

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tomáš Zelenka

Identifikace a aktivace kryptického genového shluku pro biosyntézu látek
manumycinového typu u *Saccharothrix espanaensis* DSM44229

Identification and activation of a cryptic biosynthetic gene cluster for
manumycin-type metabolites in *Saccharothrix espanaensis* DSM44229

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 8. 2014

Podpis:

Poděkování:

Tímto chci poděkovat své školitelce Mgr. Kateřině Petříčkové, Ph.D. a vedoucímu laboratoře Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. za jejich trpělivost, přátelský přístup, značnou pomoc při mé laboratorní práci a v neposlední řadě za poskytnutí cenných rad a zkušeností při vypracování této diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Tereze Tylové za analýzu LC-MS a za zaškolení do této problematiky a Ing. Stanislavu Pospíšilovi, CSc. za pomoc s metabolickou analýzou.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým přátelům a celé své rodině za jejich podporu během mého studia a přípravy této diplomové práce.

Abstrakt:

Sekundární metabolismus grampozitivních půdních bakterií rodu *Streptomyces* je neocenitelným významným zdrojem přírodních produktů, mezi které patří i skupina polyketidových látek, manumycinů. Tyto látky vykazují kromě slabého antimikrobiálního účinku významné protizánětlivé a protinádorové aktivity. Rod *Streptomyces* skýtá značné množství dosud neobjevených, potenciálně klinicky využitelných antibiotik, což dělá z těchto organismů nadějně řešení současného problému rozvoje antibiotikových rezistencí u mikroorganismů. Výzkum se ubírá dvěma hlavními směry, jednak je zde snaha o „umělé“ vytváření různých modifikací ve struktuře molekul a o porozumění jejich funkcím, jednak jde o objevování úplně nových producentů metodami „genome miningu“, optimalizace postupů pro probouzení skrytých kryptických genových shluků a zvýšení produkce požadovaných metabolitů. Jeden z mnoha takových tichých shluků obsahuje i *Saccharothrix espanaensis* DSM44229. Tato genetická informace byla s cílem charakterizace jejího produktu přenesena do heterologního hostitele, kde následně došlo k aktivaci a produkci nových látek manumycinového typu.

Klíčová slova: *streptomycety, sekundární metabolity, polyketidy, manumyciny, protizánětlivé metabolity, genové inženýrství*

Abstract:

Secondary metabolism of Gram-positive soil bacteria from the genus *Streptomyces* is an inestimable source of natural products including manumycins, which belong to a polyketide group. These products possess weak antimicrobial, but important antiinflammatory, and antitumor activities. *Streptomyces* sp. offers broad amounts of yet undiscovered antibiotics, potentially utilizable in clinical medicine. This fact makes out of these organisms a promising solution to our present problem with rising antibiotic resistance among microorganisms. Two main ways are applied in this research: There are efforts of preparing new derivatives based on known products and creating various modifications in their structure. Next, new producers are discovered by “genome mining” methods, activation of silent gene clusters, followed by improvements of antibiotic production. One of those silent clusters was found in the *Saccharothrix espanaensis* DSM44229 strain. The genetic information has been transferred to a heterologous host in order to characterize its product. Cluster activation and production of novel manumycin-type metabolites occurred in the host after the transfer.

Keywords: *streptomycetes, secondary metabolites, polyketides, manumycins, anti-inflammatory metabolites, genetic engineering*

Obsah

Obsah.....	2
Seznam zkratek.....	4
1. Úvod	6
2. Přehled literatury.....	8
2.1. Polyketidy	8
2.1.1. Syntéza polyketidů a mastných kyselin	8
2.1.1.1. Mastné kyseliny	8
2.1.1.2. Polyketidsyntázy	10
2.1.1.3. Tailoring (post-PKS procesy)	10
2.2. Manumyciny.....	12
2.2.1. Struktura manumycinů	12
2.2.2. Produkce manumycinů.....	13
2.2.2.1. Rod <i>Streptomyces</i> (<i>Actinomycetales</i>)	14
2.2.2.2. Rod <i>Saccharothrix</i> (<i>Actinomycetales</i>)	15
2.2.2.3. Biosyntéza manumycinů.....	16
Syntéza z pohledu celé molekuly	18
2.2.2.4. Úpravy manumycinů	19
2.2.3. Aktivita	19
2.2.3.1. Inhibice Ras-specifické farnesyltransferázy	19
2.2.3.2. Inhibice IL-1 β konvertujícího enzymu.....	20
2.2.3.3. Ostatní aktivity	20
2.2.4. Hledání nových producentů manumycinů.....	21
2.3. Stimulace sekundárního metabolismu.....	21
2.3.1. Nestandardní kultivace	22
2.3.2. Genetické modifikace	23
2.3.3. Heterologní exprese	24
3. Materiál a metody	25
3.1. Materiál	25
3.1.1. Média pro kultivaci.....	25
3.1.2. Roztoky a pufrý	30
3.1.3. Komerční kity:	38
3.1.4. Enzymy	39
3.1.5. Bakteriální kmeny.....	40
3.1.6. Vektory.....	42
3.1.7. Oligonukleotidy a DNA standardy.....	44

3.2. Metody	47
3.2.1. Izolace a zpracování DNA	47
3.2.1.1. Další úpravy DNA	52
3.2.2. PCR reakce	54
3.2.3. Genové manipulace	56
3.2.3.1. Transformační metody	57
3.2.4. Další metody	59
4. Výsledky	64
4.1. Identifikace kmene <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM44229 jako možného producenta manumycinových antibiotik	64
4.1.1. Produkce manumycinů u divokého kmene <i>S. espanaensis</i> DSM44229	66
4.2. Příprava kosmidové knihovny kmene <i>S. espanaensis</i>	67
4.2.1. Izolace chromozomální DNA kmene <i>S. espanaensis</i>	67
4.2.2. Úprava chromozomální DNA pro vytvoření kosmidové knihovny	67
4.2.3. Příprava kosmidové knihovny	70
4.3. Příprava kmenů pro heterologní expresi biosyntetického shluku, pocházejícího ze <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM44229	70
4.3.1. Zjištění přítomnosti genů pro ALAS v <i>E. coli</i> VCS257	70
4.3.2. Ověření přítomnosti celého biosyntetického shluku	72
4.3.3. Přenos kosmidu do streptomycet	72
4.4. Analýza výsledného produktu heterologní exprese a optimalizace jeho produkce	77
4.4.1. Charakterizace metabolického profilu heterologního producenta	77
4.4.1.1. NMR analýza struktury	80
4.4.2. Stimulace produkce nových metabolitů u kmene K4-114/pESP446-2	82
4.4.2.1. Nadexprese regulačních genů <i>espR1</i> a <i>espR2</i>	82
5. Diskuse	89
6. Souhrn	93
7. Seznam použité literatury	94

Seznam zkratek

3,4-AHBA	3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina
3,5-AHBA	3-amino-5-hydroxybenzoová kyselina
5-ALA	5-aminolevulová kyselina
A ₂₆₀	Absorbance při vlnové délce 260 nm
ACP	Acyl-vázající protein (acyl-carrier protein)
ALAS	Aminolevulinátsyntáza
ASA	1-aspartát-4-semialdehyd
AT	Acyltransferáza
bp	Páry bazí (base pair)
BSA	Bovinní sérový albumin
C ₅ N	2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CLF	Faktor délky řetězce (chain length factor)
CoA	Koenzym A
DAD	Detektor diodového pole (Diode array detector)
dATP	Deoxyadenosin-trifosfát
dCTP	Deoxycytidin-trifosfát
DTT	Dithiotritol
dGTP	Deoxyguanosin-trifosfát
DH	Dehydrogenáza
dH ₂ O	Demineralizovaná voda
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonfosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleosid-trifosfát
dsDNA	Dvojláknová DNA
dTTP	Deoxythymidin-trifosfát
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
ER	Enoylreduktáza
ESI	Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FAS	Syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GR	GeneRuler 1 kb (viz. 3.1.7.)
CHC	Cyklohexylkarbonyl
chDNA	Chromozomální DNA

ICE	Interleukin-1 β konvertující enzym
IKK	I- κ B-kináza
IPTG	Izopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranozid
KR	Ketoreduktáza
KS	Ketosyntáza
<i>m</i> -ABA	3-aminobenzoová kyselina
MAT	Malonyl-acetyl transferáza
<i>m</i> -C ₇ N	2-amino-4-hydroxycyklohex-2-enon
MCS	Mnohočetné klonovací místo (multiple cloning site)
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NBT	Nitroblue-tetrazolium
NF- κ B	„Necrosis factor κ B“
OD ₆₀₀	Optická densita při vlnové délce 600 nm
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Polyetylenglykol
PKS	Polyketid syntáza
PNK	Polynukleotid kináza
ppGpp	Guanosin-tetrafosfát
RNAP	RNA polymeráza
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SAP	Krevetová alkalická fosfatáza (shrimp alkaline phosphatase)
SDS	Dodecylsírán sodný
TE	Thioesteráza
TES	N-tris(hydroxymetyl)metyl-2-aminoetansulfonová kyselina
TNF- α	„Tumor necrosis factor α “
ToF	Doba letu (time of flight)
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometan
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid

1. Úvod

Každá buňka vykonává během svého života celou řadu enzymových reakcí látkové přeměny, během kterých dochází k přeměně různých látek a energií. Souhrn těchto tzv. metabolických drah označujeme jako metabolismus. V metabolicky aktivních buňkách může metabolismus probíhat ve dvou základních formách.

Vedle primárního metabolismu, který je často cyklického charakteru a zajišťuje látky esenciální pro přežití a úspěšnou reprodukci jako jsou například nukleové kyseliny, tuky, cukry nebo některé aminokyseliny, buňky mohou vykonávat také metabolismus sekundární. K jeho nastartování dochází, především pokud je buňka vystavena stresu, například při vyčerpání živin, a probíhá paralelně s primárním metabolismem. Produkty sekundárního metabolismu mají často dosud neobjasněnou funkci, avšak v mnoha případech dochází ke spuštění alternativních metabolických drah pro získávání živin. Během těchto procesů, které poskytují buňce lepší možnosti pro přežití v okolní konkurenci, dochází také k produkci různých pigmentů nebo antibiotik.

Sekundární metabolismus je v největší míře využíván například některými druhy rostlin, hub a hlavně prokaryot. Zatímco u rostlin může produkce probíhat během celého života buňky, u prokaryot se soustřeďuje především do stacionární fáze. Zde dochází k produkci mnoha různých skupin chemických látek, čehož je hojně využíváno v praxi při produkci antibiotik. Mnoho těchto látek, včetně manumycinů, patří do skupiny polyketidů. Jejich syntéza je ve značné míře podobná syntéze mastných kyselin. U obou těchto skupin je základní stavební složkou Acetyl-CoA.

Manumycinová antibiotika jsou malá skupina bakteriálních metabolitů, pojmenovaná po Manumycinu A1, který byl popsán jako první v roce 1963 (Buzzetti *et al.* 1963). Tyto látky vykazují značné množství různých biologických aktivit, od protizánětlivé (Tanaka *et al.* 1996), antibakteriální (Omura *et al.* 1976, Shu *et al.* 1994) až po protirakovinnou (Hara *et al.* 1993, Sattler a Tamanoi 1996, Barbacid 1987).

Struktura manumycinových látek byla poprvé popsána v roce 1973 na manumycinu A1 (Schröder a Zeeck 1973) jako dva nenasycené uhlíkové řetězce propojené unikátním uhlíkovým kruhem. Zatímco dolní řetězec je relativně konzervovaný, horní může nabývat různé délky a může být také různými způsoby zakončen. Tato rozmanitost určuje, jakou aktivitu bude konkrétní manumycin mít. To je také důvodem, proč se v posledních letech zájem obrací právě na získávání nových, dosud nepopsaných manumycinů, s potenciálně využitelnými biologickými účinky.

Cíle práce:

- Konstrukce kosmidové knihovny genomové DNA kmene *S. espanaensis* DSM44229
- Naklonování celého biosyntetického genového shluku manumycinového typu
- Přenos genového shluku a jeho oživení v heterologním producentovi
- Charakterizace výsledných produktů genového shluku z DSM44229
- Optimalizace produkce objevených manumycinových metabolitů

2. Přehled literatury

2.1. Polyketidy

Polyketidové látky tvoří významnou skupinu přírodních látek, jež vykazují velké množství různých klinicky využitelných biologických účinků. Vedle manumycinů sem patří řada dalších sekundárních metabolitů, běžně využívaných v medicíně, jako je například erytromycin.

2.1.1. Syntéza polyketidů a mastných kyselin

I přes vysokou strukturální diverzitu je biosyntéza polyketidů jednotná a pravděpodobně se původně vyvinula ze syntézy mastných kyselin, které se značně podobá (Hopwood and Sherman 1990). V obou případech je založena na Claisenově kondenzaci.

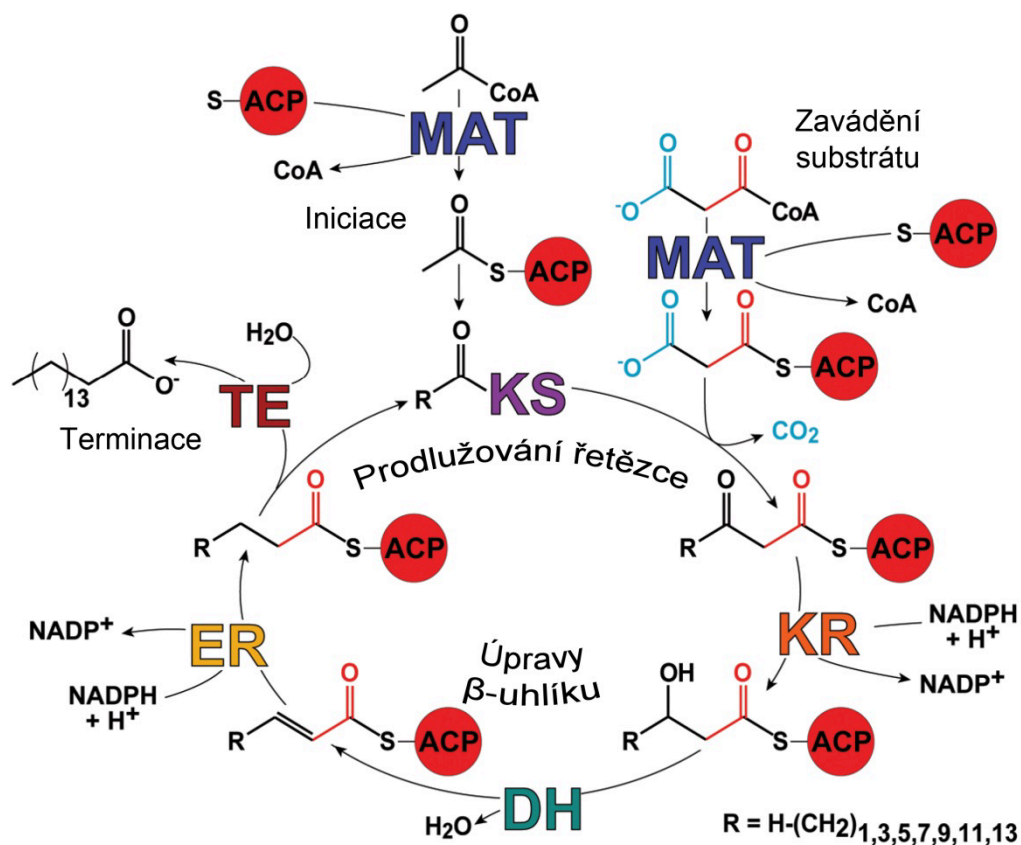
2.1.1.1. Mastné kyseliny

V případě syntézy mastných kyselin je kondenzace vykonávána enzymovým systémem syntézy mastných kyselin (FAS – Fatty Acid Synthase). Ty zajišťují připojování malonylových podjednotek a jejich vazbu k počáteční podjednotce, většinou acetylu, vznikajícímu z acetyl-CoA nebo z malonyl-CoA dekarboxylací (obr. 1).

Látky účastnící se kondenzace jsou vázány na speciální enzymy. Prvním z nich je ketosyntáza (KS), na kterou je navázána startovní acetylová jednotka a která katalyzuje kondenzaci. Malonylové podjednotky určené pro prodloužení řetězce jsou přenášeny druhým enzymem, kterým je acyl-vázací protein (ACP), jež je kromě toho také prostředníkem při přenosu acetylu na KS.

Kondenzace probíhá v několika cyklech podle požadované délky vznikajícího řetězce. Výsledkem každého cyklu je prodloužený řetězec vázaný ve formě β -ketoesteru na ACP. Následné kroky slouží k odstranění β -kyslíku. Nejprve probíhá redukce ketoreduktázou (KR), dehydrogenace dehydrogenázou (DH) a konečně další redukce enoylreduktázou (ER). Po dokončení všech těchto kroků je, po přenesení nasyceného řetězce z ACP na KS, celý cyklus opakován. Po dosažení konečné délky je řetězec přenesen na enzym thioesterázu (TE), ze které je následně uvolněn ve formě volné kyseliny nebo acyl-esteru.

Jelikož jsou jednotlivé stavební složky (startovní acetyl a malonylové jednotky) vstupující do biosyntézy ve formě vázané na koenzym A, účastní se procesu ještě další složka FAS, kterou je malonyl-acetyl transferáza (MAT). Její úlohou je přenos těchto složek z koenzymu na příslušné enzymatické domény FAS (Staunton a Weissman 2001).



Obr. 1: Cyklus biosyntézy mastných kyselin začíná přenosem acetylové skupiny na **KS** pomocí **MAT**, přes intermediát vázaný na **ACP** (Iniciace). Podobným způsobem je na **ACP** pomocí **MAT** přenesena i malonylová podjednotka (Zavádění substrátu), která je následně připojena prodlužovanému řetězci, vázanému na **KS** (Prodlužování řetězce). Výsledný β-ketoester je pak redukován (**KR**, **ER**) a dehydratován (**DH**), za vzniku nasyceného řetězce (Úpravy β-uhlíku), který je přenesen na **KS**, čímž začíná další cyklus syntézy. Požadovaný řetězec je z cyklu vypuštěn přes **TE** (Terminace). (převzato z Brignole et al. 2009).

Popsaný mechanismus je shodný u všech systémů využívajících FAS a ve všech případech lze rozlišit základních 7 domén s výše popsanými enzymatickými účinky. FAS se dělí na 2 základní typy v principu podle organizace mezi jednotlivými doménami. FAS typu I jsou velké proteiny, ve kterých jsou sdruženy všechny enzymatické domény, účastníci se biosyntézy mastných kyselin. V případě FAS typu II se jedná o jednotlivé proteiny, které katalyzují jen jednu reakci, a které se během syntézy postupně střídají.

2.1.1.2. Polyketidsyntázy

Nejdůležitějšími enzymy při biosyntéze polyketidů jsou polyketidsyntázy (PKS). Tyto komplexy se dělí v podstatě na 3 typy (obr. 2).

PKS typu I jsou, podobně jako v případě FAS, velké multidoménové enzymy, nesoucí aktivitu potřebnou pro všechny kroky biosyntézy polyketidů rozdělenou mezi jednotlivé domény. Každá z těchto domén je obvykle během syntézy enzymaticky aktivní pouze jednou. Díky tomu se dá podle pořadí jednotlivých domén celkem dobře odhadnout konečná struktura produktu.

U PKS typu II jsou naproti tomu jednotlivé aktivní domény rozmístěny na několika malých enzymech, které obvykle nesou pouze jednu funkci, ale jsou využívány opakovaně. Tento typ je nejčastěji využíván při syntéze bakteriálních aromatických polyketidů. Jelikož jsou jednotlivé složky těchto PKS aktivní opakovaně během procesu kondenzace, neexistuje žádný vztah mezi jejich počtem a počtem kroků kondenzace. U těchto PKS lze tedy strukturu výsledného produktu odhadnout mnohem obtížněji, než je tomu u PKS I. K odhadnutí lze v tomto případě využít například podobností mezi různými chain length faktory (CLF), určujícími délku polyketidových řetězců.

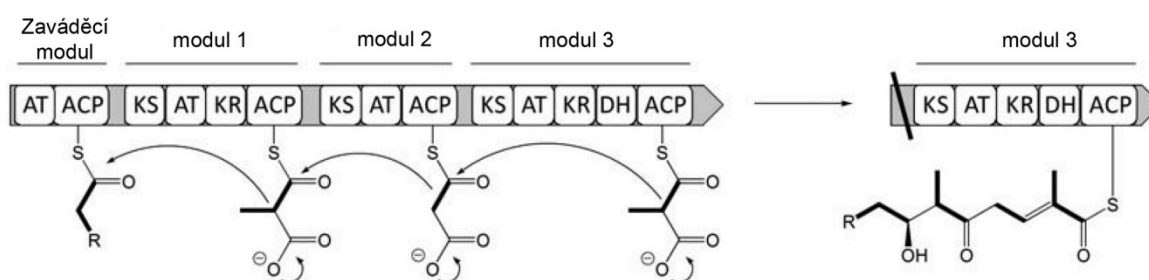
Existují také PKS typu III, které mají zvláštní homodimerní strukturu. U bakterií a hub byly tyto PKS popsány pouze v několika případech (Austin a Noel 2003, Katsuyama a Ohnishi 2012). Tento systém zajišťuje kondenzaci malonylových jednotek a je zajímavý především tím, že nevyužívá žádný ACP k iniciaci syntézy, ale dochází k ní rovnou na startovní jednotce.

2.1.1.3. Tailoring (post-PKS procesy)

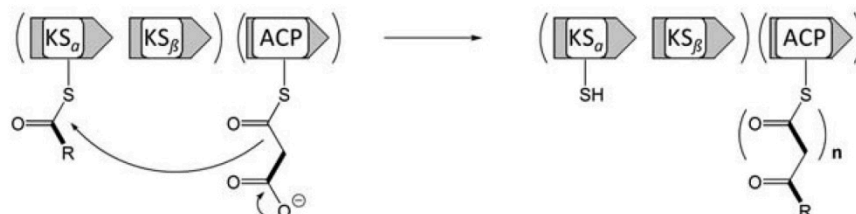
Jako tailoring procesy se označují děje, které polyketid podstupuje po syntéze polyketidsyntázou. Jedná se o dodatečné úpravy různými enzymy od oxidoreduktáz, přes různé transferázové enzymy, až po halogenázy a jiné (Olano *et al.* 2010).

Mezi oxidoreduktázy patří řada enzymů, které se těchto procesů účastní nejčastěji. Jedná se o oxygenázy, oxidázy, peroxidázy, reduktázy nebo dehydrogenázy, enzymy ovlivňující kyslík-obsahující skupiny (hydroxylové, epoxidové, aldehydové anebo keto), případně zavádějící vodíkové atomy. Některé z nich, jako například ketoreduktázy nalezneme také přímo u PKS, kde odstraňují ketoskupinu během cyklů Claisenovy kondenzace.

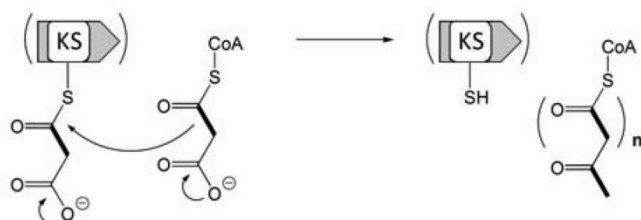
Typ I



Typ II



Typ III



Obr. 2: Organizace jednotlivých typů PKS; ACP – acyl carrier protein; AT – acyltransferáza; DH – dehydratáza; KR – ketoreduktáza; KS – ketoacyl syntáza (převzato z Olano *et al.* 2010).

Transferázových enzymů je hned několik typů, podle toho jaké skupiny přenášejí. Mnoho polyketidů je dodatečně upraveno glykosylací glykosyltransferázami (Salas a Méndez 2007; Thorson *et al.* 2001). Takto jsou modifikována i některá významná antibiotika (erytromycin, doxorubicin aj.), u nichž je glykosylace esenciální pro jejich aktivitu. Další důležitou transferázovou reakcí je přenos metylové skupiny. Metyltransferázy většinou jako donor využívají S-adenosylmethionin. K těmto reakcím se také řadí například připojování krátkých uhlíkatých řetězců acyltransferázami, aminoskupin aminotransferázami, nebo prenylových skupin prenyltransferázami.

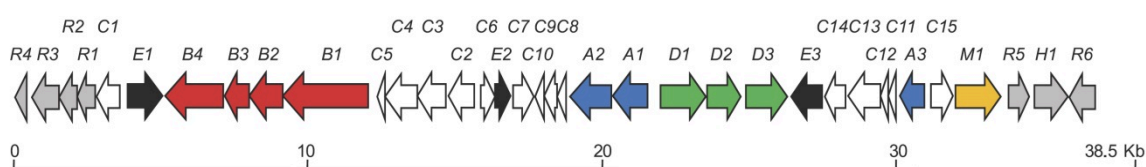
Značný dopad na aktivitu látek byl prokázán také v případě halogenace u antibiotik, jako je například vankomycin nebo chloramfenikol (Harris *et al.* 1985; Neumann *et al.* 2008). Obecně se nejčastěji jedná o halogenaci atomy chloru, případně bromu, méně často jódu a fluoru.

Porozumění těmto procesům v posledních letech značně pokročilo a otevřelo tak do budoucna další atraktivní možnosti pro získávání nových derivátů přírodních látek.

2.2. Manumyciny

Manumyciny jsou malá skupina látek, syntetizovaných v rámci bakteriálního sekundárního metabolismu. První takováto látka, po které byla skupina pojmenována, byla objevena již v roce 1963 (Buzzetti *et al.* 1963) a označena jako manumycin A. Na této látce byla popsána základní manumycinová struktura (viz 2.2.1.). Ta je kromě horní části molekuly u většiny těchto látek velice podobná. Geny kódující všechny složky potřebné pro biosyntézu manumycinů jsou na lineárním chromosomu soustředěny do shluků.

Z hlediska biosyntézy byly tyto látky nejlépe charakterizovány na případě asukamycinu, produkovaného kmenem *Streptomyces nodosus ssp. asukaensis*, u kterého byl celý genový shluk osekvenován a popsán. Všechny geny v něm byly rozděleny do několika skupin podle toho, jakých částí biosyntézy se účastní (obr. 3) (Rui *et al.* 2010).



Obr. 3: Otevřené čtecí rámce identifikované v genovém shluku pro syntézu asukamycinu. Geny rozděleny dle svých funkcí do několika skupin: skupina **A** pro biosyntézu a adenylaci 3,4-AHBA; skupina **B** pro biosyntézu CHC-CoA; skupina **C** pro skládání polyketidových řetězců; skupina **D** pro tvorbu C₅N podjednotky; skupina **E** pro oxygenaci; skupina **R** jsou regulátorové oblasti; **M** - export (převzato z Rui *et al.* 2010).

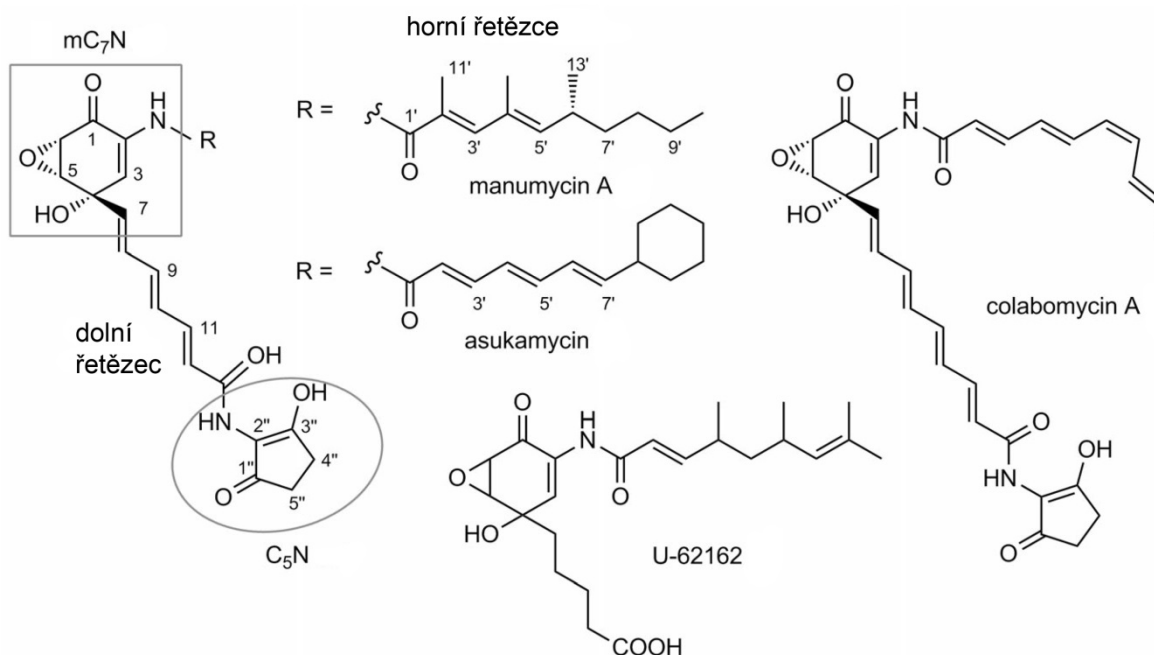
2.2.1. Struktura manumycinů

Charakteristickou složkou struktury manumycinů je *m*-C₇N (2-amino-4-hydroxycyklohex-2-enon) kruhová podjednotka umístěná ve středu molekuly. Charakteristické je meta uspořádání mezi dusíkem a uhlíkem C7. Podle uspořádání substituentů na uhlících C5/C6 se molekuly dělí na dva základní typy. Molekuly s uspořádáním 5,6-epoxy se označují jako Typ I, který se dále podle nasycenosti dolního řetězce dělí na Typ Ia (nenasycený) a Typ Ib (nasycený). Typu II jsou molekuly, u nichž se na C5/C6 nachází hydroxyetylenová struktura. Způsob substituce na uhlících C5/C6 ovlivňuje antimikrobiální aktivitu molekuly (viz. 2.2.3.3.). Na tuto centrální jednotku jsou navázány dva uhlíkaté řetězce, přičemž uhlík C7 přechází v takzvaný dolní řetězec a na dusík je navázaný horní řetězec.

Variabilita dolního řetězce je značně omezená, ve většině případů se jedná o trien, nebo tetraen, jako je tomu v případě kolabomycinů A7 a D8. Dolní uhlíkatý řetězec je nejčastěji zakončen C₅N (2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon) podjednotkou. Pouze v několika

případech je zakončen karboxy skupinou. Struktura C₅N podjednotky je značně konzervovaná napříč mnoha druhy přírodních látek.

Z hlediska variability manumycinových látek je nejdůležitější strukturou právě horní řetězec, který do značné míry určuje vlastnosti konkrétní molekuly. Jeho struktura se může různit například v celkové délce řetězce nebo v počtu a umístění metylových zbytků a dvojných vazeb. Zdrojem variability je i volba startovní jednotky, která byla pro syntézu tohoto řetězce použita. Tato podjednotka se ve finální molekule manumycinu nachází na konci horního řetězce (obr. 4).



Obr. 4: Základní struktura manumycinu (vlevo), různé struktury horního řetězce (vpravo) (převzato z Petříčková et al. 2014).

2.2.2. Produkce manumycinů

Hlavními producenty látek tohoto typu je rod *Streptomyces* z řádu *Actinomycetales*. Díky jejich pestrému sekundárnímu metabolismu se obecně jedná o bakterie využívané v mnoha odvětvích biotechnologického průmyslu. Tyto organismy jsou často zmiňovány v souvislosti s hledáním nových druhů léčiv s protizánětlivými nebo například protinádorovými účinky.

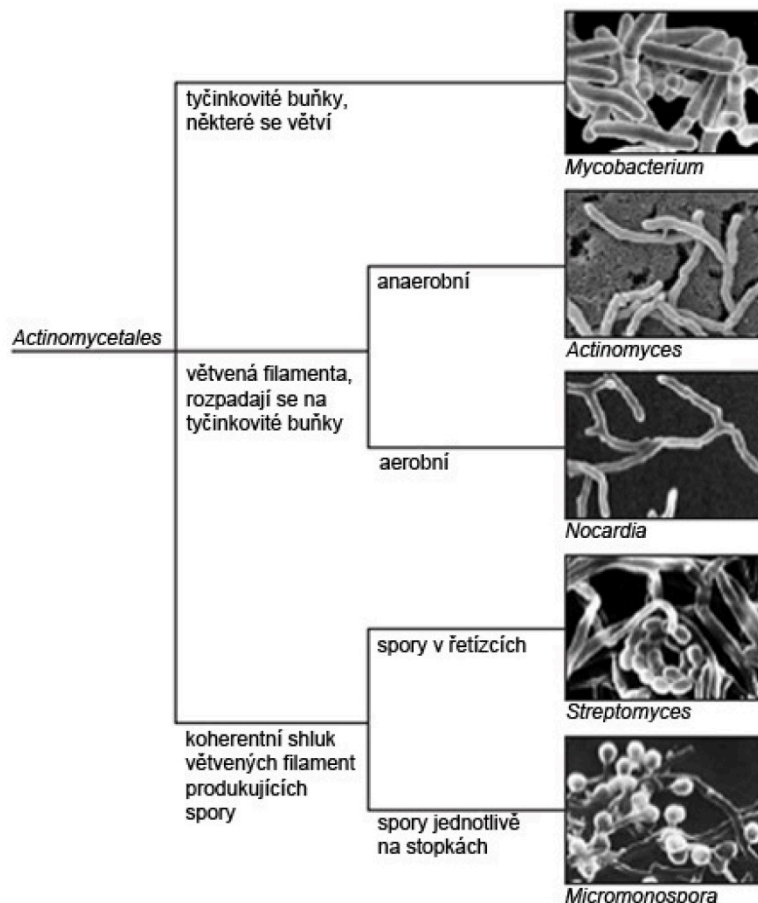
Jak již bylo řečeno, geny pro biosyntézu manumycinů jsou jako u většiny ostatních sekundárních metabolitů aktinomycet na chromosomu sdruženy ve shlucích (viz 2.2.). Velikost manumycinových genových shluků se pohybuje někde v rozmezí od 25 kbp do 40 kbp. Expres těchto shluků bývá zahájena v rámci sekundárního metabolismu za různých stresových podmínek. Většina těchto genových shluků však není za běžných laboratorních

podmínek aktivována ani při stresu. Některé studie tvrdí, že každá ze streptomycet vlastní až dvě desítky různých genových shluků pro syntézu sekundárních metabolitů, ale pouze několik z nich je během stresu aktivováno (Bentley *et al.* 2002; Ikeda *et al.* 2003). Ať už jsou tyto odhady přesné nebo ne, jisté je to, že doposud jsme poznali jen malý zlomek z celkového počtu těchto látek a že tento druh organismů do budoucna nabízí obrovský potenciál ve smyslu hledání nových látek s využitelnými biologickými aktivitami. Tyto neexprimované genové shluky se označují jako „kryptické“ a vzhledem k jejich množství se jejich aktivací zabývá čím dál více studií. Důvody a mechanismy utlumení těchto shluků však nejsou doposud známy. Z hlediska molekulární biologie je rod *Streptomyces* dlouhodobě dobře probádaný, což poskytuje řadu možností pro genetické manipulace používané při pokusech o aktivaci kryptických shluků.

2.2.2.1. Rod *Streptomyces* (*Actinomycetales*)

Bakterie rodu *Streptomyces* jsou především půdní vláknité aerobní organismy, patří do řádu *Actinomycetales*. Obsahují lineární chromosom dlouhý přibližně 6-10 Mbp o vysokém podílu GC párů (až 70%) (Bentley *et al.* 2002), který se rozděluje na dvě základní oblasti. V konzervované centrální části jsou soustředěny převážně esenciální geny primárního metabolismu (Choulet *et al.* 2006; Ohnishi *et al.* 2008), v ramenech pak nalezneme geny sekundárního metabolismu a geny adaptační (Choulet *et al.* 2006). Streptomycety jsou dále studovány i jako model buněčné diference na prokaryotické úrovni. Procházejí složitým životním cyklem, který připomíná cyklus plísni. Prvním stupněm růstu na pevném médiu je tvorba substrátového mycelia prorůstajícího do substrátu. V další fázi dochází k tvorbě nadzemních sporogenních hyf, ze kterých jsou následně při stresových podmínkách oddělovány spory. *Actinomycetales* zahrnují kromě rodu *Streptomyces* ještě další rody, které se navzájem liší především tvarem, způsobem růstu anebo tvorbou spor (obr. 5).

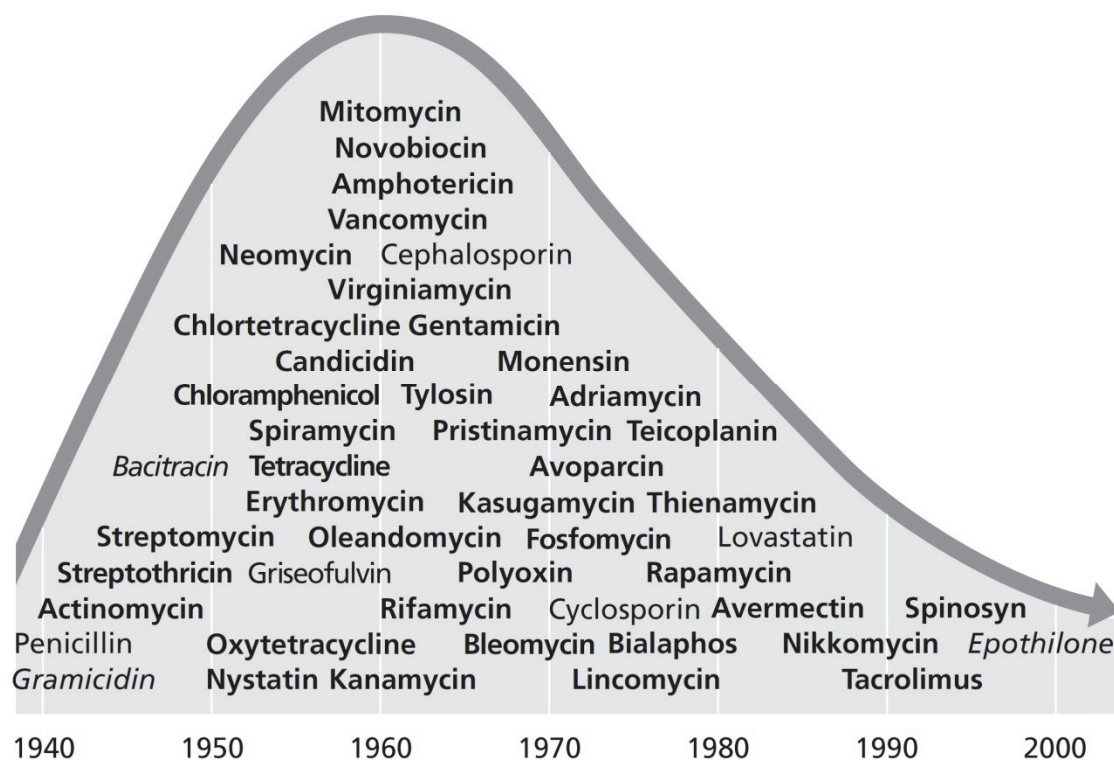
Řád *Actinomycetales* je po mnoho let obecně nejvýznamnější skupinou bakterií z pohledu získávání nových typů antibiotik a jiných přírodních látek (obr. 6). Do roku 2002 bylo u těchto organismů nalezeno téměř 50% všech nových antibiotik a jiných biologicky aktivních látek (tab. 1) (Bérdy 2005).



Obr. 5: Klasifikace aktinomycet podle Waksmana a Henriciho, 1949 (převzato z Hopwood 2007).

2.2.2.2. Rod *Saccharothrix* (Actinomycetales)

Bakterie rodu *Saccharothrix* jsou dalšími zástupci řádu *Actinomycetales*, patřícími do čeledi pseudonokardií. Tento rod je často zmiňován v souvislosti svou schopností glykosylovat přírodní produkty (Ohuchi *et al.* 2000). Mezi takovéto látky patří například sacharomyciny ze skupiny heptadekaglykosidových antibiotik, aktivní proti MRSA (Singh *et al.* 2000). Prvním osekvenovaným genomem organismu z této skupiny byl *Saccharothrix espanaensis* DSM44229. Na rozdíl od streptomycet je genom této bakterie cirkulární, stejně jako u dalších pseudonokardií (Land *et al.* 2009; Liolias *et al.* 2010; Oliynyk *et al.* 2007; Pati *et al.* 2009; Sales *et al.* 2011), o délce 9 360 653 párů bazí a neobsahuje žádné mimochromozomální replikony. V jeho genomu bylo nalezeno až 26 potenciálních genových shluků pro sekundární metabolismus. Kromě sacharomycinů A a B nebyla zaznamenána produkce jiných sekundárních metabolitů (Strobel *et al.* 2012).



Obr. 6: Objevy důležitých antibiotik a jiných přírodních látek v letech 1940 až 2000. **Tučně** vyznačené jsou produkty bakterií řádu Actinomycetales; normálně produkty hub; kurzíva označuje látky vyráběné bakteriemi z jiných skupin než Actinomycetales (Hopwood 2007).

Producenti	Antibiotika	Ostatní aktivity	Celkem
<i>Actinomycetales</i>	8 700	1 400	10 100
Ostatní bakterie	2 900	900	3 800
Houby	4 900	3 700	8 600
Celkem	16 500	6 000	22 500

Tab. 1: Počty nových přírodních látek, izolovaných z hlavních 3 skupin mikroorganismů do roku 2002 (převzato z Bérdy 2005)

2.2.2.3. Biosyntéza manumycinů

Mechanismy biosyntézy byly intenzivně studovány u organismů *Streptomyces parvulus* a *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*, produkujících manumycin A a asukamycin (Thiericke *et al.* 1990). Obě tyto látky obsahují v podstatě 4 základní stavební složky (viz. 2.2.1.) pocházející z nezávislých metabolických drah.

Centrální m -C₇N podjednotka se kromě manumycinů nachází také u mnoha dalších antibiotik, u nichž se ale její původ může různit. U velké části těchto látek pochází její prekurzor z cyklu kyseliny šikimové (Kim *et al.* 1996), konkrétně se jedná o kyselinu 3-amino-5-hydroxybenzoovou (AHBA) (Kibby a Rickards 1981, Herlt *et al.* 1981). Jiným možným prekurzorem je 3-aminobenzoová kyselina (m -ABA), která je také intermediátem cyklu kyseliny šikimové (Rinehart *et al.* 1981). V případě manumycinů ale probíhá tvorba m -C₇N jednotky odlišným způsobem. Prekurzorem je kyselina 3-amino-4-hydroxybenzoová (3,4-AHBA) (Hu *et al.* 1997), která však nevzniká v cyklu kyseliny šikimové, ale vzniká kondenzací a následnou cyklizací dvou dalších látek. První z nich je 1-aspartát-4-semialdehyd (ASA), pocházející z Krebsova cyklu a druhou je dihydroxyacetonfosfát (DHAP) nebo dihydroxyaceton (DHA) (Thiericke *et al.* 1990).

Výstavba horního polyketidového řetězce probíhá polyketidovou syntézou, která začíná na startovní molekule. Tou mohou být různé látky, přičemž většinou se jedná o jednu ze tří hlavních skupin. První z nich je acetyl-koenzym A, který je využit v případě syntézy manumycinu A. Druhou je jednotka isopropylu, použitá při stavbě manumycinů E a G. Poslední z hlavních skupin startovních jednotek je cyklohexan. Ten nalezneme například u asukamycinu nebo u manumycinu F. Typ použité molekuly také hornímu řetězci, resp. celé látce, uděluje značnou strukturální variabilitu. Jednotky použité k prodloužení řetězce se mohou také mírně lišit. U manumycinu A jde o připojení jednoho malonyl-koenzymu A a tří metylmalonyl-koenzymů A.

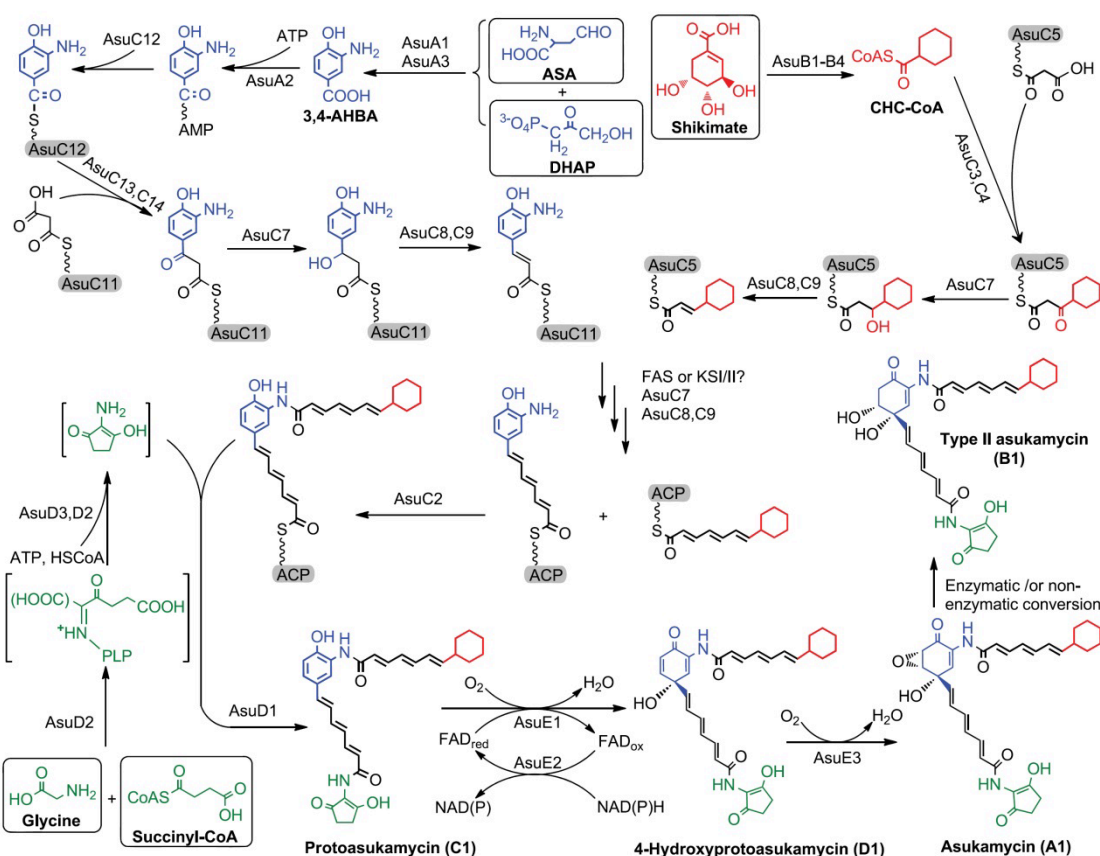
Syntéza dolního řetězce je také zajištěna polyketidovou syntézou, ale na rozdíl od horního řetězce je jako startovní molekula použita 3,4-AHBA nesená aryl-přenášejícím proteinem. Syntéza tedy v podstatě začíná na vznikající m -C₇N jednotce. K syntéze je využíván malonyl-CoA, přičemž počet kondenzačních kroků se liší podle toho, zda vzniká látka s trienovým (např. manumycin A nebo asukamycin) nebo tetraenovým (colabomycin) dolním řetězcem (Thiericke *et al.* 1990). V rámci závěrečných úprav je řetězec ještě ošetřen ketoreduktázou a dehydrogenován, čímž dojde ke vzniku dvojných vazeb na spojených jednotkách (Rui *et al.* 2010). Úplně na závěr je na konec řetězce připojena C₅N jednotka, nebo je ponecháno zakončení v podobě karboxylové kyseliny.

Prekurzorem pro vznik 2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enonové jednotky (C₅N) je kyselina 5-aminolevulová (5-ALA), která v případě biosyntézy mynumycinových látek vzniká většinou z glycinu a sukcinyl-koenzymu A v rámci takzvané C₄ dráhy. Klíčovou roli při tomto vzniku kyseliny 5-aminolevulové sehrává enzym 5-aminolevulinát syntáza. Druhým způsobem vzniku 5-ALA je C₅ dráha. Zde je tRNA^{glu} po přeměně na semialdehyd transaminována na 5-ALA. Takto vzniklá kyselina aminolevulová však slouží výhradně k účelům primárního metabolismu a stává se prekurzorem porfyrinů a hemu (Petříček *et al.* 2006).

Syntéza z pohledu celé molekuly

Proces skládání finální molekuly byl opět nejlépe popsán u molekuly asukamycinu (obr. 7). V tomto procesu hrají důležitou roli dvě amid-syntázy. Tyto enzymy vytvářejí amidové vazby, kterými jsou jednotlivé strukturální jednotky spojeny. Konkrétně se jedná o vazbu mezi *m*-C₇N jednotkou a horním řetězcem a o vazbu kterou je C₅N jednotka připojena k dolnímu polyketidovému řetězci (Rui *et al.* 2010).

V posledních úpravách dochází pomocí oxygenáz k oxidaci *m*-C₇N jednotky na uhlících C4 a C5/C6 (Thiericke *et al.* 1990). Oxidací na C4 vzniká 4-hydroxyprotoasukamycin, u něhož dochází ke vzniku epoxidové skupiny na C5/C6 (Rui *et al.* 2010). Jako výchozí vznikají tedy vždy mynumyciny typu I (s epoxidovou skupinou), u kterých může být epoxid redukován jak enzymaticky, tak neenzymaticky za vzniku manumycinu typu II.



Obr. 7: Schematické znázornění biosyntézy asukamycinu. Primární metabolity znázorněny v obdélnících, červeně startovní jednotka horního řetězce a její prekurzor, zeleně C₅N jednotka a prekurzory, modře *m*-C₇N jednotka a prekurzory (převzato z Rui *et al.* 2010).

2.2.2.4. Úpravy manumycinů

Kromě hledání úplně nových manumycinů lze látky s modifikovanými aktivitami získat také cílenými zásahy do jejich struktury. Jelikož se na jednotlivých aktivitách často podílejí odlišné části molekul těchto látek, můžeme úpravami konkrétních struktur molekuly modifikovat cíleně určitou biologickou aktivitu. Takto „vylepšené“ deriváty by pak mohly být lépe využity v klinické praxi. Existují dva základní přístupy, kterými lze změny docílit.

V prvním případě se obecně jedná o zásahy na genetické úrovni, ať už delecemi či insercemi některých genů, nebo kombinatorní biosyntézou. V obou případech je nutná znalost biosyntetických shluků a jednotlivých drah. Nejčastější deleční úpravou je například vyřazení genů zajišťujících tvorbu C₅N jednotky. Takto vznikají deriváty jinak shodné s výchozí látkou, jen postrádají tento strukturní element (Rui *et al.* 2010).

Dále se pro tvorbu upravených manumycinů využívá tzv. kombinatorní biosyntéza (Khosla a Zawada 1996). Kombinací genetické informace ze dvou producentů příbuzných látek lze docílit biosyntézy hybridní látky, která spojuje jednotlivé strukturní podjednotky obou látek v jedné. Takto byla vytvořena hybridní molekula obsahující horní řetězec asukamycinu a dolní delší tetraenový z kolabomycinu záměnou genů pro CLF (Petříčková *et al.* 2014). Tímto způsobem bychom v budoucnu mohli cíleně produkovat látky s přesně definovanými vlastnostmi.

Vedle genetických úprav lze modifikovaných látek dosáhnout také pomocí kultivace v přítomnosti nepřirozených prekurzorů. Tento způsob se nazývá suplementace prekurzory („precursor feeding“). Základem této metody je to, že některé enzymy mohou zpracovat několik podobných substrátů. Během biosyntézy nám tak zase vznikají produkty částečně pozměněnými strukturami. „Feeding“ byl testován například na záměně startovních molekul pro syntézu horního řetězce u asukamycinu (Pospíšil *et al.* 2011; Hu a Floss 2006). Oba přístupy lze přitom úspěšně kombinovat.

2.2.3. Aktivita

Manumycinové látky vykazují řadu zajímavých biologických aktivit, mezi něž patří zejména slabá antibakteriální, protinádorová a protizánětlivá. Tyto vlastnosti většinou závisí na konkrétní struktuře molekuly. Jejich molekulární podstatou je velmi často inhibice klíčových eukaryotických enzymů.

2.2.3.1. Inhibice Ras-specifické farnesyltransferázy

Farnesyltransferáza je enzym esenciální během posttranslačních úprav Ras proteinu, který katalyzuje přenos farnesyly na C-konec Ras proteinu (Sattler a Tamanoi 1996,

Barbacid 1987). Ras je G-protein, který je centrální buněčnou signální molekulou pro regulaci buněčného dělení. Jeho mutovaná, konstitutivně aktivovaná, forma se stává onkogenní a způsobuje značné procento nádorových onemocnění (Gibbs *et al.* 1994). Farnesylova Ras proteinu je vyžadována pro jeho vazbu do membrány, která je nezbytná pro jeho regulační funkce při stimulaci *ras* genů, vedoucím ke zvýšené proliferaci. Tento proces vede v deregulovaném stavu ke vzniku nádorů.

Při inhibici aktivity tohoto enzymu je pravděpodobně podstatná struktura „horního“ polyketidového řetězce, kdy u méně větvených manumycinů byla oproti manumycinu A inhibiční aktivita snížena (Shu *et al.* 1994). Ačkoliv je farnesylova součástí mnoha buněčných procesů, nebyla během takto cílené protinádorové terapie zaznamenána výrazná vedlejší toxicita. Zásadní je při tom schopnost rozlišit a neovlivňovat velice příbuznou geranylgeranyltransferázu I, která je pro funkci buňky esenciální. Tento způsob inhibice nádorových onemocnění byl kromě rostlin (Qian *et al.* 1996) studován u myši s implantovaným *ras* dependentním fibrosarkomem, u kterých došlo po užití manumycinu A k výraznému ústupu tohoto nádoru (Hara *et al.* 1993).

2.2.3.2. Inhibice IL-1 β konvertujícího enzymu

Dalším enzymem, který je některými manumyciny inhibován, je interleukin-1 β konvertující enzym (ICE). Interleukin-1 bývá příčinou patogenních zánětů a je produkován makrofágy a aktivovanými monocyty. Existuje ve dvou isoformách IL-1 α a IL-1 β , přičemž aktivní forma β vzniká proteolyticky z prekursoru za účasti právě ICE. Některé manumyciny jsou díky schopnosti blokovat tento proces blíže testovány pro jejich potenciální využití v protizánětlivé léčbě (Tanaka *et al.* 1996). Byla testována aktivita degradativních benzochinonových derivátů těchto látek, postrádajících dolní řetězec a nebylo u nich pozorováno signifikantní snížení inhibiční aktivity. Tento fakt naznačuje, že ani v tomto případě pravděpodobně není dolní řetězec nezbytnou strukturou.

2.2.3.3. Ostatní aktivity

Manumycinové látky vykazují dále také antibakteriální aktivitu. Až na několik výjimek však ovlivňují pouze grampozitivní bakterie, přičemž na gramnegativní nemá většina manumycinů žádný vliv (Shu *et al.* 1994; Hayashi *et al.* 1994; Zeeck *et al.* 1987; Grote *et al.* 1988b; Franco *et al.* 1991; Omura *et al.* 1976). Tato aktivita je však charakteristická pouze pro manumyciny Typu I (Kohno *et al.* 1996), aktivní strukturou molekuly bude tedy pravděpodobně epoxidová skupina na centrální jednotce.

Další zajímavou vlastností je schopnost inhibice IKK (I- κ B-Kinase). Ta je zodpovědná za fosforylaci NF- κ B (Necrosis Factor κ B), následně aktivujícího geny pro zánětlivou odpověď

a onkogenezi. IKK je trimer tvořený proteiny IKK α , IKK β a IKK γ a pro svou aktivitu vyžaduje přítomnost cytokinu TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) nebo interleukinu-1. Inhibice procesu manumycinem A spočívá v inaktivaci podjednotky IKK β , potažmo celé IKK (Bernier *et al.* 2006).

V neposlední řadě je v poslední době studován vliv manumycinů na rozvoj Alzheimerovy choroby. Manumycin A inhibuje neutrální sfingomyelinázu, čímž dochází k přerušení dráhy vedoucí ke vzniku amyloid- β -peptidu, který se během choroby hromadí v mozku a je jednou z příčin demence (Constantini *et al.* 2005).

2.2.4. Hledání nových producentů manumycinů

Prvním krokem při získávání nových manumycinových látek je hledání nových kmenů streptomycet, které vlastní genový shluk pro jejich syntézu. Takové kmeny jsou vyhledávány dvěma základními způsoby.

Prvním z nich je klasický genetický screening různých kmenů, získaných v ideálním případě ze vzdálených lokalit. Běžně bývá screening zacílen na přítomnost genů pro polyketidsyntázy. Tento cíl screeningu je ale velice nespecifický pro hledání konkrétních polyketidových látek, v našem případě manumycinů. PKS jsou totiž u těchto organismů značně rozšířené enzymy a každá streptomyceta obsahuje v genomu hned několik PKS genů. Daleko specifičtější je screening zaměřený na přítomnost genů kódujících aminolevulinát syntázu. Tento enzym zajišťuje tvorbu kyseliny aminolevulové, prekurzoru C₅N jednotky, a účastní se i její cyklizace (viz 2.2.2.4). C₅N jednotka se ale u některých manumycinů nemusí vůbec vyskytovat, čímž se nám některé kmeny mohou falešně jevit jako negativní na přítomnost tohoto shluku. Nejspecifičtější zacílením screeningu jsou geny pro syntázu kyseliny 3-amino-5-hydroxybenzoové, jejíž činností vzniká prekurzor *m*-C₇N jednotky (viz 2.2.2.4.), jakožto společné struktury manumycinů.

Druhým přístupem v získávání nových producentů je vyhledávání těchto genových shluků přímo v online databázích v rámci tzv. genome scanningu. Počet osekvenovaných genomů streptomycet se v těchto databázích v poslední době výrazně rozrůstá, a to hlavně díky moderním způsobům sekvenací a díky příznivějším finančním nárokům na jejich realizaci.

2.3. Stimulace sekundárního metabolismu

Úroveň produkce sekundárních metabolitů se může u jednotlivých kmenů velmi výrazně lišit, případně mohou kmeny vlastnit takzvané „kryptické“ genové shluky, u nichž nedochází k expresi (viz 2.2.2.). Předmětem výzkumu je tedy v poslední době často „oživení“

kryptických shluků a zvýšení produkce. Těchto cílů lze dosáhnout modifikacemi na různých úrovních syntézy těchto látek. Častým a nejjednodušším způsobem, jak zvýšit produkci je kultivace bakterií za nestandardních podmínek, jak fyzikálních, tak nutričních. Dále se za tímto cílem využívá klasických genetických manipulací, například v oblastech regulačních genů shluku (Gottelt *et al.* 2010), nebo i v jiných genech, ležících mimo něj. Poslední metodou, jak dosáhnout „oživení“ exprese „kryptických“ shluků je pak jejich kompletní přenesení do heterologních producentů. Kromě těchto „klasických“ metod stojí také za zmínku zapojení postupů syntetické biologie, kde je původní regulace úplně nahrazena uměle zkonstruovaným regulačním systémem, který by byl přesně známý, a snadno manipulovatelný (Bayer *et al.* 2009; Salis *et al.* 2009; Widmaier *et al.* 2009).

2.3.1. Nestandardní kultivace

Bylo prokázáno, že některé druhy stresových stimulů mohou spustit expresi genů pro sekundární metabolismus. Mezi ně patří například teplotní nebo ethanolový šok, které poškozují buněčný obal a způsobují špatné sbalování proteinů (Puglia *et al.* 1995; Servant a Mazodier 2001; Yura a Nakahigashi 1999).

Teplotní a ethanolový šok byl testován například u organismu *Streptomyces venezuelae*, produkujícího polyketidové antibiotikum jadomycin B, který má antibiotické účinky proti Grampozitivním patogenům (například některé stafylokoky) (Jakeman *et al.* 2009). Genový shluk pro syntézu této látky je pod kontrolou dvou hlavních transkripčních faktorů. Geny *jadR1* pro transkripční aktivátor JadR1 a *jadR2*, kódující JadR2, který funguje jako represor genu *jadR1* (Yang *et al.* 2001; Yang *et al.* 1995). Tato represe byla v důsledku šoku přerušena a došlo k výraznému nárůstu v množství produkovaného jadomycinu B (Doull *et al.* 1993; Doull *et al.* 1994). U *Streptomyces coelicolor* bylo zvýšení produkce metylenomycinu pozorováno při limitaci alaninem nebo glukózou (Hayes *et al.* 1997). Obecně však lze říci, že mechanismy, jakými k těmto stimulacím dochází, nejsou příliš podrobně prozkoumány.

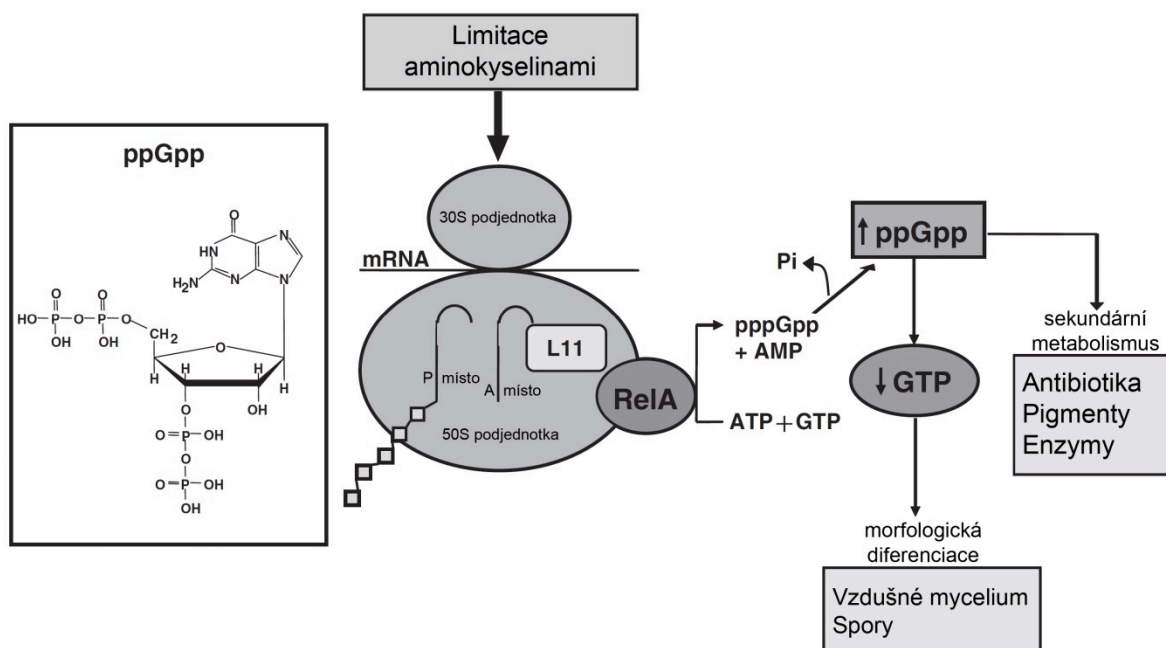
Zajímavým způsobem, jak stimulovat produkci během procesu kultivace je přidání malých koncentrací vzácných prvků, jako jsou například lanthan (La) nebo skandium (Sc). Několikanásobné zvýšení produkce sekundárních metabolitů po přidání Sc se prokázalo hned u několika organismů (*S. coelicolor*, *S. antibioticus*, *S. griseus*) (Kawai *et al.* 2007).

Nárůst produkce sekundárních metabolitů byl pozorován také v případě kultivace v přítomnosti jiného bakteriálního kmene (Onaka *et al.* 2011). Především se jedná o kokultivaci s bakteriemi produkujícími mykolové kyseliny, jako například *Tsukamurella pulmonis* nebo *Corynebacterium glutamicum*. Nutno však podotknout, že přidáním pouze samotné mykolové kyseliny k žádnému nárůstu produkce nedocházelo (Onaka *et al.* 2011).

2.3.2. Genetické modifikace

Z hlediska regulačních mechanismů sekundárního metabolismu je nutné si uvědomit, že mnoho z nich funguje jako odpověď na stav primárního metabolismu (Wang *et al.* 2013) a fyziologický stav buňky, například na přítomnost N-acetylglukosaminu po autolýze mycelia (Rigali *et al.* 2008). Sekundární metabolismus je také částečně koregulován s buněčnou diferenciací (Hempel *et al.* 2012). Modifikace se tedy vůbec nemusí zaměřovat pouze přímo na regulační geny sekundárního metabolismu. Většina těchto genů je navíc sdílena hned mezi několika metabolickými drahami.

Výzkumy prováděné na *Streptomyces lividans* poukázaly na fakt, že buněčný alarmon ppGpp (obr. 8) může svou vazbou na RNA polymerázu (RNAP) (Artsimovitch *et al.* 2004) způsobit zvýšení produkce antibiotik (Hesketh *et al.* 2001; Ochi 2007). Následně byla vytvořena mutovaná RNAP rezistentní k rifampicinu, která napodobovala RNAP s navázaným ppGpp aktivující expresi biosyntetických sluků (Lai *et al.* 2002; Xu *et al.* 2002).



Obr. 8: Schéma bakteriální stringentní odpovědi vedoucí k diferenciaci a struktura molekuly ppGpp (převzato z Ochi 2007).

Tyto výsledky vedly ke vzniku metody označované jako ribozomové inženýrství, jehož cílem je změna v genové expresi sekundárních metabolitů díky zásahům do transkripčních a translačních procesů. K tomu jsou využívány například úpravy různých ribozomálních proteinů (*rpsL* mutovaný protein S12), translačních faktorů nebo již zmiňované RNA polymerázy (*rpoB* mutantní β -podjednotka RNAP) (Ochi 2007; Ochi a Hosaka 2013). Doposud bylo popsáno více než 60 takovýchto mutací, majících za následek zvýšení úrovně

sekundárního metabolismu nejen u aktinomycet. V mnoha případech se jednalo o vznik různých typů rezistencí.

Kromě mutací v transkripčním a translačním aparátu existuje také řada jiných stimulačních mutací. Za zmínku stojí například gen *dasR*, kódující transkripční represor DasR. Ten se mimo jiné podílí na buněčné odpovědi na zvyšující se koncentraci N-acetylglukosaminu (GlcNAc). Ukázalo se, že i tato mutace má za následek několikanásobné zvýšení produkce antibiotik (Rigali *et al.* 2008).

2.3.3. Heterologní exprese

Aktivace produkce sekundárních metabolitů přenosem genů do heterologního hostitele je velice účinným a univerzálním nástrojem pro získávání nových typů přírodních látek. Vedle genetických modifikací se jedná o druhou techniku používanou při takzvaném „genome miningu“, což je souhrné označení procesu vedoucího ke zpřístupnění a charakterizaci nových produktů tichých genových shluků (Challis 2008; Nett *et al.* 2009). Heterologní exprese je kromě toho využívána také při produkci nových derivátů známých látek, a to kombinací částí různých shluků, nebo přenosem shluků mutovaných (Gomez-Escribano a Bibb 2012).

Existuje několik různých hostitelských (produkčních) kmenů, používaných pro tento způsob exprese. Velká část z nich byla genetickými modifikacemi odvozena z nejlépe prostudovaného *S. coelicolor*, u kterého je známo značné množství metod pro genetické manipulace (Gust 2004; Kieser 2000). Jednotlivé kmeny se liší především tím, do jaké míry byl jejich genom modifikován pro potřeby heterologní exprese. Nejčastěji používané produkční kmeny odvozené ze *S. coelicolor* jsou CH999 (McDaniel *et al.* 1993), M512 (Floriano a Bibb 1996), M1146 a z něho dále odvozené M1152 a M1154 (Gomez-Escribano a Bibb 2011). Obecně je u těchto kmenů potlačena exprese vlastních sekundárních metabolitů za současné maximalizace exprese metabolitů vložených. V posledních dvou případech (M1152 a M1154) se jedná o kmeny, obsahující takzvané „Ochi-type“ mutace, jak jsou nazývány mutace prováděné za účelem zvýšení produkce na úrovni složek transkripčního a translačního aparátu (Ochi a Hosaka 2013). U kmene M1152 se jedná o bodovou mutaci v *rpoB* a u M1154 o bodové mutace v genech *rpoB* a *rpsL* (Ochi a Hosaka 2013).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Média pro kultivaci

Tekutá média

GYM médium

- 4 g glukóza
 - 4 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
 - 10 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)
 - 1 g NZ Amin A (NZ Amine[®], Type A, Wako)
 - 2 g NaCl
 - 3 ml OB soli
- doplnit do celkového objemu 1000 ml dH₂O
 - pH 7.3 (upravit 2M vodnými roztoky HCl nebo NaOH)
 - sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

OB soli

- 0,166 g CuSO₄•5H₂O
 - 0,25 g FeSO₄•7H₂O
 - 0,12 g MnSO₄•5H₂O
 - 0,5 g CaCl₂•2H₂O
 - 0,3 g ZnSO₄•7H₂O
- doplnit do 100 ml dH₂O, skladovat ve tmavé lahvi

LB médium

- 10 g trypton (Tryptone, Oxoid)
 - 5 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
 - 5 g* NaCl
- doplnit do 1000 ml dH₂O
 - pH 7.2-7.4* (upravit 2M vodnými roztoky HCl nebo NaOH)
 - sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

- * LB médium používané při Gigapack III Gold metodě obsahuje 10 g NaCl a jeho pH je upraveno na 7.0

YEME médium

- 3 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
- 5 g pepton (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)
- 3 g sladový extrakt (Malt Extract, Oxoid)
- 10 g glukóza
- 340 g sacharóza
- doplnit do 1000 ml dH₂O
- pH 7.2 (upravit 2M vodnými roztoky HCl nebo NaOH)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

po sterilizaci přidat sterilní (na 100 ml)

- 0,2 ml 2,5M MgCl₂
- 2,5 ml 20% glycin (w/v) – pouze pro přípravu protoplastů

SOC médium

- 4 g trypton (Tryptone, Oxoid)
- 1 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
- 116 mg NaCl
- 38 mg KCl
- doplnit do 200 ml dH₂O
- pH 6.9-7.1 (upravit 2M vodnými roztoky HCl nebo NaOH)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

po sterilizaci přidat sterilní (na 200 ml)

- 2 ml Mg²⁺ roztok (1M MgCl₂•6H₂O a 1M MgSO₄•7H₂O)
- 2 ml 2M D-glukóza

SMM médium

- smíchat následující sterilní roztoky (sterilizovat v autoklávu – 121 °C, 23 minut, 101,5 kPa, kromě stopových prvků, které jsou sterilizovány filtrací)
- 81,9 ml 6,1% PEG 6000 (w/v v dH₂O)
- 2,5 ml MgSO₄•7H₂O (2,4 g/100 ml dH₂O)
- 10 ml 0,25M TES pufr (pH 7,2)
- 1 ml roztok 50mM NaH₂PO₄ a 50mM K₂HPO₄

2 ml 50% glukóza (w/v)
0,1 ml stopové prvky B
1 ml 20% kasein (w/v)
2,5 ml 20% glycin (w/v)

stopové prvky B

0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1 g NaCl

- doplnit do 1000 ml dH_2O , skladovat 2-4 týdny ve 4 °C

SSM médium

10 g glukóza
2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2 g NaCl
0,5 g KH_2PO_4
1 g K_2HPO_4
0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5 g CaCO_3
2 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)

- doplnit do 1000 ml dH_2O

- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

SSY médium

20 g sójová mouka
10 g sacharóza
5 g škrobová mouka
2 g kvasnicový extrakt (Yeast Extract, Oxoid)
2 g pepton (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)
2 g NaCl
1 g CaCO_3
0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,5 g KH_2PO_4

- doplnit do 1000 ml dH_2O

- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

SN médium

- 5 g pepton (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)
- 1 g kaseinový hydrolyzát
- 0,25 g KH_2PO_4
- 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 10 ml roztok solí pro SN
- 2 g CaCO_3
- 2 g NaCl
- 30 g glycerol
- doplnit do 1000 ml dH_2O
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

roztok solí pro SN (100x konc.)

- 0,5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

STX médium

- 10 g melasa
- 5 g CaCO_3
- 2 g NaCl
- 20 g glukóza
- 1 l sójový vývar (40 g sójové mouky povařené 20 minut v dH_2O)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

Agarová média

R5 médium (R2YE)

- 103 g sacharóza
- 0,25 g K_2SO_4
- 10,12 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 10 g glukóza
- 0,1 g kaseinový hydrolyzát
- 2 ml stopové prvky A
- 5 g kvasnicový extrakt

5,73 g TES
22 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
- doplnit do 1000 ml dH₂O
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

po sterilizaci přidat sterilní roztoky (na 100 ml)

1 ml 0,5% KH₂PO₄ (w/v)
0,4 ml 5M CaCl₂
1,5 ml 20% L-prolin (w/v)
0,7 ml 1M NaOH

stopové prvky A

40 mg ZnCl₂
200 mg FeCl₃•6H₂O
10 mg CuCl₂•2H₂O
10 mg MnCl₂•4H₂O
10 mg Na₂B₄O₇•10H₂O
10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O
- doplnit do 1000 ml dH₂O, skladovat ve tmavé lahvi

GYM agarové médium

1 l GYM médium
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

LA médium (LB agarové médium)

1 l LB médium
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

MS médium (Mannitol soya flour – někdy SFM)

20 g mannitol
20 g sójová mouka
20 g agar (Agar Bacteriological, Oxoid)
- doplnit do 1000 ml vodou z kohoutku
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

3.1.2. Roztoky a pufrы

Nal roztok

- Rozpustíme 0,45 kg NaI v 250 ml dH₂O (při pokojové teplotě nasycený roztok).
Pufrujeme 20mM Trisem (pH 7.5), přefiltrujeme a přidáme 1 g Na₂SO₃.
- skladujeme ve tmavé lahvi v lednici při 4 °C.

Skelné mléko (Glass milk)

- Resuspendujeme 400 g skelného prachu v 800 ml dH₂O, mícháme 60 minut a necháme 90 minut stát. Zcentrifugujeme (6000 rpm, 10 minut – centrifuga Sorvall RC5C, rotor GS3) a sediment resuspendujeme v 200-300 ml dH₂O. Přidáme HNO₃ do 50% koncentrace, zahřejeme téměř k varu a ochladíme. Znovu zcentrifugujeme a sediment 4-6x promyjeme dH₂O (upravíme na pH 7.0). Zásobní 50% suspenzi v dH₂O uchováme při -70 °C, pro práci při 4 °C)

NEW WASH

100mM NaCl
1mM EDTA
50% Etanol
10mM Tris (pH 7.5)

TAE pufr zásobní (50x koncentrovaný)

2M Tris
1M kyselina octová
50mM EDTA (pH 8.0)
- v dH₂O
- používán 1x koncentrovaný

Nanášecí pufr pro agarózovou elektroforézu (6x konc.)

0,25% bromfenolová modř (w/v)
30% glycerol (w/v)
5x TAE pufr
- v dH₂O

SM pufr

5,8 g NaCl

- 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 50 ml 1M Tris-HCl (pH 7.5)
- 4 ml 2% želatina (w/v)
- doplnit do 1000 ml dH_2O
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

STET pufr

- 8 g sacharóza
- 5 g triton X-100
- 10 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)
- 5 ml 1M Tris-HCl (pH 8.0)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

TNE pufr

- 1M NaCl
- 20mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 5mM EDTA (pH 8.0)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

TNE+40% sacharóza

- TNE pufr se 40% sacharózou (w/v)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

10mM MgSO_4

- 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- doplnit do 200 ml dH_2O
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

TE+34% sacharóza

- 34% sacharóza v TE (w/v)
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

Roztok pronázy

- 10 mg pronázy rozpustíme v 1 ml dH_2O , inkubujeme 10 minut ve 30 °C
- uchováme při -20 °C

30% PEG 6000

30% PEG 6000 v dH₂O

- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

Fenol pro izolaci chromozomální DNA streptomycet

100 g fenol

0,1 g 8-hydroxychinolin

15 ml TE pufr obsahující 0,1M NaCl

- uchovat ve tmavé lahvi při +4 °C

Neutrální Fenol-Chloroform

- Kyselý fenol-chloroform vytřepáváme 10 minut s polovičním objemem 1M Tris-HCl (pH 8.8). Po rozdělení odstraníme horní vodnou fázi a zbytek vytřepeme 10 minut s polovičním objemem 0,1M Tris-HCl (pH 8.0). Po rozdělení odstraníme horní fázi a zbylý neutrální fenol-chloroform uchováme v tmavé lahvi při 4 °C.

Kyselý Fenol-Chloroform

5 g fenol

5 ml chloroform

1 ml dH₂O

5 mg 8-hydroxychinolin

NaOH/SDS

3 ml 5M NaOH

10 ml 10% SDS (w/v)

- doplnit dH₂O do 50 ml

TESLR pufr

25mM Tris-HCl (pH 8.0)

25mM EDTA (pH 8.0)

0,3M sacharóza

- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

před použitím přidat

2 mg/ml lysozym

5 µg/ml RNáza A (převařená)

TE pufr

10mM Tris-HCl (pH 8.0)

1mM EDTA (pH 8.0)

- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

Denaturační roztok

0,5M NaOH

1,5M NaCl

- v dH₂O

Neutralizační roztok

1,5M NaCl

0,5M Tris-HCl (pH 7.4)

- v dH₂O

Hybridizační roztok

20 ml 20x SSC

0,5 g blokovací činidlo

0,1 g N-lauroylsarkosin

0,2 ml 10% SDS (w/v)

- doplnit do 100 ml dH₂O

- pro rozpuštění míchat asi 1 h při 50-70 °C, roztok zůstane kalný

1 promývací roztok na hybridizaci

20 ml 20x SSC - sterilní

2 ml 10% SDS (w/v) - sterilní

- doplnit do 200 ml dH₂O

2 promývací roztok na hybridizaci

1 ml 20x SSC - sterilní

2 ml 10% SDS (w/v) – sterilní

- doplnit do 200 ml dH₂O

1 pufr na imunologickou detekci

- 12,1 g Tris
- 8,766 g NaCl
- doplnit do 1000 ml dH₂O
- upravit na pH 7.5

2 pufr na imunologickou detekci

- 0,5 g blokovací činidlo
- rozpustit ve 100 ml pufru 1 (Tris/NaCl, pH 7.5)
- pro rozpuštění míchat 1 h při 50-70 °C, roztok zůstane kalný

3 pufr na imunologickou detekci

- 2,42 g Tris
- 1,17 g NaCl
- 2,035 g MgCl₂
- doplnit do 200 ml dH₂O
- upravit na pH 9.5

Barvicí roztok na imunologickou detekci

- 45 µl NBT roztoku
- 35 µl X-fosfátového roztoku
- přidat do 10 ml pufru 3 (Tris/NaCl/MgCl₂, pH 9.5)
- před použitím připravit vždy čerstvé

NBT roztok (nitroblue-tetrazolium)

- zásobní roztok NBT v dimethylformamidu, koncentrace 75 mg/ml (70% v/v)
- uchovat v mrazáku při -20 °C

X-fosfátový roztok

- zásobní roztok toluidinové soli 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu v dimethylformamidu, koncentrace 50 mg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

1 roztok pro izolaci kosmidové DNA

- 50mM Tris/HCl (pH 8.0)
- 10mM EDTA

2 roztok pro izolaci kosmidové DNA

200mM NaOH
1% SDS (w/v)

3 roztok pro izolaci kosmidové DNA

3M octan draselný (pH 5.5)

L (lytický) pufr na přípravu protoplastů

100 ml 10,3% sacharóza se stopovými prvky A^{a)}
10 ml 5,73% TES pufr, pH 7.2 (w/v)
1 ml 2,5% K₂SO₄(w/v)
1 ml 0,5% KH₂PO₄(w/v)
0,1 ml 2,5M MgCl₂•6H₂O
1 ml 0,25M CaCl₂

- ^{a)} před sterilizací přidáme 0,2 ml stopových prvků A (viz. příprava R5 média) do 100 ml 10,3% glukózy (w/v)
- do směsi výše uvedených sterilních roztoků přidáme před použitím lysozym v koncentraci 1 mg/ml

P (protoplastový) pufr na přípravu protoplastů

20 ml základ P pufru
0,25 ml 0,5% KH₂PO₄ (w/v)
2,5 ml 3,68% CaCl₂•2H₂O (w/v)
2,5 ml 5,73% TES pufr, pH 7.2 (w/v)

- před použitím smícháme výše uvedené sterilní roztoky sterilizované v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

základ P pufru

103 g sacharóza
0,25 g K₂SO₄
2,02 g MgCl₂•6H₂O
2 ml stopové prvky A (viz. příprava R5 média)

- rozpustit v dH₂O do objemu 800 ml
- sterilizovat v autoklávu (121 °C, 23 minut, 101,5 kPa)

T (transformační) pufr na transformaci protoplastů

25 ml	10,3% sacharóza se stopovými prvky A ^{a)}
75 ml	dH ₂ O se stopovými prvky A ^{a)}
1 ml	2,5% K ₂ SO ₄

Na každých 9,3 ml směsi výše uvedených sterilních roztoků přidáme

0,2 ml	5M CaCl ₂
0,5 ml	Tris-maleinový pufr ^{b)}

- výsledný roztok smícháme v poměru 3:1 (v/w) se sterilním PEG 1000
- ^{a)} před sterilizací přidáme 0,2 ml stopových prvků A (viz. příprava R5 média) do 100 ml dH₂O nebo 10,3% glukózy (w/v)
- ^{b)} 1M Tris, upravit na pH 8.0 přidáním kyseliny maleinové

IPTG (izopropyl-β-D-1-thiogalactopyranozid)

- 0,2M zásobní roztok v dH₂O
- uchovat v mrazáku při -20 °C

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

- 4% zásobní roztok v dimethylformamidu
- uchovat v mrazáku při -20 °C

2mM dNTPs

- | | |
|-----|------|
| 2mM | dATP |
| 2mM | dTTP |
| 2mM | dGTP |
| 2mM | dCTP |
- ve sterilní dH₂O
 - uchovat v mrazáku při -20 °C

Antibiotika

Thiostrepton (Thio)

- koncentrace zásobního roztoku – 60 mg/ml (v DMSO)
- používaná výsledná koncentrace – 30 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Apramycin (Apr)

- koncentrace zásobního roztoku – 100 mg/ml (v dH₂O)
- používaná výsledná koncentrace – 50 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Ampicilin (Amp)

- koncentrace zásobního roztoku – 100 mg/ml (v dH₂O)
- používaná výsledná koncentrace – 100 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Kanamycin (Kan)

- koncentrace zásobního roztoku – 100 mg/ml (v dH₂O)
- používaná výsledná koncentrace – 25 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Chloramfenikol (Cml)

- koncentrace zásobního roztoku – 100 mg/ml (v dH₂O)
- používaná výsledná koncentrace – 25 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Kyselina nalidixová

- koncentrace zásobního roztoku – 25 mg/ml (v dH₂O)
- používaná výsledná koncentrace – 25 µg/ml
- uchovat v mrazáku při -20 °C

Pufry pro enzymy

10x T4 DNA ligační pufr (10x T4 DNA Ligase buffer, Thermo Scientific)

složení:

400mM Tris-HCl (pH 7.8 při 25 °C), 100mM MgCl₂, 100mM DDT, 5mM ATP

10x Klenow pufr (10x Klenow buffer, Thermo Scientific)

složení:

500mM Tris-HCl (pH 8.0 při 25 °C), 50mM MgCl₂, 10mM DDT

10x Tango pufr (Thermo Scientific)

složení:

33mM Tris-acetát, 66mM octan draselný, 10mM octan hořečnatý, 0,1 mg/ml BSA

10x B pufr (Thermo Scientific)

složení:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA

10x G pufr (Thermo Scientific)

složení:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

10x O pufr (Thermo Scientific)

složení:

50mM Tris-HCl (pH 7.5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

10x R pufr (Thermo Scientific)

složení:

10mM Tris-HCl (pH 7.5 při 37 °C), 10mM MgCl₂, 100mM KCl, 0,1 mg/ml BSA

3.1.3. Komerční kity:

Kit pro přípravu značené DNA sondy (DIG DNA Labeling kit, Roche)

dNTP Labeling Mixture – směs dNTP (1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0,65mM dTTP, 0,35mM Dig-dUTP), 10x konc.

Hexanucleotide Mix – směs náhodných hexanukleotidů, 10x konc.

Klenow Enzyme – 2 U/μl Klenow enzym

- uchovat v mrazáku při -20 °C

Kit pro GC-rich PCR (GC-RICH PCR System, Roche)

GC-RICH Enzyme Mix (in storage buffer)

5x GC-RICH Reaction Buffer – 7,5mM MgCl₂, DMSO

5M GC-RICH Resolution Solution

- uchovat v mrazáku při -20 °C

Kit na izolaci chromozomální DNA streptomycet (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega)

Cell Lysis Solution

Nuclei Lysis Solution

Protein Precipitation Solution

RNase Solution – 4 mg/ml roztok RNázy A v DNA Rehydration Solution

DNA Rehydration Solution – 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA (pH 8.0)

- kit uchován v pokojové teplotě

Kit na izolaci plasmidové DNA *E. coli* (JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed)

G1 (Cell Suspension) – 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNáza A

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

G3 (Neutralization/Binding) – octan, guanidin hydrochlorid

G4 (Wash) – etanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl

GX (Wash) – etanol, EDTA, octan, guanidin hydrochlorid

- roztok G1 nutno uchovat ve 4 °C, všechny ostatní v pokojové teplotě

Kit pro balení kosmidů do fágových partikulí a infekci do *E. coli* (Gigapack III Gold, Agilent Technologies)

Gigapack III Gold packaging extracts – balící extrakty pro maximální efektivitu balení

Dodávaný kmen VCS257

Kit FastStart PCR Master (Roche)

Ready-to-use master mix: obsahuje Taq DNA polymerázu, MgCl₂, 2x reakční pufr a 0,4mM dNTP

3.1.4. Enzymy

RNáza A

Roztok RNázy A 1 mg/ml ve sterilní dH₂O

- 10 minut povařit při 100 °C a uchovat v mrazáku při -20 °C

DNA ligáza

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

Klenow fragment

Klenow Fragment (10 U/μl, Thermo Scientific)

T4 PNK

T4 polynukleotid kináza (10 U/μl, New England Biolabs)

SAP

Krevetová alkalická fosfatáza (10 U/μl, Thermo Scientific)

Restrikční endonukleázy (Thermo Scientific, NEB)

HindIII, Sau3A, KpnI, XhoI, BamHI, HpaI, MluI, EcoRV, SphI, SacI, XbaI, NotI, BglII

Protilátky

AP-konjugát

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

3.1.5. Bakteriální kmeny

Escherichia coli SURE

- Kmen používaný pro klonování DNA, postrádající komponenty katalyzující přestavby DNA (Stop Unwanted Rearrangement Events)
- Genotyp: *endA1, glnV44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5 uvrC, e14-, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10]*
- Kmen poskytla Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Escherichia coli GM2929

- Kmen deficientní v metylaci DNA používaný při klonování plasmidů pro transformaci streptomycet

- Genotyp: *araC14, leuB6(Am), fhuA13, lacY1, tsx-78, glnX44(AS), galK2(Oc), galT22, LAM-, mcrA0, dcm-6, hisG4(Oc), rfbC1, rpsL136(strR), dam-13::Tn9, xylA5, mtl-1, recF143, thiE1, mcrB9999, hsdR2*
- Kmen poskytla Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Escherichia coli ET12567

- Kmen deficientní v metylaci DNA používaný pro konjugační přenos DNA do streptomycet dle protokolu REDIRECT
- Genotyp: *dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, zjj-202::Tn10, recF143, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, tonA31, rpsL136, hisG4, tsx-78, mtl-1, glnV44*
- Kmen poskytl Dr. Bertolt Gust (Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Velká Británie)

Escherichia coli VCS257

- Kmen využíváný k transdukci kosmidů fágovými partikulami, vytvořenými metodou Gigapack III Gold, a jejich klonování.
- Genotyp: *supE44, supF58, hsdS3(r_B⁻m_B⁻), dapD8, lacY1, glnV44, Δ(gal-uvrB)47, tyrT58, gyrA29, tonA53, Δ(thyA57)*
- Kmen obsahuje *supF* mutaci pro zvýšení efektivity výsevu a vyšší stabilitu rekombinantních klonů
- Kmen poskytl Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

Saccharothrix espanaensis DSM44229

- Divoký kmen *Saccharothrix espanaensis*, u kterého byla sekvenací genomu zjištěna přítomnost kryptického biosyntetického genového shluku pro syntézu manumycinových látek
- Sbírkový kmen z německé sbírky mikroorganismů DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Streptomyces coelicolor M512, M1146, M1154

- Speciálně upravené kmeny se zvýšenou expresí genů pro cizorodý sekundární metabolismus (viz. 2.3.3.)
- Genotyp M512: *redD, actII-ORF4, SCP1, SCP2*
- Genotyp M1146: *Δact, Δred, Δcpk, Δcda*
- Genotyp M1154: *Δact, Δred, Δcpk, Δcda, rpoB[C1298T], rpsL[A262G]*
- Kmeny pochází z John Innes Centre, Norwich Research Park, Velká Británie

Streptomyces lividans K4-114

- Speciálně upravený kmen se zvýšenou expresí genů pro cizorodý sekundární metabolismus (viz. 2.3.3.)
- Genotyp: *pro-2*, *str-6*, *SLP2⁺*, *SLP3⁺*, *act::ermE*
- Kmen pochází z John Innes Centre, Norwich Research Park, Velká Británie

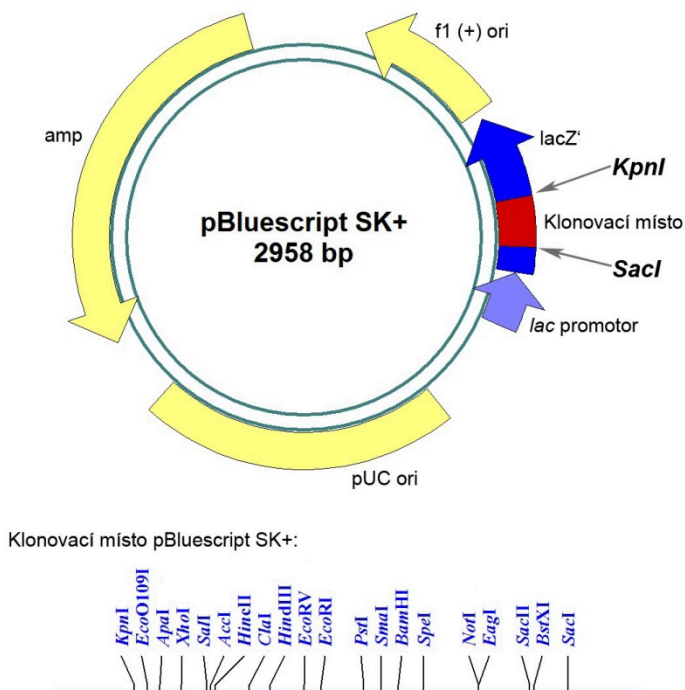
Streptomyces lividans TK24

- Kmen k přípravě protoplastů pro transformaci
- Genotyp: *str6⁻*, *SLP2⁻*, *SLP3⁻*
- Kmen poskytla Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)

3.1.6. Vektory

pBluescript SK+

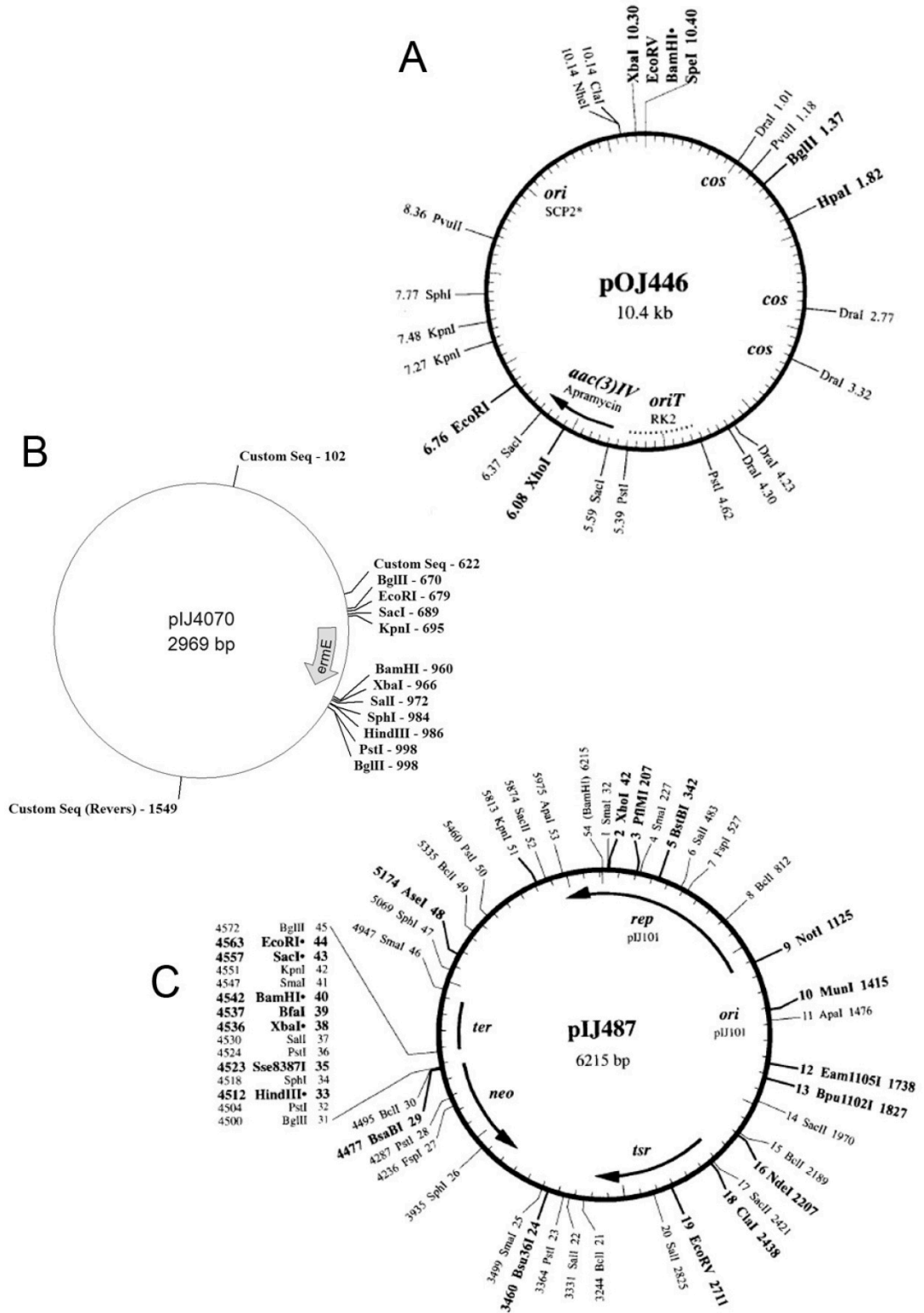
- Klonovací vektor obsahující geny pro rezistenci k ampicilinu, f1 replikační počátek a klonovací místo (MCS) (obr. 9). MCS se nachází uvnitř *lacZ'* genu udělujícího modré zabarvení kolonií v případě prázdného MCS. V přítomnosti X-gal umožňuje tento vektor modro/bílou selekci na nepřítomnost/přítomnost vkládaného fragmentu
- Vektor poskytla Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)



Obr. 9: Schéma vektoru *pBluescript SK+* (nahore) a mapa jeho klonovacího místa (dole), *amp* – gen pro rezistenci k ampicilinu, *lacZ'* – gen pro α -fragment β -galaktozidázy

pOJ446, pIJ4070, pIJ487 (Kieser *et al.* 2000)

- Kosmidový vektor pOJ446 (obr. 10A) poskytl Ing. Miroslav Petříček, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)
- Vektory pIJ4070 (obr. 10B) a pIJ487 (obr. 10C) poskytla Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i)



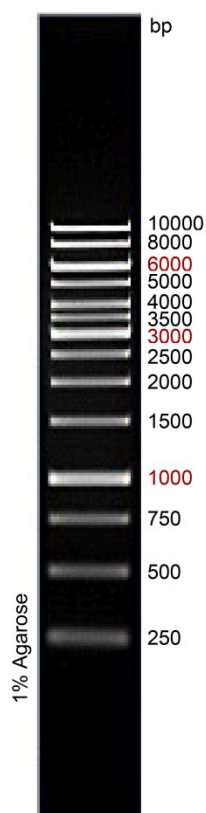
Obr. 10: Popis na další straně

Obr. 10: Restrikční mapy používaných vektorů. **A:** pOJ446 odvozený od plasmidu pKC505. Místa PvuII a HpaI umožňují linearizaci pro kosmidové klonování. BamHI místo je použito pro inzerci DNA fragmentu (Bierman et al. 1992), aac(3)IV – gen pro rezistenci k apramycinu. **B:** pIJ4070 obsahující konstitutivní promotor espR*. **C:** pIJ487 používaný pro transformaci streptomycet, rep – gen pro plasmidový replikační protein, tsr – gen pro rezistenci k thiostreptonu, neo – gen pro rezistenci k neomycinu.

3.1.7. Oligonukleotidy a DNA standardy

Standardy

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10 000 bp (Thermo Scientific, Obr. 11)



0,5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Obr. 11: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

Oligonukleotidy

HEMA1

- sekvence - 1:1 směs oligonukleotidů HEMA1a a HEMA1b:

HEMA1a: 5'- GTS TGG TGY TCS AAC GAC TAC CT -3' (S = G nebo C;
Y = C nebo T)

HEMA1b: 5'- GTS TGG TGY RGS AAC GAC TAC CT -3' (S = G nebo C;
Y = C nebo T; R = A nebo G)

- specifita: gen pro ALAS

HEMA3

- sekvence: 5'- GTA CAT SCC SAC SGC GTG SAC CTC GTC -3' (S = G nebo C)
- specifita: gen pro ALAS

AHBAS F

- sekvence: 5'- AAG ATC CCS YTS GAG ATC GTS GTS GC -3' (S = G nebo C;
Y = C nebo T)
- specifita: gen pro syntázu 3,4-AHBA

AHBAS R

- sekvence: 5'- SGG CAT GTA CGG SAR SGG GTG SGT CTC -3' (S = G nebo C;
R = A nebo G)
- specifita: gen pro syntázu 3,4-AHBA

ESPR1 F

- sekvence: 5'- AGG ATC CAG GGT CGA CCG ACG TGC T -3'
- specifita: gen *espR1*
- obsahuje restriční místo pro *Bam*HI
- T_m = 60 °C

ESPR1 R

- sekvence: 5'- CGC ATG CCA TTT CCC CAG CTT ACC C -3'
- specifita: gen *espR1*
- obsahuje restriční místo pro *Sph*I
- T_m = 64 °C

ESPR2 F

- sekvence: 5'- CGC ATG CCG GGT CTG CGA CAT CTG -3'
- specifita: gen *espR2*
- obsahuje restrikční místo pro *SphI*
- Tm = 60 °C

ESPR2 R

- sekvence: 5'- CAA GCT TAA TCG CGT TCG GGC TCC T -3'
- specifita: gen *espR2*
- obsahuje restrikční místo pro *HindIII*
- Tm = 58 °C

3.2. Metody

3.2.1. Izolace a zpracování DNA

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* (Sambrook a Russell 2001)

- 1) Přes noc kultivujeme buňky v 1,5 ml LB média obsahujícího 180 µg ampicilinu ve třepačce při 37 °C
- 2) zcentrifugujeme v eppendorfkách při 13 000 rpm, 30 s, +4 °C. Slijeme supernatant
- 3) pelet resuspendujeme ve 300 µl STET pufru, do kterého jsme přidali 200 µg lysozymu
- 4) 10 minut inkubujeme na ledu
- 5) uzavřené zkumavky inkubujeme 2 minuty v bločku při 100 °C
- 6) zcentrifugujeme při 13 000 rpm, 25 minut, +4 °C
- 7) do nové zkumavky odebereme vrchních 200 µl, ke kterým přidáme 200 µl isopropanolu (+4 °C)
- 8) důkladně promícháme a srážíme 30 minut při -20 °C
- 9) zcentrifugujeme při 13 000 rpm, 10 minut, +4 °C
- 10) dvakrát promyjeme 75% EtOH (-20 °C), mezi promýváním zcentrifugujeme jako v předešlém kroku
- 11) pelet vysušíme a rozpustíme v 50 µl TE pufru obsahujícím 1 µl RNázy A (1 µg/µl)

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed

- buňky kultivujeme maximálně v 5 ml LB média 24 h při 37 °C

- 1) kulturu zcentrifugujeme, odebereme zbytky média a pelet důkladně resuspendujeme ve 250 µl roztoku G1
- 2) přidáme 250 µl roztoku G2 a převrácením zkumavky opatrně promícháme
- 3) inkubujeme 5 minut v pokojové teplotě
- 4) přidáme 350 µl roztoku G3, opatrně promícháme, dokud není suspenze homogenní (nevortexujeme!) a centrifugujeme při pokojové teplotě, 13 000 rpm, 10 minut
- 5) umístíme kolonku (JETQUICK spin column) do přiložené 2 ml sběrné zkumavky a přeneseme supernatant na kolonku. Zcentrifugujeme 1 min při 13 000 rpm. Vylijeme tekutinu a kolonku vrátíme do sběrné zkumavky

- 6) (volitelný – promytí v případě bakterií bohatých na nukleázy): nanese se na kolonku 500 µl roztoku GX a necháme 1 minutu stát. Zcentrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Vylijeme tekutinu a vrátíme kolonku
- 7) přidáme 500 µl reconstituted roztoku G4 a centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm. Vylijeme tekutinu, vrátíme kolonku a stejným způsobem ještě jednou zcentrifugujeme
- 8) kolonku vložíme do 1,5 ml eppendorfky, na střed DNA-vázacího nosiče nanese se 50 µl TE předehřátého na 65-70 °C a necháme minutu stát. Centrifugujeme 2 minuty při 13 000 rpm
- 9) odebereme kolonku a zkumavku s eluovanou DNA skladujeme při +4 °C

Izolace kosmidové DNA z *E. coli* (REDIRECT)

- 2) transformanty kultivujeme v 5 ml LB média s antibiotiky přes noc ve 37 °C
- 3) 1 ml kultury zcentrifugujeme při 13 000 rpm
- 4) pelet resuspendujeme vortexováním ve 100 µl roztoku 1
- 5) ihned přidáme 200 µl roztoku 2 a převrácením zkumavky důkladně promícháme
- 6) hned poté přidáme 150 µl roztoku 3 a znovu promícháme převrácením zkumavky
- 7) zcentrifugujeme při 13 000 rpm, 5 minut při pokojové teplotě
- 8) k supernatantu přidáme 400 µl neutrálního fenol-chloroformu, vortexujeme 2 minuty a zcentrifugujeme jako v předchozím kroku
- 9) horní fázi přeneseme do nové zkumavky a přidáme 600 µl isopropanolu. Ponecháme na ledu 10 minut
- 10) zcentrifugujeme stejně jako v kroku 6 a pelet promyjeme 200 µl 75% EtOH
- 11) znovu zcentrifugujeme jako v kroku 6, pelet necháme vysušit a rozpustíme v 50 µl TE pufru
 - kosmidovou DNA skladujeme v -20 °C.

Izolace plasmidu ze streptomycet alkalickou lyzí a fenolovou precipitací

- 1) mycelium kultivujeme v 8 ml YEME média s antibiotiky při 28 °C po dobu přibližně 4-7 dní (u různých kmenů se doba může značně lišit)
- 2) 5ml narostlé kultury zcentrifugujeme a pelet resuspendujeme v 500 µl TESLR
- 3) inkubujeme 30 minut při 37 °C
- 4) přidáme 250 µl NaOH/SDS a ihned vortexujeme. Inkubujeme 15 minut při 70 °C
- 5) ochladíme a přidáme 80 µl kyselého fenol-chloroformu, důkladně rozvortexujeme a centrifugujeme při 13 000 rpm, 10 minut v pokojové teplotě

- 6) supernatant přendáme do nové zkumavky s 50 μ l 3M nepufrovaného NaAc a 450 μ l isopropanolu a promícháme
- 7) centrifugujeme jako v kroku 5 a odstraníme veškerou tekutinu
- 8) pelet rozpustíme v 70 μ l TE
- 9) přidáme 14 μ l 3M nepufrovaného NaAc a 14 μ l kyselého fenol-chloroformu. Rozvortexujeme, ochladíme v ledu a centrifugujeme při 13 000 rpm, 5 minut, +4 °C
- 10) horní fázi přendáme do nové zkumavky s 56 μ l 3M nepufrovaného NaAc a 630 μ l TE. Přidáme 460 μ l isopropanolu, promícháme, centrifugujeme 5 minut a odebereme veškerou tekutinu
- 11) pelet promyjeme 1,2 ml 75% EtOH, zcentrifugujeme 5 minut a odstraníme veškerou tekutinu
- 12) pelet rozpustíme ve 150 μ l TE, přidáme 150 μ l 5M NH₄Ac a promícháme. Centrifugujeme 10 minut
- 13) v nové zkumavce přidáme k supernatantu 660 μ l EtOH, promícháme a centrifugujeme 10 minut. Odstraníme veškerou tekutinu
- 14) promyjeme 75% EtOH, zcentrifugujeme, pelet vysušíme a rozpustíme v 50 μ l TE

Izolace genomové DNA streptomycet

- množství jsou počítána na 1-1,5 g mycelia

- 1) mycelium kultivujeme v GYM médiu při 28 °C
- 2) zcentrifugované mycelium zvážíme a resuspendujeme v 5 ml TE+34% sach., přidáme 10 mg lysozymu a promícháme
- 3) inkubujeme ve 30 °C, každých 15 minut protáhneme suspenzi pipetou. Inkubujeme do doby, než dojde přidáním kapky 10% SDS ke kapce suspenze na mikroskopickém sklíčku k téměř úplnému pročištění suspenze
- 4) poté přidáme 1,2 ml 0,5M EDTA, opatrně promícháme a přidáme 0.13 ml roztoku pronázy. Znovu opatrně promícháme a inkubujeme 5 minut ve 30 °C
- 5) přidáme 0.7 ml 10% SDS, promícháme a inkubujeme 1-2 h ve 37 °C
- 6) následující kroky s fenolem provádíme v ochranných brýlích a rukavicích
- 7) přidáme 6 ml fenolu a v ruce důkladně protřepáváme 10 minut v pokojové teplotě
- 8) přidáme 6 ml chloroformu, znovu protřepáváme 5 minut
- 9) centrifugujeme při 8 000 rpm, 10 minut. Pasterkou odebereme horní vodnou fázi
- 10) opakujeme kroky 6-8 dokud se nám mezi fázemi tvoří sraženina a dokud není odebíraná fáze čirá
- 11) pro odstranění fenolu přidáme 6 ml chloroformu a znovu protřepáváme 5 minut. Centrifugujeme jako v kroku 8 ale jen 5 minut
- 12) pasterkou odebereme horní fázi a opakujeme krok 10

- 13) horní fázi přeneseme pasterkou do předem zvážené zkumavky a určíme hmotnost vzorku
- 14) na každý gram vzorku přidáme 40 µg RNázy A (převařené) a inkubujeme 1 h ve 37 °C
- 15) na ledu přidáme čtvrtinu objemu 5M NaCl a promícháme
- 16) přidáme poloviční objem 30% PEG 6000 tak, aby výsledná koncentrace byla 10%, a mícháme zatavenou pasterkou nebo skleněnou tyčinkou
- 17) během míchání by se vysrážená DNA měla na pasterku navinout
- 18) DNA opláchneme na pasterce 2x1 ml 75% EtOH a necháme vysušit na vzduchu
- 19) DNA rozpustíme přes noc při +4 °C v 5 ml TE pufru
- 20) po rozpuštění přidáme 0,6 ml 3M NaAc a 12 ml 100% EtOH. Promícháme a DNA navineme stejně jako v krocích 16 a 17
- 21) vysušenou DNA nakonec rozpustíme ve 100-400 µl TE pufru (podle množství získané DNA) a skladujeme ve +4 °C

GLASS MILK izolace DNA z agarózového gelu (Vogelstein a Gillespie 1979)

- 1) odřízneme části gelu s velikostními standardy a obarvíme je EtBr
 - 2) po obarvení vyznačíme pod UV lampou skalpelem na prouzcích oblast požadované velikosti, přiložíme standardy zpět k prouzkům s fragmentem a podle značek jej vyřízneme
 - 3) vyříznutou část zvážíme a přidáme 2-3 ml NaI na 1 g gelu
 - 4) inkubujeme při 53 °C, dokud se gel nerozpustí (maximálně 5 minut), občas promícháme
 - 5) přidáme 1 µl skelného mléka na 1 µg DNA (minimálně 5 µl), důkladně promícháme
 - 6) inkubujeme 10 minut v ledu, občas promícháme
 - 7) zcentrifugujeme 10 ve stolní mikrocentrifuze a sediment 3x promyjeme 1 ml NEW WASH roztoku. Po posledním promytí znovu stočíme a pipetou odebereme zbytek tekutiny
 - 8) resuspendujeme v 50 µl TE nebo dH₂O a eluujeme DNA 10 minut při 53 °C
 - 9) zcentrifugujeme 1 minutu a odebereme supernatant s eluovanou DNA
- před ligací supernatant extrahujeme fenol-chloroformem a přesrážíme EtOH

Neradioaktivní značení DNA (DIG DNA Labeling kit, Roche)

- následující množství jsou určena pro značení až 3 µg lineární DNA
- před značením je doporučeno DNA přečistit fenol-chloroformem a přesrážet etanolem

- 1) DNA rozpuštěnou v 15 μl dH_2O denaturujeme 10 minut při 95 $^\circ\text{C}$ a poté rychle ochladíme na směsi ledu a NaCl
- 2) na ledu přidáme 2 μl směsi hexanukleotidů, 2 μl dNTP značící směsi a 1 μl Klenow enzymu
- 3) směs inkubujeme až 20 hodin ve 37 $^\circ\text{C}$
- 4) nakonec reakci zastavíme přidáním 2 μl 0,2M EDTA pH 8.0
- 5) naznačenou DNA přesrážíme přidáním 2,5 μl 4M LiCl a 75 μl EtOH (-20 $^\circ\text{C}$). Promícháme a necháme alespoň 30 minut při -70 $^\circ\text{C}$
- 6) zcentrifugujeme při 13 000 rpm, 10 minut, +4 $^\circ\text{C}$. Pelet opláchneme 75% EtOH (-20 $^\circ\text{C}$) a vysušíme
- 7) rozpustíme v 50 μl TE

Klonování PCR fragmentu „natupo“

- 1) amplifikovanou PCR směs nanese na gelovou elektroforézu a poté požadovaný fragment izolujeme z gelu metodou GLASSMILK.
- 2) DNA v objemu 24,5 μl smícháme se 3 μl 10xPNK pufru, 1,5 μl 20mM ATP a 1 μl PNK.
- 3) Inkubujeme 30 minut při 37 $^\circ\text{C}$ a poté inaktivujeme 10 minut při 70 $^\circ\text{C}$.
- 4) Po fenol/chloroformové extrakci supernatant srážíme přidáním 1/10 objemu NaAc (pH7.0) a 3 objemů ledového 100% EtOH po dobu 1 hodiny v -80 $^\circ\text{C}$.
- 5) Centrifugujeme 15 minut při 4 $^\circ\text{C}$, 13 000 rpm, supernatant vylijeme a přidáme 100 μl 75% EtOH. Centrifugujeme stejným způsobem dalších 5 minut. Slijeme supernatant a sediment na vzduchu vysušíme.
- 6) DNA rozpustíme v 17 μl dH_2O , přidáme 2 μl 10x Klenow pufru, 0,5 μl 2mM dNTP a 1 μl Klenow enzymu. Inkubujeme 15 minut při 37 $^\circ\text{C}$ a poté enzym inaktivujeme 10 minut při 70 $^\circ\text{C}$.
- 7) Spojíme s naštěpeným defosforylovaným vektorem a extrahujeme stejným objemem neutrálního FCI.
- 8) Vysušený sediment rozpustíme ve 31 μl dH_2O , přidáme 4 μl 10x ligačního pufru s ATP, 4 μl PEG 4000 a 1 μl T4DNA ligázy. Inkubujeme přes noc při 14 $^\circ\text{C}$ nebo 1-2 hodiny při 22 $^\circ\text{C}$.
- 9) Srážíme přidáním 1/10 objemu NaAc (pH7.0) a 3 objemů ledového 100% EtOH po dobu 1 hodiny v -80 $^\circ\text{C}$, zcentrifugujeme a vysušíme stejně jako v kroku 5.
- 10) Vysušený sediment rozpustíme v 5 μl sterilní dH_2O .
- 11) Elektroporací transformujeme kompetentní buňky *E. coli* SURE (viz.), které selektujeme na LB miskách s ampicilinem, IPTG a X-GAL. Kultivujeme přes noc při 37 $^\circ\text{C}$.

Ultracentrifugace v sacharózovém gradientu

- 1) Do tenkostěnné ultracentrifugační kyvety (Sorvall® Inst. 11.6x60.3 mm, 4,4 ml Polyallomer Ultra Tube) si pipetou opatrně navrstvíme gradient 15-40% sacharózy v TNE pufru. Každou vrstvu gradientu nanášíme s rozdílem koncentrací 5% v objemu 0,6 ml.
- 2) Na hladinu gradientu opatrně nanese přesráženou DNA rozpuštěnou ve 100 μ l dH₂O.
- 3) Kyvety vyvážíme TNE pufrem a centrifugujeme 19 hodin při 20 °C a 31 000 rpm (ultracentrifuga Sorvall Ultracentrifuge OTD Combi, rotor TST60.4).
- 4) Po centrifugaci etanolem očistíme a jehlou slabě propíchneme dno kyvety a obsah necháme pomalu odkapat do několika připravených zkumavek. Objem prvních frakcí by se měl pohybovat v rozmezí 100 až 200 μ l, dále až 0.5 ml, abychom odebrali celý objem kyvety.
- 5) Část každé frakce nanese na gelovou elektroforézu, abychom ověřili velikost fragmentů v jednotlivých frakcích.
- 6) Frakce s fragmenty s požadovanou velikostí spojíme, přidáme stejný objem dH₂O a 2,5 násobek objemu 100% EtOH. Důkladně promícháme a srážíme 1 h při -80 °C.
- 7) Centrifugujeme 15 minut při 13 000 rpm, 4 °C, promyjeme 300 μ l 75% EtOH a stejným způsobem centrifugujeme dalších 5 minut.
- 8) Sediment vysušíme a rozpustíme v 90 μ l dH₂O.

3.2.1.1. Další úpravy DNA

Fenol/chloroformová extrakce (Sambrook a Russell 2001)

- 1) K roztoku přidáme stejný objem neutrálního FCI a důkladně vortexujeme.
- 2) Centrifugujeme na stolní centrifuze 10 minut při 13 000 rpm.
- 3) Vodnou fázi srážíme v nové zkumavce přídatkem 1/10 objemu NaAc (pH7.0) a 3 objemů ledového 100% EtOH po dobu 1 hodiny v -80 °C.
- 4) Centrifugujeme 15 minut při 4 °C, 13 000 rpm, supernatant vylijeme a přidáme 300 μ l 75% EtOH. Centrifugujeme stejným způsobem dalších 5 minut. Slijeme supernatant a sediment na vzduchu vysušíme.
- 5) DNA rozpustíme v dH₂O nebo TE pufru.

Srážení DNA pomocí EtOH (Sambrook and Russell 2001)

- 1) Ke vzorku přidáme 1/10 objemu NaAc (pH 7.0) a 3 objemy ledového 100% EtOH

- 2) Srážíme minimálně 1 hodinu při -80 °C.
- 3) Centrifugujeme 15 minut při 4 °C, 13 000 rpm, supernatant vylijeme a přidáme 300 µl 75% EtOH. Centrifugujeme stejným způsobem dalších 5 minut.
- 4) Supernatant vylijeme a sediment necháme na vzduchu důkladně vysušit.
- 5) DNA rozpustíme v dH₂O nebo TE pufru.

Měření koncentrace DNA ve vzorku

- K určování koncentrace DNA ve vzorku využíváme absorbanci při vlnové délce 260 nm. Absorbanci měříme na spektrofotometru Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom. Jako blank pro měření používáme TE pufr nebo dH₂O podle toho v čem je měřený vzorek rozpuštěn.

- 1) vzorek naředíme do objemu alespoň 300 µl změříme A_{260} v kyvetě typu Q
- 2) pro koncentraci dsDNA 50 µg/ml je $A_{260} = 1$. Z tohoto vztahu a použitého ředění odečteme koncentraci měřeného vzorku.

Restrikční štěpení DNA

- štěpení bylo prováděno obvykle v objemu 10-30 µl restrikčními enzymy od Thermo Scientific za teploty požadované použitým enzymem po dobu 1-1,5 hodiny.
- štěpicí směs obsahuje DNA, dH₂O, restrikční pufr dle tabulky dodávané výrobcem a 1/10 objemu enzymu.

Defosforylace 5'konců DNA

- 1) Vzorek DNA naředíme dH₂O do objemu 90 µl
- 2) Přidáme 10 µl 10x SAP pufru a 1 µl SAP
- 3) Inkubujeme 1 hodinu při 37 °C
- 4) Inaktivujeme fosfatázu 10 minut při 70 °C.

Ligace DNA (Sambrook a Russell 2001)

- 1) DNA určenou k ligaci, extrahovanou fenol-chloroformem a přesráženou etanolem, rozpustíme ve 35 µl sterilní dH₂O.
- 2) Přidáme 4 µl 10x konc. T4 DNA ligačního pufru a 1 µl T4 DNA ligázy
- 3) Inkubujeme přes noc při 14 °C nebo 2 hodiny při 22 °C a poté inaktivujeme 10 minut při 70 °C.
- 4) Ligovanou DNA přesrážíme etanolem a rozpustíme v požadovaném objemu sterilní dH₂O nebo TE pufru.

Gelová elektroforéza (Sambrook a Russell 2001)

- pro elektroforézu používáme 1% nebo 0,3% agarózu (SeaKem® LE Agarose, Lonza) v 1x TAE pufru (w/v).
- pro nanášení přidáváme do vzorků nanášecí pufr o objemu jedné pětiny vzorku.
- elektroforézu provádíme v 1x konc. TAE pufru.
- gel se vzorkem následně barvíme 20 minut ve vodném roztoku EtBr (1 µg/ml), opláchneme pod tekoucí vodou a vizualizujeme UV zářením.

3.2.2. PCR reakce

- Míchání reakčních směsí pro PCR provádíme vždy na ledu čistými sterilními špičkami. Pro PCR reakce používáme termocykler T-Gradient Thermocycler od Whatman Biometra. Teploty nasedání primerů jsou obvykle o 4 °C nižší než teplota tání (T_m) uváděná výrobcem, v případě různých teplot se jedná o průměrnou hodnotu.

PCR screening ALS-ALL

Reakční směs: 0,5 µl Primer 1
0,5 µl Primer 2
5 µl 2mM dNTP
3 µl 25mM MgCl₂
5 µl 10x *Taq* pufr (10x buffer *Taq*, Top-Bio)
1 µl DNA (0,5 µg/µl)
34,5 µl dH₂O
0,5 µl *Taq* polymeráza (přidat během prvního nasedání)

Cyklování:

cyklů		čas	teplota
1	počáteční denaturace	10 min	95 °C
10	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	60 °C (v každém cyklu snížena o 0,5 °C)
	elongace	45 s/kb	72 °C
25	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	55 °C
	elongace	45 s/kb	72 °C
1	finální elongace	7 min	72 °C

GC-RICH PCR System (Roche)

- Sada speciálně navržená pro PCR reakce při použití templátů s vysokým obsahem GC párů

Reakční směs 1: 5 μ l 2mM dNTP
0,2 μ l Primer 1 (finální konc. 2 μ M)
0,2 μ l Primer 2 (finální konc. 2 μ M)
10 μ l GC-RICH resolution solution
1 μ l DNA (1 μ g/ μ l)
19 μ l dH₂O

Reakční směs 2: 10 μ l 5x GC-RICH PCR reaction buffer
1 μ l GC-RICH PCR Systém enzyme mix
5 μ l dH₂O

- před použitím smícháme ve sterilní mikrozkuhavce 35 μ l reakční směsi 1 a 15 μ l směsi 2 a umístíme do termocykleru

Cyklování:

cyklů		čas	teplota
1	počáteční denaturace	3 min	95 °C
10	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	$T_m - 4$ °C
	elongace	45 s/kb	72 °C
20	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	$T_m - 4$ °C
	elongace	45 s/kb (+5 s v každém dalším cyklu)	72 °C
1	finální elongace	7 min	72 °C

Koloniová PCR (FastStart PCR Master, Roche)

Reakční směs: 2,5 μ l 10x konc. primer 1
2,5 μ l 10x konc. primer 2
7,5 μ l dH₂O
12,5 μ l Master Mix

- jako templát použijeme mikroskopické množství mycelia přenesené do směsi sterilním párátkem

Cyklování:

cyklů		čas	teplota
1	lyze a denaturace	10 min	95 °C
15	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	$T_m - 4\text{ °C}$
	elongace	60 s/kb	72 °C
20	denaturace	30 s	95 °C
	nasedání primerů	30 s	$T_m - 4\text{ °C}$
	elongace	60 s/kb (+5 s v každém dalším cyklu)	72 °C
1	finální elongace	7 min	72 °C

3.2.3. Genové manipulace

Konjugační přenos kosmidu z *E. coli* do streptomycet (REDIRECT)

- 1) Připravíme si kompetentní buňky *E. coli* ET12567 (kultivujeme v médiu s kanamycinem a chloramfenikolem). Buňky transformujeme kosmidem a selektujeme na médiu s apramycinem (100 µg/ml).
- 2) Jednou kolonií zaočkujeme 10 ml LB média s apramycinem (50 µg/ml), chloramfenikolem a kanamycinem (50 µg/ml).
- 3) 100 µl inokula zaočkujeme do 10 ml čerstvého LB média s antibiotiky a kultivujeme přibližně 4 hodiny při 37 °C, dokud nebude $OD_{600} = 0,4$.
- 4) Poté buňky dvakrát promyjeme 10 ml samotného LB média, abychom odstranili antibiotika, a nakonec resuspendujeme v 1 ml LB média.
- 5) Pro každou konjugaci přeneseme 10 µl spor streptomycet do 500 µl 2xYT média a inkubujeme 10 minut při 50 °C. Poté necháme ochladit.
- 6) Smícháme 0,5 ml buněk *E. coli* a 0,5 ml připravených spor a krátce zcentrifugujeme. Vylijeme většinu supernatantu a pelet resuspendujeme ve zbytku tekutiny (cca 50 µl).
- 7) (volitelný – připravíme ředění od 10^{-1} do 10^{-4} v celkovém objemu 100 µl dH₂O).
- 8) Vysejeme na misky s MS médiem obsahujícím 10mM MgCl₂ bez antibiotik a inkubujeme 16-20 hodin při 30 °C.

- 9) Misky přelijeme 1 ml dH₂O s 0,5 mg kyseliny nalidixové a 1,25 mg apramycinu. Inkubujeme dále při 30 °C.

3.2.3.1. Transformační metody

Příprava elektrokompetentních buněk *E. coli* (Sambrook a Russell 2001)

- 1) V 5 ml LB média (dle kmene s přidanými antibiotiky) si připravíme inokulum z jedné kolonie, které inkubujeme na třepačce přes noc při 37 °C.
- 2) 2 ml inokula zaočkujeme do 200 ml LB média v litrové baňce a na třepačce inkubujeme při 37 °C, dokud kultura nedosáhne OD₆₀₀ = 0,7.
- 3) Poté buňky zchladíme a ve vychlazených sterilních centrifugačních zkumavkách centrifugujeme 8 minut, při 4 °C, 8 000 rpm (MR 23i, rotor AM 100.13, Jouan).
- 4) Supernatant opatrně vylijeme a buňky resuspendujeme ve 200 ml ledové sterilní dH₂O a centrifugujeme stejným způsobem jako v kroku 3.
- 5) Promyjeme ještě jednou jako v kroku 4 a odstraníme zbylou tekutinu.
- 6) Buňky resuspendujeme v 0,5 ml ledového sterilního 10% glycerolu a rozdělíme po 50 µl do sterilních 1,5 ml zkumavek. Uchováme při -80 °C.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* elektroporací (Sambrook a Russell 2001)

- 1) K 1-5 µl plasmidové DNA v 1,5 ml zkumavce přidáme 50 µl elektrokompetentních buněk, promícháme a inkubujeme 10 minut na ledu.
- 2) Směs poté přeneseme do sterilizované vychlazené elektroporační kyvety, tak aby ve směsi nevznikaly bubliny, a provedeme elektroporaci (Electro Square Porator ECM 830, BTX Division of Genetronics, program HV, napětí 2000 V, délka pulzu 99 µs, 10 pulzů, interval 100 ms).
- 3) Okamžitě po elektroporaci přidáme do kyvety 1 ml sterilního SOC média a přeneseme do sterilní zkumavky.
- 4) Inkubujeme na třepačce 1-1,5 hodiny při 37 °C, 1 200 rpm
- 5) Část buněk vysejeme na misky s LB médiem a příslušnými antibiotiky pro selekci a inkubujeme přes noc při 37 °C.

Příprava protoplastů ze streptomycet (Kieser *et al.* 2000)

- 1) Do prolamované baňky s 80 ml YEME média s glycinem (případně s antibiotiky) zaočkujeme spory příslušného kmene streptomycet (glycin lze u některých kmenů přidat až několik hodin před ukončením kultivace).

- 2) Inkubujeme 50-52 hodin na třepačce při 28 °C.
- 3) 20 ml kultury přelijeme do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugujeme 10 minut při 20 °C, 8 000 rpm (MR 23i, rotor AM 50C.13, Jouan)
- 4) Vylijeme supernatant a buňky resuspendujeme v 15 ml sterilní 10,3% sacharózy a znovu zcentrifugujeme. Vylijeme supernatant.
- 5) Buňky resuspendujeme ve 4 ml L pufru s lysozymem (sterilizujeme filtrací) a inkubujeme maximálně 60 minut při 30 °C. Každých 15 minut promícháme opatrným vtažením do 10 ml pipety. Doba inkubace se může u různých kmenů výrazně lišit, tvorbu protoplastů kontrolujeme pod mikroskopem při zvětšení 1000x s imerzním olejem.
- 6) Před koncem přidáme 5 ml P pufru a opatrně promícháme.
- 7) Protoplasty přefiltrujeme přes smotek vaty umístěný na dně proděravělé zkumavky, vložené uvnitř větší zkumavky zachycující roztok s protoplasty (vše předem sterilizováno).
- 8) Protoplasty centrifugujeme 7 minut při 20 °C, 700g (MR 23i, rotor AM50C.13, Jouan)
- 9) Supernatant vylijeme, protoplasty resuspendujeme ve 300-500 µl P pufru a po 50 µl rozdělíme do 1,5 ml sterilních zkumavek. Uchováme při -80 °C.

Transformace protoplastů (Kieser *et al.* 2000)

- Pipetuje výhradně sterilními špičkami s ustríženým koncem

- 1) Ke 3-5 µl plasmidové DNA v 1,5 ml zkumavce přidáme 50 µl připravených protoplastů a ihned přidáme 200 µl T pufru a pipetou několikrát promícháme.
- 2) Protoplasty vysejeme na misky s vysušeným R5 médiem (2 hodiny sušeno ve flowboxu).
- 3) Misky inkubujeme 18 hodin při 28 °C a poté přelijeme roztokem příslušného antibiotika ve sterilní dH₂O (1 ml dH₂O a množství antibiotika požadované na misku).
- 4) Misky dále inkubujeme několik dní při 28 °C, dokud nejsou vidět kolonie.

Balení kosmidu do fágových partikulí (Gigapack III Gold)

- balící extrakt ponecháváme před zpracováním co nejdéle ve zmraženém stavu

- 1) zkumavku s extrakty mezi prsty rychle rozmrazíme a ihned přidáme 1-4 µl ligované DNA.
- 2) Obsah velice opatrně promícháme pipetou a 5 s centrifugací stočíme veškerý obsah na dno zkumavky.
- 3) Inkubujeme 2 hodiny při 22 °C.
- 4) Přidáme 500 µl SM pufru a 20 µl chloroformu. Opatrně promícháme obsah zkumavky.

- 5) Krátce zcentrifugujeme na stolní centrifuze.
- 6) Supernatant je připraven pro infekci. Skladujeme při 4 °C až 1 měsíc.

Infekce buněk *E. coli* VCS257 fágovými partikulemi (Gigapack III Gold)

- 1) Připravíme si inokulum zaočkováním jedné kolonie buněk VCS257 do 1 ml LB média bez antibiotik a kultivujeme přes noc při 37 °C.
- 2) Druhý den inokulum zaočkujeme do 100 ml LB média bez antibiotik, obsahujícího 10 mM MgSO₄ a 0,2 % (w/v) maltózy.
- 3) Na třepačce kultivujeme při 37 °C po dobu 4-6 hodin tak, abychom nepřesáhli OD₆₀₀ = 1.
- 4) Kulturu centrifugujeme 10 minut při 500 g
- 5) Supernatant vylijeme a buňky resuspendujeme v 10mM MgSO₄ do OD₆₀₀ = 0,5.
- 6) Smícháme 100 µl sbalených partikulí a 100 µl připravených buněk a při pokojové teplotě inkubujeme 30 minut.
- 7) Přidáme 800 µl LB média a inkubujeme při 37 °C 1 hodinu. Každých 15 minut obsah opatrně promícháme.
- 8) Buňky zcentrifugujeme 1 minutu na stolní centrifuze při 13 000 rpm, vylijeme většinu supernatantu a buňky resuspendované ve zbytku kapaliny vysejeme na LB misky s apramycinem a inkubujeme přes noc při 37 °C.

3.2.4. Další metody

Lyze buněk na membráně

- 1) Kolečko filtračního papíru namočené do 10% SDS vložíme na dno petriho misky a vylijeme veškerou volnou kapalinu.
- 2) Nylonovou membránu položíme na filtrační papír koloniemi nahoru tak, aby se mezi papírem a membránou netvořily bubliny a necháme působit 3 minuty
- 3) Poté membránu přeneseme do druhé misky, do které jsme umístili filtrační papír stejným způsobem namočený do denaturačního roztoku a necháme působit 5 minut
- 4) Neutralizujeme 5 minut ve třetí misce na filtračním papíru s neutralizačním roztokem
- 5) Nakonec membránu položíme na 5 minut na filtrační papír namočený do 2xSSC
- 6) Membránu necháme vysušit a 5 minut osvítime UV lampou, aby došlo k navázání uvolněné DNA na membránu.

Příprava neradioaktivně značené DNA próby (DIG DNA Labeling Kit, Roche)

- 1) Fragment DNA izolovaný z gelu a přesrážený etanolem rozpustíme v 15 μ l sterilní dH_2O a denaturujeme 10 minut při 100 °C. Poté okamžitě rychle zchladíme na ledu s NaCl.
- 2) Přímo na ledu přidáme ke směsi 2 μ l hexanukleotidové směsi, 2 μ l dNTP značící směsi a 1 μ l Klenow enzymu. Promícháme a inkubujeme přes noc při 37 °C.
- 3) Pro zastavení reakce přidáme 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8.0) a inkubujeme 10 minut při 65 °C.
- 4) Přidáme 2,5 μ l 4M LiCl a 75 μ l ledového 100% EtOH. Rozvortexujeme a srážíme při -80 °C alespoň 30 minut.
- 5) Zcentrifugujeme 15 minut při 4 °C, 13 000 rpm.
- 6) Vylijeme supernatant, promyjeme 300 μ l 75% EtOH a centrifugujeme stejně jako v kroku 5.
- 7) Vylijeme supernatant a sediment necháme na vzduchu vysušit.
- 8) DNA rozpustíme v 50 μ l sterilní dH_2O a před použitím denaturujeme 10 minut při 100 °C.

Hybridizace DNA na nylonové membráně s neradioaktivně značenou próbou a imunologická detekce

- 1) Pro prehybridizaci přidáme k membráně v hybridizačním válci 20 ml hybridizačního roztoku na 100 cm^2 membrány. V hybridizační pícce (HPOI & HPIO MiniOven, Apollo) inkubujeme za současného otáčení 1 hodinu při 68 °C.
- 2) Hybridizační roztok vylijeme a nahradíme ho 2,5 ml čerstvého hybridizačního roztoku, který ve válci necháme předeřhát na 68 °C.
- 3) Do roztoku přidáme denaturovanou próbu (10 min při 100 °C) a za současného otáčení necháme přes noc hybridizovat v pícce při 68 °C.
- 4) Membrány promyjeme za pokojové teploty 2 x 5 minut 50 ml promývacího roztoku 1 (50 ml) a při 68 °C 2 x 15 minut 50 ml promývacího roztoku 2, předeřhátého na 68 °C.
- 5) Pro imunologickou detekci membránu asi 1 minutu promyjeme puřrem 1.
- 6) Po promytí přidáme 100 ml puřru 2 a inkubujeme 30 minut za současného míchání (Multifunction 3D rotator PS-M3D, Grant-Bio).
- 7) Puřr vylijeme a znovu promyjeme puřrem 1.
- 8) Přidáme 20 ml konjugované protilátky naředené puřrem 1 do koncentrace 150 mU/ml.
- 9) Znovu za současného míchání inkubujeme 30 minut a roztok poté vylijeme.

- 10) Mícháním promyjeme 2 x 15 minut 100 ml pufru 1 a poté ekvilibrujeme 2 minuty ve 20 ml pufru 3.
- 11) Pufr vylijeme a na membránu nanese 10 ml barvicího roztoku.
- 12) Inkubujeme ve tmě 30 minut až několik hodin (případně až do druhého dne).
- 13) Pro inhibici reakce inkubujeme 5 minut v TE pufru. Membránu vysušíme a uchováme v suchu a temnu.

Aceton/etylacetátová extrakce metabolitů

- Pro odpařování vzorků byla použita rotační vakuová odparka LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments). Metabolity jsou citlivé na oxidaci, vzorky proto uchováváme v chladu a temnu, ideálně za nepřístupu kyslíku.
- 1) Mycelium zaočkujeme do prolamované baňky s 50 ml YEME média s příslušnými antibiotiky a na třepače kultivujeme 2 dny při 28 °C. Poté malým množstvím inokula zaočkujeme v nové baňce v poměru 1:10 čerstvé médium pro produkci sekundárních metabolitů (např. SMM) a kultivujeme stejným způsobem další 3 dny.
 - 2) Filtrací nebo centrifugací oddělíme mycelium (A) od kultivačního média (B) a dále zpracováváme odděleně
 - 3) A: K myceliu přidáme aceton o polovičním objemu, než byl objem kultury a 30 minut necháme protřepávat ve 4 °C. Poté mycelium zcentrifugujeme a aceton odpaříme na rotační vakuové odparce (teplota lázně 37 °C, podtlak 90 mbar).
B: V kultivační kapalině rozpustíme NaCl do 5M koncentrace.
 - 4) A: V baňce po odpaření obvykle zůstane malé množství kapaliny, ke které přidáme 3 násobný objem etylacetátu a znovu necháme 30 minut protřepávat při 4 °C.
B: Přidáme EtAc o třetinovém objemu původní kultury a 30 minut protřepáváme ve 4 °C.
 - 5) A/B: V dělicí nálevce nebo centrifugací odebereme horní EtAc frakce.
 - 6) Obě EtAc frakce spojíme a odpaříme na rotační vakuové odparce.
 - 7) Extrakt rozpustíme v malém objemu chloroformu, přeneseme do tmavých lahvíček a pro lepší trvanlivost extraktu je napustíme dusíkem.
 - 8) Uchováme v -80 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

- 1) Podle počtu vzorků si vystříhneme požadovanou velikost chromatografické destičky (TLC aluminium sheets 20x20 cm Silica gel 60 F₂₅₄, Merck), na kterou si tužkou naznačíme přibližně 1,5 cm od spodního okraje start a na něm místa, na které budou jednotlivé vzorky nanášeny.

- 2) Na vyznačená místa mikrostříkačkou pomalu nanese jednotlivé vzorky (20 µl), přičemž při nanášení vždy počkáme, než zaschne předchozí nanesená kapka tak, abychom vzorek nanесли na co nejmenší plochu.
- 3) Po zaschnutí nanesených vzorků umístíme chromatografickou destičku do vyvíjecí kolony, do které jsme předem nalili mobilní fázi (benzen-aceton v poměru 3:2) v takovém množství, aby hladina mobilní fáze nedosahovala na úroveň nanesených vzorků.
- 4) Ve chvíli kdy mobilní fáze doputuje téměř na konec destičky, destičku vyjmeme a necháme zaschnout.
- 5) Vysušenou destičku osvítíme UV světlem (366 nm) a vyfotografujeme.

Analýza extraktů pomocí UHPLC-UV(DAD)-ESI ToF MS (*ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detekcí diodového pole a hmotnostní detekcí doby letu*) – měřeno a vyhodnocováno Mgr. Terezou Tylovou

- Systém Acquity UPLC firmy Waters je tvořen UPLC vysokotlakým čerpadlem, dávkovačem vzorků, kolonovým termostatem, detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním spektrometrem (MS) s ionizací elektrosprejem (ESI) a analyzátozem doby letu (ToF; vše Waters, ČR). K vyhodnocení vzorků byl použit dodávaný software MassLynx V4.1 (Waters, ČR).

- Podmínky měření:

UHPLC - kolona Acquity UPLC BEH C18 (50x2,1 mm, velikost částic 1,7 µm; Waters, ČR)

mobilní fáze: **A** – 0,1% kyselina mravenčí v dH₂O; **B** – 100% acetonitril

rychlost průtoku: 0,4 ml/min

gradientová eluce (min/%A): 0/90, 12/40, 15/20, 16/20, 18/0, 20/90

teplota kolony: 25 °C

teplota vzorků: 10 °C

objem nástřiku: 2-5 µl

MS – negativní ESI ionizace (ES⁻)

napětí na vstupním kuželu: ±40 V

napětí na kapiláře: ±2500 V

teplota bloku iontového zdroje: 120 °C

teplota desolvatačního plynu (N): 350 °C

průtok desolvatačního plynu: 800 l/h

průtok plynu na vstupním kuželu: 50 l/h

měřeno ve „W“ módu, čas skenu 0,1 s, prodleva mezi skeny 0,01 s

- specifické $[M-H]^-$ a $[M+H]^+$ ionty byly extrahovány s hmotnostním oknem 0,05 Da

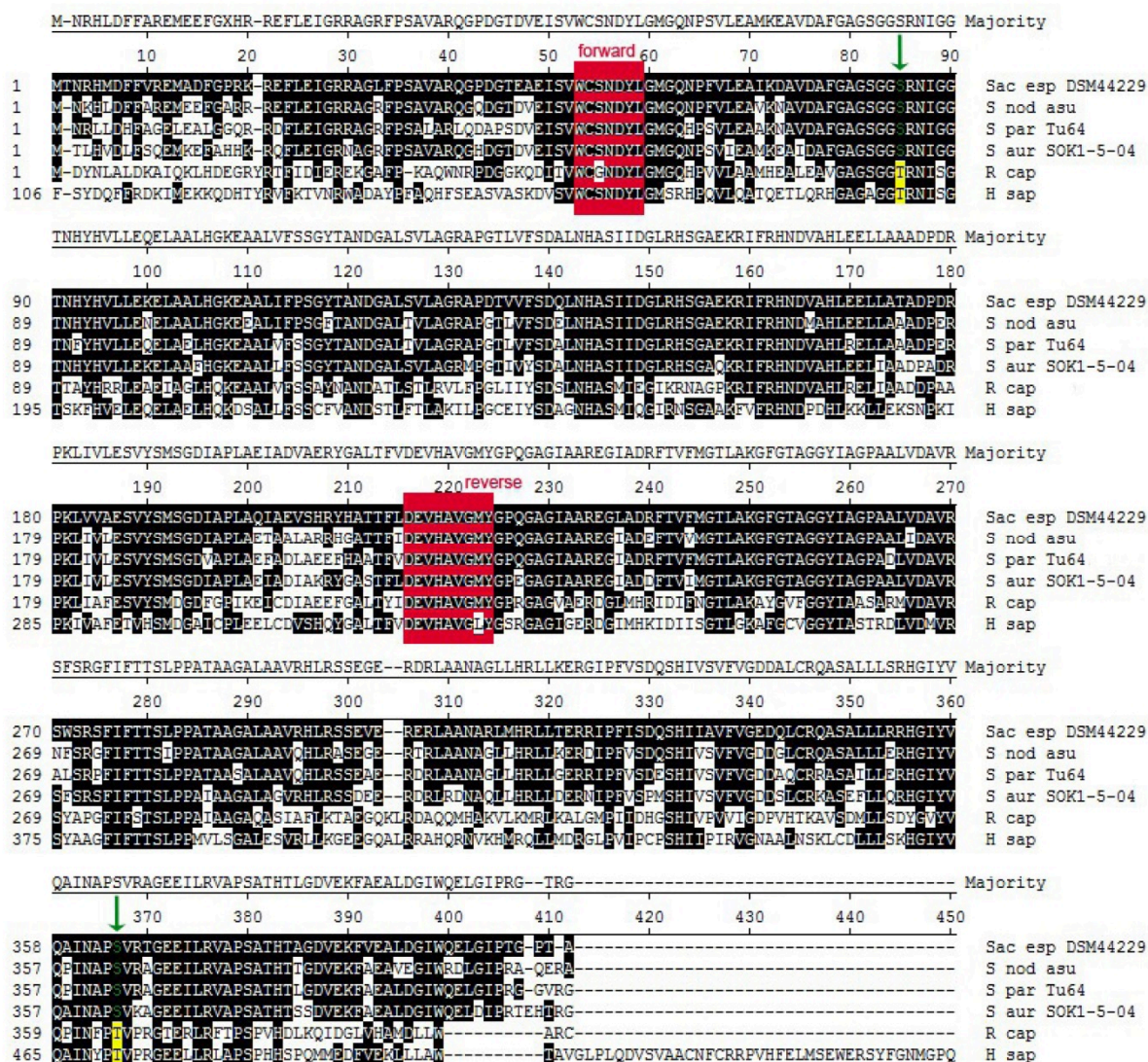
Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR)

- Analýza realizována Markem Kuzmou, PhD. z laboratoře charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR, v.v.i
- Měřeno pomocí přístroje Bruker Avance III 700 při 700.13 MHz pro ^1H a při 176.05 MHz pro ^{13}C v deuteriochloroformu (CDCl_3 , ARMAR AG, Döttingen, Německo) při teplotě 20 °C.
- Metody: ^1H NMR
 ^{13}C NMR
COSY (corellation spectroscopy)
TOCSY (total correlation spectroscopy)
J-resolved spectroscopy
 ^1H - ^{13}C HSQC (heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy)
 ^1H - ^{13}C HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)

4. Výsledky

4.1. Identifikace kmene *Saccharothrix espanaensis* DSM44229 jako možného producenta manumycinových antibiotik

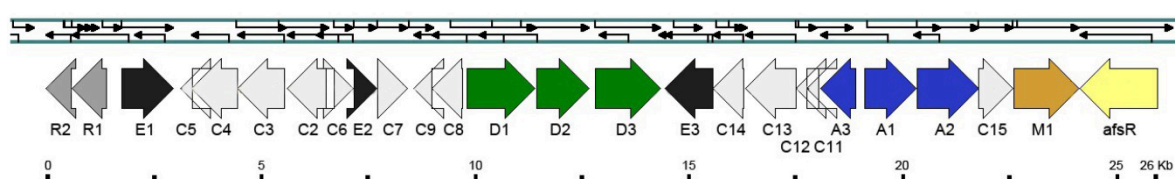
Biosyntetický genový shluk kmene *Saccharothrix espanaensis* DSM44229 byl objeven pomocí „genome scanningu“ s využitím vyhledávání podobných proteinových sekvencí algoritmem BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>). Pro vyhledávání byla použita aminokyselinová sekvence cyklizující aminolevulinát syntázy, specifické pro biosyntézu antibiotik s tzv. C₅N jednotkou, produktu genu *asuD2* z producenta asukamycinu *S. nodosus* ssp. *asukaensis*. Od klasických aminolevulinát syntáz z primárního metabolismu hemu a porfyrinů se liší několika konzervativními záměnami v aminokyselinové sekvenci, které jim udílejí schopnost cyklizovat vznikající kyselinu aminolevulovou na C₅N jednotku (obr. 12).



Obr. 12: Popis na další straně.

Obr. 12: Srovnání homologie aminokyselinové sekvence organismů *Saccharothrix espanaensis* DSM44229, *S. nodosus* ssp. *asukaensis*, *S. parvulus* Tu64, *S. aureus* SOK1/5-04, *Rhodobacter capsulatus* a *Homo sapiens*. Červeně jsou vyznačeny oblasti, na které nasedají primery HEMA1 a HEMA3, navržené na genetický screening přítomnosti genů pro ALAS. Zelené šipky znázorňují místa specifických záměn tyrosinu za serin u cyklizujících ALAS.

V případě kmene DSM44229 obsahuje okolí příslušného genu i kompletní konzervovaný operon zajišťující syntézu C₅N a její připojení na kostru antibiotika a další geny typické pro manumycinový biosyntetický shluk (obr. 13, tab. 2).



Obr. 13: Čtecí rámce biosyntetického genového shluku *S. espanaensis* DSM44229

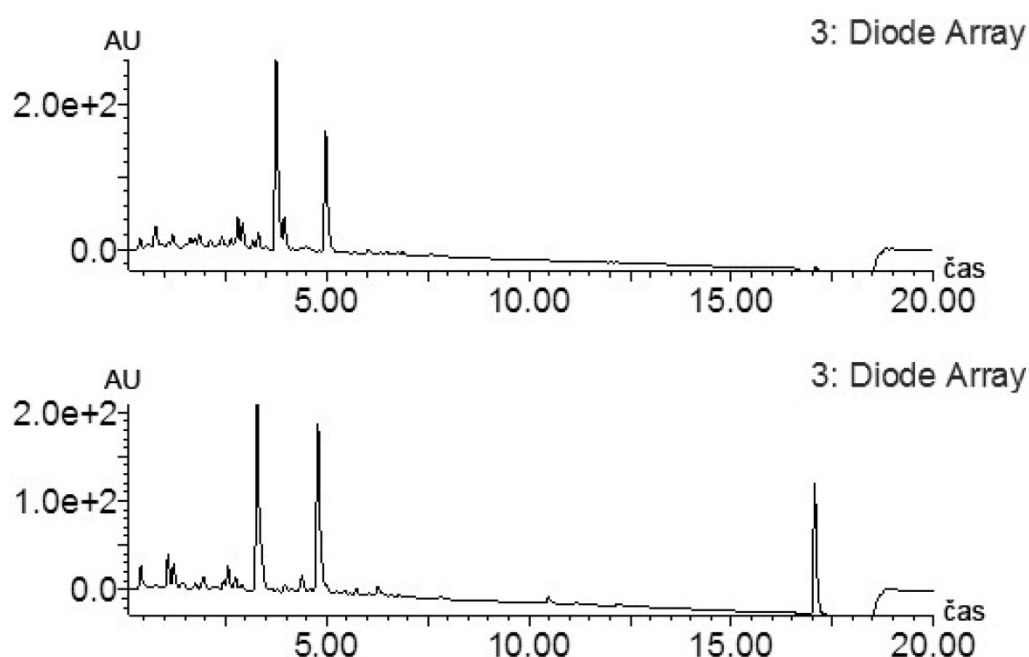
Protein	Homolog	Odhadovaná funkce
EspA1 (YP_007036332.1)	AsuA1 (ADI58644.1)	3,4-AHBA syntáza
EspA2 (YP_007036333.1)	AsuA2 (ADI58643.1)	AMP-vazebný enzym
EspA3 (YP_007036331.1)	AsuA3 (ADI58653.1)	2-amino-4,5-dihydroxy-6-on-heptanoyl-7-fosfát syntáza
EspC11 (YP_007036330.1)	AsuC11 (ADI58652.1)	ACP
EspC12 (YP_007036329.1)	AsuC12 (ADI58651.1)	ACP specifické pro 3,4-AHBA
EspC13 (YP_007036328.1)	AsuC13 (ADI58650.1)	3-oxoacyl-[ACP] syntáza II
EspC14 (YP_007036327.1)	AsuC14 (ADI58649.1)	„chain length“ faktor
EspC15 (YP_007036334.1)	AsuC15 (ADI58654.1)	thioesteráza
EspC2 (YP_007036317.1)	AsuC2 (ADI58636.1)	arylamínacetyltransferáza
EspC3 (YP_007036316.1)	AsuC3 (ADI58635.1)	3-oxoacyl-[ACP] syntáza III
EspC4 (YP_007036315.1)	AsuC4 (ADI58634.1)	3-oxoacyl-[ACP] syntáza III
EspC5 (YP_007036314.1)	AsuC5 (ADI58633.1)	ACP
EspC6 (YP_007036318.1)	AsuC6 (ADI58637.1)	thioesteráza
EspC7 (YP_007036320.1)	AsuC7 (ADI58639.1)	3-oxoacyl-[ACP] reduktáza
EspC8 (YP_007036322.1)	AsuC8 (ADI58642.1)	acyl dehydratáza
EspC9 (YP_007036321.1)	AsuC9 (ADI58641.1)	acyl dehydratáza
EspD1 (YP_007036323.1)	AsuD1 (ADI58645.1)	amidsyntáza
EspD2 (YP_007036324.1)	AsuD2 (AAO62615.1)	5-aminolevulinát syntáza
EspD3 (YP_007036325.1)	AsuD3 (ADI58647.1)	aminolevulinát-CoA ligáza
EspE1 (YP_007036313.1)	AsuE1 (ADI58628.1)	oxygenáza
EspE2 (YP_007036319.1)	AsuE2 (ADI58638.1)	oxidoreduktáza

Protein	Homolog	Odhadovaná funkce
EspE3 (YP_007036326.1)	AsuE3 (ADI58648.1)	limonen 1,2-monooxygenáza
EspM1 (YP_007036335.1)	AsuM1 (ADI58655.1)	membránový transportér
EspR1 (YP_007036312.1)	AsuR1 (ADI58626.1)	transkripční regulátor
EspR2 (YP_007036311.1)	AsuR2 (ADI58625.1)	transkripční regulátor, TetR
AfsR (YP_007036336.1)	(WP_030236535.1)	transkripční regulátor, SARP

Tab. 2: Odhadované funkce otevřených čtecích rámců biosyntetického genového shluku, nalezeného u *Saccharothrix espanaensis* DSM44229 a jednotlivé homologie k proteinům popsáným u producenta asukamycinu *Streptomyces nodosus* spp. *asukaensis*.

4.1.1. Produkce manumycinů u divokého kmene *S. espanaensis* DSM44229

Pro produkci látek manumycinového typu divokým kmenem jsme provedli fermentační kultivace v médiích SN a STX, která běžně používáme pro produkci manumycinů u streptomycet. Metabolity byly poté z kultivačního média a mycelia extrahovány acetonem a etylacetátem (viz. 3.2.4.). Extrakty byly analyzovány pomocí UHPLC-UV(DAD)-ESI ToF MS (viz. 3.2.4.), která nezaznamenala produkci žádných látek manumycinového typu (obr. 14). Stejného výsledku jsme dosáhli i v případě kultivace na médiích SSY a SSM (Wang et al. 2010; Bouras et al. 2007), která se dle literatury používají na kultivaci pseudonokardií, mezi které kmen patří.



Obr. 14: Chromatogramy extraktů z divokého kmene DSM44229 po kultivaci na médiu STX (nahore) a médiu SN (dole).

Na základě těchto výsledků jsme usoudili, že by genový shluk mohl být v původním hostiteli za laboratorních podmínek kryptický. Proto jsme se rozhodli ho přenést do heterologního producenta za účelem aktivace. K tomu bylo potřeba ve vhodném kosmidovém vektoru vytvořit knihovnu fragmentů chromozomální DNA (chDNA) a selektovat klony, které nesou kompletní genový shluk.

4.2. Příprava kosmidové knihovny kmene *S. espanaensis*

4.2.1. Izolace chromozomální DNA kmene *S. espanaensis*

Metodou pro izolaci kompletní chDNA (viz. 3.2.1.) jsme získali vzorek genomové DNA z kmene *Saccharothrix espanaensis*. Pro další aplikace byla důležitá vysoká kvalita izolované DNA, zejména co nejnižší mechanická fragmentace. Pro ověření velikosti generovaných fragmentů jsme vzorek nanесли na gelovou elektroforézu a obarvili Etidium-bromidem (EtBr) (viz. 3.2.1.1.), přičemž jako standard jsme použili GeneRuler (GR) + DNA bakteriofága λ naštěpenou restrikční endonukleázou *KpnI* nebo *XhoI* (viz 3.2.7.)

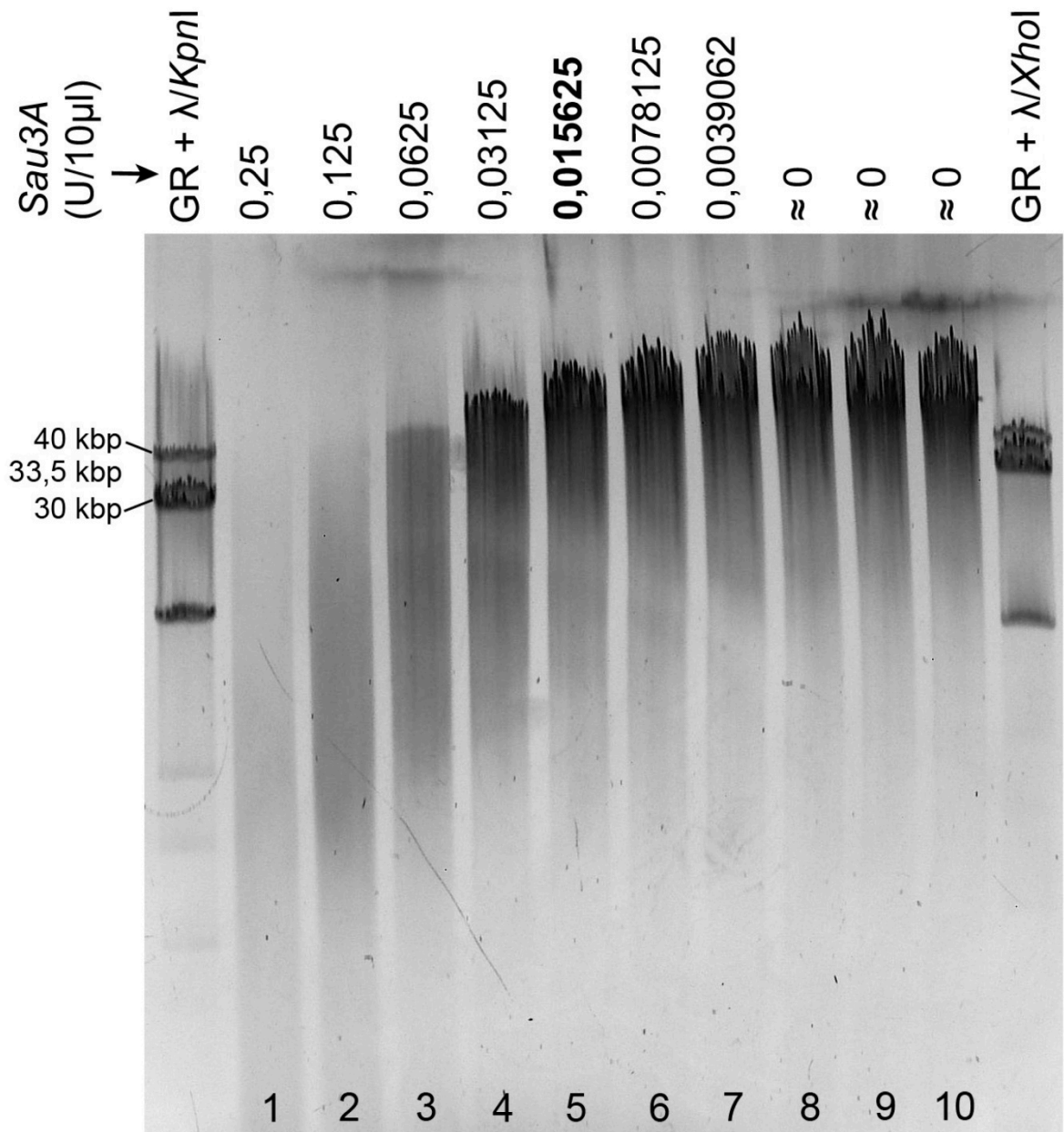
4.2.2. Úprava chromozomální DNA pro vytvoření kosmidové knihovny

Pro klonování do kosmidového vektoru pOJ446 je nutné použít fragmenty chDNA o velikosti 35-40 kbp, aby docházelo k efektivnímu balení do fágových partikulí. Vzorek jsme pro kalibraci nejprve štěpili různou koncentrací enzymu *Sau3A* (viz. 3.2.1.1.), abychom určili, při jaké koncentraci enzymu dochází ke generaci maximálního množství požadovaných fragmentů. V malých objemech (10 μ l pro každou koncentraci) jsme tedy štěpili 3,5 μ g chDNA přesně definovanou koncentrací restrikční endonukleázy *Sau3A* (dvojková řadící řada začínající na koncentraci enzymu 0,25 U/10 μ l) po dobu 1 hodiny při 37 °C. Po naštěpení jsme výsledek analyzovali gelovou elektroforézou a obarvili EtBr (obr. 15).

Pro preparativní reakci jsme použili koncentrace enzymu, při které docházelo pouze k částečnému štěpení DNA a při které se velikost výsledných fragmentů pohybovala kolem 40 kbp, v našem případě vzorek v 5. jamce. Pro preparativní reakci jsme připravili štěpnou směs o celkovém objemu 550 μ l, obsahující přibližně 190 μ g chDNA a enzym *Sau3A* v koncentraci 0,015625 jednotek na 10 μ l (0,86 U/550 μ l). Reakce probíhala za stejných podmínek jako kalibrace, tedy po dobu 1 hodiny při 37 °C.

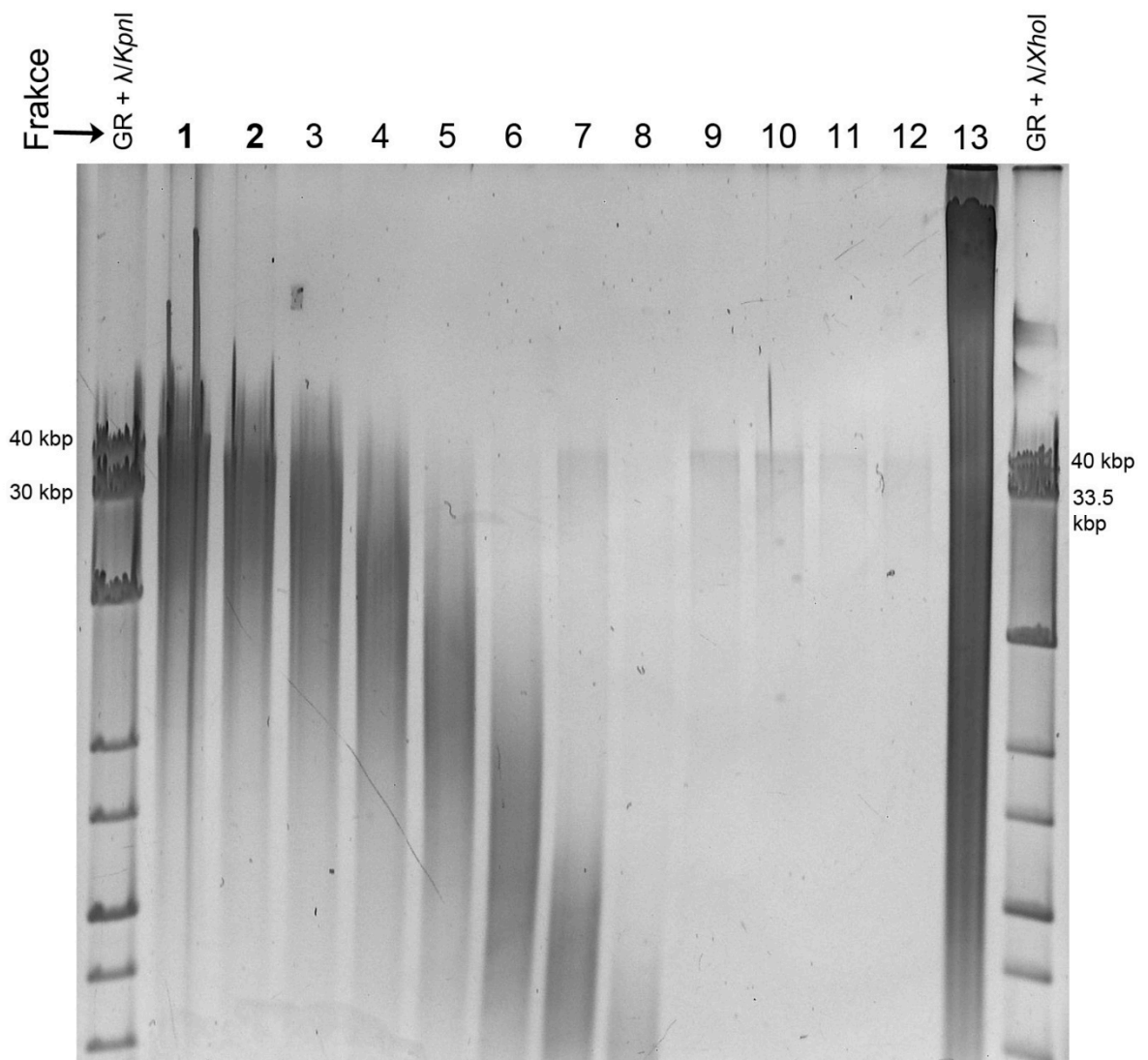
Pro co nejšetrnější separaci a izolaci fragmentů o ideální velikosti ze vzorku byla namísto gelové elektroforézy použita ultracentrifugace v sacharózovém gradientu (viz. 3.2.1.). Poté

jsme malým otvorem na dně centrifugační kyvety nechali její obsah pomalu odkapat do několika zkumavek. Fragmenty o požadované velikosti jsme očekávali v prvních několika frakcích, a proto jsme gradient rozdělili na 13 frakcí o objemu 0,2-0,35 ml (prvních 6 frakcí po 200 μ l a dalších 7 frakcí po 350 μ l), abychom od vzorku efektivně oddělili fragmenty jiných velikostí.



Obr. 15: Snímek gelové elektroforézy z kalibrace štěpení vzorku DNA *S. espanaensis* enzymem *Sau3A*. Jako standard v krajních jamkách byl použit GR + λ DNA štěpená enzymy *KpnI* nebo *XhoI*. Separace probíhala v 0,3% agarózovém gelu.

Abychom určili velikost fragmentů v jednotlivých frakcích, nanесли jsme malou část z každé frakce na gelovou elektroforézu spolu se standardy GR + λ /KpnI resp. XhoI a obarvili EtBr (obr. 16). Pro následující práci byly použity pouze první dvě frakce, obsahující fragmenty o požadované velikosti. Před dalším použitím jsme DNA z těchto dvou sacharózových vzorků naředili dH₂O, přesráželi etanolem a rozpustili v 90 μ l H₂O. Nakonec byla DNA podrobena defosforylaci 5' konců alkalickou fosfatázou SAP (viz. 3.2.1.1.), abychom zabránili následné nežádoucí ligaci menších fragmentů. Poté byla fosfatáza inaktivována 10 minut při 70 °C.



Obr. 16: Snímek gelové elektroforézy se vzorky frakcí ze sacharózového gradientu. Jako standard v krajních jamkách byl použit GR + λ DNA štěpená enzymy KpnI nebo XhoI. Separace probíhala v 0,3% agarózovém gelu.

4.2.3. Příprava kosmidové knihovny

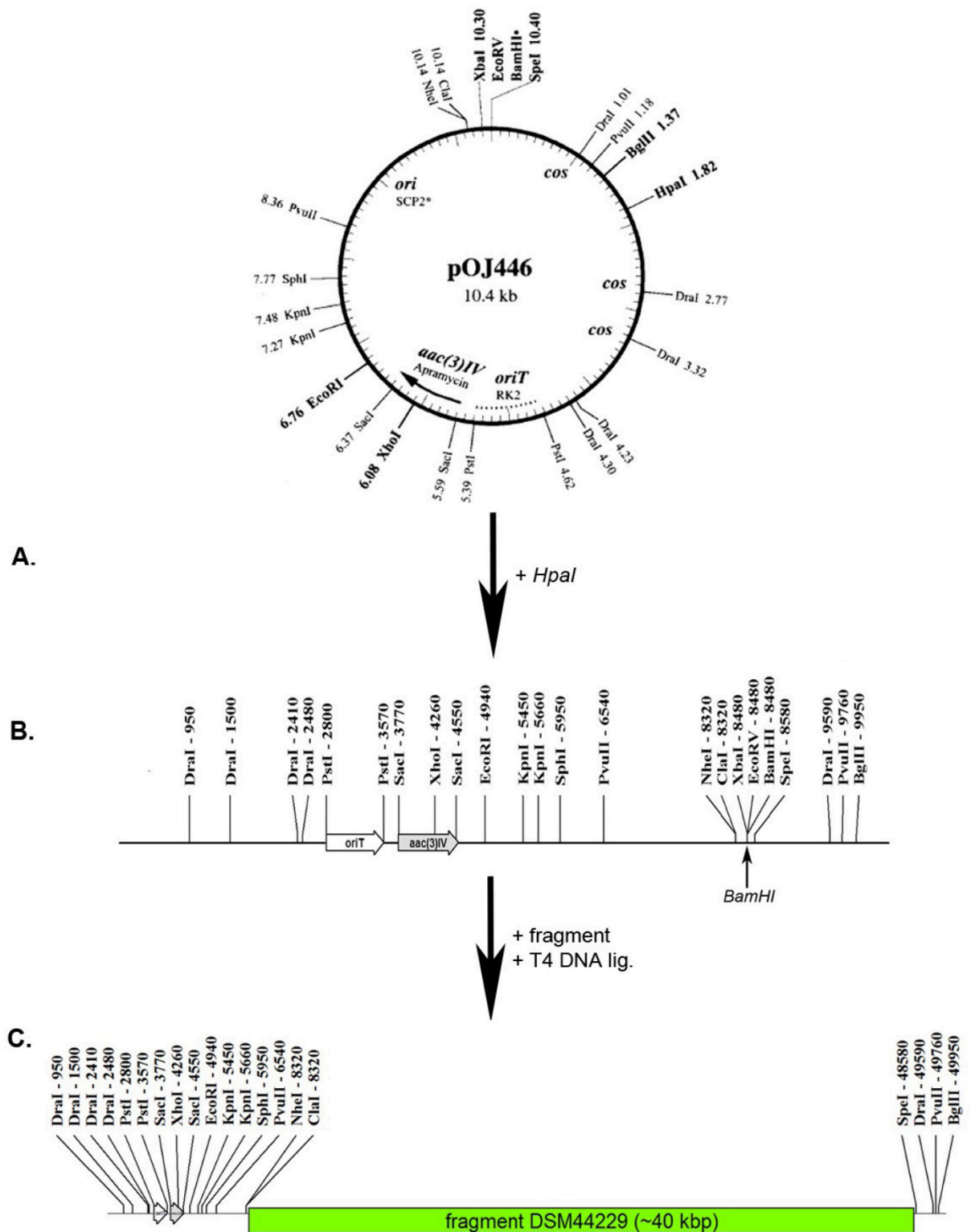
Pro vytvoření kosmidové knihovny byl použit kosmidový vektor pOJ446, nesoucí gen pro apramycinovou rezistenci. Tento vektor jsme nejprve linearizovali 2 hodinovým štěpením restriční endonukleázou *HpaI* a následně defosforylovali alkalickou fosfatázou aby nedocházelo ke zpětné cirkularizaci (obr. 17A). Po tepelné inaktivaci enzymů jsme linearizovaný plazmid před ligací extrahovali fenol/chloroformem (viz. 3.2.1.1.) a přesráželi do menšího objemu H₂O (8 µl) (viz. 3.2.1.1.). Pro inzerci fragmentu jsme plasmid dále 2 hodiny štěpili enzymem *BamHI* (obr. 17B) a po přidání připravené fragmentované chDNA ligovali T4 DNA ligázou (obr. 17C) (viz. 3.2.1.1.). Nakonec jsme DNA přesráželi etanolem a rozpustili ve 4 µl H₂O pro balení do fágových partikulí.

4.3. Příprava kmenů pro heterologní expresi biosyntetického shluku, pocházejícího ze *Saccharothrix espanaensis* DSM44229

Připravený vzorek kosmidové knihovny jsme kvůli co nejvyšší účinnosti balili do fágových partikulí pomocí kitu Gigapack III Gold (viz. 3.2.3.1.). Fágem jsme infikovali dodávaný kmen *E. coli* VCS257, upravený pro zvýšení efektivity transdukce (viz. 3.2.3.1.), který jsme následně kvůli selekci vyseli na misky s LB médiem a apramycinem. Za účelem pozdějších manipulací jsme na povrch agaru před výsevem rozprostřeli sterilní nitrocelulózovou membránu. Misky jsme inkubovali přes noc při 37 °C. Pro hybridizační analýzu jsme druhý den membránu s malými koloniemi přesně otiskli na sterilní nylonovou membránu na další misce s LB médiem a apramycinem. Původní misku jsme poté inkubovali další 4 hodiny a následně pro další zpracování uchovali v +4 °C. Misku s nylonovou membránou jsme inkubovali 6 hodin ve 37 °C a pak provedli lyzi buněk na membráně, aby došlo k uvolnění obsažené DNA (viz. 3.2.4.). Po vazbě uvolněné DNA na membránu pomocí UV záření byla vysušená nylonová membrána použita pro hybridizaci.

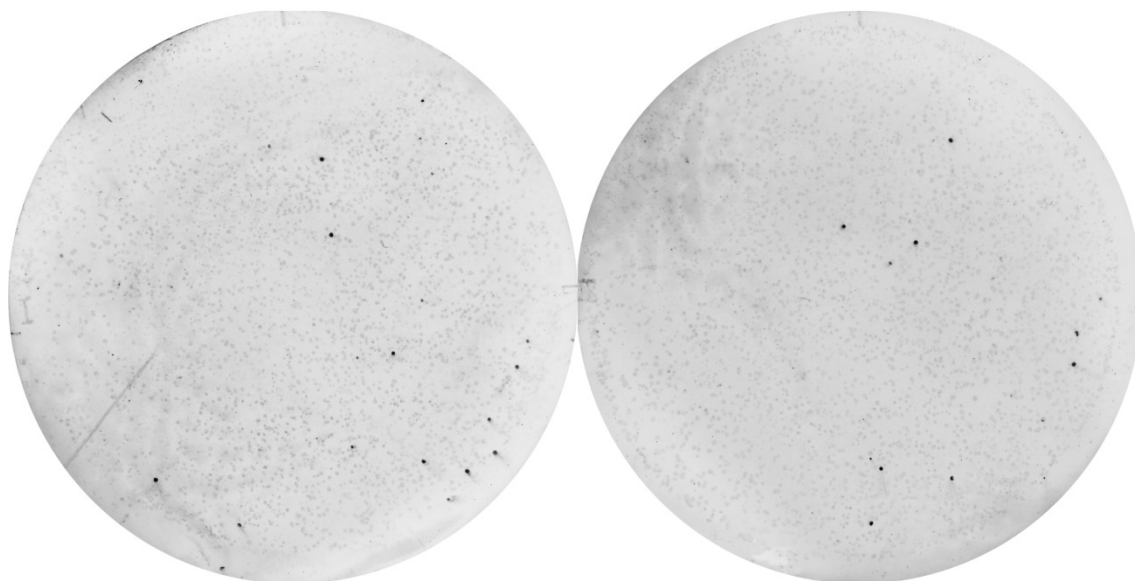
4.3.1. Zjištění přítomnosti genů pro ALAS v *E. coli* VCS257

Pro přibližné určení přítomnosti požadovaného biosyntetického shluku v jednotlivých koloniích VCS257/pESP446 (pOJ446+44229) jsme provedli hybridizaci s proubou detekující gen pro aminolevulinát syntázu. DNA fragment pro vytvoření této próby vznikl pomocí PCR metody pro screening ALS-ALL za využití degenerovaných primerů HEMA1 a HEMA3, kde jako templát sloužila chromozomální DNA izolovaná z kmene *S. espanaensis* (viz. 3.2.2.). Výsledný fragment jsme poté pro vizualizaci označili digoxigeninem pomocí kitu DIG DNA Labeling kit (viz. 3.2.4.) a použili jako próbu.



Obr. 17: Schéma vzniku kosmidové knihovny z plasmidu pOJ446 a fragmentů DSM44229.

Nylonovou membránu s lyzovanými koloniemi VCS257/pESP446 jsme hybridizovali s připravenou próbou (viz. 3.2.4.). Výsledek hybridizace prokázal minimálně 14 klonů pozitivních na přítomnost genů pro ALAS (obr. 18).



Obr. 18: Snímek dvou hybridizovaných nylonových membrán s lyzovanými koloniemi pozitivními na přítomnost genu pro ALAS.

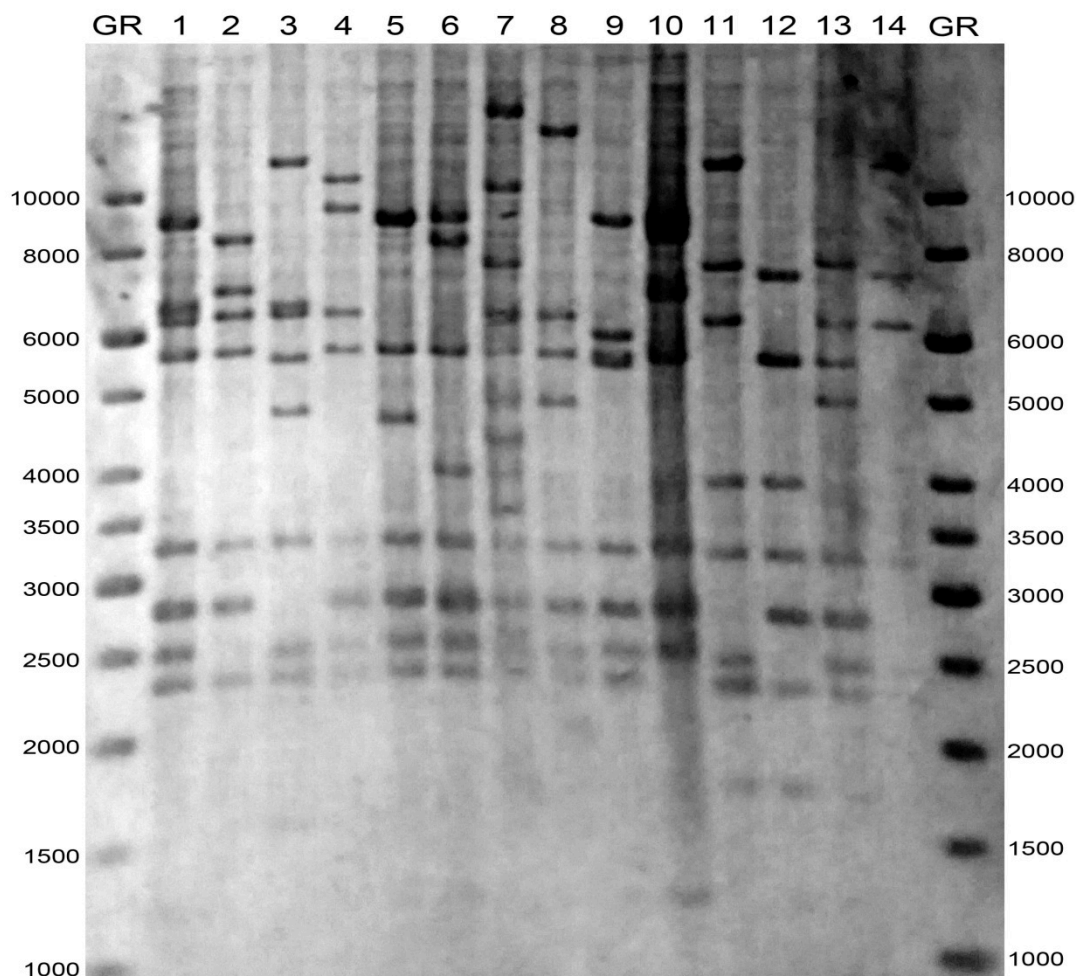
4.3.2. Ověření přítomnosti celého biosyntetického shluku

14 pozitivních kolonií jsme pro izolaci kosmidové DNA (viz. 3.2.1.) zaočkovali z původní misky s nitrocelulózovou membránou do tekutého LB média. Pro ověření přítomnosti celého biosyntetického shluku jsme kosmidy z jednotlivých klonů podrobili restriktivnímu štěpení enzymy *MluI* (obr. 19) nebo *KpnI* (obr. 20). Jelikož je tento genový shluk osekvenován, známe přesně jeho restriktivní profil pro tato štěpení (obr. 21).

Dle přítomnosti očekávaných fragmentů ve vzorcích po naštěpení těmito enzymy jsme mohli určit přibližný rozsah vložení genomové DNA u jednotlivých klonů (obr. 21).

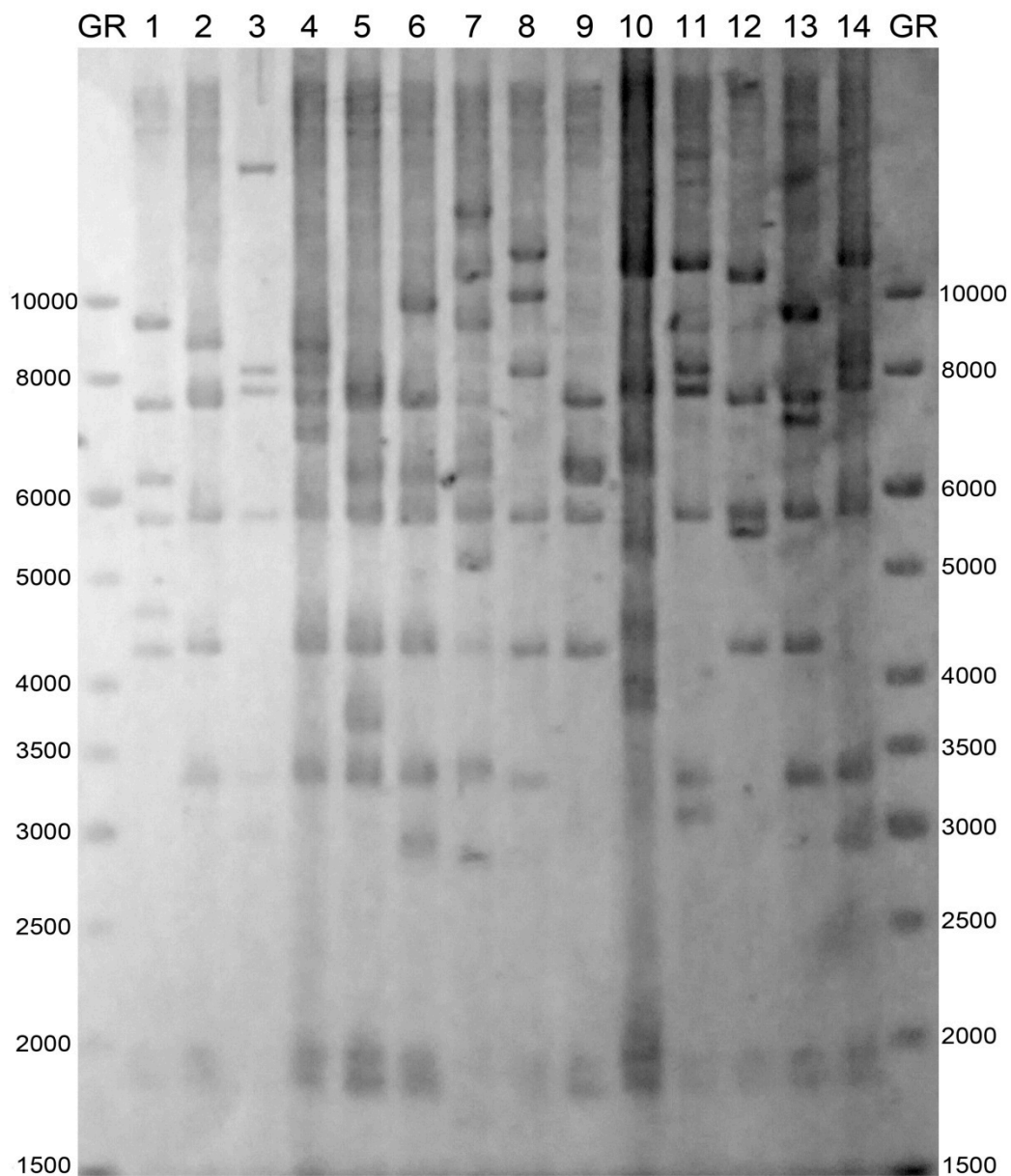
4.3.3. Přenos kosmidu do streptomycet

Pro další práci jsme zvolili klon *E. coli* VCS257 číslo 2 (VCS257/pESP446-2). Kosmid obsahující celý genový shluk jsme z VCS257/pESP446-2 izolovali a použili pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* ET12567 (viz. 3.2.3.1.), ze kterých byl dle protokolu REDIRECT (viz. 3.2.3.) přenesen konjugací do kmenů streptomycet pro heterologní produkci. Kmen ET12567 je deficientní v metylaci DNA a kóduje konjugační funkce pro mezidruhový přenos DNA z *E. coli* do streptomycet. Jako recipienty jsme použili produkční kmeny *S. coelicolor* M512, M1146 a M1154 a *S. lividans* K4-114 (viz. 3.1.5.). Rekombinantní klony jsme selektovali na rezistenci k apramycinu.



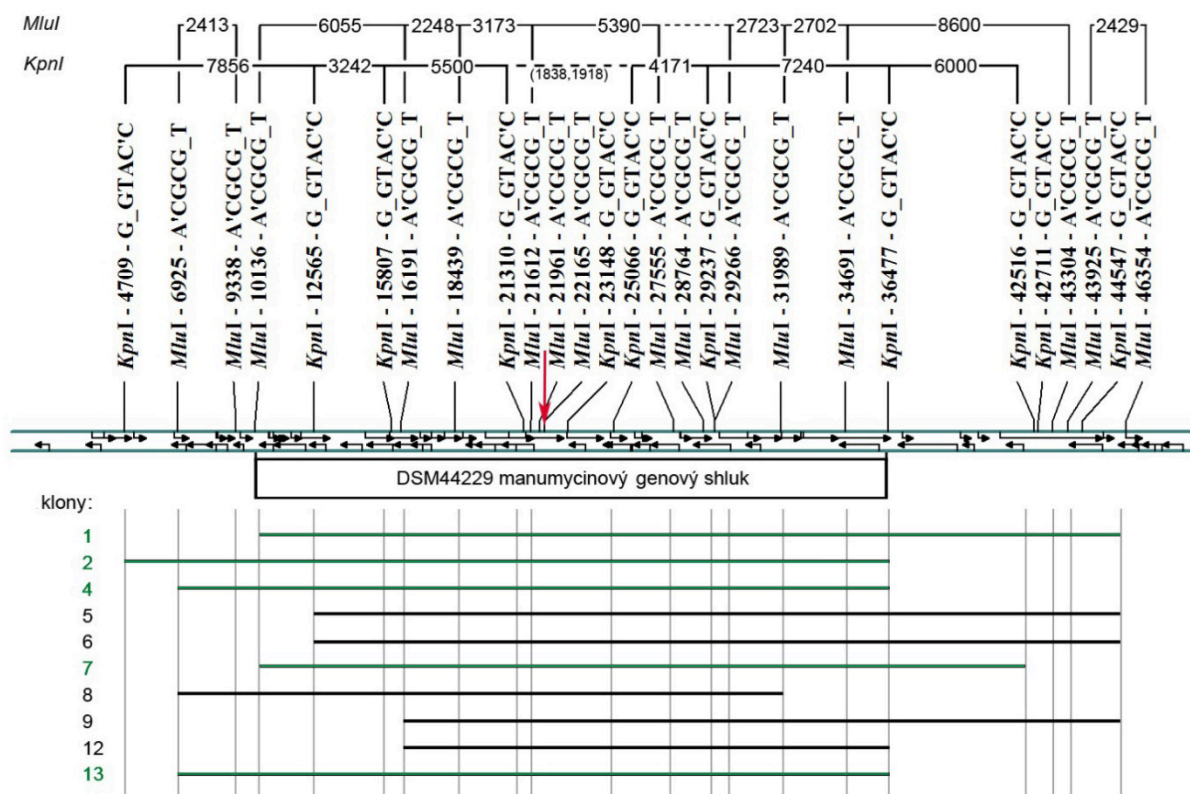
2413 bp			+	+				+			+		+	
6055 bp	+	+	+	+			+	+			+		+	+
2248 bp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3173 bp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
5390 bp	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
1209 bp	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	?	?	?	?
2723 bp														
2702 bp	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	
8600 bp	+			?	+	+			+	+				
2429 bp	+				+	+	+		+	+				

Obr. 19: Snímek gelové elektroforézy po štěpení enzymem *MluI* a přítomnost fragmentů určitých velikostí dle restriční mapy shluku z *DSM44229* ve vzorcích kosmidů, pozitivních na přítomnost genů pro *ALAS*. Fragment o velikosti 1209 bp je ve vzorcích špatně pozorovatelný. GR = GeneRuler 1 kb viz. 3.1.7.



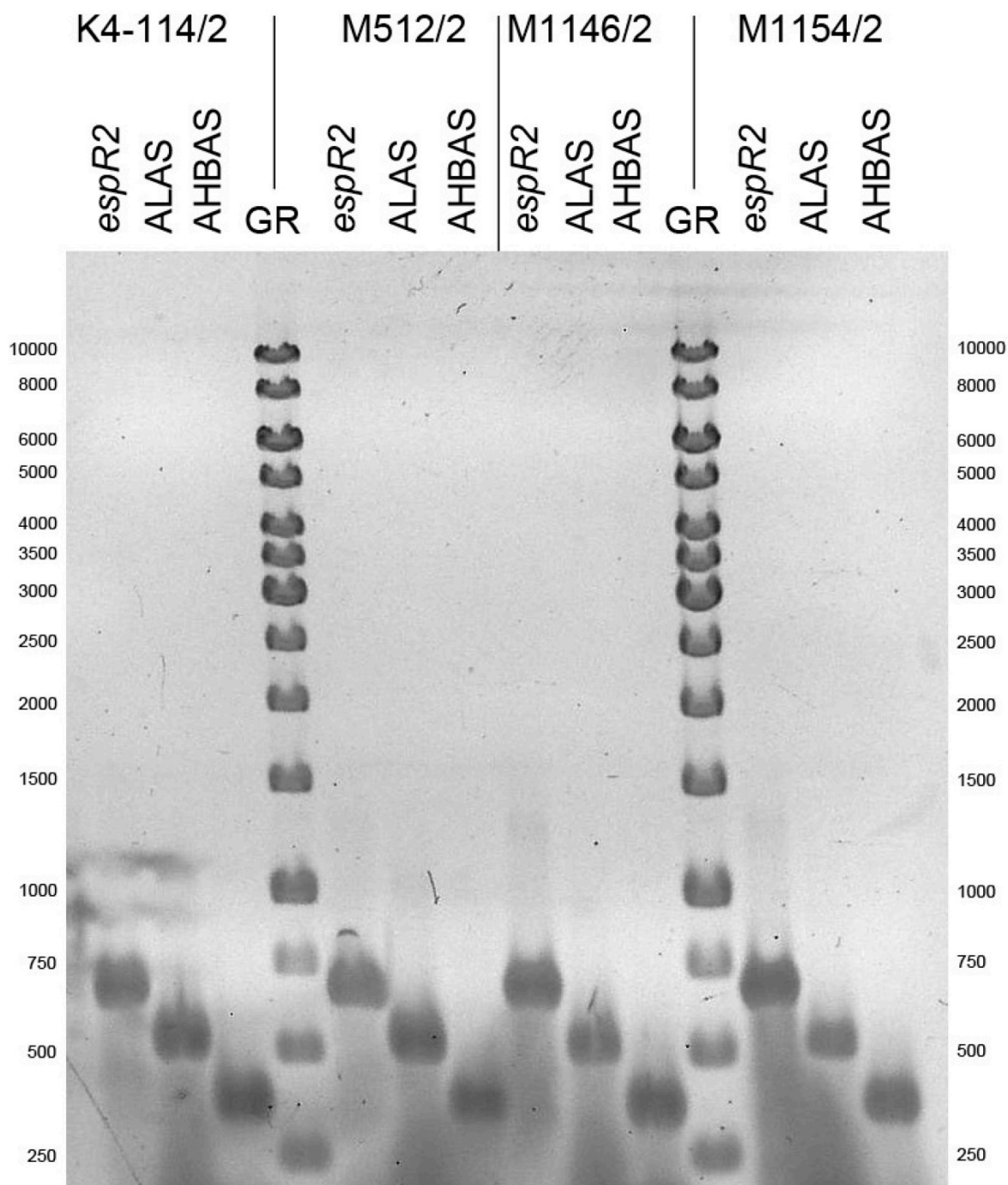
7856 bp		?	+								+			+
3242 bp		+	+	+	+	+	+	+			+		+	+
5503 bp	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
1838 bp	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1918 bp	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4171 bp	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+	
7240 bp	+	+		+	+	+	+		+			+	+	
6039 bp	+			?	+	+	+		+					

Obr. 20: Snímek gelové elektroforézy po štěpení enzymem KpnI a přítomnost fragmentů určitých velikostí dle restriční mapy shluku z DSM44229 ve vzorcích kosmidů, pozitivních na přítomnost genů pro ALAS. GR = GeneRuler 1 kb viz. 3.1.7.



Obr. 21: Předpokládaný rozsah vložené DNA z kmene DSM44229 v jednotlivých klonech pozitivních na přítomnost genů pro ALAS. Sestrojeno na základě nalezených fragmentů určitých velikostí. Zeleně jsou vyznačeny klony, u kterých je předpokládána přítomnost celého biosynetického shluku. Červená šipka vyznačuje přibližnou pozici genu pro ALAS.

Přítomnost celého genového shluku v klonech s kosmidem číslo 2 jsme kromě mapování restrikními endonukleázami ověřili pomocí koloniové PCR kitem FastStart PCR Master (viz. 3.2.2.) s cyklováním dle metody pro screening ALS-ALL (viz. 3.2.2.) a s využitím primerů pro 3 různé geny. Okrajové části shluku jsme amplifikovali primery AHBAS F a AHBAS R pro gen kódující 3,4-AHBA syntázu na jednom konci a primery ESPR2 R a ESPR2 F pro regulační gen *espR2* na druhém konci. Primery HEMA1 a HEMA3 jsme amplifikovali gen pro ALAS nacházející se v centrální části shluku. PCR směsi jsme analyzovali pomocí gelové elektroforézy a obarvili EtBr. Primery pro 3,4-AHBA syntázu generují fragment o velikosti 366 bp, pro ALAS fragment o 519 bp a primery pro gen *espR2* generují fragment o 619 bp (obr. 22).



Obr. 22: Snímek gelové elektroforézy PCR směsí po amplifikaci genu *espR2* a částí genů pro ALAS a 3,4-AHBAS. GR – GeneRuler 1 kb.

4.4. Analýza výsledného produktu heterologní exprese a optimalizace jeho produkce

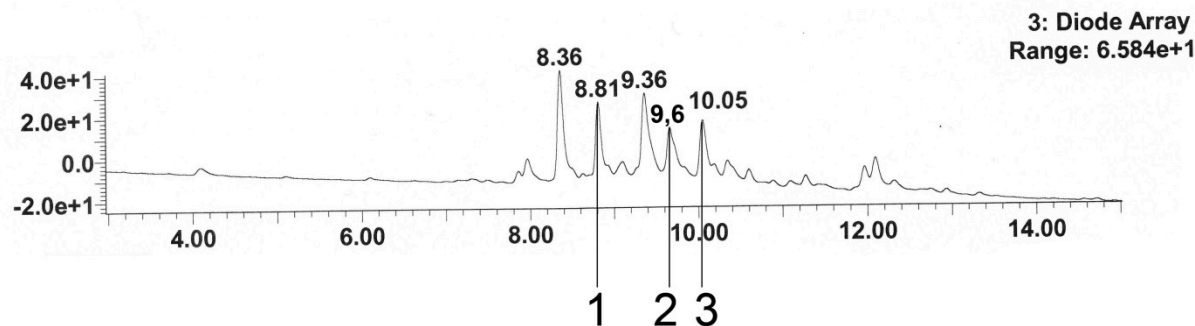
4.4.1. Charakterizace metabolického profilu heterologního producenta

Pro analýzu produkce sekundárních metabolitů jsme kmen K4-114/pESP446-2 zaočkovali do 50 ml YEME média s apramycinem a kultivovali na třepačce 2 dny při 28 °C. Takto připravené inokulum jsme v poměru 1:10 zaočkovali do SMM média s apramycinem do výsledného objemu 80 ml. Následovala 3-denní kultivace na třepačce při 28 °C. Stejným způsobem jsme provedli kultivaci kmene K4-114 bez vloženého kosmidu pro negativní kontrolu.

Po ukončení kultivace následovala EtAc extrakce metabolitů z kultivačního média i mycelia (viz. 3.2.4.) a složení výsledného vzorku bylo analyzováno pomocí UHPLC-UV(DAD)-ESI ToF MS (viz. 3.2.4.) (obr. 23).

Chromatogram složek extraktu metabolitů prokázal oproti neupravenému kmeni K4-114 přítomnost 3 nových látek v připraveném kmeni K4-114/pESP446-2. Absorbční spektrum s maximem kolem vlnové délky 355 nm a odhadovaný souhrný vzorec nalezených látek s retenčními časy 8,81, 9,6 a 10,05 minuty odpovídá látkám manumycinového typu. Pomocí UHPLC-UV(DAD)-ESI ToF MS metody byla zjištěna molekulová hmotnost a elementární složení těchto látek. Následně byla provedena tzv. fragmentace ve zdroji, kdy dochází za zvýšeného napětí ve zdroji k rozpadu původní molekuly na fragmenty, a díky níž je možné získat bližší informace o struktuře sledovaných látek. Fragmentace ve zdroji byla úspěšně provedena u dvou menších nalezených metabolitů jak v pozitivním, tak v negativním ionizačním módu: Nejprve při napětí ve zdroji ± 100 V (obr. 24A a 25A) a pro zpřesnění odhadu složení horního řetězce také při napětí ± 50 V (obr. 24B a 25B). U třetího největšího metabolitu nebyla fragmentace ve zdroji provedena z důvodu nedostatečné separace tohoto metabolitu od koeluujičích látek, což vedlo k nejasnostem o původu vzniklých fragmentů ve fragmentačním spektru. Získaná fragmentační spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru Mass Fragment (Waters, ČR), který je schopen s vysokou pravděpodobností určit elementární složení fragmentů ve spektru včetně pravděpodobnosti jejich vzniku z původní molekuly. Data získaná metodou fragmentace ve zdroji potvrzují přítomnost látek manumycinového typu s typickými štěpy představujícími C_5N jednotku a dolní řetězec s C_5N jednotkou, který má patrně strukturu tetraenu jako u kolabomycinů. Z molekulové hmotnosti celé molekuly a ze získaných dat z fragmentace ve zdroji pak lze odvodit i elementární složení horního řetězce. Ten je ve srovnání se známými kolabomycinami významně menší u obou látek podrobených fragmentační analýze. Ze získaných dat však nelze, kvůli vysoké variabilitě, odhadnout jeho nasycení a větvení. Ani jedna z nových látek nemá molekulovou

hmotnost shodnou s žádným z dříve charakterizovaných manumycinů a pravděpodobně se tedy jedná o zcela nové, dosud nepopsané manumyciny.



1: $t_r = 8,81 \text{ min}$

ES+ 509,2257

ES- 507,2173

$C_{28}H_{32}N_2O_7$

2: $t_r = 9,6 \text{ min}$

ES+ 523,2433

ES- 521,2343

$C_{29}H_{34}N_2O_7$

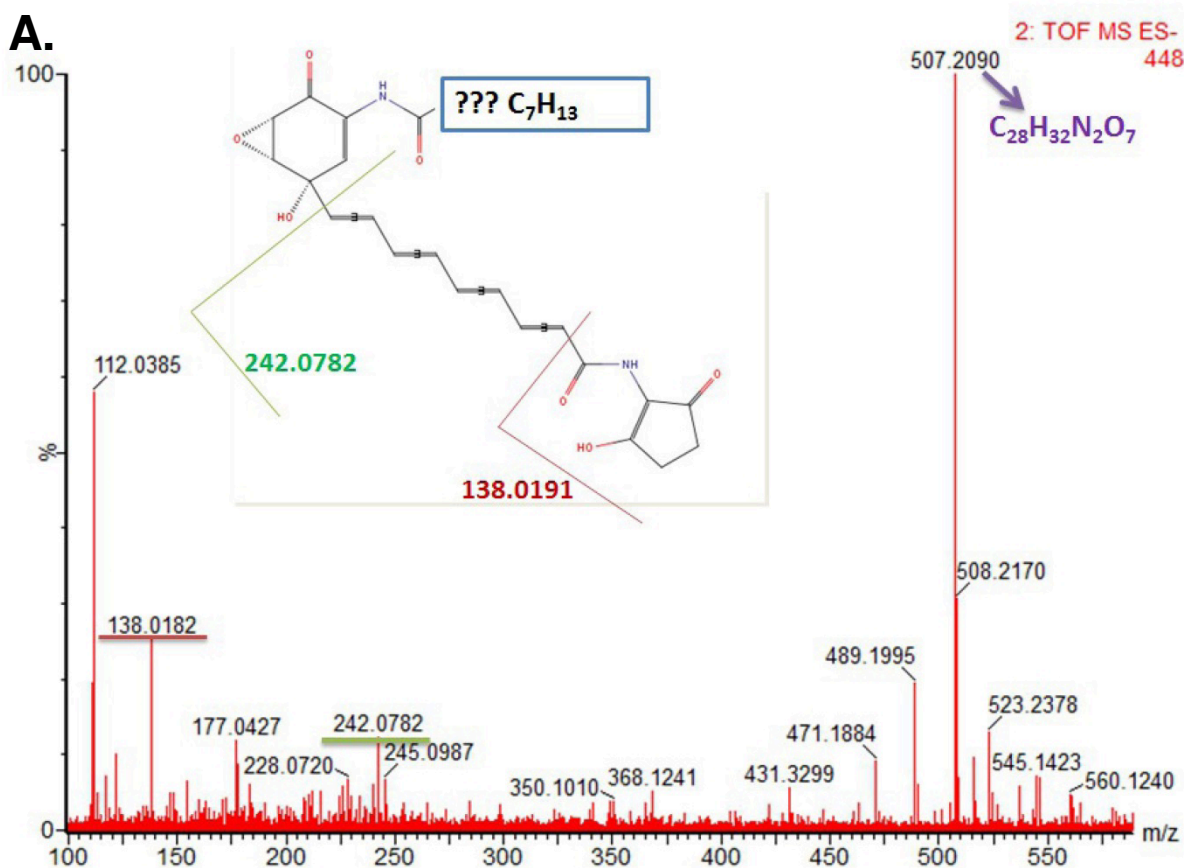
3: $t_r = 10,05 \text{ min}$

ES+ 535,2416

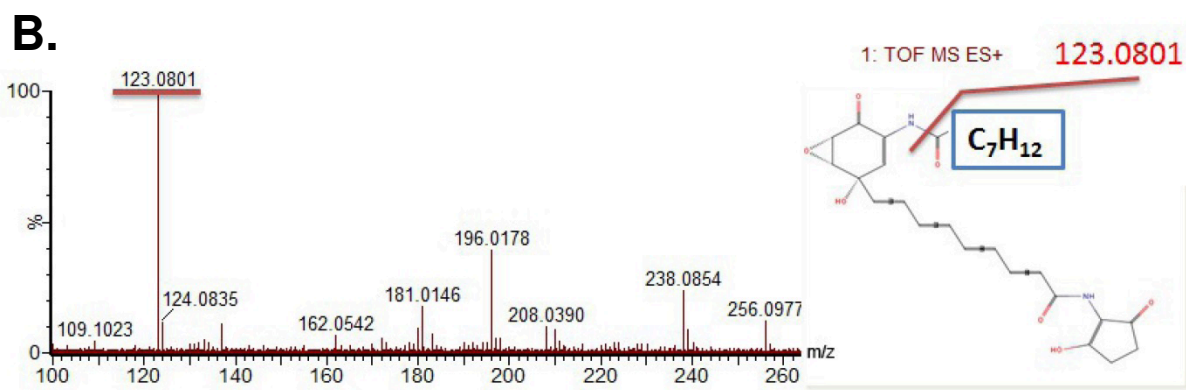
ES- 533,2308

$C_{30}H_{34}N_2O_7$

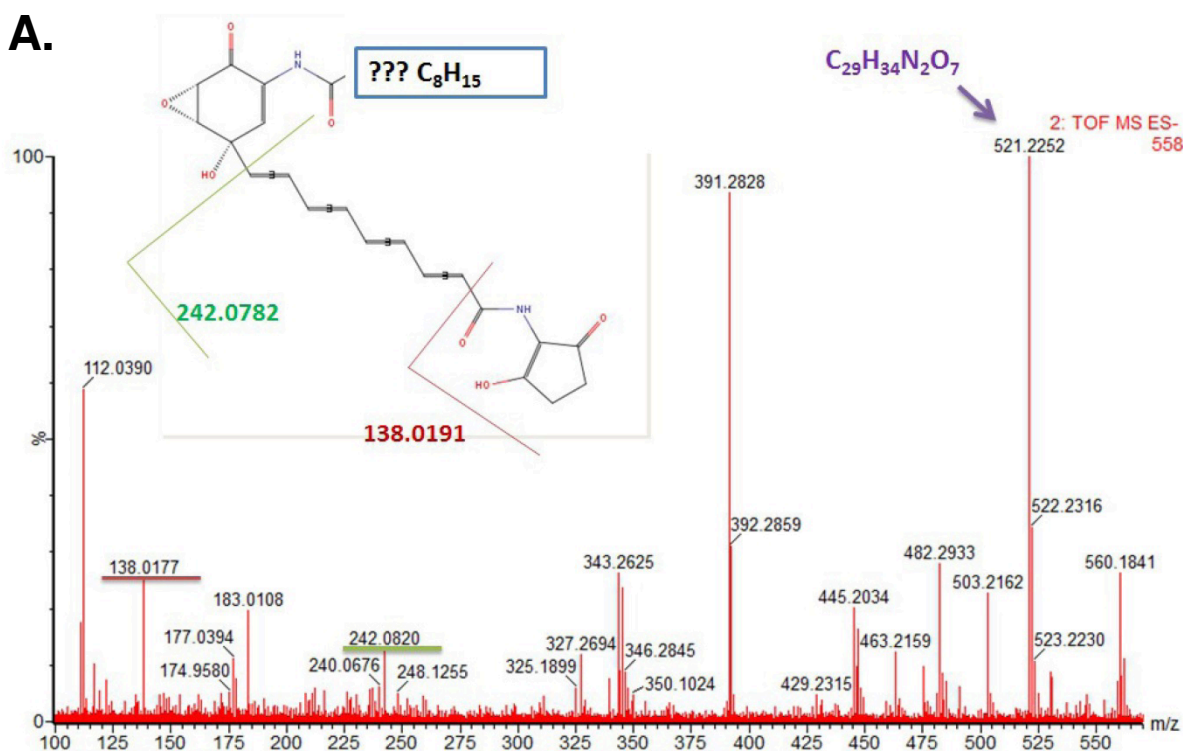
Obr. 23: UHPLC-UV(DAD) analýza frakce prvního extraktu metabolitů kmene K4-114/pESP446-2 (nahore). Vlastnosti 3 nových látek a jejich pravděpodobné elementární složení.



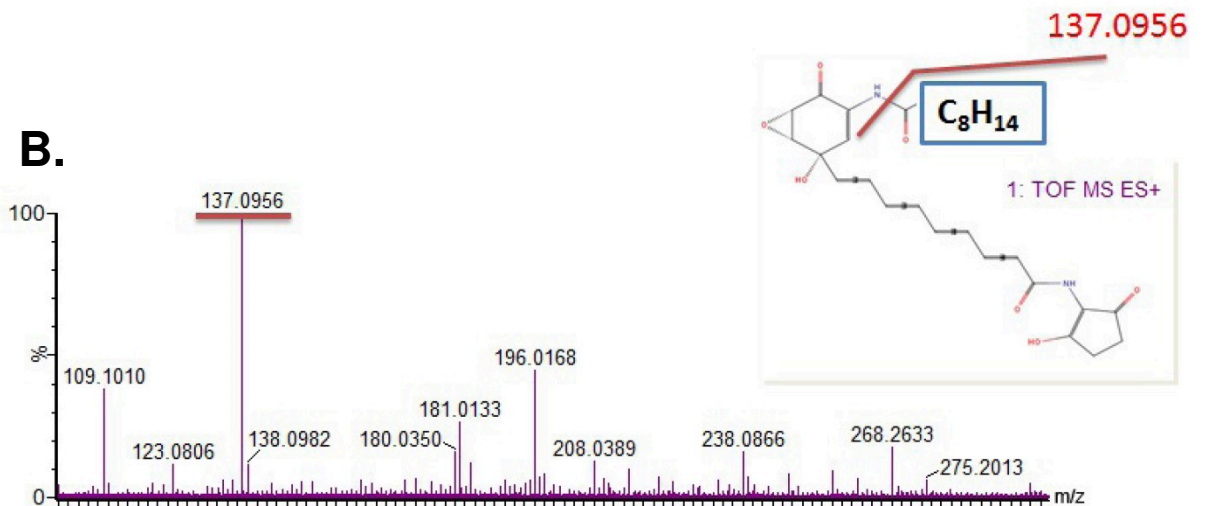
Obr. 24: Pokračování a popis na další straně.



Obr. 24: MS fragmentační spektra (fragmentace ve zdroji) metabolitu s retenčním časem 8,8 minuty získaná UHPLC-UV(DAD) ToF MS analýzou. Hmotnostní spektrum zachycuje vznik jednotlivých štěpných produktů. **A:** fragmentace při napětí -100 V (ES-) a odhadnuté struktury molekuly (horní řetězec pouze elementární složení). **B:** fragmentace při +50 V (ES+) zachycuje fragment odpovídající hornímu řetězci.



Obr. 25: Pokračování a popis na další straně.



Obr. 25: MS fragmentační spektra (fragmentace ve zdroji) metabolitu s retenčním časem 9,6 minuty získaná UHPLC-UV(DAD) ToF MS analýzou. Hmotnostní spektrum zachycuje vznik jednotlivých štěpných produktů. **A:** fragmentace při napětí -100 V (ES-) a odhadnuté struktury molekuly (horní řetězec pouze elementární složení). **B:** fragmentace při +50 V (ES+) zachycuje fragment odpovídající hornímu řetězci.

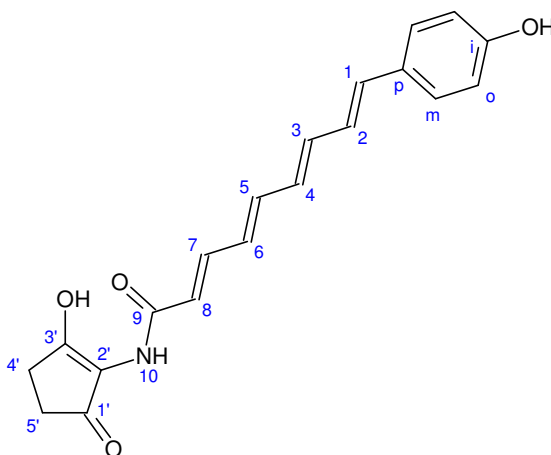
Produkce těchto metabolitů v připraveném kmeni K4-114/pESP446-2 byla však z neznámého důvodu nestálá a kvůli vysokému obsahu monoacylglycerolů, které jsou od manumycinových látek jen těžko oddělitelné běžnými separačními technikami, nedostačovala k důkladnějšímu přečištění, což komplikovalo přesné určení struktury pomocí NMR. Z tohoto důvodu jsme se produkci pokusili zvýšit a stabilizovat vhodnými genetickými zásahy.

4.4.1.1. NMR analýza struktury

Jelikož extrakty obsahují také značné množství jednotlivých částí sledovaných molekul jakožto degradativních produktů a meziproduktů, podařilo se z extraktu purifikovat alespoň strukturu dolního řetězce s částí centrální jednotky a pomocí NMR (viz. 3.2.4.) určit přesnou strukturu této molekuly (obr. 26, tab. 3). Výsledek této analýzy prováděné na izolátu, který se podařilo získat Ing. S. Pospíšilovi, CSc. (Laboratoř molekulární biologie aktinomycet, MBÚ AV ČR, v.v.i), potvrdil tetraenovou strukturu dolního řetězce předpokládanou na základě fragmentace. Kompletní manumycinové produkty se bohužel zatím nepodařilo izolovat v čistotě a množství dostačujícím pro určení struktury pomocí NMR, proto nám zatím chybí informace o struktuře horních polyketidových řetězců.

Atom#	δ_C	m	δ_H	m	J_{HH} [Hz]
<i>ipso</i>	155.72	s	-	-	-
<i>ortho</i>	115.72	d	6.811	m	-
<i>meta</i>	128.26	d	7.337	m	-
<i>para</i>	129.92	s	-		
<i>i</i> -OH	-		n.d.		
1	135.14	d	6.629	d	15.4
2	126.53	d	6.742	dd	10.7, 15.4
3	138.55	d	6.592	dd	10.7, 14.8
4	131.03	d	6.396	dd	11.1, 14.8
5	142.26	d	6.693	dd	11.1, 14.8
6	128.92	d	6.360	dd	11.8, 14.8
7	144.57	d	7.379	dd	11.8, 14.6
8	119.11	d	5.951	d	14.6
9	165.73	s	-	-	-
10	-		n.d.		
1'	197.30	s	-		
2'	115.01	s	-		
3'	173.67	s	-		
4'	25.59	t	2.620	m	-
5'	32.12	t	2.543	m	-
3'-OH	-	-	13.718	s	-

Tab. 3: NMR data naměřená pro 1H a ^{13}C vzorku obsahujícího molekuly dolního řetězce. Měřeno při 700.13 MHz pro 1H a při 176.05 MHz pro ^{13}C v $CDCl_3$ při 20°C.



Obr. 26: Výsledná struktura dolního řetězce nových molekul určená na základě dat z analýzy pomocí NMR.

4.4.2. Stimulace produkce nových metabolitů u kmene K4-114/pESP446-2

Pro docílení zvýšené a stabilní produkce žádaných metabolitů jsme zvolili metodu nadexprese dvou regulačních genů (*espR1* a *espR2*), ležících na okraji genového shluku z DSM44229 (viz. obr. 13). Oba tyto geny jsou vysoce homologní ke genům *asuR1* a *asuR2* z genového shluku pro biosyntézu asukamycinu, kde jsou hlavními regulátory (Xie *et al.* 2012).

4.4.2.1. Nadexprese regulačních genů *espR1* a *espR2*

Jednotlivé oblasti jsme nejprve amplifikovali pomocí PCR s využitím navržených primerů ESPR2 R a ESPR2 F pro gen *espR2*, ESPR1 R a ESPR1 F pro gen *espR1* a pro amplifikaci obou regulačních genů současně primerů ESPR1 F a ESPR2 R. Tyto primery byly navrženy tak, aby nasedaly nedaleko regulačních oblastí a obsahovaly restriční místa pro následné klonování (obr. 27). Jako templát pro PCR reakci jsme použili původní chromozomální DNA izolovanou z kmene DSM44229 a kvůli vysokému poměru GC párů jsme k provedení zvolili GC-RICH PCR metodu (viz. 3.2.2.), abychom snížili riziko vzniku mutací ve výsledném amplifikovaném fragmentu.

Výsledné PCR fragmenty jsme dle protokolu pro klonování „natupo“ (viz. 3.2.1.) vložili přes restriční místo pro *EcoRV* do plasmidů pBluescript SK+ (pBlueEspR). Těmi jsme pak elektroporací transformovali připravené kompetentní buňky *E. coli* SURE (viz. 3.2.3.1.). Selektce transformantů probíhala na LB miskách s ampicilinem, IPTG a X-gal. Pro ověření, zda nebyly během PCR do genů vneseny mutace, byly plasmidy izolované z úspěšných transformantů osekvenovány.

Osekvenované fragmenty jsme z plasmidu pBluescript SK+ vyštěpili restričními enzymy podle primerů použitých pro jejich amplifikaci, a poté oddělili gelovou elektroforézou. U genu *espR2* byla pro vyštěpení použita jiná restriční místa, která nám umožnila po dalším klonovacím kroku eliminaci prázdných vektorů štěpením po ligaci (viz. dále). Fragmenty o velikosti odpovídající požadovaným genům jsme z gelu izolovali metodou GLASSMILK (viz. 3.2.1.) a po fenol-chloroformové extrakci jsme je přes stejná restriční místa vložili pomocí T4 DNA ligázy do naštěpeného defosforylovaného plasmidu pJ4070, nesoucího silný konstitutivní streptomycetový promotor *ermE** (pESPR-4070). Gen *espR2* byl vložen za využití restričních enzymů *HindIII* a *BamHI*, gen *espR1* pomocí enzymů *SphI* a *BamHI*. Část obsahující oba geny přes restriční místa pro *BamHI* a *HindIII* (obr. 27). Hotovými plasmidy jsme poté elektroporací transformovali kompetentní buňky *E. coli* GM2929 (viz. 3.2.3.1.). Tento kmen *E. coli* nemetyluje DNA, což usnadňuje její následné klonování ve streptomycetách. Úspěšné transformanty jsme seletovali na miskách s LA médiem a ampicilinem. Přítomnost požadovaných genů v plasmidech izolovaných z transformantů

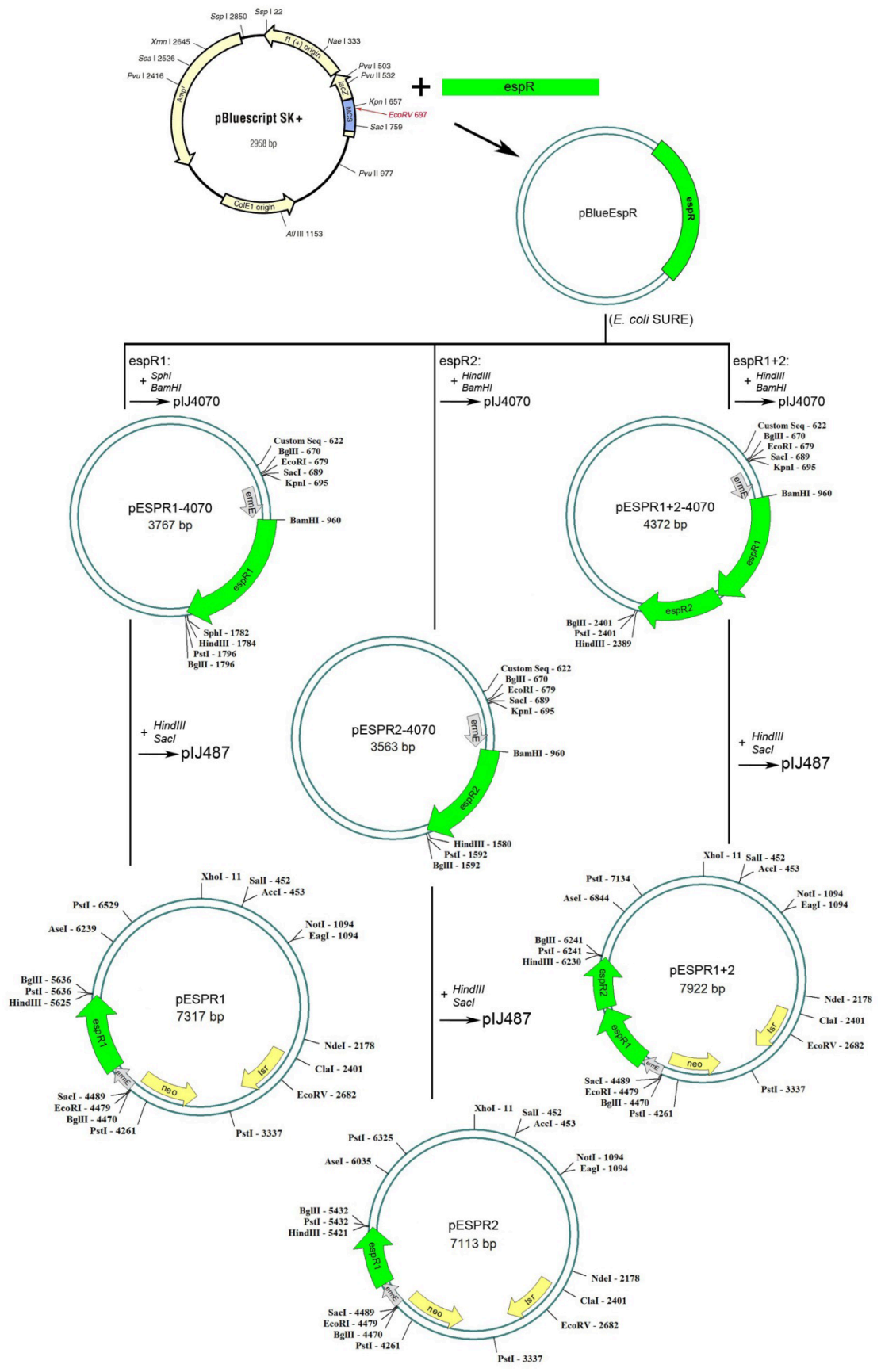
jsme ověřili jejich opětovným restrikcčním vyštěpením a následně gelovou elektroforézou (obr. 28A).

Fragmenty jsme z těchto plasmidů znovu vyštěpili, tentokrát restrikcčními enzymy *HindIII* a *SacI* tak, aby navíc obsahovaly konstitutivní promotor *ermE** z plasmidu pJJ4070. Požadované fragmenty jsme poté opět separovali gelovou elektroforézou, izolovali metodou GLASSMILK (viz. 3.2.1.) a ligovali T4 DNA ligázou do připraveného plasmidu pJJ487. Plasmid pJJ487 jsme před tím naštěpili enzymy *HindIII* a *SacI* a defosforylovali. Po ligaci jsme ligázu tepelně inaktivovali při 70 °C po dobu 10 minut a plasmidy štěpili restrikcčním enzymem *XbaI*, jehož restrikcční místo bylo u rekombinantních konstruktů během vkládání fragmentů vyřazeno. Linearizovány byly tedy pouze původní prázdné plasmidy, čímž jsme omezili vznik transformantů bez požadovaných fragmentů a značně zvýšili frekvenci úspěšných transformantů s rekombinantními konstrukty.

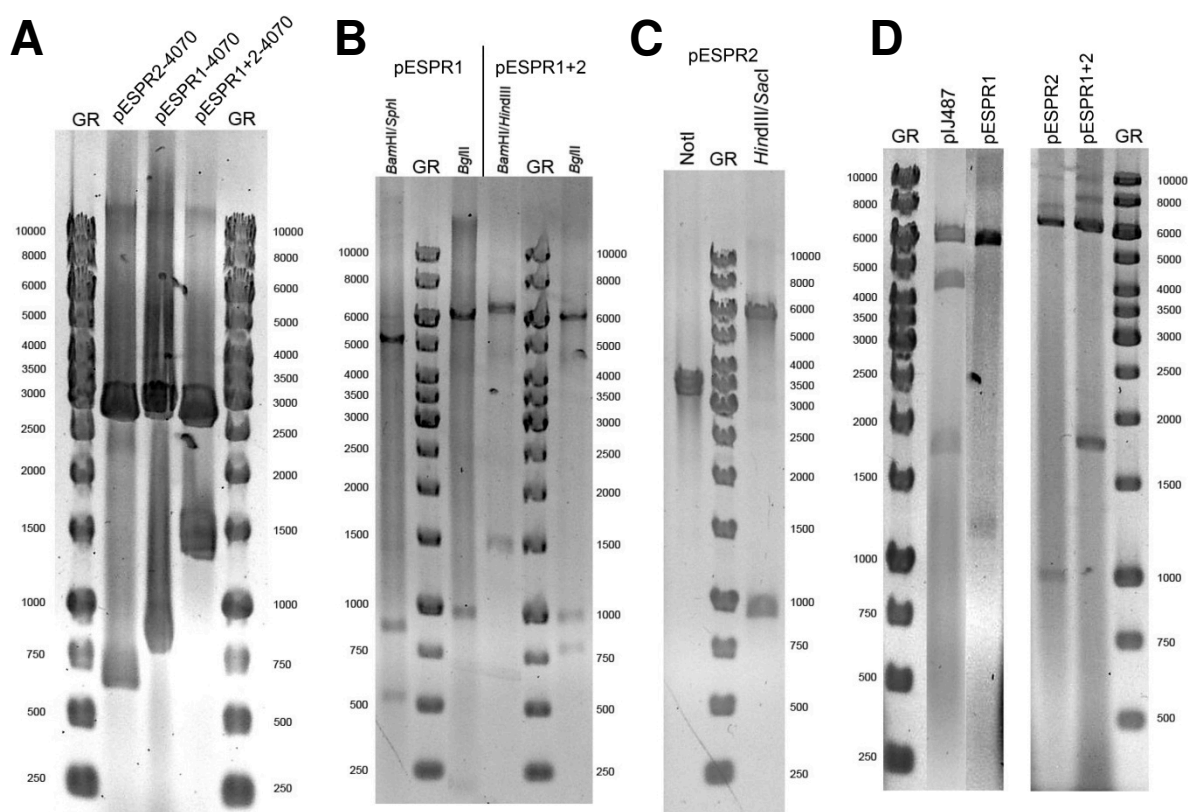
Hotovými plasmidy (dále pESPR) jsme transformovali protoplasty připravené z kmene *S. lividans* TK24 (viz. 3.2.3.1.). Protoplasty jsme pro jejich regeneraci vyseli na vysušené R2YE misky bez antibiotik a kultivovali přes noc při 28 °C. Druhý den jsme kvůli selekci transformantů misky přelili roztokem thiostreptonu (750 µg na misku) a kultivovali dalších několik dní, než se objevily kolonie. Přítomnost genů v jednotlivých koloniích jsme ověřili pomocí koloniové PCR (viz. 3.2.2.) (obr. 29A). Pozitivní kolonie jsme přeočkovali na nové R2YE misky s thiostreptonem a poté do 5 ml YEME s thiostreptonem pro izolaci plasmidu ze streptomycet (viz. 3.2.1.). Přítomnost požadovaných genů v plasmidech jsme znovu ověřili štěpením různými enzymy dle jejich restrikcčních map. Produkty štěpení jsme analyzovali gelovou elektroforézou (obr. 28B,C).

Ověřenými expresními konstrukty jsme nakonec transformovali protoplasty připraveného kmene K4-114/pESP446-2 (viz. 3.2.3.1.), které jsme následně vyseli na vysušené R2YE misky s apramycinem. Kultivace probíhala přes noc při 28 °C a druhý den byly misky přelity roztokem thiostreptonu (750 µg na misku). Kultivace pokračovala dalších několik dní, dokud se neobjevily kolonie. Narostlé kolonie jsme otestovali na přítomnost genů koloniovou PCR (obr. 29B) a pozitivní klony jsme přeočkovali na nové R2YE misky s apramycinem a thiostreptonem a následně do YEME média se stejnými antibiotiky na izolaci plasmidu pro další ověření přítomnosti regulačních genů *espR* restrikcčním štěpením (obr. 28D). Ověřené kmeny K4-114/pESP446-2,pESPR byly tímto připraveny pro fermentační produkci manumycinových látek. Pro kontrolu byl připraven kmen K4-114/pESP446-2,pJJ487, transformovaný prázdným vektorem pJJ487.

Za účelem porovnání produkce nových látek takto upravenými kmeny K4-114/pESP446-2,pESPR a K4-114/pESP446-2,pJJ487 byla za stejných podmínek u všech provedena extrakce metabolitů (viz. 3.2.4.), přičemž během extrakce byla pro porovnání zvážena suchá hmotnost mycelia z použitých kultur.

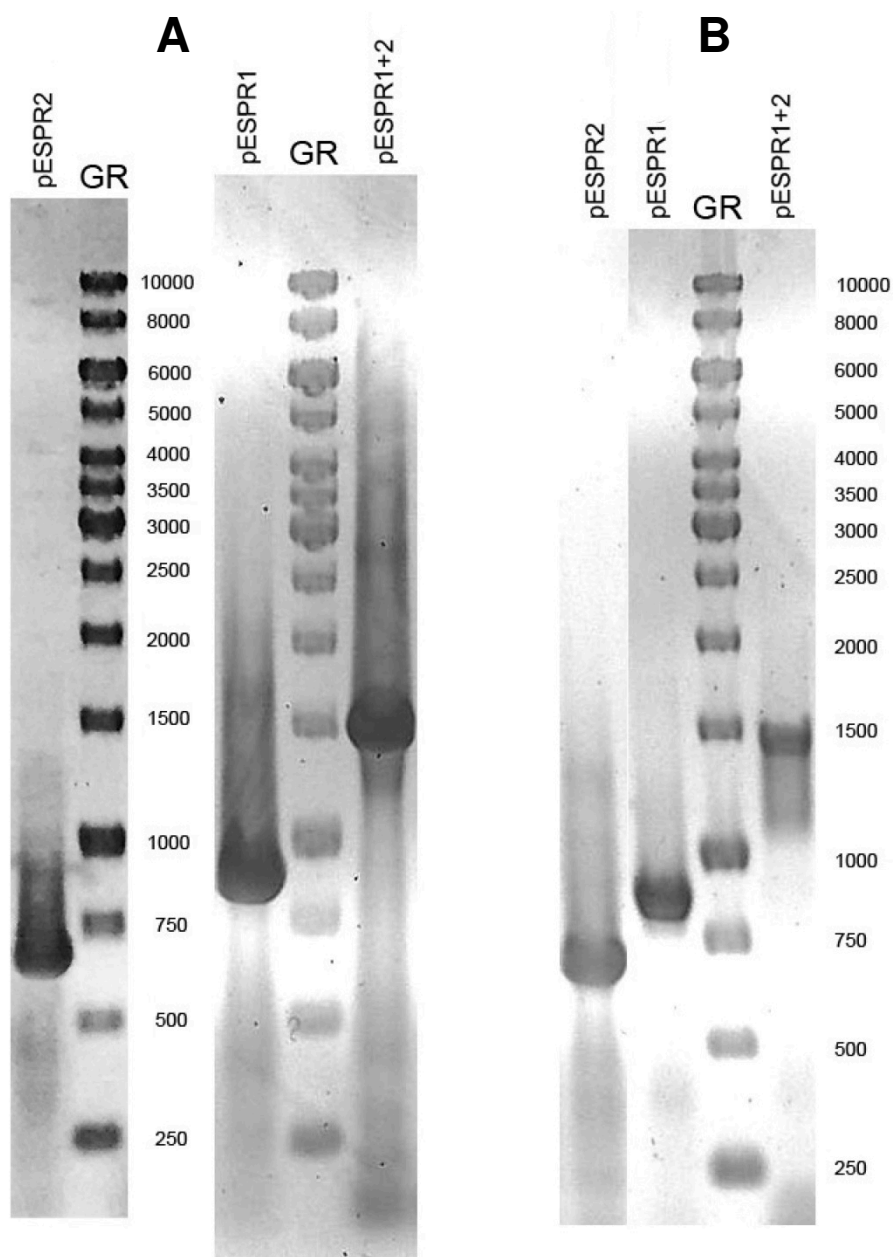


Obr. 27: Schéma všech klonovacích kroků prováděných za účelem nadexprese regulačních genů *espR1*, *espR2* a *espR1+2* v produkčním kmeni K4-114/pESP446-2.



Obr. 28: Snímky gelových elektroforéz z kontrolních štěpení jednotlivých klonování během nadexprese regulačních genů *espR1* a 2. **A:** vyštěpení jednotlivých genů z plasmidů *pESPR-4070* restričními enzymy použitými pro jejich vložení do vektoru. *HindIII* a *BamHI* pro gen *espR2*, *SphI* a *BamHI* pro gen *espR1* a *BamHI* a *HindIII* pro geny *espR1+2*. **B,C:** kontrolní restriční štěpení plasmidů *pESPR* po transformaci protoplastů *S. lividans* TK24. **D:** kontrolní restriční štěpení plasmidů *pJ487* a *pESPR* po transformaci protoplastů upraveného kmene *S. lividans* K4-114/*pESP446-2*. Prázdný plasmid byl štěpen enzymy *XbaI* a *XhoI*, z ostatních plasmidů byly jednotlivé geny vyštěpeny pomocí enzymů *HindIII* a *SacI*. GR – GeneRuler 1 kb (viz. 3.1.7.)

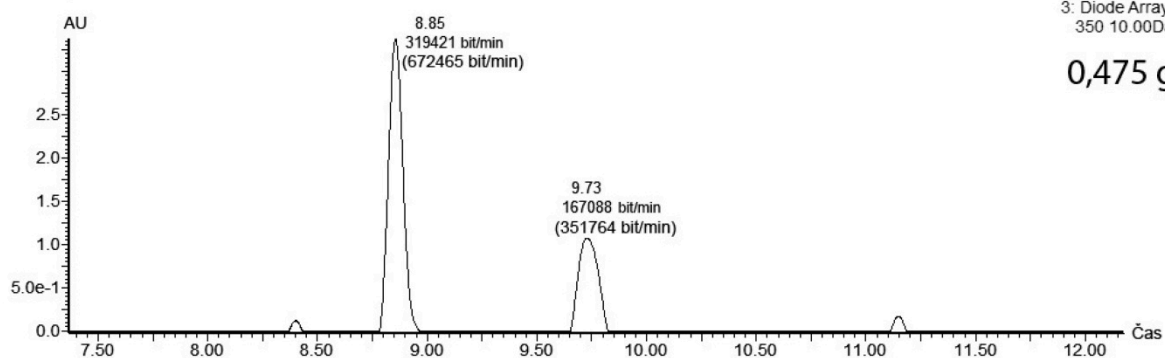
Prvotní analýza složek těchto extraktů pomocí UHPLC-UV(DAD) poukázala na zvýšenou produkci nově identifikovaných látek u kmene K4-114/*pESP446-2*,*pESPR1* s nadexprimovaným regulačním genem *espR1*. Naproti tomu však došlo k úplné inhibici produkce u ostatních kmenů s nadexprimovanými geny *espR2* a *espR1+2* a také u kontrolního kmene K4-114/*pESP446-2*,*pJ487* transformovaného samotným plasmidem *pJ487* (obr. 30).



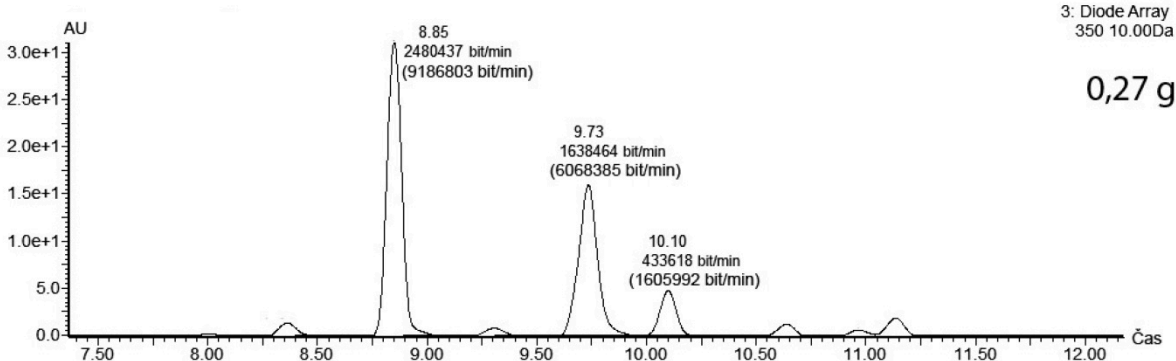
Obr. 29: Snímky gelových elektroforéz produktů koloniové PCR zaměřené na přítomnost jednotlivých regulačních genů *espR*. **A:** koloniová PCR kmenů *S. lividans* TK24 transformovaných plasmidy *pESPR*. **B:** koloniová PCR kmenů *S. lividans* K4-114/*pESP446-2,pESPR*

Analýza extraktů pomocí TLC (viz. 3.2.4.) zaznamenala látky s podobnou pohyblivostí u extraktů, získaných z kmenů K4-114/*pESP446-2* a K4-114/*pESP446-2,pESPR1*, včetně jedné látky detekované jen u kmene K4-114/*pESP446-2,pESPR1*. TLC dále poukázala na značnou podobnost mezi kmeny, u kterých byla pozorována inhibice produkce a divokým produkčním kmenem *S. lividans* K4-114 (obr. 31).

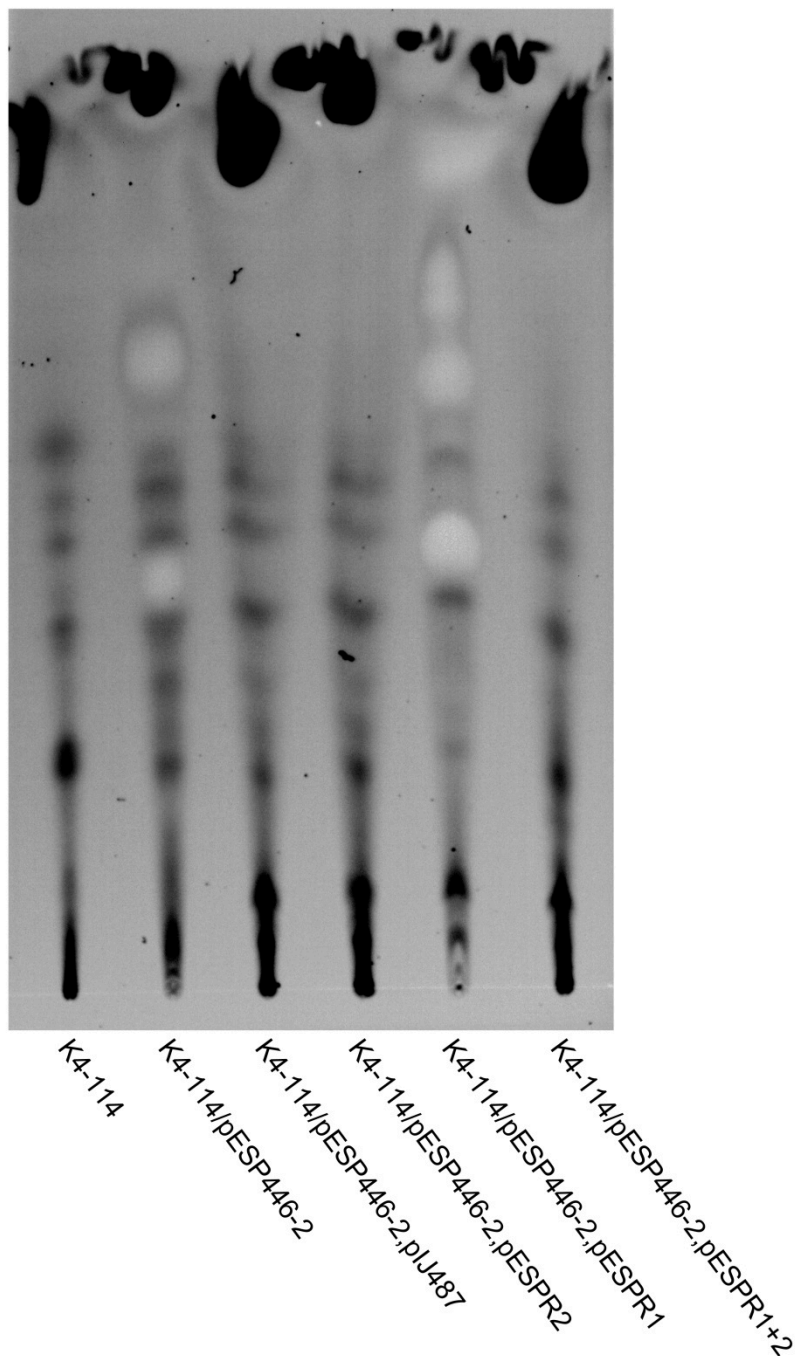
K4-114/pESP446-2



K4-114/pESP446-2,pESPR1



Obr. 30: UHPLC-UV(DAD) analýza extraktů metabolitů kmene *S. lividans* K4-114/pESP446-2 a kmene K4-114/pESP446-2,pESPR1 s nadexpresí genu *espR1*. Vpravo uvedena hmotnost mycelia z kultury použité při extrakci. U ostatních kmenů, včetně kontrolního kmene transformovaného pouze plasmidem *plJ487*, nebyla zaznamenána žádná produkce požadovaných látek. U signálů je uveden retenční čas, plocha peaku a plocha peaku přepočtená na 1 gram mycelia.



Obr. 31: Snímek TLC extraktů získaných z divokého produkčního kmene *S. lividans* K4-114, původního upraveného kmene *S. lividans* K4-114/pESP446-2 a kmenů K4-114/pESP446-2,pESPR s nadexprimovanými regulačními geny *espR*, včetně kontrolního kmene K4-114/pESP446-2,pIJ487. Světlé skvrny u vzorků K4-114/pESP446-2 a K4-114/pESP446-2,pESPR1 odpovídají sledovaným látkám, nalezeným také pomocí UHPLC-UV(DAD), včetně třetí, detekované v obou případech jen u vzorku K4-114/pESP446-2,pESPR1. K4-114 byl kultivován bez antibiotik, K4-114/pESP446-2 kultivován s apramycinem a ostatní byly kultivovány s apramycinem a thiostreptonem. Vyfoceno při UV o vlnové délce 366 nm.

5. Diskuse

Sekundární metabolismus vláknitých bakterií řádu *Actinomycetales* představuje obrovský rezervoár dosud neobjevených látek s velkým potenciálem průmyslového využití. Tyto organismy v minulosti posloužily k objevení většiny klinicky používaných antibiotik a dalších biologicky aktivních látek. Stále se však jedná jen o malé procento podobných látek, které nám mohou tyto organismy do budoucna poskytnout. Většina z nich zůstává neodhalena, protože jsou geny pro jejich expresi v divokých kmenech neaktivní. Účel nebo mechanismus inaktivace těchto „kryptických“ genových shluků není dodnes objasněn. Různé metody jejich aktivace jsou v posledních letech často zmiňovány, a to nejen kvůli zvyšující se potřebě nových antibiotik, ale také za účelem získávání různých protizánětlivých a jinak biologicky aktivních látek.

Naším zájmem jsou především látky manumycinového typu. I přesto, že se jedná o malé, relativně jednoduché molekuly, vykazují tyto látky značnou variabilitu, a to nejen strukturní, ale i na úrovni jejich biologických aktivit. Struktury nesoucí některé z těchto aktivit jsou dnes již identifikované, jako například epoxidová skupina na *m*-C₇N jednotce jako pravděpodobný nositel antibakteriální aktivity. Z hlediska protinádorové aktivity se zdá být důležitá úroveň větvení horního řetězce, který ovlivňuje také výskyt aktivit protizánětlivých. Dokonalé poznání funkcí, biosyntézy a vlivu jednotlivých struktur molekuly na její biologické aktivity by s využitím různých modifikačních metod, například kombinatorní biosyntézy, mohlo v budoucnu vést k cílenému vytváření látek s přesně požadovanými aktivitami.

Cílem této práce byla aktivace genového shluku, nalezeného v osekvenovaném genomu organismu *Saccharothrix espanensis* DSM44229. Scanningem byla zjištěna přítomnost manumycinového genového shluku v jeho genomu. Ve srovnání se dvěma nejlépe prozkoumanými genovými shluky pro syntézu asukamycinu a kolabomycinu E je tento shluk kratší a oproti oběma postrádá hned několik genů. Vzhledem k asukamycinovému biosyntetickému shluku postrádá shluk nalezený u *S. espanensis* DSM44229 4 transkripčně regulační geny (*asuR3-6*), všechny geny skupiny *asuB* (1-4), pro syntézu cyklohexyl-CoA, specifické startovní jednotky horního polyketidového řetězce asukamycinu, a geny *asuC1* pro fosfopanteteinyltransferázu a *asuC10* pro hypotetický protein s neznámou funkcí. Nepřítomnost genů *asuB* a *asuC10* pravděpodobně není zásadní. Biosyntéza horního řetězce nejspíše používá běžných prekurzorů mastných kyselin a polyketidů, jako je tomu např. u manumycinu. Produkt genu *asuC1* u asukamycinu modifikuje potřebné ACP a dá se předpokládat, že biosyntetický aparát u *Saccharothrix* využívá homologního enzymu kódovaného jinde v genomu. K tomu evidentně dochází i po přenosu genového shluku do heterologních producentů, kde jsou manumycinové látky produkovány. Dle výsledků deleční analýzy prováděné u genového shluku pro biosyntézu asukamycinu jsou geny *asuR1*

a *asuR5* pravděpodobně klíčovými pozitivními regulátory produkce. Po deleci jednoho z těchto genů docházelo k úplné inhibici produkce asukamycinu mutantními kmeny (Xie *et al.* 2012). Při srovnání s genovým shlukem pro biosyntézu kolabomycinu E, s nímž nově identifikované metabolity pravděpodobně sdílejí tetraenový charakter dolního polyketidového řetězce, postrádá shluk *S. espanaensis* DSM44229 dva regulační geny (*colR3* a *colR5*) a 3 geny skupiny *colC* (1, 10 a 16). Gen *col16* je specifický pro kolabomycinový shluk, u asukamycinu chybí a jeho produkt je podobný tzv. DSBA oxidoreduktázám disulfidových můstků bílkovin, které často regulují aktivitu proteinů a proteinových komplexů. Oproti oběma zmiňovaným postrádá genový shluk *S. espanaensis* také gen označený jako *H1* (*asuH1* resp. *colH1*) pro bílkovinu s DNA-vazebným motivem „helix-turn-helix“, jejíž funkce zůstává u obou shluků neznámá. Genový shluk nalezený u *S. espanaensis* DSM44229 však na druhou stranu neobsahuje žádné geny, které bychom nenalezli u shluků pro biosyntézu asukamycinu nebo kolabomycinu E. Otázkou zůstává, zda je nulová exprese shluku u *S. espanaensis* DSM44229 způsobena právě absencí některého z genů, např. zmiňovaného regulačního genu *R5*, a jakým způsobem dochází k její aktivaci v případě heterologní produkce, nebo zda k inhibici dochází vlivem genů ležících mimo tento genový shluk.

Scanningem genomu *S. espanaensis* DSM44229 byla kromě manumycinového biosyntetického shluku zjištěna také přítomnost dalších dvou genů pro aminolevulinátsyntázu (BN6_48530 a BN6_50240). Dle jejich sekvence by se mohlo také jednat o geny cyklizujícího typu ALAS, což do jisté míry naznačuje i okolí těchto genů, které odpovídá operonům pro produkci strukturní C₅N jednotky. Příslušné genové lokusy obsahují i putativní geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů, např. acyltransferázy, geny pro biosyntézu aromatických uhlovodíkových zbytků, oxidoreduktázy a v širším okolí BN6 48530 též geny pro modulární PKS. Zdali se jedná o funkční genové shluky pro biosyntézu dalších typů látek s C₅N jednotkou, aktivní či kryptické, nebo jen o zlomky nefunkční genetické informace, není jisté. Žádný další metabolit s C₅N jednotkou nebyl u tohoto kmene identifikován.

Expresi „kryptického“ genového shluku *S. espanaensis* DSM44229 se nepodařilo navodit na žádném z médií, běžně používaných pro produkci sekundárních metabolitů u streptomycet a pseudonokardií. S cílem charakterizace výsledného produktu tohoto genového shluku jsme se jeho expresi pokusili aktivovat pomocí heterologní exprese. Aktivace kryptických biosyntetických genových shluků přenosem do heterologních hostitelů je velice účinným způsobem objevování nových biologicky využitelných látek. Kmeny aktinomycet pro heterologní expresi jsou geneticky modifikovány tak, aby produkce jejich vlastních sekundárních metabolitů byla potlačena, ale celková úroveň sekundárního metabolismu zvýšena. Proto se zde poměrně často exprimují i genové shluky, které jsou v původních organismech neaktivní. Tímto postupem se podařilo navodit expresi genového

shluku pocházejícího ze *Saccharothrix espanaensis* DSM44229. Pro heterologní produkci jsme použili produkční kmeny *S. coelicolor* M512, M1146 a M1154 a *S. lividans* K4-114. Tyto kmeny byly konjugačním přenosem transformovány kosmidem obsahujícím celý genový shluk, pocházející ze *S. espanaensis* DSM44229.

U kmene *Streptomyces lividans* K4-114, speciálně upraveného pro maximalizaci exprese vložených genů sekundárního metabolismu, se po vložení genového shluku, pocházejícího ze *S. espanaensis* DSM44229, podařilo pomocí UHPLC-UV(DAD)-ESI ToF MS identifikovat 3 nové produkty. Absorbční spektrum těchto látek přesně odpovídá spektru s absorbčním maximem okolo vlnové délky 355 nm, které je typické pro látky manumycinového typu. Také naměřená molekulová hmotnost a odhadovaný souhrnný vzorec naznačují, že se jedná o tento typ látek, tvořených centrální m - C_7N jednotkou, kompletním dolním polyketidovým řetězcem, zakončeným C_5N jednotkou, a horním polyketidovým řetězcem. Těmito výsledky byla potvrzena využitelnost metody heterologní exprese při pokusech o aktivaci „kryptických“ genových shluků streptomycet s cílem identifikace nových metabolitů s využitelnými biologickými aktivitami.

Ve vytvořeném heterologním kmeni však kromě nově identifikovaných látek dochází také ke zvýšené produkci monoacylglycerolů, kterou se nám zatím nepodařilo snížit změnou kultivačních podmínek. Od žádaných metabolitů jsou monoacylglyceroly velice těžko oddělitelné, což značně komplikuje přesné určení struktury nových látek. Prvních odhadů struktur některých částí molekuly bylo proto dosaženo pomocí fragmentace v ionizujícím záření a následné analýzy fragmentů hmotnostní spektrometrií. Tímto způsobem bylo u dvou látek dosaženo relativně spolehlivého odhadu struktury dolní části molekuly, která se u obou shoduje a je tvořena delším tetraenovým polyketidovým řetězcem s C_5N jednotkou, jako je tomu u kolabomycinů. Odhadovaná struktura dolního polyketidového řetězce byla následně potvrzena také analýzou jednoho z izolovaných meziproduktů pomocí NMR. Předpokládáme tedy, že se tyto látky, včetně třetí, u které se fragmentaci provést nepodařilo, budou lišit pouze ve struktuře horního polyketidového řetězce, který bude dle získaných hmotnostních dat výrazně kratší než u popsaných kolabomycinů a také u většiny dalších manumycinů. Vzhledem k tomu, že struktura horního řetězce je významným faktorem ovlivňujícím jednotlivé biologické aktivity manumycinových látek, je izolace těchto nových metabolitů v dostatečném množství a čistotě, kromě identifikace jejich struktury pomocí NMR, důležitá pro otestování jejich biologických aktivit a porovnání výsledků se známými manumyciny.

Abychom u vytvořeného kmene docílili stabilnější produkce žádaných metabolitů, rozhodli jsme se v něm nadexprimovat dva regulační geny ležící na kraji genového shluku. Jelikož jsou tyto geny homologní ke dvěma hlavním regulačním genům z genového shluku pro biosyntézu asukamycinu, doufali jsme, že se nám tímto způsobem podaří produkci stabilizovat a zvýšit.

Za účelem nadexprese jsme tedy připravili expresní konstrukty, obsahující jednotlivé regulační geny umístěné pod kontrolu silného streptomycetového konstitutivního promotoru *ermE**. Těmito konstrukty jsme poté transformovali protoplasty upravených produkčních kmenů K4-114/pESP446-2. Takto jsme připravili dva kmeny: K4-114/pESP446-2,pESPR1 a K4-114/pESP446-2,pESPR2 s nadexprimovanými jednotlivými regulátory *espR1* resp. *espR2* a jeden kmen K4-114/pESP446-2,pESPR1+2 s kombinovanou nadexpresí obou regulačních genů.

Prvotní analýza kmenů K4-114/pESP446-2,pESPR se zvýšenou expresí regulačních genů *espR* poukázala na značné zvýšení produkce nově identifikovaných metabolitů u kmene K4-114/pESP446-2,pESPR1, ve kterém byla navozena nadexprese regulačního genu *espR1*. V porovnání s původním upraveným kmenem K4-114/pESP446-2 zde byl zaznamenán přibližně desetinásobný nárůst v produkci požadovaných látek i přesto, že u takto upraveného kmene došlo ke zpomalení růstu kultury. Analýza však také poukázala na úplnou inhibici produkce těchto metabolitů u kmenů K4-114/pESP446-2,pESPR2 s nadexpresí genu *espR2* a u kmene K4-114/pESP446-2,pESPR1+2 s nadexpresí obou regulačních genů. Tento výsledek částečně koresponduje s delečními experimenty, prováděnými u shluku pro biosyntézu asukamycinu (Xie *et al.* 2012), při kterých docházelo k téměř nulové expresi genového shluku v případě delece genu *asuR1* a mírně zvýšené expresi po deleci genu *asuR2*. V případě obou delecí byla celková produkce asukamycinu inhibována.

Detekovatelné množství sledovaných metabolitů se nám však nepodařilo izolovat ani u kontrolního kmene K4-114/pESP446-2,pIJ487, který byl transformován prázdným plasmidem pIJ487. Příčinu tohoto jevu se nám dosud nepodařilo objasnit a bude proto nutné celou sérii pokusů zopakovat, případně ověřit možný inhibiční efekt antibiotik použitých při kultivaci jednotlivých kmenů jejich opětovnou kultivací bez antibiotik a následnou analýzou výsledných extraktů.

6. Souhrn

- Připravili jsme kosmidovou knihovnu genomové DNA kmene *S. espanaensis* DSM44229.
- Podařilo se naklonovat celý manumycinový biosyntetický genový shluk pocházející z kmene *S. espanaensis* DSM44229.
- Manumycinový genový shluk se podařilo aktivovat přenosem do heterologního producenta, čímž jsme potvrdili, že je tato metoda vhodná pro aktivaci některých „kryptických“ genových shluků.
- Heterologní produkcí jsme dosáhli produkce 3 nových metabolitů kódovaných genovým shlukem z kmene *S. espanaensis* DSM44229.
- U nově identifikovaných produktů se podařilo přesně charakterizovat tetraenovou strukturu dolního polyketidového řetězce, odpovídající struktuře kolabomycinů, a přibližně i strukturu zbytku jejich molekul.
- Nadexprese regulačního genu *espR1* vedla ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů, čímž byla potvrzena jeho předpokládaná funkce při pozitivní regulaci genového shluku. Takto získaný rekombinantní kmen bude použit pro izolaci a purifikaci nově identifikovaných látek za účelem určení jejich přesné struktury a stanovení biologických aktivit.

7. Seznam použité literatury

- Artsimovitch I., Patlan V., Sekine S., Vassilyeva M.N., Hosaka T., Ochi K., Yokoyama S. and Vassilyev D.G. 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*; 117: 299-310.
- Austin M.B. and Noel J.P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*; 20: 79-110.
- Barbacid M. 1987. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*; 56: 779-827.
- Bayer T.S., Widmaier D.M., Temme K., Mirsky E.A., Santi D.V. and Voigt C.A. 2009. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. *J. Am. Chem. Soc.*; 131: 6508-6515.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M. *et al.* 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*; 417: 141-147.
- 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 κ B kinase β activity. *J. Biol. Chem.*; 281: 2551-2561.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites, a personal view. *J. Antibiot.*; 58: 1-26.
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N. and Schoner B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*; 116: 43-19.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. 2007. Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.* 42: 925-933.
- Brignole E.J., Smith S. and Asturias F.J. 2009. Conformational flexibility of metazoan fatty acid synthase enables catalysis. *Nature Structural & Molecular Biology*; 16: 190-197
- Buzzetti F., Gaeumann E., Huetter R., Keller-Schierlein W., Neipp L., Prelog V. and Zaehner H. 1963. [METABOLITES OF MICROORGANISMS. 41. MANUMYCIN]. *Pharm. Acta Helv.*; 38: 871-874.
- Constantini C., Weindruch R., Della Valle G. and Puglielli L. 2005. A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid β -peptide generation during aging. *Biochem. J.*; 391: 59-67.
- Doull J.L., Ayer S.W., Singh A.K. and Thibault P. 1993. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J. Antibiot.*; 46: 869.
- Doull J.L., Singh A.K., Hoare M. and Ayer S.W. 1994. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J. Ind. Microbiol.*; 13: 120-125.
- Floriano B. and Bibb M. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*; 21: 385-396.
- Franco C.M., Maurya R., Vijayakumar E.K., Chatterjee S., Blumbach J. and Ganguli B.N. 1991. Alisamycin, a new antibiotic of the manumycin group. *J. Antibiot.*; 44: 1289-1293.

- Gibbs J.B., Oliff A. and Kohl N.E. 1994. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell*; 77: 175-178.
- Gomez-Escribano J.P. and Bibb M.J. 2011. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.*; 4: 207-215.
- Gomez-Escribano J.P. and Bibb M.J. 2012. *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters. *Methods Enzymol.*; 517: 279-300.
- Gottelt M., Kol S., Gomez-Escribano J.P., Bibb M. and Takano E. 2010. Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*; 156: 2343-2353.
- 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*. *J. Antibiot.*; 41: 1178-1185.
- Gust B., Chandra G., Jakimowicz D., Yuqing T., Bruton C.J. and Chater K.F. 2004. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.*; 54: 107-128.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90: 2281-2285.
- Haris C.M., Kannan R., Kopecka H. and Harris T.M. 1985. The role of the chlorine substituents in the antibiotic vankomycin: preparation and characterization of mono- and didechlorovancomycin. *J. Am. Chem. Soc.*; 107: 6652-6685.
- Hayashi K., Nakagawa M., Fujita T., Tanimori S. and Nakayama M. 1994. Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp. K106. *J. Antibiot.*; 47: 1110-1115.
- Hayes A., Hobbs G., Smith C.P., Oliver S.G. and Butler P.R. 1997. Environmental signals triggering methylenomycin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.*; 179: 5511-5515.
- Hempel A.M., Cantlay S., Molle V., Wang S.B., Naldrett M.J., Parker J.L., Richards D.M., Jung Y.G., Buttner M.J. and Flärdh K. 2012. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 109: E2371-2379.
- Herlt A.J., Kibby J.J. and Rickards R.W. 1981. Synthesis of unlabelled and carboxyl-labelled 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid. *Aust. J. Chem.*; 34: 1319-1324.
- Hesketh A., Sun J. and Bibb M. 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.*; 39: 136-144.
- Hopwood D.A. 2007. *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press.
- Hopwood D.A. and Sherman D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*; 24: 37-66.

- Hu Y. 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.
- Hu Y., Melville C.R., Gould S.J. and Floss H.G. 1997. 3-Amino-4-hydroxybenzoic Acid: the Precursor of the C₇N Unit in Asukamycin and Manumycin. *J. Am. Chem. Soc.*; 119: 4301-4302.
- Challis G.L. 2008. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*; 154: 1555-1569.
- Choulet F., Aigle B., Gallois A., Mangenot S., Gerbaud C., Truong C., Francou F.X., Fourrier C., Guérineau M., Decaris B., Barbe V., Pernodet J.L. and Leblond P. 2006. Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol. Biol. Evol.*; 23: 2361-2369.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. and Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.*; 21: 526-531.
- Jakeman D.L., Bandi S., Graham C.L., Reid T.R., Wentzell J.R. and Douglas S.E. 2009. Antimicrobial activities of jadomycin B and structurally related analogues. *Antimicrob. Agents Ch.*; 53: 1245-1247.
- Katsuyama Y. and Ohnishi Y. 2012. Type III polyketide synthases in microorganisms. *Methods Enzymol.*; 515: 359-377.
- Kawai K., Wang G., Okamoto S. and Ochi K. 2007. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*; 274: 311-315.
- Khosla C. and Zawada. R.J. 1996. Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. *Trends Biotechnol.*; 14: 335-341.
- Kibby J.J. and Rickards R.W. 1981. The identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a new natural aromatic amino acid. *J. Antibiot.*; 34: 605.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich.
- Kim C.G., Kirschning A., Bergon P., Zhou P., Su E., Sauerbrei B., Ning S., Ahn Y., Breuer M., Leistner E. and Floss H.G. 1996. Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC₇N units in ansamycin antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*; 118: 7486-7491.
- 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*. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological properties. *J. Antibiot.*; 49: 1212-1220.
- Lai C., Xu J., Tozawa Y., Okamoto-Hosoya Y., Yao X. and Ochi K. 2002. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*; 148: 3365-3373.
- Land M., Lapidus A., Mayilraj S., Chen F., Copeland A., Del Rio T.G., Nolan M., Lucas S., Tice H. *et al.* 2009. Complete genome sequence of *Actinosynnema mirum* type strain (101). *Strand Genomic Sci.*; 1: 46.53.

- Liolias K., Sikorski J., Jando M., Lapidus A., Copeland A., Glavina T., Del R., Nolan M., Lucas S., Tice H. *et al.* 2010. Complete genome sequence of *Thermobispora bispora* type strain (R51). *Stand Genomic Sci.*; 2:318-326.
- McDaniel R., Ebert-Khosla S., Hopwood D.A. and Khosla C. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science*; 262: 1546-1550.
- Nett M., Ikeda H. and Moore B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the *Actinomycetes*. *Nat. Prod. Rep.*; 26: 1362-1384.
- Neumann C.S., Fujimori D.G. and Walsh C.T. 2008. Halogenation Strategies In Natural Product Biosynthesis. *Chem. Biol.*; 15: 99-109.
- Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M. and Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.*; 190: 4050-4060.
- Ohuchi T., Ikeda-Araki A., Watanabe-Sakamoto A., Kojiri K., Nagashima M., Okanishi M. and Suda H. 2000. Cloning and expression of a gene encoding N-glycosyltransferase (*ngt*) from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC39243. *J. Antibiot.*; 53: 393-403.
- Ochi K. 2007. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 71: 1373-1386.
- Ochi K. and Hosaka T. 2013. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotech.*; 97: 87-98.
- Olanó C., Méndez C. and Salas J.A. 2010. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing *Actinomycetes* from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*; 27: 571-616.
- Oliynyk M., Samborsky M., Lester J.B., Mironenko T., Scott N., Dickens S., Haydock S.F. and Leadlay P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat. Biotech.*; 25: 447-453.
- Omura S., Kitao Ch., Tanaka H., Oiwa R., Takahashi Y., Nakagawa A., Shimada M. and Iwai Y. 1976. A new antibiotic, asukamycin, produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.*; 29: 876-881.
- Onaka H., Mori Y., Igarashi Y. and Furumai T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*; 77: 400-406.
- Pati A., Sikorski J., Nolan M., Lapidus A., Copeland A., Glavina Del Rio T., Lucas S., Chen F., Tice H., Pitluck S. *et al.* 2009. Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101). *Stand Genomic Sci.*; 1: 141-149.
- Petříček M., Petříčková K., Havlíček L and Felsberg J. 2006. Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *J. Bacteriol.*; 188: 5113-5123.
- Petříčková K., Pospíšil S., Kuzma M., Tylová T., Jágr M., Tomek P., Chroňáková A., Brabcová E., Anděra L., Křišťůfek V. and Petříček M. 2014. Biosynthesis of colabomycin e, a new manumycin-family metabolite, involves an unusual chain-length factor. *Chembiochem.*; 15: 1334-1345.

- Pospíšil S., Petříčková K., Sedmera P., Halada P., Olšovská J. and Petříček M. 2011. Effect of starter unit availability on the spectrum of manumycin-type metabolites produced by *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*. *J. Appl. Microbiol.*; 111: 1116-1128.
- Puglia A.M., Vohradsky J. and Thompson C.J. 1995. Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*; 17: 737-746.
- Qian D., Zhou D., Ju R., Cramer C.L. and Yang Z. 1996. Protein farnesyltransferase in plants: molecular characterization and involvement in cell cycle control. *Plant Cell*; 8: 2381-2394.
- Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W. and Hopwood D.A., van Wezel G.P. 2008. Feast of famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.*; 9: 670-675.
- Rinehart K.L., Potgieter M., Delaware D.L. and Seto H. 1981. Direct evidence from multiple ¹³C labeling and homonuclear decoupling for the labeling pattern by glucose of the *m*-aminobenzoyl (C₇N) unit of pactamycin. *J. Am. Chem. Soc.*; 103: 2099-2101.
- Rui Z., Petříčková K., Škanta F., Pospíšil S., Yang Y., Chen Ch.Y., Tsai S.F., Floss H.G., Petříček M. and Yu T.W. 2010. Biochemical and Genetic Insights into Asukamycin Biosynthesis. *J. Bio. Chem.*; 285: 24915-24924.
- Salas J.A. and Méndez C. 2007. Engineering the glycosylation of natural products in *Actinomycetes*. *Trends Microbiol.*; 15: 219-232.
- Sales C.M., Mahendra S., Grostern A., Parales R.E., Goodwin L.A., Woyke T., Nolan M., Lapidus A., Chertkov O., Ovchinnikova G., Sczyrba A. and Alvarez-Cohen L. 2011. Genome sequence of the 1,4- dioxane-degrading *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190. *J. Bacteriol.*; 193: 4549-4550.
- Salis H.M., Mirsky E.A. and Voigt C.A. 2009. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control expression. *Nat. Biotech.*; 27: 946-950.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. CSHL Press, New York.
- Sattler I. and Tamanoi F. 1996. Prenylation of RAS and Inhibitors of Prenyltransferases. *Regulation of the RAS Signaling Network*; 95-137.
- Servant P. and Mazodier P. 2001. Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. *Arch. Microbiol.*; 176: 237-242.
- 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. Manumycins E, F and G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*; 47: 324-333.
- Schröder K. and Zeeck A. 1973. Manumycin. *Tetrahedron Letters*; 50: 4995-4998.
- Singh M.P., Petersen P.J., Weiss W.J., Kong F. and Greenstein M. 2000. Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 44: 2154-2159.
- Staunton J. and Weissman K.J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.*; 18: 380-416.

- Strobel T., Al-Dilaimi A., Blom J., Gessner A., Kalinowski J., Luzhetska M., Pühler A., Szczepanowski R., Bechthold A. and Rückert C. 2012. Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229(T) and comparison to the other completely sequenced *Pseudonocardiaceae*. *BMC Genomics*. 13: 465.
- 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. III. Biochemical properties of EI-1511-3, -5 and EI-1625-2. *J. Antibiot.*; 49: 1085-1090.
- Thiericke R., Zeeck A., Nagakawa A., Omura S., Herrold R.E., Wu S.T., Beale J.M. and Floss H.G. 1990. Biosynthesis of the manumycin group antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*; 112: 3979-3987.
- Thorson J.S., Hosted T.J., Jiang J., Biggins J.B. and Ahlert J. 2001. Nature's Carbohydrate Chemists The Enzymatic Glycosylation of Bioactive Bacterial Metabolites. *Curr. Org. Chem.*; 5: 139-167.
- Vogelstein B. and Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 76: 615-619.
- Wang R., Mast Y., Wang J., Zhang W., Zhao G., Wohlleben W., Lu Y. and Jiang W. 2013. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*; 87: 30-48.
- Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. and Gao X. 2010. Optimization of the fermentation process of actinomycete strain hhs.015. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:141876. doi: 10.1155/2010/141876.
- Widmaier D.M., Tullman-Ercek D., Mirsky E.A., Hill R., Govindarajan S., Minshull J. and Voigt C.A. 2009. Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers. *Mol. Sys. Biol.*; 5: 309.
- Xie P., Sheng Y., Ito T. and Mahmud T. 2012. Transcriptional regulation and increased production of asukamycin in engineered *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 96: 451-460.
- Xu J., Tozawa Y., Lai C., Hayashi H. and Ochi K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Genet. Genomics*; 268: 179-189.
- Yang K., Han L., He J., Wang L. and Vining L.C. 2001. A repressor-response regulator gene pair controlling jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Gene*; 279: 165-173.
- Yang K., Han L. and Vining L.C. 1995. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, *jadR2*. *J. Bacteriol.*; 177: 6111-6117.
- Yura T. and Nakahigashi K. 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.*; 2: 153-158.
- Zeeck A., Schröder K., Frobel K., Grote R. and Thiericke R. 1987. The structure of manumycin. I. Characterization, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.*; 40: 1530-1540.