 5113-5123.
- Petrickova, K., Pospisil, S., Kuzma, M., Tylova, T., Jagr, M., Tomek, P., Chronakova, A., Brabcova, E., Andera, L., Kristufek, V., *et al.* (2014). Biosynthesis of Colabomycin E, a New Manumycin-Family Metabolite, Involves an Unusual Chain-Length Factor. *Chembiochem* *15*, 1334-1345.
- Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D.V., Hutchinson, C.R., and McDaniel, R. (2003). A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry* *42*, 72-79.
- Rui, Z., Petrickova, K., Skanta, F., Pospisil, S., Yang, Y.L., Chen, C.Y., Tsai, S.F., Floss, H.G., Petricek, M., and Yu, T.W. (2010). Biochemical and Genetic Insights into Asukamycin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 24915-24924.
- Rui, Z., Sandy, M., Jung, B., and Zhang, W.J. (2013). Tandem Enzymatic Oxygenations in Biosynthesis of Epoxyquinone Pharmacophore of Manumycin-type Metabolites. *Chemistry & Biology* *20*, 879-887.
- Sackova, V., Kulikova, L., Kello, M., Uhrinova, I., and Fedorocko, P. (2011). Enhanced Antiproliferative and Apoptotic Response of HT-29 Adenocarcinoma Cells to Combination of Photoactivated Hypericin and Farnesyltransferase Inhibitor Manumycin A. *International Journal of Molecular Sciences* *12*, 8388-8405.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. CSHL Press, New York.
- Sattler, I., Grone, C., and Zeeck, A. (1993). New compounds of the manumycin group of antibiotics and a facilitated route for their structure elucidation. *Journal of Organic Chemistry* *58*, 6583-6587.

- Sattler, I., Thiericke, R., and Zeeck, A. (1998). The manumycin-group metabolites. *Natural Product Reports* *15*, 221-240.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *68*, 686-691.
- Schoner, T.A., Fuchs, S.W., Reinhold-Hurek, B., and Bode, H.B. (2014). Identification and Biosynthesis of a Novel Xanthomonadin-Dialkylresorcinol-Hybrid from *Azoarcus* sp BH72. *Plos One* *9*, 1-9.
- Sears, K.T., Daino, H., and Carey, G.B. (2008). Reactive oxygen species-dependent destruction of MEK and Akt in Manumycin stimulated death of lymphoid tumor and myeloma cell lines. *International Journal of Cancer* *122*, 1496-1505.
- Shan, D.D., Chen, L., Njardarson, J.T., Gaul, C., Ma, X.J., Danishefsky, S.J., and Huang, X.Y. (2005). Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 3772-3776.
- Sharma, V., Dixit, D., Koul, N., Mehta, V.S., and Sen, E. (2011). Ras regulates interleukin-1 beta-induced HIF-1 alpha transcriptional activity in glioblastoma. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* *89*, 123-136.
- Sharma, V., Shaheen, S.S., Dixit, D., and Sen, E. (2012). Farnesyltransferase Inhibitor Manumycin Targets IL1 β -Ras-HIF-1 α Axis in Tumor Cells of Diverse Origin. *Inflammation* *35*, 516-519.
- She, M., Pan, J., Sun, L., and Yeung, S.C.J. (2005). Enhancement of manumycin A-induced apoptosis by methoxyamine in myeloid leukemia cells. *Leukemia* *19*, 595-602.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* *7*, 285-295.
- Shimizu, K., and Tamura, G. (1981). Reductiomyacin, a new antibiotic .2. Structural elucidation by spectroscopic studies. *Journal of Antibiotics* *34*, 654-657.
- Shiple, P.R., Donnelly, C.C.A., Le, C.H., Bernauer, A.D., and Klegeris, A. (2009). Antitumor activity of asukamycin, a secondary metabolite from the actinomycete bacterium *Streptomyces nodosus* subspecies *asukaensis*. *International Journal of Molecular Medicine* *24*, 711-715.
- Shu, Y.Z., Huang, S., Wang, R.R., Lam, K.S., Klohr, S.E., Volk, K.J., Pirnik, D.M., Wells, J.S., Fernandes, P.B., and Patel, P.S. (1994). Manumycin E, manumycin F and manumycin G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *Journal of Antibiotics* *47*, 324-333.
- Singha, P.K., Pandeswara, S., Venkatachalam, M.A., and Saikumar, P. (2013). Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death. *Cell Death & Disease* *4*, 10.
- Slechta, L., Cialdella, J.I., Mizesak, S.A., and Hoeksema, H. (1982). Isolation and characterization of a new antibiotic U-62162. *Journal of Antibiotics* *35*, 556-560.
- Speyer, J.F., Basilio, C., and Lengyel, P. (1962). Ribosomal localization of streptomycin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *48*, 684-686.
- Striz, I., Brabcova, E., Petrickova, K., Kolesar, L., Sekerkova, A., Jaresova, M., and Petricek, M. (2013). Manumycin A inhibition of IL-1 beta and IL-6 release from human monocytes and macrophages. *Allergy* *68*, 337-337.
- Suzuki, H., Ohnishi, Y., Furusho, Y., Sakuda, S., and Horinouchi, S. (2006). Novel benzene ring biosynthesis from C-3 and C-4 primary metabolites by two enzymes. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 36944-36951.
- Tanaka, T., Tsukuda, E., Uosaki, Y., and Matsuda, Y. (1996). EI-1511-3, -5 and EI-1625-2, novel interleukin-1 beta converting enzyme inhibitors produced by *Streptomyces* sp E-1511 and E-1625 .3. Biochemical properties of EI-1511-3, -5 and EI-1625-2. *Journal of Antibiotics* *49*, 1085-1090.

- Thiericke, R., Zeeck, A., Nakagawa, A., Omura, S., Herrold, R.E., Wu, S.T.S., Beale, J.M., and Floss, H.G. (1990). Biosynthesis of the manumycin group antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* *112*, 3979-3987.
- Tsuda, M., Okamoto, K., Muguruma, N., Sannomiya, K., Nakagawa, T., Miyamoto, H., Kitamura, S., Goji, T., Kimura, T., Okahisa, T., *et al.* (2013). Suppressive effect of RAS inhibitor manumycin A on aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced rat colorectal carcinogenesis model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* *28*, 1616-1623.
- Vineis, P., Bartsch, H., Caporaso, N., Harrington, A.M., Kadlubar, F.F., Landi, M.T., Malaveille, C., Shields, P.G., Skipper, P., Talaska, G., *et al.* (1994). Genetically based N-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature* *369*, 154-156.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 615-619.
- Waksman, S.A., and Woodruff, H.B. (1942). Streptomycin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* *49*, 207-210.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., and Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology* *176*, 386-390.
- Weber, W., Zahner, H., Damberg, M., Russ, P., and Zeeck, A. (1981). Metabolic products of microorganisms .201. Ansatrienin A and ansatrienin B, antifungal antibiotics from *Streptomyces collinus*. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene I Abteilung Originale C-Allgemeine Angewandte Und Okologische Mikrobiologie* *2*, 122-139.
- Werner, G., Hagenmaier, H., Drautz, H., Baumgartner, A., and Zahner, H. (1984). Metabolic products of microorganisms .224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics production, isolation, chemical-structure and biological-activity. *Journal of Antibiotics* *37*, 110-117.
- Xie, P.F., Sheng, Y., Ito, T., and Mahmud, T. (2012). Transcriptional regulation and increased production of asukamycin in engineered *Streptomyces nodosus* subsp *asukaensis* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* *96*, 451-460.
- Xiong, Q.M., and Rikihisa, Y. (2011). The prenylation inhibitor manumycin A reduces the viability of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Medical Microbiology* *60*, 744-749.
- Yeung, S.C.J., Xu, G.P., Pan, J.X., Christgen, M., and Bamiagis, A. (2000). Manumycin enhances the cytotoxic effect of paclitaxel on anaplastic thyroid carcinoma cells. *Cancer Research* *60*, 650-656.
- Zeeck, A., Schroder, K., Frobel, K., Grote, R., and Thiericke, R. (1987). The structure of manumycin .1. Characterization, structure elucidation and biological-activity. *Journal of Antibiotics* *40*, 1530-1540.
- Zhang, W.J., Bolla, M.L., Kahne, D., and Walsh, C.T. (2010). A Three Enzyme Pathway for 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enone Formation and Incorporation in Natural Product Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* *132*, 6402-6411.
- Zheng, J.T., Gay, D.C., Demeler, B., White, M.A., and Keatinge-Clay, A.T. (2012). Divergence of multimodular polyketide synthases revealed by a didomain structure. *Nature Chemical Biology* *8*, 615-621.
- Zheng, Z.H., Dong, Y.S., Zhang, H., Lu, X.H., Ren, X., Zhao, G.Y., He, J.G., and Si, S.Y. (2007). Isolation and characterization of N98-1272 A, B and C, selective acetylcholinesterase inhibitors from metabolites of an actinomycete strain. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* *22*, 43-49.
- Ziermann, R., and Betlach, M.C. (1999). Recombinant polyketide synthesis in *Streptomyces*: Engineering of improved host strains. *Biotechniques* *26*, 106-110.