

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

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Lucie Korbová**

Role proteinů LmbF a CcbF v biosyntéze antibiotik linkomycinu resp. celesticetinu a jejich  
potenciální uplatnění v biosyntéze hybridního antibiotika CELIN

The role of LmbF and CcbF proteins in the biosynthesis of the antibiotics lincomycin  
and celesticetin and their potential application in the biosynthesis of the hybrid antibiotic  
CELIN

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Markéta Koběřská, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 5.8.2024

.....

Bc. Lucie Korbová

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce RNDr. Markétě Koběrské, PhD. za její odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup, ochotu a trpělivost. Dále bych také ráda zvláště poděkovala Msc. Durze Mahor, PhD. za předané znalosti a zkušenosti, vstřícnost a ochotu. Poté bych ráda poděkovala celému týmu Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metaboliky MBÚ, AV ČR za velmi příjemné pracovní prostředí, přínosné rady a ochotu pomoci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým nejbližším za podporu během celého studia.

*Tato práce byla vytvořena s podporou:*

*„Projekt Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103)  
– Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.“*

*„The project National Institute of virology and bacteriology (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5103) - Funded by the European Union - Next Generation EU.“*

*We acknowledge CMS-BIOCEV („Biophysical techniques, Crystallisation, Diffraction, Structural mass spectrometry“) of CIISB, Infrastruct-CZ Centre, supported by MEYS CR (LM2023042) and CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/0015974.*

## Abstrakt

Hybridní antibiotika kombinují struktury nebo mechanismy účinku dvou nebo více známých antibiotik a představují tak jednu z cest ke zlepšení účinnosti antibiotik. V naší laboratoři bylo *in vitro* biosyntézou připraveno hybridní antibiotikum CELIN, jež kombinuje strukturně podobná antibiotika linkomycin a celesticetin. CELIN má ve své struktuře propylový zbytek navázaný na prolinu, který přirozeně obsahuje antibiotikum linkomycin, a kyselinu salicylovou, která je přirozenou součástí antimikrobiální látky celesticetinu. Jelikož se jedná o kombinaci dvou přirozeně syntetizovaných antibiotik, nabízí se možnost přípravy producenta tohoto hybridního antibiotika. Nicméně snaha připravit producenta CELINu mutagenézí kmene *Streptomyces lincolnensis*, produkujícího linkomycin, zatím nebyla úspěšná. Cílem této diplomové práce je určit klíčové kroky pro přípravu producenta CELINu. Nejprve byla ověřována schopnost mutanty *Streptomyces caelestis*, přirozeně produkující celesticetin, produkovat CELIN. Následně byla za účelem detekce interakčního partnera proteinu LmbF, jež katalyzuje klíčový biosyntetický krok v biosyntéze linkomycinu, provedena metoda pulldown s bakteriálním lyzátem *Streptomyces lincolnensis* a *in vitro* reakce obsahující různou kombinaci proteinů LmbF, LmbG a CcbF. Výsledky této diplomové práce indikují, že *Streptomyces caelestis*, bez dodatečných genetických modifikací, není vhodným organismem pro produkci CELINu, jelikož schopnost produkce hybridního antibiotika připravenou mutantou *Streptomyces caelestis* nebyla detekována. Analýza metody pulldown provedené s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* naznačuje, že možným interakčním partnerem proteinu LmbF by mohl být protein LmbG. Z naměřených hodnot *in vitro* reakcí lze usuzovat, že protein CcbF je schopen pravděpodobně katalyzovat nejen reakci vedoucí k jeho přirozenému produktu a také reakci vedoucí k analogu produktu enzymu LmbF. Výsledky této práce tedy ukazují další směr v přípravě producenta CELINu mutagenézí *Streptomyces lincolnensis*, kdy k zastavení produkce linkomycinu je nutno inaktivovat i gen kódující enzym pro následný krok, *lmbG*, v již dříve připravené mutantě *Streptomyces lincolnensis* s deletovaným genem *lmbF* a vloženým genem *ccbF* a geny kódujícími biosyntézu salicylátové podjednotky.

## Klíčová slova

linkomycin, celesticetin, hybridní antibiotika, biosyntéza

## Abstract

Hybrid antibiotics combine the structures or mechanisms of action of two or more known antibiotics and thus represent one way to improve the effectiveness of antibiotics. In our laboratory, the hybrid antibiotic CELIN was prepared *in vitro*. This antibiotic combines the structurally similar antibiotics lincomycin and celesticetin. CELIN has in its structure a propyl group attached to proline, which is naturally found in the antibiotic lincomycin, and salicylic acid, which is a natural component of the antimicrobial agent celesticetin. Since it is a combination of two naturally synthesized antibiotics, it should be possible to prepare a producer of this hybrid antibiotic. However, efforts to prepare a CELIN producer by mutagenesis of a lincomycin-producing strain of *Streptomyces lincolnensis* have not yet been successful. The aim of this thesis is to determine the key steps for the preparation of a CELIN producer. First, the ability of the *Streptomyces caelestis*, which naturally produces celesticetin, mutant to produce CELIN was verified. Next, in order to detect the interaction partner of the LmbF protein, which catalyzes the key biosynthetic step in lincomycin biosynthesis, the pulldown method was performed with *Streptomyces lincolnensis* bacterial lysate. *In vitro* reactions containing different combinations of LmbF, LmbG and CcbF proteins were also performed. The results of this thesis indicate that *Streptomyces caelestis*, without additional genetic modifications, is not a suitable organism for the production of CELIN, since the ability of the prepared mutant *Streptomyces caelestis* to produce a hybrid antibiotic was not detected. The analysis of the pulldown method indicate that the possible interaction partner of the LmbF protein could be the LmbG protein. From the results of the *in vitro* reactions, it can be concluded that the CcbF protein is probably able to catalyze the reaction leading to its natural product as well as the reaction leading to the analog of product of the enzyme LmbF. The results of this work therefore show another direction in the preparation of the CELIN producer by mutagenesis of *Streptomyces lincolnensis*, when to stop the production of lincomycin, it is also necessary to inactivate the gene encoding the enzyme for the subsequent step, *lmbG*, in the previously prepared *Streptomyces lincolnensis* mutant with the deleted *lmbF* gene and the inserted *ccbF* gene and the genes encoding the biosynthesis of the salicylate subunit.

## Key words

lincomycin, celesticetin, hybrid antibiotics, biosynthesis

# Obsah

1. Úvod .....	10
2. Cíle.....	11
3. Literární přehled.....	12
3.1 Streptomycety produkující linkosamidy .....	12
3.1.1 <i>Streptomyces lincolnensis</i> .....	12
3.1.2 <i>Streptomyces caelestis</i> .....	13
3.2 Linkosamidová antibiotika.....	13
3.2.1 Přírodní a semisyntetické linkosamidy .....	14
3.2.2 Syntetické linkosamidy .....	15
3.3 Genové shluky pro biosyntézu linkosamidových antibiotik.....	16
3.3.1 Geny kódující biosyntézu propyl-prolinové části linkomycinu.....	17
3.3.2 Geny kódující enzymy účastnící se biosyntézy cukerné podjednotky linkosamidových antibiotik.....	19
3.3.3 Geny kódující kondenzaci cukerné podjednotky s aminokyselinou a následující kroky biosyntézy linkomycinu.....	20
3.3.3.1 Finální kroky biosyntézy linkomycinu .....	22
3.3.3.2 Specifické kroky v biosyntéze celesticetinu ve srovnání s biosyntézou linkomycinu .....	23
3.3.4 Regulační a rezistenční geny ve shlucích pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu.....	26
3.3.5 Evoluce linkosamidových biosyntetických shluků.....	27
3.4 Data Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky .....	28
3.5 Proteinové interakce.....	30
4. Materiál a metody .....	34
4.1 Materiál.....	34
4.1.1 Chemikálie .....	34
4.1.2 Použitá instrumentace .....	35
4.1.3 Antibiotika .....	36
4.1.4 Bakteriální kmeny .....	36
4.1.5 Plazmidy .....	36
4.1.5.1 pIJ10257.....	36
4.1.5.2 pET-48 .....	37
4.1.5.3 pET-42 .....	37
4.1.6 Primery.....	37
4.1.7 Kultivační média.....	38

4.1.8	Roztoky a pufrý.....	40
4.1.9	Komerčně dodávané sety a standardy.....	42
4.1.10	Software a internetové aplikace.....	43
4.2	Použité metody.....	43
4.2.1	Metody práce s DNA.....	43
4.2.1.1	Extrakce DNA.....	43
4.2.1.2	Restrikční štěpení.....	44
4.2.1.3	Polymerázová řetězová reakce.....	44
4.2.1.4	DpnI treatment.....	47
4.2.1.5	Přečištění PCR produktů.....	47
4.2.1.6	Elektroforetická separace nukleových kyselin v agarózovém gelu.....	47
4.2.1.7	Rekombinace DNA fragmentů.....	48
4.2.2	Kultivace, uchovávání a další práce s bakteriemi.....	49
4.2.2.1	Transformace.....	49
4.2.2.1.1.	Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> pro transformaci tepelným šokem.....	49
4.2.2.1.2.	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> teplotním šokem.....	49
4.2.2.2	Namnožení plazmidu.....	50
4.2.2.3	Heterologní produkce proteinů v <i>Escherichia coli</i> .....	50
4.2.2.4	Příprava lyzátu <i>Escherichia coli</i> s heterologní produkcí proteinů.....	51
4.2.2.5	Konjugace.....	51
4.2.2.5.1.	Konjugace plazmidu z <i>Escherichia coli</i> do <i>Streptomyces caelestis</i> .....	51
4.2.2.6	Kultivace <i>Streptomyces ssp.</i> na pevném médiu.....	53
4.2.2.7	Smývání spor streptomycet a příprava konzervy.....	53
4.2.2.8	Germinace a prekultura <i>Streptomyces spp.</i> .....	53
4.2.2.9	Příprava lyzátu ze <i>Streptomyces lincolnensis</i> .....	54
4.2.3	Metody práce s proteiny.....	54
4.2.3.1	Příprava kolony s Ni-INDIGO náplní.....	54
4.2.3.2	Čištění a uchovávání kolony s Ni-INDIGO.....	54
4.2.3.3	Purifikace proteinů na koloně s Ni-INDIGO náplní.....	55
4.2.3.4	SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	55
4.2.3.4.1.	Příprava SDS-PAGE polyakrylamidového gelu.....	55
4.2.3.4.2.	Příprava vzorků proteinů na SDS-PAGE elektroforézu.....	56
4.2.3.4.3.	SDS-PAGE elektroforetická separace proteinů a jejich barvení.....	56
4.2.3.5	Koncentrování proteinů.....	57



4.2.3.6	Gelová permeační chromatografie .....	57
4.2.3.7	Pulldown metoda .....	58
4.2.3.8	<i>In vitro</i> reakce .....	58
4.2.4	Příprava vzorků na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí .....	59
4.2.4.1	Příprava buněk <i>Streptomyces caelestis</i> z kultivace v tekutém médiu pro měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí .....	59
4.2.4.2	Extrakce z pevných půd pro měření obsahu metabolitů na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí .....	59
4.2.4.3	Příprava vzorků obsahujících celesticetin, CELIN, ODCELIN a linkomycin na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí .....	60
4.2.5	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využitá pro měření produkce CELINu a <i>in vitro</i> reakcí zastavených po 2 hod .....	60
4.2.6	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využitá pro měření <i>in vitro</i> reakcí s časovým průběhem .....	61
4.2.7	Substrát C-2 pro <i>in vitro</i> reakce .....	61
5.	<b>Výsledky</b> .....	62
5.1	<i>In vivo</i> produkce CELINu .....	62
5.1.1	Vnesení genu <i>lmbC</i> do <i>Streptomyces caelestis</i> , kultivace a měření produkce CELINu .....	62
5.1.1.1	Vnesení genu <i>lmbC</i> do <i>Streptomyces caelestis</i> .....	62
5.1.1.2	Kultivace mutanty <i>Streptomyces caelestis</i> s vneseným genem <i>lmbC</i> .....	67
5.2	Vyhledávání proteinů interagujících s proteinem LmbF .....	70
5.2.1	Vyhledávání interakčních partnerů proteinu LmbF pomocí metody pulldown .....	70
5.2.1.1	Heterologní exprese a purifikace proteinu LmbF .....	71
5.2.1.2	Příprava lyzátu ze <i>Streptomyces lincolnensis</i> .....	75
5.2.1.3	Metoda pulldown .....	77
5.3	<i>In vitro</i> reakce katalyzované proteiny LmbF, CcbF a LmbG .....	88
5.3.1	Heterologní exprese proteinů LmbF, CcbF a LmbG .....	88
5.3.2	<i>In vitro</i> reakce .....	93
5.3.2.1	<i>In vitro</i> reakce zastavené po 2 hodinách .....	95
5.3.2.2	Časový průběh <i>in vitro</i> reakcí .....	101
5.3.2.2.1.	Výsledky měření reakční směsi 0 (negativní kontrola) .....	103
5.3.2.2.2.	Výsledky měření reakční směsi 1 (obsahuje protein CcbF) .....	106
5.3.2.2.3.	Výsledky měření reakční směsi 2 (obsahuje proteiny CcbF + LmbG)..	109
5.3.2.2.4.	Výsledky měření reakční směsi 3 (obsahuje protein LmbF) .....	112

5.3.2.2.5.	Výsledky měření reakční směsi 4 (obsahuje proteiny LmbF + LmbG).	113
5.3.2.2.6.	Shrnutí výsledků <i>in vitro</i> reakcí.....	114
6.	<b>Diskuze</b> .....	115
7.	<b>Souhrn</b> .....	121
8.	<b>Použitá literatura</b> .....	122

## Seznam použitých zkratek

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
Da	Dalton
FRET	Fluorescenční přenos rezonanční energie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
EGT	Ergothiol
GDP	Guanindifosfát
GTP	Guanintrifosfát
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
Kbp	Kilo páry bází
Mbp	Mega páry bází
MSH	Mykothiol
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamiddiadeninnukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NH <sub>3</sub>	Amoniak
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PLP	Pyridoxalfosfát
PPL	Propyl-prolin
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SAM	S-adenosylmethionin
SDS	Dodecylsíran sodný
UDP	Uridindifosfát
UV	Ultrafialové záření
WT	Divoký typ

# 1. Úvod

V současné době čelíme celosvětové medicínské krizi, kdy již proti všem klinicky využívaným antibiotikům byly detekovány rezistentní kmeny bakterií (Jian et al., 2021). Rezistence se šíří mezi kmeny bakterií a antibiotika se stávají méně účinná, vůči některým kmenům bakterií jsou antibiotika již zcela neúčinná (Darby et al., 2023). Většina oblastí moderní medicíny je nemyslitelná bez přístupu k účinným antimikrobiálním látkám a rezistentní kmeny bakterií způsobují celosvětově statisíce úmrtí ročně, proto je tato krize velmi alarmující pro současnou a budoucí medicínu a veřejné zdraví (Miethke et al., 2021).

Současný výzkum se zaměřuje jak na zkoumání mechanismů bakteriální rezistence, tak na výzkum nových antimikrobiálních látek, jež by byly účinnější než ty současné klinicky využívané a jež by překonávaly známé mechanismy rezistence bakterií.

Výzkum nových antibiotik se soustředí do několika směrů. Jedním z přístupů je screening enviromentálních izolátů a jejich metabolitů, kde je ale nízká pravděpodobnost objevení antimikrobiální látky. Tyto potenciální antimikrobiální sloučeniny jsou vyhledávány jak u již známých producentů antibiotik, zejména u aktinomycet, v jejich běžně v laboratoři umlčeném genomu. Tak také u kmenů, u nichž zatím produkce antimikrobiálních látek není známá, u zatím nekultivovatelných kmenů bakterií, ale i u organismů z jiných říší. Dalšími možnými cestami jsou hybridní antibiotika kombinující dvě nebo více známých antimikrobiálních látek, chemické modifikace již klinicky využívaných či kvůli nízké účinnosti nevyužívaných antimikrobiálních látek či kompletní chemická syntéza zcela syntetických sloučenin s antimikrobiálními vlastnostmi. Výhodou hybridních antibiotik je, že se jedná o spojení již známých a otestovaných molekul, takže riziko jejich toxicity je nižší než u zcela nových sloučenin (Hutchings et al., 2019; Lewis, 2020).

V nedávno publikovaném článku Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky (Kadlcik et al., 2017) bylo kombinací biosyntetických enzymů, z drah pro biosyntézu přírodních linkosamidových a sobě strukturně podobných antimikrobiálních látek linkosamidu a celesticetinu, kombinatoriální biosyntézou *in vitro* připraveno hybridní antibiotikum CELIN. Vzhledem k tomu, že se jedná o spojení přírodních biosyntetických drah, nabízí se možnost využití metod genového inženýrství k vytvoření producenta tohoto hybridního antibiotika. Tato diplomová práce se zaměřuje na studium enzymů LmbF a CcbF, jež jsou zodpovědné za diverzifikaci biosyntéz linkomycinu a celesticetinu a na cílenou modifikaci potencionálního producenta CELINU *Streptomyces caelestis*.

## 2. Cíle

Cíle mé diplomové práce byly formulovány na základě předchozí práce naší laboratoře, která zahrnovala *in vitro* kombinatoriální biosyntézu hybridního antibiotika CELIN (Kadlcik et al., 2017) a navazující experimenty s cílem připravit mutantní kmen *Streptomyces lincolnensis*, který by toto hybridní antibiotikum produkoval (nepublikovaná data laboratoře).

Mezi tyto cíle patří:

- 1) Příprava mutanty *Streptomyces caelestis* a *semi-vivo* produkce tohoto hybridního antibiotika CELIN
  - Vložení genu *lmbC* do vektoru pIJ10257 a konjugace tohoto konstruktů do *Streptomyces caelestis*
  - Kultivace mutanty na médiu s propyl-prolinem
  - Extrakce metabolitů z média a mycelia *Streptomyces caelestis* a analýza produkce celesticetinu a CELINu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- 2) Zjištění interakčních partnerů proteinu LmbF
  - Heterologní exprese rekombinantního proteinu LmbF s fúzní histidinovou kotvou a jeho purifikace
  - Pulldown analýza interakce LmbF s proteiny z lyzátu *Streptomyces lincolnensis*
- 3) Zjištění interakčních partnerů LmbF pomocí *in vitro* reakcí
  - Heterologní exprese rekombinantních proteinů LmbF, LmbG a CcbF s fúzní histidinovou kotvou a jejich purifikace
  - Provedení *in vitro* reakcí a analýza jejich produktů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Streptomycety produkující linkosamidy

*Streptomyces* je významný rod aerobních, gram-pozitivních bakterií patřících do kmene *Actinomycetota*. Tento kmen se vyznačuje lineárním genomem s vysokým obsahem GC párů, který dosahuje velikosti přibližně 10 Mbp. *Streptomyces* je rod všudypřítomných bakterií osidlujících rozmanitá prostředí, nejčastěji se vyskytují v půdě, kde hrají klíčovou roli při mineralizaci organických látek. Streptomycety tvoří hyfy, jež vytvářejí substrátové mycelium ve vegetativní fázi životního cyklu. V případě působení environmentálního stresu se hyfy diferencují do řetězců spor, které jsou odolné a přežijí tyto nepříznivé podmínky. Jedná se tedy o rod se složitým životním cyklem, který začíná klíčením spor a tvorbou substrátového mycelia ve vegetativní fázi vývojového cyklu, pokračuje tvorbou vzdušného mycelia ve stacionární fázi a končí tvorbou sept s řetězci spor. Většina specializovaných metabolitů je produkována při přechodu z vegetativní fáze do sporulační fáze životního cyklu. Významnou vlastností rodu *Streptomyces* je schopnost produkovat širokou škálu biologicky aktivních specializovaných metabolitů mezi něž patří např. laktamy, neribozomální peptidy, terpeny, polyketidy a pro tuto práci důležité linkosamidy. Všechny tyto specializované metabolity jsou klinicky využívány např. jako antimykotika, antivirotika, antibiotika nebo imunosupresiva. Dvě třetiny všech přírodních klinicky využívaných antibiotik jsou produkovány právě *Streptomyces*. (Alam et al., 2022; De Lima Procópio et al., 2012; Donald et al., 2022; Hwang et al., 2014; Yagüe et al., 2013;)

Mezi streptomycety produkující linkosamidy patří *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces caelestis* a *Streptomyces sp.* kmen H230-5 (Kadlcik et al., 2017).

##### 3.1.1 *Streptomyces lincolnensis*

*Streptomyces lincolnensis* je producentem antibiotika linkomycinu (viz obrázek 1), jež patří mezi linkosamidová antibiotika. Linkomycin byl poprvé izolován v roce 1962 (Hou et al., 2021). *Streptomyces lincolnensis* syntetizuje kromě linkomycinu A, který je medicínsky důležitý vzhledem k antimikrobiálním vlastnostem, zároveň také méně účinný a medicínsky nevýznamný linkomycin B (Hou et al., 2018). Pro tuto biosyntézu má *Streptomyces lincolnensis* genový shluk pro biosyntézu linkomycinu o velikosti 35 kbp, ve kterém se nachází 25 strukturálních genů, jeden gen kódující regulátor LmbU a 3 geny pro rezistenci (Hou et al., 2021).

### 3.1.2 *Streptomyces caelestis*

*Streptomyces caelestis* je aktinomyceta izolovaná z mořského prostředí. Tato streptomyceta je producentem linkosamidového antibiotika celesticetinu (viz obrázek 1), jež má pouze slabé antimikrobiální účinky (Kadlcik et al., 2017; Liu et al., 2012; Liu et al., 2019). Genový shluk pro biosyntézu celesticetinu obsahuje 23 genů kódujících biosyntetické enzymy a jeden rezistenční gen (Janata et al., 2018; Vobruba et al., 2020).

## 3.2 Linkosamidová antibiotika

Linkosamidy se skládají z aminokyseliny a aminosacharidu októzy spojených amidovou vazbou (Kadlcik et al., 2017). Linkosamidová antibiotika jsou orální a netoxické látky inhibující translaci vazbou na 23S rRNA 50S podjednotky bakteriálního ribozomu blízko peptidyl-transferázového centra (Mason et al., 2021). Cukerná část molekuly se váže na 23S rRNA ribozomu pomocí 3 vodíkových vazeb a to tak, že propylový zbytek na inkomycinu je umístěn u A místa ribozomu, čímž ho blokuje, a cukerná část molekuly blokuje ribosomální výstupní tunel. (Matzov et al., 2017) Linkosamidy jsou bakteriostatická antibiotika, jež brání v růstu mikroorganismům, která ale při vyšších koncentracích, kterých je možno *in vivo* také dosáhnout, mohou být baktericidní, a tedy mikroorganismy přímo zabíjet, s dlouhým postantibiotickým účinkem (Armengol Álvarez et al., 2022).

Mezi linkosamidové antimikrobiální látky izolované z přírody patří linkomycin (viz obrázek 1) produkovaný *Streptomyces lincolnensis*, Bu-2545 (viz obrázek 1) izolovaný ze *Streptomyces spp.* z kmene H230-5 a celesticetin (viz obrázek 1) produkovaný *Streptomyces caelestis*. Klinicky schválená linkosamidová antibiotika jsou linkomycin, klindamycin (viz obrázek 2) a pirlimycin (viz obrázek 2). Klindamycin a pirlimycin patří mezi semisyntetické linkosamidové deriváty. Mezi další semisyntetické linkosamidové deriváty patří deriváty firmy Vicuron a CELIN a ODCELIN (viz obrázek 9) připravené naší laboratoří. (Hendrickson et al., 2020; Kadlcik et al., 2017; Li et al., 2020; Mori a Abe, 2024; Rosenberg, 1996; Spížek a Řezanka, 2004; Wakiyama et al., 2017; Wang et al., 2016; Wang et al., 2020)



Obrázek 1 Přírodní linkosamidy vypracováno podle Kadlcik, 2017 v programu Chemsketch

### 3.2.1 Přírodní a semisyntetické linkosamidy

Linkomycin je klinicky používán ve formě hydrochloridu (Cheng et al., 2020). Jeho semisyntetický derivát klindamycin (7-chloro-7-deoxy-linkomycin) (viz obrázek 2) byl představen v roce 1966 farmaceutickou firmou Upjohn (Magerlein et al., 1967; Wright et al., 2014). Klindamycin je dle Státního ústavu pro kontrolu léčiv klinicky dostupný ve třech formách a to ve formě klindamycin-hydrochloridu ve formě perorálních tobolek, ve formě klindamycin-dihydrogen-fosfátu pro intravenózní podání a ve formě klindamycin-hydrochlorid-palmitátu ve formě orální suspenze (Armengol Álvarez et al., 2022; SÚKL). Klindamycin v současné době již zcela v humánní medicíně nahradil linkomycin (Armengol Álvarez et al., 2022).

Klindamycin je antibiotikum účinné proti aerobním gram-pozitivním kokům (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) a proti anaerobním bakteriím (*Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.* atd.). Dále je klindamycin účinný také proti prvokům, u kterých cíleně blokuje proteosyntézu ve speciální organelle apikoplastu (Janata et al., 2018). Klindamycin se využívá při léčbě malárie způsobené *Plasmodium falciparum* a toxoplasmózy vyvolané *Toxoplasma gondii* (Armengol Álvarez et al., 2022; Radke et al., 2018; SÚKL).

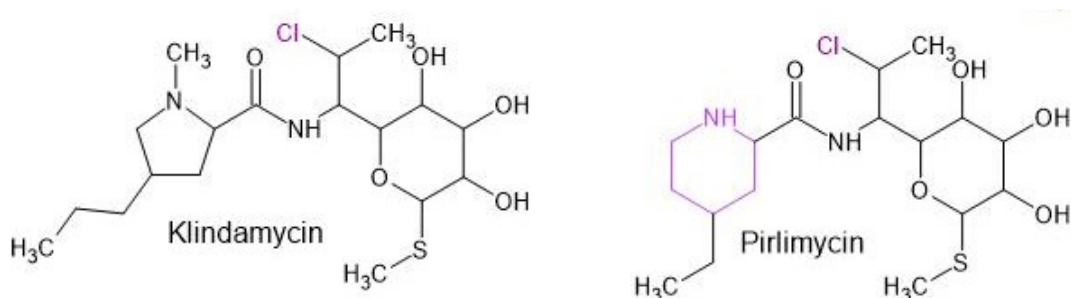
Ze stejné farmaceutické firmy poté také pochází další semisyntetický derivát linkomycinu s názvem pirlimycin (viz obrázek 2). V pirlimycinu je pyrolin (pětičlenný kruh) nahrazen piperidinem (šestičlenný kruh). Pirlimycin je pro klinické podání dostupný ve formě pirlimycin-hydrochloridu (Owens a Nickerson, 2011). Tato antimikrobiální látka se využívá ve veterinární medicíně k léčbě mastitidy (Li et al., 2020; Wright et al., 2014).

Další semisyntetické deriváty linkomycinu jsou v současné době předmětem probíhajícího výzkumu. V roce 2004 představila firma Vicuron na konferenci ve Washingtonu, DC čtyři semisyntetické deriváty linkomycinu, které mají modifikaci na C-7, pojmenované VIC 105403, VIC 105404, VIC 105405 a VIC 105446, které si následně v roce 2006 nechala patentovat firma Pfizer, se kterou došlo mezitím ke konsolidaci. VIC 105405 a VIC 105446 vykazovaly



slabé antimikrobiální účinky, ale VIC 105403 a VIC 105404 byly účinnější než klindamycin. VIC 105403 má ve své struktuře 1-demetylovou, 4-n-penthylovou a 7-metylovou skupinu. VIC 105404 má ve své struktuře 1-N-(2-hydroxyethyl), 4-n-penthylovou a 7-metylovou skupinu (Mitcheltree et al., 2021 (a); Mitcheltree et al., 2021 (b); Wakiyama et al., 2017).

V Laboratoři antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky byly připraveny linkosamidy Pelin, CELIN, ODCELIN a KLINCELIN (viz dále kapitola 3.4).

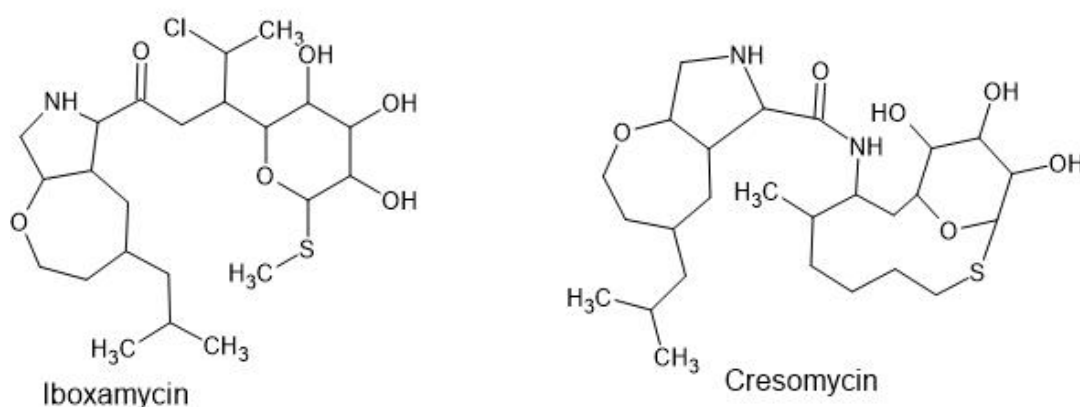


Obrázek 2 Semisyntetické linkosamidy, vypracováno podle Acharya a Kurosu Medicinal, 2023 v programu ChemSketch

### 3.2.2 Syntetické linkosamidy

Mezi nové a velmi slibné linkosamidové deriváty patří Iboxamycin (viz obrázek 3) připravený syntetickou konstrukcí vynalezenou Dr. Matthewem Michaltree. Iboxamycin se skládá z oxepanoprolinového skeletu navázaného na aminooktózový zbytek klindamycinu. Iboxamycin je orální antibiotikum vysoké účinnosti a velké šíře spektra, které se jeví jako bezpečné a efektivní v léčbě gram-pozitivních a gram-negativních bakteriálních infekcí u myší. Iboxamycin je účinný i vůči rezistentním kmenům včetně ESKAPE patogenů a včetně kmenů produkujících *Erm* a *Cfr* ribosomální RNA methyltransferázy a také vůči kmenům rezistentním k linkosamidům a k methicilin rezistentním stafylokokům. Byl účinný také vůči *Clostridium difficile*. Dále je účinný také vůči gramnegativním patogenům včetně karbapenem rezistentním *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter baumannii* a to včetně kmenů produkujících širokospektré betalaktamázy, aminoglykosidázy nebo methylázy. (Mitcheltree et al., 2021 (b)). Iboxamycin se ukázal být velmi účinný také proti *Listeria monocytogenes*, vůči které má pouze bakteriostatické účinky ovšem s výrazným postantibiotickým účinkem (Brodiazhenko et al., 2022).

Dalšími modifikacemi Iboxamycinu vznikl Cresomycin (viz obrázek 3), který vykazuje *in vitro* a *in vivo* účinnost jak vůči gram-pozitivním, tak i vůči gram-negativním patogenům včetně multirezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Ve srovnání s Iboxamycinem se Cresomycin váže na ribozom s vyšší afinitou, včetně metylovaných ribozomů, což vede k výrazně silnějším antimikrobiálním vlastnostem než má Iboxamycin (Wu et al., 2024).



Obrázek 3 Iboxamycin a Cresomycin, vypracováno podle Michaltree et al., 2021 a Wu et al., 2024 v programu ChemSketch

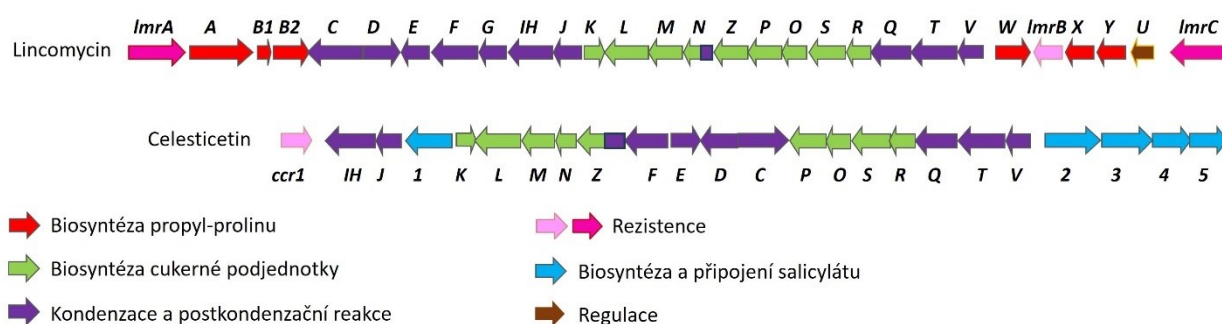
### 3.3 Genové shluky pro biosyntézu linkosamidových antibiotik

Linkosamidy se skládají ze dvou podstatných částí a to z neobvyklého osmiuhlíkatého thiocukerného jádra neboli aminothiooktózové podjednotky kondenzované pomocí amidové vazby s karboxylovou skupinou aminokyseliny. V celesticetinu se jedná o proteinogenní aminokyselinu L-prolin, u linkomycinu se jedná o neproteinogenní aminokyselinu propyl-prolin. Ve struktuře celesticetinu se navíc nachází ještě kyselina salicylová, která je ke zbytku struktury připojená přes dvouuhlíkatý zbytek na sírném atomu aminocukerné podjednotky (Janata et al., 2018; Wang et al., 2020)

Genový shluk pro biosyntézu linkomycinu (viz obrázek 4) obsahuje 25 biosyntetických genů, 3 geny rezistenční a jeden regulační gen. Genový shluk pro biosyntézu celesticetinu (viz obrázek 4) obsahuje 23 biosyntetických genů a jeden gen rezistenční. 18 z těchto genů jsou homologní páry. Geny jsou ve *Streptomyces caelestis* označeny *ccb\_* a u *Streptomyces lincolnensis* *lmb\_* (Ushimaru et al., 2016). Geny specifické pro genový shluk pro biosyntézu linkomycinu kódují enzymy pro biosyntézu propyl-prolinového prekurzoru a methyltransferázu LmbG. Geny vyskytující se pouze v genovém shluku pro biosyntézu

celesticetinu kódují enzymy pro biosyntézu a připojení salicylátové podjednotky a methyltransferázu Ccb4 (Janata et al., 2018; Ushimaru et al., 2016; Vobruba et al., 2020; Wang et al., 2016; Wang et al., 2020).

Biosyntéza thiooktózového cukerného jádra probíhá u linkomycinu i u celesticetinu stejně pomocí homologických enzymů kódovaných homogickými geny (Ushimaru et al., 2016). Geny kódující enzymy katalyzující biosyntézu cukerné části linkomycinu jsou: *lmbR*, *lmbN*, *lmbP*, *lmbK*, *lmbO*, *lmbM*, *lmbL*, *lmbZ*, *lmbS* a *lmbT*. Biosyntéza cukerné části celesticetinu je katalyzována homologickými enzymy exprimovanými z genového shluku pro biosyntézu celesticetinu. Stejně probíhají také kondenzační a postkondenzační reakce katalyzované enzymy LmbD, LmbV, LmbIH, LmbQ, LmbE a LmbJ nebo jejich homology ze *Streptomyces caelestis* (Janata et al., 2015; Najmanová et al., 2013; Zhao et al., 2015).



Obrázek 4 Genové shluky pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu, vypracováno podle Janata et al., 2018 a Vobruba et al., 2020

### 3.3.1 Geny kódující biosyntézu propyl-prolinové části linkomycinu

4-alkyl-L-prolin je neproteinogenní aminokyselina, která se vyskytuje v metabolitech aktinomycet. Mezi metabolity obsahující tuto sloučeninu patří pyrrolobenzodiazepiny, hormaomycin a pro tuto práci důležitý linkomycin A, ve kterém se vyskytuje N-methylovaný ve formě 4-propyl-L-prolinu (Zhong et al., 2017).

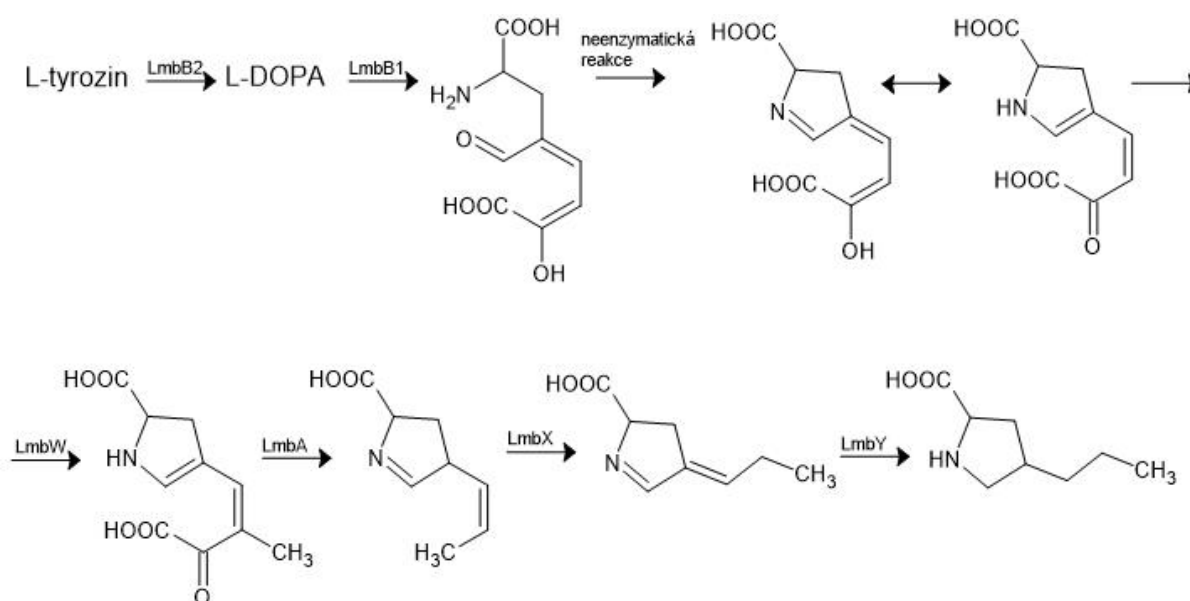
Geny, jež kódují biosyntézu propyl-prolinové části linkomycinu (viz obrázek 5), jsou specifické pro genový shluk pro biosyntézu linkomycinu. Jedná se o geny *lmbB2*, *lmbB1*, *lmbA*, *lmbW*, *lmbX* a *lmbY* (Janata, 2018; Jirásková et al., 2016; Steiningrová et al., 2020; Zhang et al., 2018; Zhong et al., 2017).

Biosyntéza 4-propyl-L-prolinu začíná hydroxylací L-tyrozinu, která je katalyzována hemovým proteinem LmbB2. Produktem této reakce je L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA)

(Novotná et al., 2013). Následuje otevření benzoového kruhu L-DOPA pomocí extradiolového štěpení. Tuto reakci katalyzuje L-DOPA dioxygenáza LmbB1, která dává vznik lineárnímu semialdehydovému meziprojektu, který je silně nestabilní a je ihned neenzymaticky cyklizován za vzniku pyrolinového produktu v iminové formě (Colabroy et al., 2014; Janata et al., 2018; Zhang et al., 2018). Následuje C-methylace katalyzovaná LmbW SAM (S-adenosylmethionin)-dependentní methyltransferázou (Janata et al., 2018; Jirásková et al., 2016; Pang, 2015).

Další reakcí v biosyntéze 4-propyl-L-prolinu je odstranění terminální dvou uhlíkaté jednotky (Zhang et al., 2018). Tato reakce je katalyzována hydrolázou LmbA, která cílí na karbonylovou skupinu postranního řetězce pyrolinového intermediátu a katalyzuje štěpení uhlíkaté vazby (Zhong et al., 2017). Následuje epimerace katalyzovaná LmbX (Zhang et al., 2018).

Posledním krokem k dosažení výsledného produktu této dráhy, tedy 4-propyl-L-prolinu, je redukce dvou dvojných vazeb katalyzovaná F<sub>420</sub>-dependentní reduktázou LmbY (Steiningerová et al., 2020).



Obrázek 5 Biosyntéza propyl-prolinu, vypracováno v programu Chemscketch podle Janata et al., 2018; Jirásková et al., 2016 a Seidlová, 2020

### 3.3.2 Geny kódující enzymy účastnící se biosyntézy cukerné podjednotky linkosamidových antibiotik

Geny kódující enzymy biosyntézy cukerné podjednotky jsou: *lmbR/ccbR*, *lmbN/ccbN*, *lmbP/ccbP*, *lmbK/ccbK*, *lmbO/ccbO*, *lmbM/ccbM*, *lmbL/ccbL*, *lmbZ/ccbZ*, *lmbS/ccbS* a *lmbT/ccbT*. Většina výzkumu probíhá na *Streptomyces lincolnensis* a biosyntéze linkomycinu, proto jsou dále v této části zmiňovány pouze enzymy účastnící se biosyntézy linkomycinu.

Intermediát methylthiolinkosamid je biosyntetizován pomocí enzymů LmbR a LmbN. LmbR katalyzuje trans-aldolovou reakci, ve které dochází k vazbě mezi C<sub>3</sub> donorem a C<sub>5</sub> akceptorem. C<sub>5</sub> akceptorem je D-ribóza-5-fosfát a C<sub>3</sub> donorem může být buď D-fruktóza-6-fosfát nebo D-sedoheptuloza-7-fosfát. Vzniká oktuloza-8-fosfát, která je 1,2-izomerizací katalyzovanou LmbN konvertována na októzu-8-fosfát (Sasaki et al., 2012). Októza-8-fosfát je následně fosforylována kinázou LmbP na októzu-1,8-bifosfát (Zhang et al., 2018). Intermediát októza-1,8-bifosfát je fosfatázou LmbK defosforylována na októzu-1-fosfát. Tato defosforylace je důležitá pro následnou aktivaci nukleotidem GTP na GDP-D- $\alpha$ -D-októzu katalyzovanou guanylyltransferázou LmbO. LmbO vykazuje striktní alfa-anomerní stereospecifitu jak pro októzové tak pro hexózové substráty (Lin et al., 2014).

GDP-D- $\alpha$ -D-októza je na GDP-D- $\alpha$ -D-linkosamid transformována za katalýzy čtyř enzymů. A to enzymů LmbM, LmbL, LmbZ a LmbS. LmbM je epimeráza příbuzná dobře prostudovaným epimerázám ADP-L-glycero-D-manno-heptóza-6-epimeráze a UDP-D-galaktóza-4-epimeráze. LmbM je ale výjimečná v tom, že katalyzuje epimerizaci jak na uhlíku 4, tak na uhlíku 6. Nejprve dochází k C6 epimerizaci GDP-D- $\alpha$ -D-októzy, která usnadňuje následnou dehydrataci, katalyzované enzymem LmbM epimerázou využívající NAD<sup>+</sup> kofaktor. Následně dochází k 6,8-dehydrataci tohoto intermediátu za katalýzy enzymy LmbL a LmbZ. Nejprve dochází k C7-oxidaci za katalýzy enzymem LmbZ. Po této dehydrogenaci pravděpodobně dochází k tautomerizaci, která předchází 1,4-dehydrataci, s tím že LmbL se pravděpodobně účastní tautomerizace a dehydratace. Poté LmbM katalyzuje epimerizaci na uhlíku číslo 4, díky které dochází k formování D-galakto-pyranózy, kterou vidíme v konečném októzovém jádře linkosamidu. Nakonec LmbS katalyzuje transaminaci tohoto intermediátu na finální GDP-D- $\alpha$ -linkosamid (Wang et al., 2020).

Následuje substituční reakce katalyzovaná enzymem S-glykosyltransferázou LmbT, která využívá ergothionin jako akceptor v přírodě vzácného C8 cukru. Při této S-glykosylaci

dochází k substituci guanosindifosfátu (GDP) v GDP-D- $\alpha$ -D-linkosamidu za ergothionin a vzniká EGT-S-linkosamid (Mori et al., 2023; Zhao et al., 2015). Ergothionin a mykothiol jsou zodpovědné za transfer, aktivaci a modifikace linkosamidu. Ergothionin je důležitý nosič, který je odpovědný za sestavení molekuly, mykothiol pak funguje jako donor atomu síry (Wang et al., 2016).

### 3.3.3 Geny kódující kondenzaci cukerné podjednotky s aminokyselinou a následující kroky biosyntézy linkomycinu

Enzymy katalyzující tyto kroky, jež budou detailněji rozepsány dále, jsou homologické a jsou kódovány následujícími geny. V genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu se jedná o geny: *lmbD*, *lmbV*, *lmbIH*, *lmbQ*, *lmbE* a *lmbJ*. V genovém shluku pro biosyntézu celesticetinu to jsou geny: *ccbD*, *ccbV*, *ccbIH*, *ccbQ*, *ccbE* a *ccbJ*. (Janata et al., 2015; Najmanová et al., 2013; Zhao et al., 2015). Biosyntéza linkomycinu se odlišuje kroky kódovanými *lmbF* a *lmbG*. Pro biosyntézu celesticetinu jsou specifické kroky kódované geny *ccbF*, *ccb1*, *ccb2*, *ccb3*, *ccb4* a *ccb5*. Jinou katalytickou funkci mají také enzymy LmbC a CcbC (Janata et al., 2018; Kaldcik et al., 2017; Kaldčik et al., 2013; Ushimaru et al., 2016; Wang et al., 2016).

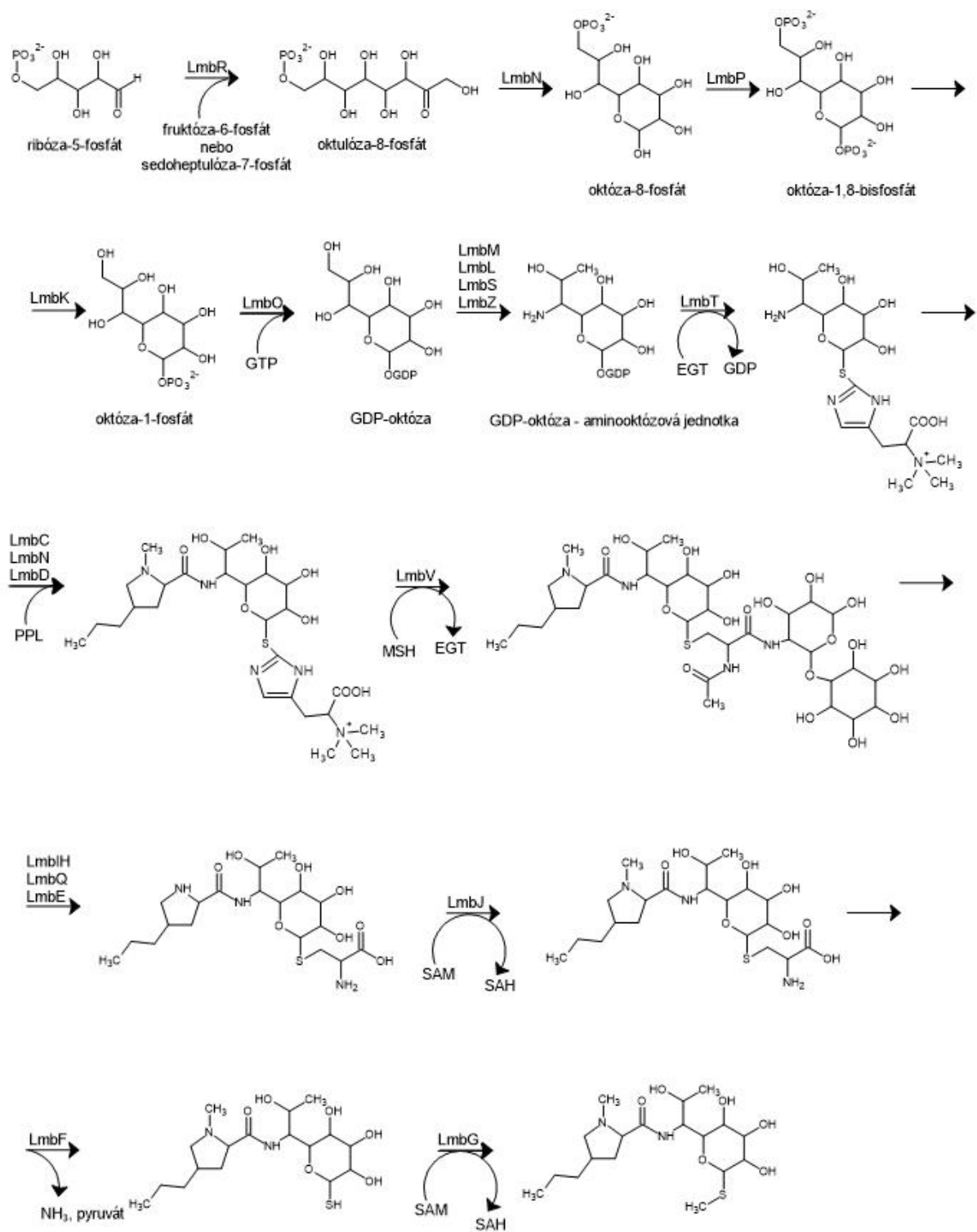
Sledu reakcí, které vedou k navázání aminokyselinového zbytku na októzu, se účastní enzymy LmbC, LmbD a LmbN. LmbN je bifunkční enzym, který katalyzuje 1,2-izomeraci, ale také má na svém N-konci protein vázající doménu. Nejprve dochází za katalýzy enzymem LmbC k aktivaci 4-propyl-L-prolinu pomocí adenosintrifosfátu (ATP) a poté je pomocí LmbC aktivovaný 4-propyl-L-prolin přenesen na protein vázající doménu proteinu LmbN. Nakonec dochází k transpeptidaci. Během transpeptidace je pomocí kondenzačního proteinu LmbD kondenzován aktivovaný 4-propyl-L-prolin s EGT-S-vázaným linkosamidem amidovou vazbou. (Kamenik et al., 2016; Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2015).

V následném kroku dochází k S-glykosylaci, kdy dochází k výměně ergothioninu za mykothiol, katalyzované S-glykosyltransferázou LmbV. Ergothionin je k linkosamidovému jádru vázán pomocí  $\beta$ -S vazby. Tento krok je nevratný a děje se díky nukleofilní substituci na druhém uhlíku. Nejprve dochází k nukleofilnímu ataku mykothiolu na C1, který je aktivovaný ergothioninem, formujícího se linkosamidu a poté dochází k S-glykosylaci pomocí nukleofilního ataku na C2, čímž se tvoří  $\alpha$ -S vazba mezi mykothiolem, který je donorem sírného atomu, a linkosamidovým jádrem (Zhao et al., 2015; Zhang et al., 2018).

V dalším biosyntetickém kroku dochází k N-deacetylaci na N-acetyl-L-cysteinovém zbytku. Tato deacetylace je katalyzována enzymy LmbIH a LmbQ, které patří do TldD/PmbA proteinové rodiny, ve které se jinak nachází pouze proteázy a peptidázy. Stejně jako ostatní proteinové páry z této rodiny se tento skládá z proteinu obsahujícího místo vazby kovu (LmbIH) a z proteinu, který toto místo neobsahuje (LmbQ). Ke katalýze reakce je nutné, aby enzymy LmbIH a LmbQ pracovaly v páru. K této reakci musí dojít ještě před N-methylací katalyzovanou LmbJ, jelikož tato methylace zabraňuje N-deacetylaci a vzniká tak případně vedlejší produkt neschopný podstoupit další reakce a utvořit finální produkt linkomycin (Vobruba et al., 2020).

Dále dochází k hydrolýze mykothiolového zbytku katalyzované enzymem LmbE (Wang et al., 2020; Zhao et al., 2015). Ve výsledku tedy to jediné, co momentálně po mykothiolu ve struktuře budoucího linkomycinu zbývá, je derivát kyseliny merkapturové charakterizovaný zbytkem N-acetyl-S-cysteinu (Kamenik et al., 2016). Poté nastává již zmíněná N-methylace na prolinu katalyzovaná SAM-dependentní methyltransferázou LmbJ (Najmanová et al., 2013; Zhang et al., 2018).

Od dalšího biosyntetického kroku se biosyntetické dráhy celesticetinu a linkomycinu zcela rozcházejí.



Obrázek 6 Biosyntéza linkomycinu vypracováno podle Janata et al., 2018 a Wang et al., 2020 v programu Chemscketch

### 3.3.3.1 Finální kroky biosyntézy linkomycinu

V biosyntetické dráze linkomycinu dochází k odstranění S-cysteinového zbytku pomocí pyridoxal-5'-fosfát dependentního enzymu s beta-lyázovou aktivitou LmbF. LmbF katalyzuje



štěpení C-S vazby mechanismem  $\beta$ -eliminace. (Kamenik et al., 2016; Wang et al., 2016) Nejprve dochází k deprotonaci na  $\alpha$ -pozici a poté k  $\beta$ -eliminaci a vzniká vysoce reaktivní thiol a vedlejší produkty  $\text{NH}_3$  a pyruvát (Ushimaru et al., 2016; Wang et al., 2016). V tuto chvíli tedy jediné, co zbývá ve struktuře budoucího linkomycinu po mykothiolu je sirný atom (Kamenik et al., 2016). Následuje poslední krok biosyntézy, ve kterém je vzniklý thiol ve velice nestabilním intermediátu přeměněn na methylmerkaptovou skupinu díky S-methylaci katalyzované S-methyltransferázou LmbG (Wang et al., 2016), čímž vzniká finální produkt linkomycin (viz obrázek 6).

### 3.3.3.2 Specifické kroky v biosyntéze celesticetinu ve srovnání s biosyntézou linkomycinu

Jedním ze zásadních rozdílů při biosyntéze linkomycinu a celesticetinu je substrátová specifita enzymů LmbC a CcbC. Oba tyto enzymy slouží jako adenylační domény neribozomální peptidové syntézy linkosamidu a striktně tedy zodpovídají za rozpoznání substrátu k aktivaci. LmbC má širší substrátovou specifitu a může aktivovat více různých substrátů, ale nejvyšší afinitu má ke svému přirozenému substrátu 4-propyl-L-prolinu. CcbC má naopak striktní substrátovou specifitu a je schopno aktivovat pouze svůj přirozený substrát L-prolin. Za tuto schopnost aktivovat adenylaci 4-propyl-L-prolin prostřednictvím LmbC je zodpovědná vazebná kapsa pro substrát tvořící se v místě vazby ligandu, která zde vzniká díky nahrazení velkých aminokyselinových zbytků, které se nachází u CcbC, malými aminokyselinovými zbytky. Do tohoto prostoru se tedy může navázat postranní alkylový řetězec na prolinu. (Kadlčík et al., 2013)

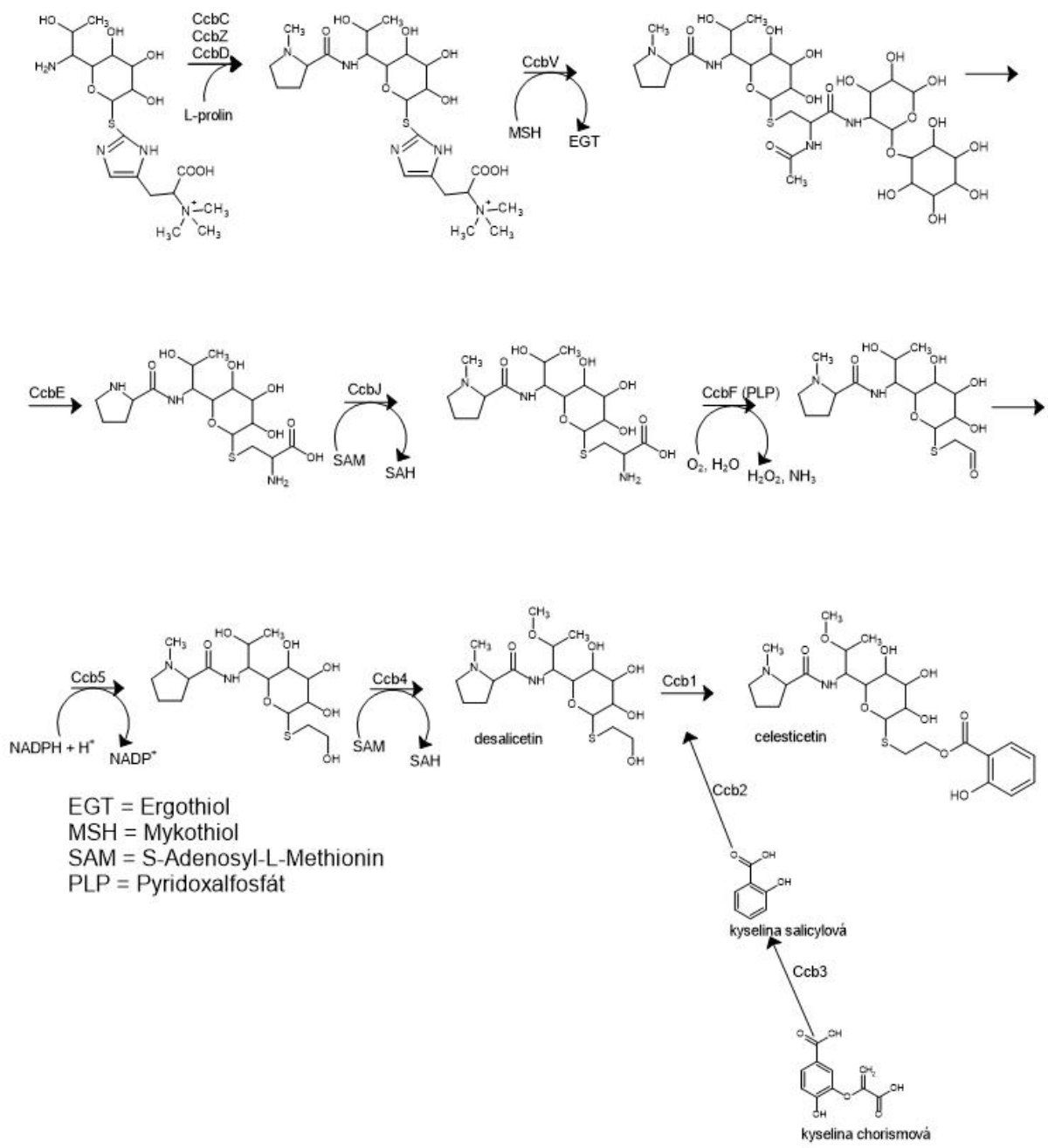
Dalším významným rozdílem v biosyntéze celesticetinu je to, na kterém enzymu se nachází protein vázající doména, na kterou je navázán aktivovaný, v tomto případě, L-prolin. Tato protein vázající doména se nachází v linkomycinové biosyntetické dráze na N konci proteinu LmbN, v biosyntetické dráze celesticetinu se nachází na C konci proteinu CcbZ. (Janata et al., 2015)

Biosyntetické dráhy se zcela odlišují od kroku, který je katalyzovaný enzymem LmbF/CcbF (viz obrázek 8), tedy v kroku následujícím po N-methylaci prolinu (Kadlčík et al., 2017). CcbF je dekarboxylační deamináza a je stejně jako LmbF pyridoxal-5'-fosfát dependentní enzym, který ke své aktivitě potřebuje pyridoxal-5'-fosfát jako kofaktor. CcbF ale katalyzuje dekarboxylační deaminaci a produktem této reakce je dvouuhlíkatý aldehyd navázaný na sirný atom. Zároveň dochází k produkci  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{NH}_3$ . CcbF je aktivní pouze v přítomnosti kyslíku (Janata et al., 2018; Ushimaru et al., 2016; Wang et al., 2016). Dalším

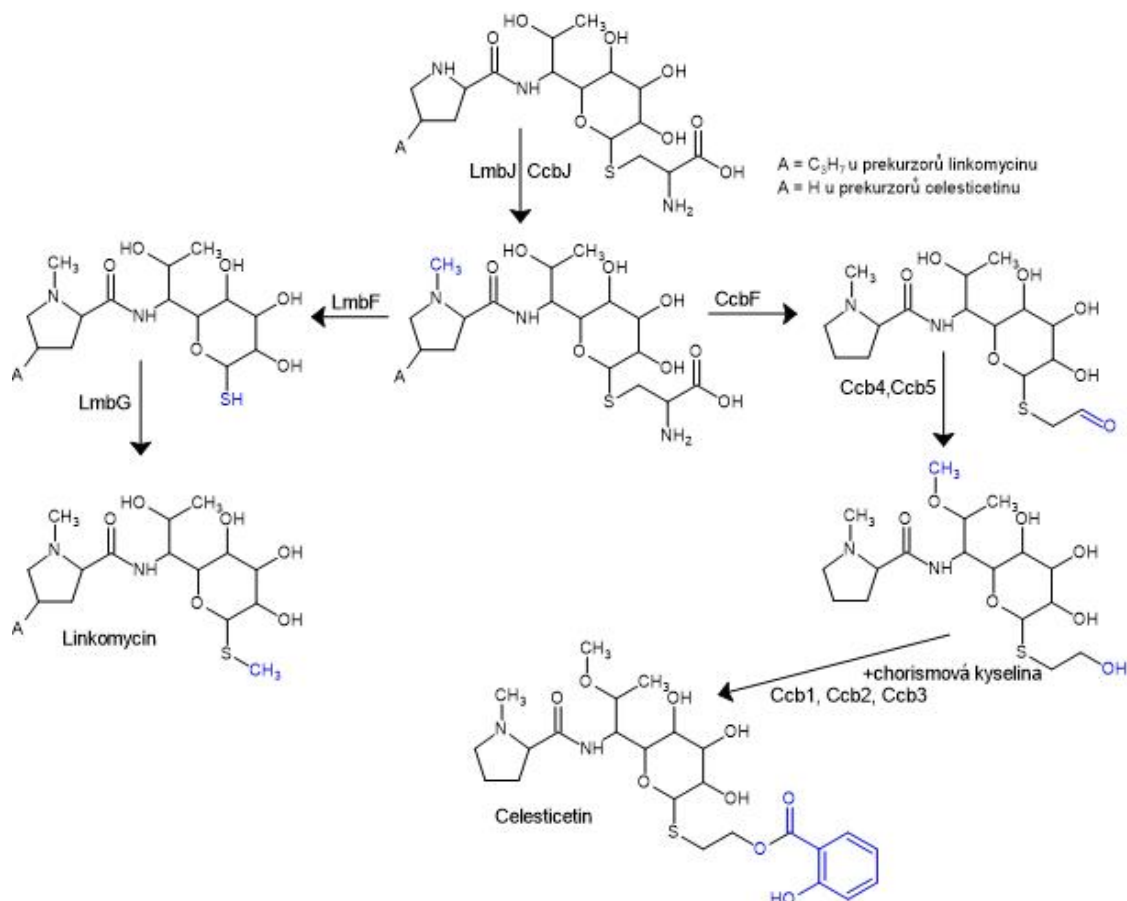
reakčním krokem v biosyntéze celesticetinu je redukce reaktivní aldehydové skupiny na alkohol pomocí NADPH-dependentní oxidoreduktázy Ccb5 (Janata et al., 2018; Wang et al., 2016). Následuje O-methylace na C7-hydroxy skupině katalyzovaná SAM-dependentní O-methyltransferázou Ccb4, čímž vzniká desalicetin (Janata et al., 2018; Ushimaru et al., 2016; Wang et al., 2016). Na pořadí reakcí katalyzovaných enzymy Ccb4 a Ccb5 nezáleží (Wang et al., 2016).

Posledním krokem celesticetinové biosyntézy je vytvoření esterové vazby mezi alkoholovou skupinou a kyselinou salicylovou (Janata et al., 2018). Tento krok je katalyzován enzymy salicylát-syntázou Ccb3, acyl-koenzym A ligázou Ccb2 a acyltransferázou Ccb1. Salicylát-syntáza přeměňuje kyselinu chorismovou na kyselinu salicylovou, Ccb2 adenyluje kyselinu salicylovou a následně katalyzuje její transport na koenzym A. Nakonec Ccb1 katalyzuje kondenzaci kyseliny salicylové a desalicetinu (Janata et al., 2015; Janata et al., 2018; Kadlcik et al., 2017) (viz obrázek 7).

CcbF je schopno přijmout také linkomycinový intermediát, LmbF je schopno přijmout kromě linkomycinového prekurzoru také celesticetinový prekurzor. Různou kombinací enzymů LmbF, LmbG, CcbF a Ccb4 mohou vzniknout díky jejich vzájemné kompatibilitě z celesticetinového prekurzoru různé linkosamidové produkty (Ushimaru et al., 2016).



Obrázek 7 Konečné kroky biosyntézy celesticetinu, vypracováno v programu Chemskech podle Janata et al., 2018 a Seidelová, 2020



Obrázek 8 Rozdílné kroky v biosyntéze linkomycinu a celesticetinu, vypracováno podle Kadlcik et al., 2017 v programu Chemscketch

### 3.3.4 Regulační a rezistenční geny ve shlicích pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu

Biosyntéza linkomycinu je pozitivně regulována pomocí transkripčního aktivátoru LmbU. LmbU je DNA vazebný protein, který aktivuje promotory genů *lmbA*, *lmbC*, *lmbJ* a *lmbW* a tím spouští transkripci proteinů LmbA, LmbC, LmbJ a LmbW. LmbU zároveň reprimuje promotory genů *lmbU* a *lmbK* (Hou et al., 2018). LmbU reguluje také transkripci genů mimo genový shluk pro biosyntézu linkomycinu a to například gen *hpdA*, který je důležitý pro biosyntézu L-tyrozinu jakožto prekurzoru linkomycinu, nebo geny pro dusíkatý a cukerný transmembránový transport (Lin et al., 2020).

V genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu jsou dále tři geny (*lmrA*, *lmrB*, *lmrC*) kódující proteiny zajišťující rezistenci k linkomycinu. Jedná se o linkomycinový transmembránový efluxní protein LmrA, o 23S rRNA dimethyltransferázu LmrB a ATP vazebný protein z rodiny ABCF LmrC. LmrA a LmrB zajišťují silnou rezistenci vůči linkomycinu, díky LmrC je buňka pouze středně rezistentní k linkomycinu. LmrC

má dvojí funkci a to rezistenční a regulační. LmrC má podstatnou funkci v přenosu signálu, který je vyvolán antibiotiky ze skupiny linkosamidů, streptograminů A nebo pleuromutilinů. Tato antibiotika se váží do peptidyl-transferázového centra na ribozomu a spouští expresi *lmrC* a LmrC následně aktivuje transkripci *lmbU*. Tím se spouští transkripce genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. LmrA je regulováno globálním regulátorem GlnR (Hou et al., 2021; Janata et al., 2015; Koběrská et al., 2008; Koběrská et al., 2021; Tiffert et al., 2008). GlnR je globální regulátor, který reguluje dusíkový metabolismus (Martín a Liras, 2020).

Biosyntéza linkomycinu je dále regulována proteiny kódovanými mimo genový shluk pro biosyntézu linkomycinu jako např. LcbR1, DeoR, které produkci linkomycinu snižují, nebo BldD, který pozitivně reguluje produkci linkomycinu (Li et al., 2019; Wang et al., 2023; Zou et al., 2023).

V genovém shluku pro biosyntézu celesticetinu se nachází gen *ccr1* kódující 23S rRNA monomethyltransferázu Ccr1, která zajišťuje rezistenci k celesticetinu (Janata et al., 2015; Koběrská et al., 2021).

### **3.3.5 Evoluce linkosamidových biosyntetických shluků**

Geny pro enzymy biosyntetických drah specializovaných bakteriálních metabolitů jsou seskupeny blízko u sebe v seskupeních nazývaných biosyntetické genové shluky (Del Carratore et al., 2019). Biosyntetické genové shluky komplexních specializovaných bakteriálních metabolitů vytvářejí podshluky. Každý podshluk kóduje biosyntézu určitého prekurzoru a může být na ostatních podshlucích evolučně nezávislý (Janata et al., 2018). Tyto biosyntetické genové podshluky mohou být šířeny pomocí horizontálního genového přenosu mezi nepříbuznými biosyntetickými genovými shluky a jsou do nich začleňovány, což vede k biosyntéze nových produktů, které mohou mít výhodnější vlastnosti (Chevrette et al., 2020; Janata et al., 2018; Osbourn, 2010). Výhodou shlukování je společný přenos všech potřebných genů a jejich snazší regulace (Osbourn, 2020). Biosyntetické genové shluky kódující produkci toxických metabolitů musí taktéž obsahovat geny rezistence k těmto sloučeninám. Tyto geny rezistence mohou být šířeny pomocí horizontálního genového přenosu samostatně. Původci genů antibiotické rezistence, které nevznikly náhodnou mutací, jsou půdní mikroorganismy biosyntetizující antimikrobiální látky (Forsberg et al., 2012; Chevrette et al., 2020; Maclean a San Millan, 2019).

Evoluce biosyntetických genových shluků je dobře vidět na propyl-prolinové podjednotce linkomycinu. Biosyntetický genový podshluk pro 4-alkyl-L-prolinový derivát linkomycinové a hormaomycinové biosyntetické dráhy pocházejí pravděpodobně ze společného předka

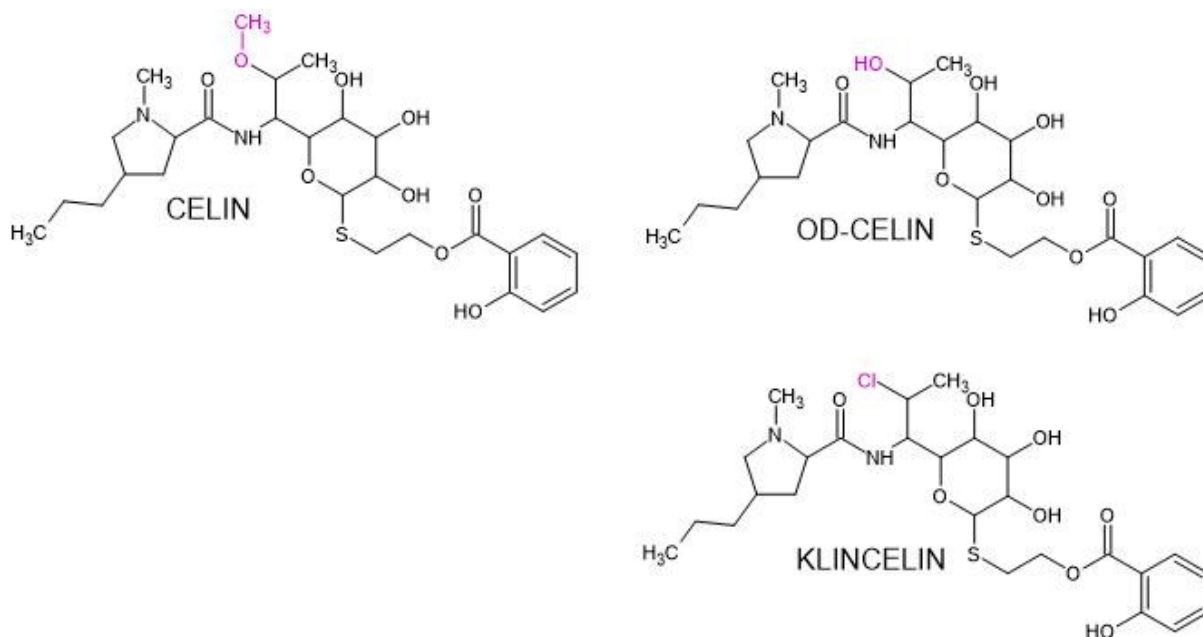
vzhledem k fylogenetické podobnosti genů, stejnému pořadí genů a přítomnosti homologního regulačního genu. Další linkosamidová antibiotika celesticetin a Bu-2545 4-alkyl-L-prolinový derivát neobsahují. Tento podshluk byl tedy pravděpodobně pomocí horizontálního genového přenosu přenesen a začleněn do původního producenta linkosamidu obsahujícího také běžnou proteinogenní aminokyselinu L-prolin (Janata et al., 2018; Kadlcik et al., 2017; Vobruba, 2020). Pro tento účel se vyvinul enzym LmbC, který je schopný aktivovat tento derivát prolinu, který může být následně začleněn do molekuly. Tuto schopnost pravděpodobně postrádá evolučně starší enzym (Janata et al., 2018; Kadlčík et al., 2013).

Vzhledem k tomu, že celesticetinový biosyntetický genový shluk neobsahuje homolog regulačního genu *lmbU* a hormaomycinový biosyntetický genový shluk obsahuje homolog tohoto genu označený *hrmB*, tento regulační gen byl pravděpodobně přenesen horizontálním genovým přenosem spolu s biosyntetickým genovým podshlukem pro 4-alkyl-L-prolinový derivát (Janata et al., 2018; Lin et al., 2020).

### **3.4 Data Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky**

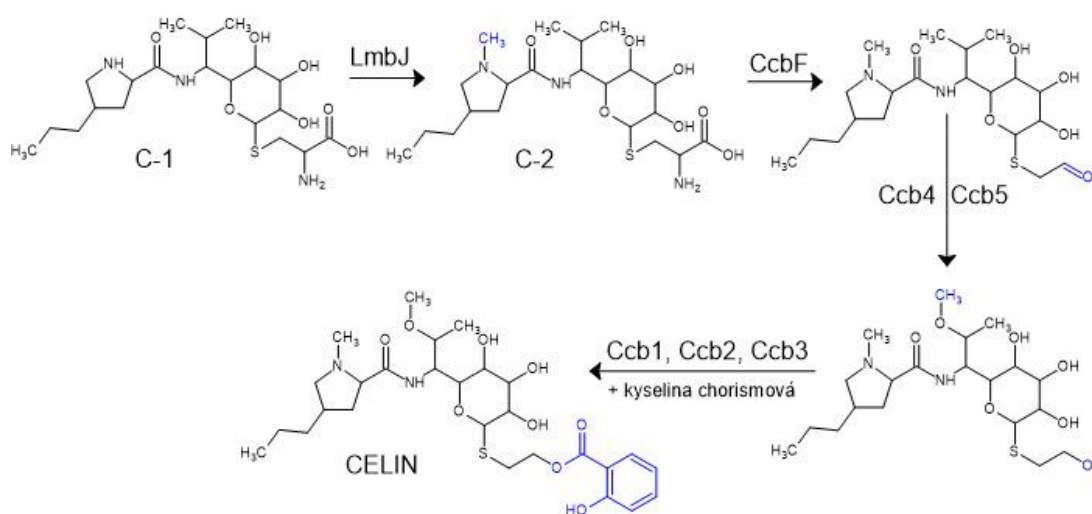
Skupina Ulanová a spol. připravila Pelin, což byl linkomycin s 4-pentyl-L-prolinem místo 4-propyl-L-prolinu. Tento Pelin byl produkován mutantním kmenem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbX inkubovaným na médiu s 4-pentyl-L-prolinem a byl účinnější než linkomycin (Ulanová et al., 2010).

V laboratoři byla poté připravena hybridní linkosamidová antibiotika CELIN a ODCELIN (viz obrázek 9), která kombinují 4-propyl-L-prolinový vedlejší řetězec a O-methylovou skupinu z linkomycinu a dvouuhlíkatý zbytek a kyselinu salicylovou z celesticetinu. ODCELIN je derivát CELINu, který neobsahuje methyl na kyslíkovém atomu. CELIN byl připraven *in vitro* za využití linkomycinového intermediátu a enzymů účastnících se biosyntetické dráhy celesticetinu CcbF, Ccb1, Ccb2, Ccb4, Ccb5 (viz obrázek 10) (Kadlcik et al., 2017) (viz kapitola 3.3). Tohoto bylo možné docílit, protože enzym CcbF z celesticetinové biosyntetické dráhy je schopen přijmout také linkomycinový intermediát jako substrát (Ushimaru et al., 2016). Dalším hybridním derivátem je KLINCELIN (viz obrázek 9), což je chlorovaný derivát CELINu (nepublikovaná data laboratoře).

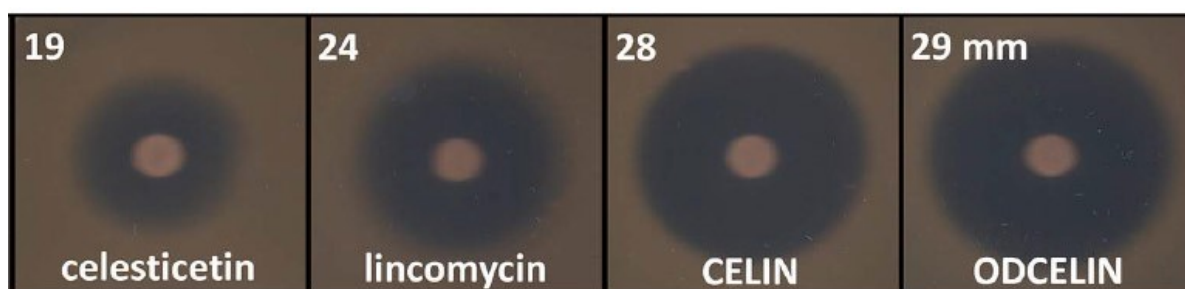


Obrázek 9 CELIN, OD-CELIN a KLINCELIN vypracováno podle Kadlcik et al., 2017 v programu Chemscketch

Délka vedlejšího uhlíkatého řetězce na prolinu výrazně ovlivňuje antibiotickou účinnost, propylový zbytek na prolinu u linkomycinu tedy výrazně zvyšuje jeho antimikrobiální efekt. Zbytek kyseliny salicylové taktéž výrazně zvyšuje antibiotickou účinnost. Proto CELIN kombinuje oba tyto zbytky. Antimikrobiální efekt CELINu a ODCELINu byl měřen oproti antimikrobiálnímu efektu celesticetinu a linkomycinu na citlivém gram-pozitivním kmeni *Kocuria rhizophila*. Ukázalo se, že CELIN i ODCELIN mají silnější antimikrobiální efekt než linkomycin. Minimální inhibiční koncentrace celesticetinu je 1600 nM, linkomycinu 400 nM a CELINu a ODCELINu 100 nM (viz obrázek 11) (Kadlcik et al., 2017).



Obrázek 10 In vitro syntéza CELINu, vypracováno v programu ChemSketch



Obrázek 11 Velikost inhibiční zóny CELINu a ODCELINu v porovnání s linkomycinem a celesticetinem, Kadlcik et al., 2017

Po *in vitro* syntéze CELINu byly naší laboratoří připraveny různé mutanty *Streptomyces lincolnensis*, jež dle dosavadních znalostí a dostupných informací měly produkovat hybridní antibiotikum CELIN. Nejprve byla připravena mutanta s deletovaným genem *lmbF* nazvaná  $\Delta$ lmbF. U této mutanty byla pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí měřena produkce linkomycinu. Bylo zjištěno, že k produkci linkomycinu nedochází a že dochází k hromadění linkomycinového prekurzoru nazvaného C-2. Do tohoto mutantního kmene  $\Delta$ lmbF byly na jednom operonu vloženy geny *ccbF* a *ccb1*, čímž vznikl mutantní kmen pojmenovaný BN3159. U tohoto kmene bylo pomocí proteomické analýzy pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí zkontrolováno, že nedochází k expresi LmbF, ale naopak dochází k expresi CcbF a Ccb1. Dalším měřením bylo zjištěno hromadění linkomycinového prekurzoru C-2 ovšem v menší míře než u  $\Delta$ lmbF. Bylo taktéž zjištěno, že byla obnovena produkce linkomycinu. Do kmene BN3159 byly na dalším operonu vloženy geny *ccb2*, *ccb3*, *ccb4* a *ccb5*, čímž vznikl kmen BN3167, u něhož byla potvrzena exprese genů *ccbF*, *ccb1*, *ccb2*, *ccb3*, *ccb4* a *ccb5* a zároveň bylo potvrzeno, že *lmbF* se neexprimuje. Linkomycinový prekurzor C-2 se u tohoto kmene hromadil, ale ještě v menší míře než u BN3159. K produkci linkomycinu kmenem BN3167 také docházelo.

Dále byly připraveny mutantní kmeny, ve kterých byl gen *lmbF* vyměněn za gen *ccbF* a kmeny mající v genu *lmbF* vložený stopkodon. Kmeny se stopkodonem v genu *lmbF* linkomycin neprodukují, ale u kmenů, u nichž byl gen *lmbF* vyměněn za gen *ccbF* byla detekována produkce linkomycinu v podobném množství jako u divokého typu kmene.

### 3.5 Proteinové interakce

Vzhledem k výsledkům naší laboratoře bude v této práci ověřována hypotéza o proteinových interakcích mezi proteinem LmbF a proteiny exprimovanými z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. Jelikož jedním z eventuálních vysvětlení, proč produkce CELINu *in vivo* v připraveném mutantním producentovi *Streptomyces lincolnensis* neprobíhá,



je možnost interakcí mezi proteiny kódovanými v rámci jednoho biosyntetického genového shluku.

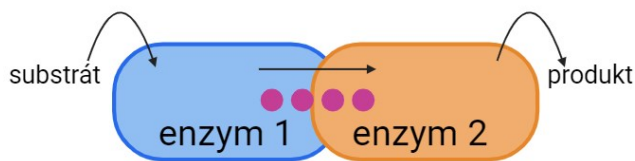
Proteiny v buňce nebývají běžně zcela homogenně rozptýlené v celém objemu buňky, ale spíše se shlukují v prostoru a čase díky proteinovým interakcím. Tyto shluky spolu interagujících enzymů jsou tvořeny enzymy jedné metabolické dráhy a tvorba a rozpad těchto shluků dynamicky reaguje na aktuální biochemické podmínky a podněty. Výhodou těchto enzymových shluků je, že usnadňují substrate channeling neboli předávání substrátu (Sweetlove a Fernie, 2018).

Substrate channeling je proces díky kterému dochází k přímému přenesení meziprojektu dané metabolické dráhy z aktivního místa jednoho enzymu, kde vzniká jako produkt, do aktivního místa enzymu katalyzujícího následnou biochemickou reakci, kde je využit jako substrát. Nedochází tak k rozptýlení meziprojektu v celém objemu buňky (Kummer et al., 2021; Sweetlove a Fernie, 2018). Substrate channeling zadržuje metabolit v daném místě, což v praktickém důsledku znamená zvýšení lokální koncentrace substrátu a zvýšení pravděpodobnosti s jakou vstoupí substrát do aktivního místa enzymu, čímž se zvyšuje katalytická účinnost (Pareek et al., 2021; Zhang a Fernie, 2021). Mezi další výhody patří ochrana buňky před toxickými intermediáty, ochrana labilních meziprojektů před degradací, regulace toku intermediátů mezi různými kompetitivními drahami a využití různých enzymů v místech větvení metabolických drah a zábrana hromadění intermediátu (Milani et. al., 2003; Miles et. al., 1999; Schoffelen a Van Hest, 2012; Sweetlove a Fernie, 2018; Zhang a Fernie, 2021). Tyto proteinové interakce také snižují množství molekul vody potřebné k hydrataci enzymů, čímž se zvyšuje enzymatická aktivita (Zhang a Fernie, 2021).

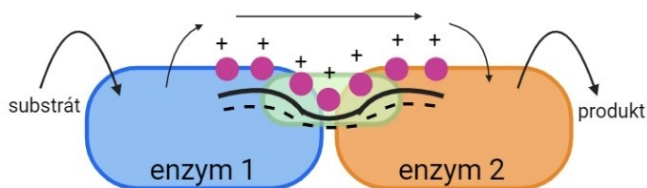
Existují tři různé možnosti proteinových interakcí. První z nich je přímý transfer (viz obrázek 12) dokázaný u tryptofan syntázy u *Salmonella typhimurium*. Tryptofan syntáza se skládá ze dvou podjednotek a katalyzuje poslední dvě reakce tryptofanové biosyntézy.  $\alpha$  podjednotka syntetizuje indol a  $\beta$  podjednotka tento indol dále zpracovává. Mezi  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotkou se tvoří hydrofobní indolový kanál, jehož diametr přesně odpovídá diametru indolu, který je tímto kanálem transportován z místa syntézy indolu do místa jeho dalšího zužitkování. Tento kanál dokáže pojmout až 4 jednotky indolu a zabraňuje tak rozptýlu hydrofobního intermediátu, který by jinak mohl difundovat z buňky (Pareek et al., 2021; Schoffelen a Van Hest, 2012). Další možností je proximity channeling (viz obrázek 13), neboli channeling založený na vzájemné blízkosti molekul, u kterého dochází k elektrostatickým interakcím mezi meziprojektu a povrchem enzymu. Mezi aktivními místy jsou na povrchu enzymu umístěny pozitivně nabitě zbytky, se kterými interaguje

negativně nabitý intermediát. Tento způsob byl prokázán u dihydrofolát reduktáza-thymidylát syntázy z *Leishmania major* (Miles et al., 1999; Pareek et al., 2021; Zhang, 2011). Poslední možností je tvorba metabolonů (viz obrázek 14). Metabolon je subramolekulární, multiproteinový komplex obsahující enzymy katalyzující následně kaskádovitě po sobě jdoucí biochemické reakce. Jedná se o bezmembránový útvar, který je od okolí oddělen pouze fázovou separací a pomocí interakcí mezi proteiny. Metabolony jsou pouze přechodná enzymová uskupení, která dynamicky reagují na dané podmínky. Metabolony mohou také interagovat se strukturami buňky jako například s cytoplazmatickou membránou (Pareek et al., 2021; Zhang a Fernie, 2021; Zhang et al., 2022).

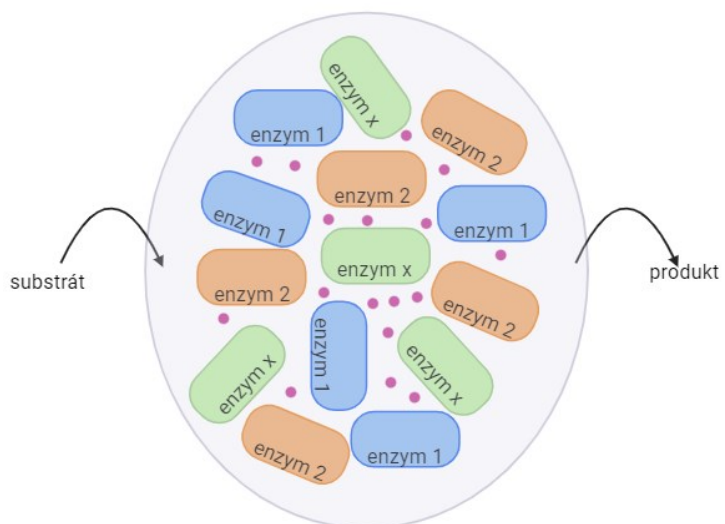
Prvním dokázaným metabolonem byl metabolon enzymů Krebsova cyklu složený z enzymů fosfofruktokinázy, aldolázy, triózafosfát izomerázy a glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (Zhang a Fernie, 2021). Mezi další metabolony patří například purizom eukaryotních buněk, který obsahuje enzymy účastnící se *de novo* biosyntézy purinů (Pareek et al., 2021; Zhang a Fernie, 2021). Že dochází u enzymů Krebsova cyklu a u enzymů *de novo* biosyntézy purinů k tvorbě enzymových seskupení bylo dokázáno i u *Escherichia coli* (Gedeon et al., 2023; Sweetlove a Fernie, 2018).



Obrázek 12 Přímá interakce skrz molekulární kanál, vypracováno v Biorenderu podle Pareek et al, 2021, růžové kuličky reprezentují produkt jednoho enzymu přenášený na enzym druhý, jež ho využívá jako substrát



Obrázek 13 Proximity channeling, vypracováno v Biorenderu podle Pareek et al, 2021, růžové kuličky reprezentují produkt jednoho enzymu přenášený na enzym druhý, jež ho využívá jako substrát



Obrázek 14 Metabolon, vypracováno v Biorenderu podle Pareek et al, 2021, růžové kuličky reprezentují meziprodukt přenášený mezi jednotlivými enzymy metabolonu, enzym x reprezentuje veškeré další enzymy, které jsou součástí metabolonu (např. metabolon Krebsova cyklu je složen ze 4 enzymů, pak by enzym x reprezentoval enzym 3 a 4)

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

<b>Chemikálie</b>	<b>Dodavatel</b>
Acrylamide/Bis Solution 37 .5 :1	SERVA, Německo
Agar Bacteriological	OXOID, UK
Calcium carbonate precipitated	AppliChem, Německo
D-Glucose monohydrate	Lachner, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	CHEMAPOL, Československo
di-Potassium hydrogen phosphate	AppliChem, Německo
Dithiothreitol (DTT)	VWR International, USA
D-Mannitol	Lachner, ČR
DpnI + 10× rCut Smart™ pufr	New England BioLabs, USA
Ethanol 96 %	VWR International, USA
Ethidium bromid	Sigma Aldrich, USA
Glycerol bidistilled 99,5 %	VWR International, USA
Formic acid 99 %	SERVA, Německo
HemoKlen Taq + 5× HemoKlen Taq pufr	New England BioLabs, USA
HindIII	New England BioLabs, USA
Imidazole	Sigma Aldrich, USA
IPTG (Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranozid)	VWR International, USA
LB Broth (Miller)	Sigma Aldrich, USA
Le Agarose	Lonza, Švýcarsko
Magnesium sulfate heptahydrate	AppliChem, Německo
Malt Extract	VWR International, USA
Manganese sulfate monohydrate	AppliChem, Německo
NEBuilder® HiFi DNA Assembly	New England BioLabs, USA
Neutralised Bacteriological Peptone	OXOID, UK
Nonidet® P40	VWR International, USA
PureCube 100 INDIGO Ni-Agarose	Cube Biotech, Německo
Pyridoxal-5-phosphate	Sigma Aldrich, USA
Síran amonný	CHEMAPOL, Československo
Sodium dihydrogen phosphate dihydrate	AppliChem, Německo
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, USA

Sodium hydroxide pearls	Lachner, ČR
Sodium chloride	Lachner, ČR
Taq purple + 10× Taq purple pufr	TopBio, ČR
Temed	MP Biomedicals, USA
Trizma® Base	Sigma Aldrich, USA
Tween	Sigma Aldrich, USA
XhoI	New Englad BioLabs, USA
Yeast Extract	OXOID, UK
SigmaFAST™ proteasový inhibitor, tablety	Sigma Aldrich, USA

Tabulka 1 Použité chemikálie

## 4.1.2 Použitá instrumentace

Přístroj	Výrobce
Analytické váhy ME204	Mettler Toledo, USA
Centrifuga 5424 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5810 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Avanti J-26S XPI	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti J-30I	Beckman Coulter, USA
Horizontální elektroforéza multiSUB min	Cleaver Scientific, UK
Chromatografický systém NGC Discover 100	Bio-Rad Laboratories, USA
Kolona ENrich SEC 650 a0 x 300	Bio-Rad Laboratories, USA
Koncentrátor Cocentrator Plus	Eppendorf, Německo
Laminární box SafeFAST Classic	FASTER, Itálie
Míchačka DRAGONLAB MS-H-S	DragonLaboratories, Čína
Mikroskop OLYMPUS BX41	OLYMPUS, Japonsko
Nanodrop DS11	DeNovix, USA
Orbitální třepačky vyhřívané Multitron Pro	INFORS MT, UK
Přístroj na měření pH SevenCompact	Mettler Toledo, USA
Sonikátor Q700	QSONICA, USA
Sonikátor UP200S	Hielscher, Německo
Stroj na výrobu ledu Bar line B 2006 AS	Scotsman, USA
Termoblok Accublock D1100	Labnet International, USA
Termocyklér My cycler™	Bio-Rad Laboratoris, USA
Třepačka Orbital Shaker	StarLab, Německo
Třepaný termoblok MB-102 ThermoCell	Bioer Technology, Čína
UV transiluminátor InGenius 3	Syngene International, Indie
Valivá třepačka PMR-30	Grant-bio, UK
Vertikální elektroforéza Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories, USA
Vodní vana	Julabo, Německo

Zdroj napětí PowerPac™ BasicPower Supply	Bio-Rad Laboratories, USA
Zobrazovací systém ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories, USA

Tabulka 2 Seznam použitých přístrojů

### 4.1.3 Antibiotika

Název antibiotika	Pracovní koncentrace	Příprava	Dodavatel
Klindamycin hydrochlorid	10 mg/l	Rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací	Sigma Aldrich, USA
Kanamycin monosulfát	50 mg/l	Rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací	MP Biomedicals, USA
Kyselina nalidixová	25 mg/l	Rozpuštěno v 0,3 M NaOH	Dufecha, Nizozemsko
Chloramfenikol	25 mg/l	Rozpuštěno v ethanolu	MP Biomedicals, USA
Hygromycin	50 mg/l	Rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací	Invitrogena, USA

Tabulka 3 Využívaná antibiotika

### 4.1.4 Bakteriální kmeny

*Escherichia coli* XL-10 (nesoucí rezistenci k chloramfenikolu a tetracyklinu)

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

*Escherichia coli* ET10257/pUZ8002

*Escherichia coli* BL21 GroEL (nesoucí rezistenci k chloramfenikolu)

*Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 (dále v práci označovaný jako *Streptomyces lincolnensis* WT)

*Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466  $\Delta$ lmbF (dále v práci označovaný jako *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF)

*Streptomyces caelestis* ATCC 15084 (dále v práci označovaný jako *Streptomyces caelestis* WT)

### 4.1.5 Plazmidy

#### 4.1.5.1 pIJ10257

Plazmid pIJ10257 je integrativní plazmid využívaný pro vnesení genů do *Streptomyces spp.* pod konstitutivním promotorem *ermE\**. Tento vektor byl použit pro vnesení genu *lmbC*

do *Streptomyces caelestis*. Selekcce kolonií obsahujících plazmid pIJ10257 byla prováděna kultivací na médiu obsahujícím hygromycin o koncentraci 40 mg/l.

#### 4.1.5.2 pET-48

Vektor pET-48 je plazmid využívaný k expresi proteinů. V této práci byl tento plazmid využit k heterologní expresi rekombinantních proteinů LmbF a LmbG s fúzní histidinovou kotvou pomocí *Escherichia coli* BL21 GroEL. Selekcce kolonií obsahujících plazmid pET-48 byla prováděna kultivací na médiu s obsahem kanamycinu o koncentraci 50 mg/l.

#### 4.1.5.3 pET-42

Plazmid pET-42 je využíván k vnášení proteinů k heterologní expresi. V této práci byl tento vektor využit k heterologní expresi rekombinantního proteinu CcbF s fúzní histidinovou kotvou pomocí *Escherichia coli* BL21 GroEL. Selekcce kolonií obsahujících plazmid pET-42 byla prováděna kultivací na médiu s obsahem kanamycinu o koncentraci 50 mg/l.

### 4.1.6 Primery

K návrhu primerů byl použit program CLC Main Workbench 22 a primery byly dodány firmou EUROFINS.

<b>Sekvence využívaných primerů</b>	
<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
pMK039_lmbC_pIJ10257_for	GATCGTCTAGAACAGGAGGCCCATATGTCGTCTCCGTTCCGACTCTCC
pMK040_lmbC_pIJ10257_rev	CATGAGAACCTAGGATCCAAGCTTTCCTCCCGCGTGTGACGAGTTC
pMK041_pIJ10257_for	ATGGGGCCTCCTGTTCTAG
pMK042_pIJ10257_rev	AGCTTGGATCCTAGGTTCTCATG
pG60_pIJ10257_seq_F	CGACCGATCTGATGTGCTCAG
test lmbC rev	CAGACCCGGCTCACCGAAGC
LK01_test_lmbR_for	CACTGCCGATGAGCAACTGG
LK02_test_lmbR_rev	TGAGACGCACGAGGAAATGG
LK03_test_lmbE_for	AGCCGCTTTGATAGAAAAGG
LK04_test_lmbE_rev	TATTTATTTCCGCGTCGTCG
TestpIJ10257 rev	GATTGTCTTTCTTCAGCTCG
TestpIJ10257 for new	TTGAAAAACGCTCACTGGTAC

Tabulka 4 Sekvence využívaných primerů

#### 4.1.7 Kultivační média

Veškerá použitá média byla po jejich namíchání sterilizována v centrálním autoklávu na teplotu 121 °C po dobu 15 min. Soli obsahující hořečnaté či vápenaté ionty a roztok glukózy byly sterilizovány filtrací přes 0,22 µm filtry od firmy filtraTECH a k médiím přidávány až po jejich sterilizaci autoklávováním. pH médií bylo upravováno pomocí kyseliny chlorovodíkové či hydroxidu sodného.

<b>Složení využívaných médií</b>			
<b>Název média</b>	<b>Složení média (1 l)</b>		<b>Použití</b>
<b>AVM médium</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	Kultivace
	Kvasničný extrakt	2 g	<i>Streptomyces spp.</i>
	NaCl	2 g	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg	
	CaCO <sub>3</sub>	5 g	
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 mg	
	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 mg	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50 mg	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100 mg	
	Destilovaná voda	880 ml	
	<i>pH upraveno na 7,4</i>		
25% roztok glukózy	120 ml		
<b>GYM agar</b>	Glukóza	4 g	Kultivace
	Kvasničný extrakt	4 g	<i>Streptomyces spp.</i>
	Sladový extrakt	10 g	
	CaCO <sub>3</sub>	2 g	
	Destilovaná voda	1 l	
	<i>pH upraveno na 7,2</i>		
Agar	12 g		
<b>LB médium (Luria-Bertani)</b>	Bacto Trypton	10 g	Kultivace
	Kvasničný extrakt	5 g	<i>Escherichia coli</i>
	NaCl	5 g	
	Destilovaná voda	1 l	
	<i>pH upraveno na 7,5</i>		



<b>LB agar (Luria-Bertani)</b>	Bacto Trypton	10 g	Kultivace
	Kvasničný extrakt	5 g	<i>Escherichia coli</i>
	NaCl	5 g	
	Destilovaná voda	1 l	
	<i>pH upraveno na 7,5</i>		
	Agar	15 g	
<b>LB Broth médium</b>	LB Broth (Miller) od firmy Sigma-Aldrich	25 g	Heterologní produkce
	Destilovaná voda	1 l	rekombinantních proteinů
<b>MS agar (manitol and soy flour)</b>	Manitol	20 g	Kultivace
	Sojová mouka	20 g	<i>Streptomyces spp.</i>
	Agar	20 g	
	Kohoutková voda	1 l	
	<i>Nutno autoklávovat 2×</i>		
<b>SOC médium (Super optimal broth for <i>Escherichia Coli</i>)</b>	Trypton	20 g	Germinizace
	Kvasničný extrakt	5,5 g	<i>Streptomyces spp.</i>
	1 M NaCl	10 ml	
	1 M KCl	2,5 ml	
	Destilovaná voda	980 ml	
	<i>pH upraveno na 7,0</i>		
	2 M MgCl <sub>2</sub>	5 ml	
	2 M MgSO <sub>4</sub>	5 ml	
	2,5 M roztok glukózy	10 ml	
<b>YEME Production médium (Yeast Extract and Malt Extract)</b>	Kvasničný extrakt	4 g	Kultivace <i>Streptomyces</i>
	Sladový extrakt	10 g	<i>spp.</i>
	Pepton	5 g	
	Destilovaná voda	1 l	
	<i>pH upraveno na 7,2</i>		
<b>Germanizační médium (2×)</b>	Kvasničný extrakt	10 g	Germinizace
	Kasaminokyseliny	10 g	<i>Streptomyces spp.</i>
	Destilovaná voda	1 l	
	<i>Po sterilizaci přidány 2 μl 5 M CaCl<sub>2</sub> na 1 ml média</i>		

Tabulka 5 Složení využívaných médií

## 4.1.8 Rostoky a pufrý

pH roztoků a pufrů bylo upravováno pomocí kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného.

<b>Složení využívaných roztoků a pufrů</b>			
<b>Název roztoku</b>	<b>Složení roztoku I</b>		<b>Použití</b>
<b>Lyzační pufr pro purifikaci proteinů</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Lyzování
	NaCl	100 mM	<i>Escherichia coli</i>
	Glycerol	10 %	s heterologní
	Imidazol	20 mM	produkci rekombinantního proteinu
<b>Ekvilibrační pufr pro purifikaci proteinů</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Ekvilibrace niklové
	NaCl	100 mM	kolony pro purifikaci
	Glycerol	20 %	proteinů
	Imidazol	10 mM	
<b>Promývací pufr pro purifikaci proteinů</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Promývání niklové
	NaCl	100 mM	kolony při purifikaci
	Glycerol	20 %	proteinů
	Imidazol	20 mM	
<b>Eluční pufr pro purifikaci proteinů</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Eluce purifikovaných
	NaCl	100 mM	proteinů z niklové
	Glycerol	20 %	kolony
	Imidazol	250 mM	
<b>Ekvilibrační pufr pro purifikaci proteinů II</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Ekvilibrace kolony
	NaCl	100 mM	ENrich SEC 650 10×
	Glycerol	20 %	300
<b>Promývací pufr pro purifikaci proteinů II</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Mobilní fáze pro
	NaCl	100 mM	gelovou permeační
	Glycerol	20 %	chromatografii
<b>Lyzační pufr</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Lyzační pufr pro
	NaCl	100 mM	lyzování buněk
	Glycerol	20 %	<i>Streptomyces spp.</i>
	Tween20	0,01 %	
	Protease inhibitor cocktail		
<b>Ekvilibrační pufr</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Ekvilibrace niklové
	NaCl	100 mM	kolony pro metodu
	Glycerol	20 %	pulldown
	Imidazol	10 mM	

<b>Promývací pufr</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Promývání
	NaCl	100 mM	niklových kolon při
	Glycerol	20 %	metodě pulldown
	Imidazol	10 mM	
<b>Eluční pufr</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Gradientová eluce
	NaCl	100 mM	z niklové kolony při
	Glycerol	20 %	metodě pulldown
	Imidazol	*	
	* koncentrace 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 225 mM, 250 mM		
<b>SDS-PAGE pufr</b>	Trizma® Base	25 mM	Pufr byl využíván při
	Dodecylsírán sodný (SDS)	192 mM	vizualizaci proteinů
	Glycin	0,1 %	pomocí SDS-PAGE
	Destilovaná voda		elektroforézy
<b>SDS-PAGE vzorkový pufr (2×)</b>	Tris-HCl	0,125 M	Pufr byl využíván pro
	Dodecylsírán sodný (SDS)	2 %	přípravu vzorků na
	Merkaptoethanol	5 %	vizualizaci proteinů
	Glycerol	20 %	pomocí SDS-PAGE
	Bromfenolová modř	0,002 %	elektroforézy
	Destilovaná voda		
<i>pH upraveno na 6,8</i>			
<b>Roztok pro barvení proteinů - Commassie</b>	Commassie Blue R-250	0,1 %	Roztok byl využíván pro barvení proteinů
	Ethanol	40 %	
	Kyselina octová	10 %	
<b>TAE pufr</b>	Trizma® Base	40 mM	Pufr byl využíván při
	EDTA 0,5 M pH 8	1 mM	elektroforetické
	Kyselina octová	20 mM	separaci nukleových
	Destilovaná voda		kyselin
<b>Reakční pufr pro <i>in vitro</i> reakce</b>	Tris-HCl pH 8	20 mM	Pufr byl používán
	NaCl	100 mM	jako reakční
	Destilovaná voda		prostředí <i>in vitro</i> reakcí

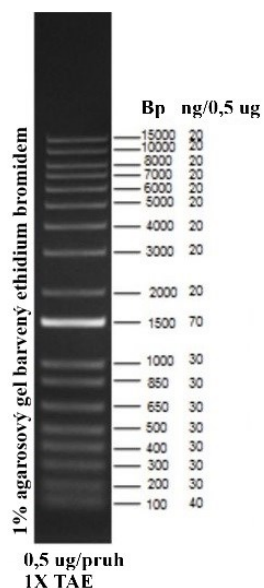
<b>TFB I</b>	KAc 1M pH 7,5	0,03 M
	RbCl	100 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerol	15 %
	Destilovaná voda	
	<i>pH upraveno na 5,8 pomocí CH<sub>3</sub>COOH pufr byl sterilizován filtrací</i>	
<b>TFB II</b>	Kyselina	10 mM
	3-(N-morfolino)propansulfonová	10 mM
	pH 7,0	75 mM
	RbCl	15 %
	CaCl <sub>2</sub>	
	Glycerol	
	Destilovaná voda	
<i>pH upraveno na 6,8 pomocí NaOH pufr byl sterilizován filtrací</i>		
<b>Neutralizační roztok pro čištění niklové kolony</b>	NaCl	150 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,0)	200 mM
<b>Roztok pro uchování niklové kolony</b>	Ethanol	20 %
	Acetát sodný (pH 6,5)	10 mM

Tabulka 6 Složení využívaných roztoků a pufrů

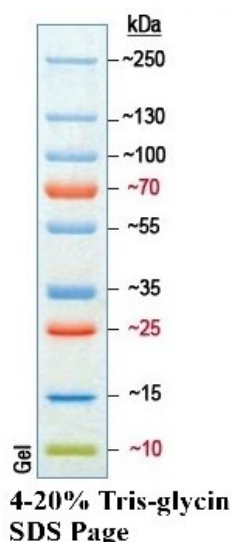
#### 4.1.9 Komerčně dodávané sety a standardy

<b>Set</b>	<b>Dodavatel</b>
1 Kb Plus DNA ladder	Invitrogen, USA
DNA Gel Loading Dye (6×)	Thermo Fischer Scientific, USA
PageRuler™ Prestained protein ladder	Thermo Fischer Scientific, USA
SPE HLB 3cc (60 mg), Waters	OASIS, Irsko
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, USA

Tabulka 7 Komerční sety a standardy



Obrázek 16 1 kb Plus DNA ladder



Obrázek 15 PageRuler™ Prestained protein ladder

## 4.1.10 Software a internetové aplikace

**CLC Main Workbench 22.0.2.** – Nástroj pro design DNA konstruktů, primerů

**GENESys v1.5.5.0** – Analýza a pořízení fotografie elektroforetických agarózových gelů

**NEB T<sub>M</sub> calculator 1.16.5.** – Modul pro výpočet teplot annealingu primerů

**Biorender** – Nástroj pro kreslení obrázků

**ChemSketch** – Program pro kreslení chemických vzorců a reakcí

**Perseus 2.0.11** – Program pro analýzu a interpretaci výsledků proteomických měření

**UniProt** – Databáze proteinů

## 4.2 Použité metody

### 4.2.1 Metody práce s DNA

#### 4.2.1.1 Extrakce DNA

DNA byla extrahována přesně podle protokolu dodaného výrobcem kitu a za využití komerčního kitu Wizard® Plus SV Mireprep DNA Purification System. Principem extrakce DNA je navázání DNA na křemičitou membránu, promytí roztokem obsahujícím ethanol, čímž dojde k odstranění proteinů a lipopolysacharidů a následná eluce MiliQ vodou.

#### 4.2.1.2 Restrikční štěpení

Restrikční endonukleázy štěpí fosfodiesterovou vazbu v DNA v místech rozpoznávaných palindromů. Restrikční endonukleázy pocházejí z bakterií, kde fungují jako obranný mechanismus proti cizorodé DNA. V laboratoři se běžně využívají restriktázy typu II, které štěpí v rozpoznávané palindromické sekvenci.

Byly využívány dvě restriktázy a to restriktáza XhoI, která rozpoznává palindrom CTCGAG a štěpí za C-1. Druhou používanou restriktázou byla HindIII, která rozpoznává palindromickou sekvenci AAGCTT a štěpí za A-1.

Reakční směs pro restrikční štěpení 1		Reakční směs pro restrikční štěpení 2	
složka	objem	složka	objem
Templát pj110257 (480 ng/μl)	3 μl	Templát pj110257 (480 ng/μl)	3 μl
Restriktáza XhoI	1 μl	Restriktáza XhoI	1 μl
10× pufr R2.1	5 μl	Restriktáza HindIII	1 μl
miliQ voda	41 μl	10× pufr R2.1	5 μl
-	-	miliQ voda	40 μl

Tabulka 8 Reakční směs pro restrikční štěpení

- 1) Nejprve byly namíchány reakční směsi podle tabulky 8
- 2) Poté byly reakční směsi inkubovány po dobu 60 min při konstantní teplotě 37 °C

#### 4.2.1.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metodou amplifikace DNA, při které dochází k několika desítkám cyklů skládajících se z denaturace dvojřetězové DNA, následného nasednutí specifických oligonukleotidových primerů na jednořetězové molekuly DNA a z elongace, při které dochází k syntéze komplementárního vlákna DNA pomocí vlákna templátového díky DNA polymeráze.

<b>Složení PCR reakční směsi 1</b>			
<b>Složka</b>	<b>Zásobní koncentrace</b>	<b>Finální koncentrace</b>	<b>Objem</b>
<b>Reakční pufr Q5</b>	5×	1×	10 µl
<b>Mix deoxynukleotidtrifosfátů</b>	10 mM	0,2 mM	1 µl
<b>Primer 1</b>	10 µM	0,5 µM	2,5 µl
<b>Primer 2</b>	10 µM	0,5 µM	2,5 µl
<b>Templátová DNA</b>	5000 ng/µl	2 ng/µl	1 µl
<b>Q5 GG enhancer</b>	5×	1×	10 µl
<b>Q5 polymeráza</b>	2000 U/ml		0,5 µl
<b>MiliQ voda</b>			22,5 µl

Tabulka 9 Složení PCR reakční směsi 1

<b>Reakční kroky PCR reakční směsi číslo 1</b>			
<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>cyklus</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	98 °C	60 s	1×
<b>Denaturace</b>	98 °C	10 s	10×
<b>Nasedání primerů</b>	67-72 °C *	30 s	
<b>Elongace</b>	72 °C	30 s/kb *	
<b>Denaturace</b>	98 °C	10 s	20×
<b>Nasedání primerů</b>	72 °C	30 s	
<b>Elongace</b>	72 °C	30 s/kb *	
<b>Finální elongace</b>	72 °C	120 s	1×
<b>Chlazení</b>	15 °C		

Tabulka 10 Reakční kroky PCR reakční směsi 1

\* Viz tabulka 11 Primery pro PCR reakční směs číslo 1

<b>Primery pro PCR reakční směs číslo 1</b>					
<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2</b>	<b>Přepisovaný úsek</b>	<b>Délka přepisovaného úseku</b>	<b>T<sub>A1</sub></b>	<b>Čas elongace</b>
pMK039_LmbC_ pIJ1025_for	pMK040_LmbC_ pIJ1025_rev	<i>lmbC</i>	1579 bp	67 °C	90 s
pMK041_pIJ10257 _for	pMK042_pIJ10257_ rev	pIJ10257	6608 bp	70 °C	4 min

Tabulka 11 Primery pro PCR reakční směs číslo 1

<b>PCR reakční směs číslo 2 pro koloniovou PCR</b>			
<b>Složka</b>	<b>Zásobní koncentrace</b>	<b>Finální koncentrace</b>	<b>Objem</b>
<b>Pufr pro Hemoklen polymerázu</b>	5×	1×	10 $\mu$ l
<b>Mix deoxynukleotidtrifosfátů</b>	10 mM	0,2 mM	1 $\mu$ l
<b>Primer 1</b>	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
<b>Primer 2</b>	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
<b>Templátová DNA</b>			
<b>DMSO</b>			2,5 $\mu$ l
<b>Hemoklen Taq polymeráza</b>			0,5 $\mu$ l
<b>MiliQ voda</b>			33 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 mM	0,5 mM	0,5 $\mu$ l
<b>Nonidet</b>			0,5 $\mu$ l

Tabulka 12 PCR reakční směs číslo 2 pro koloniovou PCR

<b>Kroky PCR reakční směsi číslo 2</b>			
<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>cyklus</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	95 °C	10 min	1×
<b>Krok přidání polymerázy</b>	67 °C	1 min	1×
<b>Denaturace</b>	95 °C	30 s	
<b>Nasedání primerů</b>	47-64 °C *	30 s	30×
<b>Elongace</b>	72 °C	30 s/ kb *	
<b>Finální elongace</b>	72 °C	5 min	1×
<b>Chlazení</b>	15 °C		

Tabulka 13 Kroky PCR reakční směsi číslo 2

\* Viz tabulka 14 Primery pro PCR reakční směs číslo 2 pro koloniovou PCR

<b>Primery pro PCR reakční směs číslo 2 pro koloniovou PCR</b>					
<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2</b>	<b>Přepisovaný úsek</b>	<b>Délka přepisovaného úseku</b>	<b>T<sub>A1</sub></b>	<b>Čas elongace</b>
Test_LmbC_rev	pG60_PIJ10257_seq_F	<i>lmbC</i>	738 bp	64 °C	60 s
LK01_test_lmbR_for	LK02_test_lmbR_rev	<i>ccbR</i>	326 bp	54 °C	60 s
LK03_test_lmbE_for	LK04_test_lmbE_rev	<i>ccbE</i>	287 bp	54 °C	60 s
TestpIJ10257 rev	TestpIJ10257 for new	<i>lmbC</i>	1998 bp	47 °C	120 s

Tabulka 14 Primery pro PCR reakční směs 2 pro koloniovou PCR



#### 4.2.1.4 DpnI treatment

Vektor pIJ10257 a inzert *lmbC* byly po dokončení polymerázové řetězové reakce ošetřeny restriční endonukleázou DpnI, která štěpí pouze metylovanou templátovou DNA a nemetylovaný produkt PCR reakce nechává nedotčený. Toto ošetření bylo provedeno tak, že ke 44,5  $\mu$ l PCR směsi bylo přidáno 0,5  $\mu$ l restriční endonukleázy DpnI a 5  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného reakčního pufru rCutSmart™ a reakce byla inkubována po dobu 60 min za konstantní teploty 37 °C.

#### 4.2.1.5 Přečištění PCR produktů

PCR produkty byly poté purifikovány a to přímo z PCR amplifikační směsi za využití komerčně dodávaného kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System od výrobce Promega, USA. U purifikace byl přesně dodržen protokol, který byl ke kitu dodán od výrobce. Poté byla koncentrace přečištěných PCR produktů změřena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na NanoDropu.

#### 4.2.1.6 Elektroforetická separace nukleových kyselin v agarózovém gelu

Veškeré produkty PCR reakcí byly vizualizovány pomocí elektroforetické separace nukleových kyselin v agarózovém gelu. Při elektroforéze nukleových kyselin dochází k rozdělení nukleových kyselin v elektrickém poli na základě jejich velikosti a to díky jejich rozdílné rychlosti migrace gelem. Molekuly nukleových kyselin mají díky fosfátovým skupinám záporný náboj, díky kterému putují gelem směrem ke kladné elektrodě, rychlost jejich pohybu gelem závisí na jejich délce, závislost není lineární. Separované nukleové kyseliny byly vizualizovány pomocí interkalačního činidla ethidium bromidu.

- 1) Agarózový gel byl připravován 1 % a to rozpuštěním odpovídajícího množství agarózy v odpovídajícím množství 1 % TAE pufru, následným zahřátím do rozpuštění agarózového prášku
- 2) Roztok byl zchlazen na pokojovou teplotu
- 3) Do roztoku byly přidány 2  $\mu$ l ethidium bromidu
- 4) Roztok byl promíchán a nalit do formy na gel s hřebínkem
- 5) Agarózový gel byl 20 min ponechán polymerizovat
- 6) Gel byl přemístěn do elektroforetické vany naplněné 1 % TAE pufrem
- 7) Byly připraveny jednotlivé vzorky nukleových kyselin k separaci smícháním 5  $\mu$ l vzorku s 1  $\mu$ l Gel Loading Dye Purple 6 $\times$

- 8) Do jamek v agarózovém gelu bylo naneseno po 5  $\mu$ l takto připravených vzorků a do 1 jamky bylo naneseno 5  $\mu$ l standardu molekulových hmotností 1 kb Plus DNA ladder
- 9) Elektroforetická separace byla prováděna po dobu 40 min při napětí 90 V
- 10) Gel byl vizualizován, analyzován a focen po ukončení elektroforetické separace za využití UV transiluminátoru InGenius 3 v programu GENESys v1.5.5.0

#### 4.2.1.7 Rekombinace DNA fragmentů

Spojení DNA fragmentů a to sice konkrétně vektoru pIJ10257 a vnášeného genu *lmbC* bylo provedeno pomocí komerčního kitu NEBuilder® HiFi DNA Assembly. Principem této metody je rekombinace mezi přesahy insertu s komplementárními okrajovými sekvencemi vektoru. Přesahy byly součástí navrhnutých primerů, díky čemuž se během PCR reakce nejprve přepsal gen insertu podle templátu, který následně fungoval jako templát pro přepsání genu insertu i s těmito přidanými sekvencemi. Během inkubace reakce NEBuilder dochází nejprve k vytvoření jednovláknových přesahů na 3' konci pomocí 5'-3' exonukleázy. Vzniklé komplementární sekvence na sebe následně nasedají a tvoří dvouvláknovou DNA. DNA polymeráza následně dosyntetizuje chybějící DNA na 3' konci a fragmenty jsou spojeny DNA ligázou. Molární poměr vektor : insert byl 1 : 2. Reakce byla připravena podle tabulky 15 a následně byla inkubována po dobu 60 min při teplotě 50 °C. Poté byla reakce zchlazena a vzniklé DNA konstrukty byly transformovány do buněk *E. coli* XL-10 pomocí teplotního šoku.

Reakční směs pro rekombinaci DNA fragmentů		
složka	Výchozí koncentrace	Objem
Vektor pIJ10257	38 ng/ $\mu$ l	3 $\mu$ l
Insert <i>lmbC</i>	29 ng/ $\mu$ l	2,9 $\mu$ l
NEBuilder HIFI DNA Assembly Master mix		5,9 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		38,2 $\mu$ l

Tabulka 15 Reakční směs pro rekombinaci DNA fragmentů

## 4.2.2 Kultivace, uchovávání a další práce s bakteriemi

### 4.2.2.1 Transformace

Transformace je forma horizontálního genového přenosu, při které dochází k aktivnímu přenosu cizorodé DNA z prostředí do cytoplazmy. Aby mohlo k transformaci dojít, musí být buňka ve stavu kompetence.

#### 4.2.2.1.1. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli* pro transformaci tepelným šokem

- 1) 100  $\mu$ l kompetentních buněk bylo inokulováno do 10 ml tekutého LB média s obsahem odpovídajícího antibiotika, ke kterému nesou dané kompetentní buňky rezistenci
- 2) Kultura byla kultivována po dobu 18 hod při teplotě 37 °C a za konstantního třepání o rychlosti 200 RPM
- 3) 1,5 ml této kultivace bylo zaočkováno do 100 ml tekutého LB média s obsahem odpovídajícího selekčního antibiotika a buňky byly kultivovány při 37 °C za třepání o rychlosti 200 RPM do doby, kdy OD<sub>600</sub> dosáhla hodnoty 0,8
- 4) Kultivace byla přenesena do předchlazených 50 ml centrifugačních zkumavek a centrifugována na 3000 g za teploty 4 °C po dobu 10 min
- 5) Peleta byla resuspendována v 15 ml TFB I média a inkubována na ledu po dobu 20 min, poté znovu centrifugována při 3000 g při 4 °C po dobu 10 min
- 6) Poté byla peleta resuspendována ve 4 ml TFB II média
- 7) Suspenze byla rozdělena na jednotlivé alikvoty, které byly nejprve zamraženy na -20 °C po dobu 2 hod a následně byly uchovávány při teplotě -80 °C

#### 4.2.2.1.2. Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* teplotním šokem

- 1) Připravené kompetentní buňky uchovávané v -80 °C byly inkubovány na ledu po dobu 5 min
- 2) Po skončení doby inkubace bylo k těmto 50  $\mu$ l kompetentních buněk přidáno 80 – 100 ng DNA
- 3) Buňky byly inkubovány na ledu po dobu 30 min
- 4) Buňky byly vystaveny teplotnímu šoku o teplotě 42 °C po dobu 45 s
- 5) Buňky byly zchlazeny 2 minovou inkubací na ledu
- 6) K těmto buňkám bylo poté přidáno 300  $\mu$ l SOC média o laboratorní teplotě

- 7) Dále byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C a za třepání o rychlosti 300 RPM po dobu 60 min
- 8) Po uplynutí doby inkubace byly kompetentní buňky vysety na LB agar se selekčním antibiotikem
- 9) Buňky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C, díky růstu na selekčním médiu došlo k vyselektování transformantů

#### 4.2.2.2 Namnožení plazmidu

Pro zajištění dostatečného množství plazmidu byl daný plazmid transformován pomocí teplotního šoku (viz kapitola 4.2.2.1.2.) do kompetentních buněk *Escherichia coli* XL-10 nebo *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Takto transformované buňky byly vysety na selekční LB agar a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace byla kolonie přeočkována do 10 ml selekčního tekutého LB média a kultivována po dobu 18 hod při teplotě 37 °C za konstantního třepání o rychlosti 200 RPM. Z těchto buněk byl následně plazmid izolován pomocí komerčního kitu Wizard® Plus SV Mireprep DNA Purification System. Plazmid byl uchováván při teplotě -20 °C.

#### 4.2.2.3 Heterologní produkce proteinů v *Escherichia coli*

- 1) Nejprve byl do 15 ml tekutého LB média se selekčními antibiotiky (chloramfenikol 25 mg/l, kanamycin 50 mg/l) zaočkován bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21 GroEL s transformovaným plazmidem s vloženým genem pro požadovaný protein
- 2) Tato kultura byla inkubována při 37 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM přes noc
- 3) Z narostlé kultury bylo po skončení inkubace zaočkováno 10 ml do 1 l LB média se selekčními antibiotiky ve 2 l prolamované Erlenmayerově baňce
- 4) Kultura byla inkubována při 37 °C a při třepání o rychlosti 200 RPM do  $OD_{600} = 0,7$
- 5) Kultura byla zchlazena za stálého třepání o rychlosti 200 RPM na 17 °C
- 6) Po zchlazení na 17 °C byl přidán induktor IPTG ve výsledné koncentraci 0,6 mM
- 7) Kultura byla inkubována při 17 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM po dobu 20 hod
- 8) Po ukončení této inkubace byla kultura centrifugována při 4 °C při 5000 g po dobu 15 min za využití rotoru JLA 9.100 od firmy BECKMAN COULTER a centrifugy BECKMAN COULTER Avanti® J-30 I
- 9) Po skončení centrifugace byla peleta rozpuštěna v 30 ml 25mM Tris-HCl (pH 7,5)

- 10) Následovala centrifugace o rychlosti 3220 g za teploty 4 °C po dobu 20 min za využití rotoru eppendorf A-4-62 a centrifugy eppendorf Centrifuge 5810 R
- 11) Po ukončení centrifugace byl odstraněn supernatant a peleta byla uchovávána při -80 °C

#### 4.2.2.4 Příprava lyzátu *Escherichia coli* s heterologní produkcí proteinů

- 1) Peleta *Escherichia coli* připravená podle kapitoly 4.2.2.3 byla pomalu rozmražena inkubací po dobu 30 min na ledu
- 2) Po uplynutí doby inkubace byla tato peleta rozpuštěna v lyzačním pufru pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) a to v poměru 5 ml lyzačního pufru pro purifikaci proteinů na 1 g pelety
- 3) Po rozpuštění pelety následovala 20 minová inkubace na ledu
- 4) Po ukončení této inkubace byla suspenze sonikována s amplitudou 10 % a poměrem času ON/OFF 2 s/8 s po dobu 15 min stavu ON za využití sonikátoru QSONICA Q700
- 5) Po uplynutí doby sonikace následovala centrifugace rychlostí 40000 g při teplotě 4 °C po dobu 30 min za využití rotoru JA-30.50 od firmy BECKMAN COULTER a centrifugy BECKMAN COULTER Avanti J-25S XPI
- 6) Supernatant byl použit pro purifikaci proteinů

#### 4.2.2.5 Konjugace

Konjugace je formou horizontálního genového přenosu, u kterého dochází k dočasnému cytoplazmatickému spojení donora a recipienta pomocí konjugačního aparátu, skládajícího se ze sex fimbrií a membránového aparátu tvořícího membránový kanál, a k přenosu plazmidové DNA z donora do recipienta.

##### 4.2.2.5.1. Konjugace plazmidu z *Escherichia coli* do *Streptomyces caelestis*

Pro přenos DNA plazmidu do bakterií *Streptomyces caelestis* byl jako prostředník využit nemethylační konjugační kmen *E. coli* ET10257 nesoucí pomocný konjugační plazmid pUZ8002.

- 1) *Escherichia coli* ET10257/pUZ8002 byla zaočkována do 10 ml LB média obsahujícího kanamycin a chloramfenikol (obojí o finální koncentraci 25 mg/l) a inkubována přes noc za konstantní teploty 37 °C
- 2) 100 µl narostlé kultury bylo inokulováno do 10 ml SOC média obsahujícího výše zmíněná antibiotika. Kultura byla inkubována za konstantní teploty 37 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM do dosažení  $OD_{600} = 0,4$

- 3) Po dosažení žádané  $OD_{600}$  byla kultura stočena za konstantní teploty 4 °C, rychlostí 4000 g po dobu 10 min za využití rotoru eppendorf A-4-62 a centrifugy eppendorf 5810 R, po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 10 ml ledově vychlazeného 10 % glycerolu
- 4) Krok 3 byl zopakován za výsledné resuspendace v 5 ml vychlazeného 10 % glycerolu
- 5) Krok 3 byl zopakován za výsledné resuspendace ve 100  $\mu$ l vychlazeného 10 % glycerolu
- 6) K 50  $\mu$ l suspenze bylo přidáno 100 ng plazmidové DNA (1-2  $\mu$ l) a byla provedena transformace teplotním šokem (viz kapitola 4.2.2.1.2.)
- 7) K transformovaným buňkám byl přidán 1 ml vychlazeného SOC média a buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 60 min
- 8) Po konci inkubace byly buňky vysety na LB agar obsahující chloramfenikol (25 mg/l), kanamycin (25 mg/l) a hygromycin (50 mg/l) a inkubovány přes noc za konstantní teploty 37 °C
- 9) Vybraná kolonie z misky byla následně zaočkována do 10 ml LB média obsahujícího chloramfenikol (25 mg/l), kanamycin (25 mg/l) a hygromycin (50 mg/l) a inkubována přes noc za konstantní teploty 37 °C a třepání o rychlosti 200 RPM
- 10) 100  $\mu$ l kultury bylo přeočkováno do čerstvých 10 ml LB média obsahující chloramfenikol, kanamycin (25 mg/l) a hygromycin (50 mg/l) a inkubováno v konstantní teplotě 37 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM do dosažení  $OD_{600}=0,4$ . Narostlá kultura byla dvakrát promyta od antibiotik 10 ml čerstvého LB média a peleta byla resuspendována v 1 ml LB média
- 11) K 0,5 ml této suspenze *E. coli* bylo přidáno 0,5 vyklíčených spor *Streptomyces caelestis* (viz kapitola 4.2.2.8). Tato směs byla následně opatrně promíchána, stočena po dobu 10 min rychlostí 3220 g za využití rotoru eppendorf A-4-62 a centrifugy eppendorf 5810 R a po odstranění supernatantu byla směs donora a akceptora vyseta na MS agar bez antibiotik s přidáním  $MgCl_2$  o finální koncentraci 10 mM. Buňky byly následně kultivovány přes noc za konstantní teploty 30 °C
- 12) Po inkubaci byla miska převrstvena 1 ml sterilní vody obsahující kyselinu nalidixovou, která účinkuje na gramnegativní bakterie, o finální koncentraci v médiu 25 mg/l a hygromycin o finální koncentraci v médiu 40 mg/l
- 13) Poté pokračovala inkubace po dobu 5 dní za konstantní teploty 30 °C, po této době byly vybrané narostlé a vysporulované kolonie přeočkovány na čerstvý MS agar

a misky byly inkubovány po dobu 10 dní při teplotě 30 °C a následně byly sklizeny spory (viz kapitola 4.2.2.7)

#### 4.2.2.6 Kultivace *Streptomyces ssp.* na pevném médiu

- 1) 5  $\mu$ l spor *Streptomyces ssp.* bylo nanášeno na MS agar a rozetřeno po celém povrchu agaru pomocí sterilní vatové tyčinky
- 2) Inkubaci při teplotě 30 °C po dobu 7 (*Streptomyces lincolnensis*) nebo 10 (*Streptomyces caelestis*) dní
- 3) Spory byly sklizeny (viz kapitola 4.2.2.7)

#### 4.2.2.7 Smývání spor streptomycet a příprava konzervy

Extrakce spor byla prováděna pro uchování daných kmenů.

- 1) Miska s narostlým a vysporulovaným kmenem streptomycety byla smyta 4 ml sterilní vody a spory byly setřeny sterilní vatovou tyčinkou
- 2) Tato suspenze obsahující setřené spory byla následně odebrána a přefiltrována přes sterilní vatový filtr, kterým projdou pouze smyté spory a ne mycelium streptomycety
- 3) Suspenze spor byla následně centrifugována po dobu 10 min na 3220 g za konstantní teploty 4 °C za využití rotoru eppendorf A-4-62 a centrifugy eppendorf Centrifuge 5810 R
- 4) Supernatant byl odstraněn a spory usazené v peletě byly resuspendovány v 200  $\mu$ l 20 % glycerolu
- 5) Spory byly uchovávány při teplotě -80 °C

#### 4.2.2.8 Germinace a prekultura *Streptomyces spp.*

Při germinaci spor *Streptomyces spp.* dochází ke klíčení spor, čímž dochází k přechodu z klidové fáze do fáze vegetativní.

- 1) Bylo zaočkováno potřebné množství spor (tak aby výsledná OD<sub>600</sub> v 50 ml YEME P byla 0,03) do 1 ml TES media
- 2) Spory byly vystaveny teplotnímu šoku o teplotě 50 °C po dobu 10 min
- 3) K těmto sporám byl přidán 1 ml 2 $\times$  koncentrovaného germinizačního média
- 4) Spory byly inkubovány při 37 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM po dobu 120 min
- 5) Po ukončení inkubace byl inokulován 1 ml germinovaných spor do 50 ml YEME P média v prolamované Erlenmayerově baňce

- 6) Prekultura *Streptomyces ssp.* byla inkubována ve 30 °C, za třepání o rychlosti 200 RPM po dobu 48 hod
- 7) Po uplynutí doby kultivace bylo 2,5 ml této prekultura doplněno v 250 ml prolamované Erlenmayerově baňce do 50 ml AVM médiem
- 8) A následovala inkubace po dobu 60 hod při teplotě 30 °C a za třepání o rychlosti 200 RPM
- 9) Po ukončení kultivace byla kultura centrifugována 10 min při 3220 g za využití rotoru eppendorf A-4-62 a centrifugy eppendorf 5810 R, supernatant byl odstraněn
- 10) Peleta byla následně uchovávána v -80 °C

#### 4.2.2.9 Příprava lyzátu ze *Streptomyces lincolnensis*

- 1) 0,5 g pelety *Streptomyces lincolnensis* WT /  $\Delta$ lmbF připravené podle kapitoly 4.2.2.8 bylo rozpuštěno v 1 ml lyzačního pufru (viz kapitola 4.1.8)
- 2) Následovala sonikace 5× 30 s amplitudou 60 % za využití sonikátoru UP200S HIELSCHER Ultrasound Technology, po celou dobu sonikace byla mikrozkušavka, obsahující peletu *Streptomyces lincolnensis* rozpuštěnou v lyzačním pufru, na ledu a mezi jednotlivými sonikacemi byla ponechána 30 vteřin na ledu mimo sonikátor
- 3) Rozsonikovaný roztok byl následně centrifugován na 20000 g za konstantní teploty 4 °C po dobu 20 min za využití rotoru FA-45-24-11 a centrifugy Eppendorf 5424R
- 4) Supernatant byl odebrán a byl vizualizován na SDS-PAGE gelu (viz kapitola 4.2.3.4)

### 4.2.3 Metody práce s proteiny

Proteiny využívané v této práci byly LmbF a LmbG z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu ze *Streptomyces lincolnensis* a CcbF z genové shluku pro biosyntézu celesticetinu ze *Streptomyces caelestis*.

#### 4.2.3.1 Příprava kolony s Ni-INDIGO náplní

Kolony byly připraveny nanesením 2 ml PureCube 100 INDIGO Ni-Agarose pryskyřičné náplně od Cube Biotech do 20 ml plastové kolony. Následně byly tyto kolony propláchnuty 60 ml destilované vody.

#### 4.2.3.2 Čištění a uchovávání kolony s Ni-INDIGO

Po každém použití byly kolony čištěny a regenerovány podle protokolu od firmy Cube Biotech. Při této regeneraci byly kolony propláchnuty vždy 20 ml dané tekutiny:



- 1) Destilovanou vodou
- 2) Roztokem 500 mM NaOH
- 3) Znovu destilovanou vodou
- 4) Neutralizačním roztokem pro čištění niklové kolony
- 5) Opět destilovanou vodou
- 6) Roztokem pro uchovávání niklové kolony
- 7) Na kolonu nanese 5 ml roztoku pro uchovávání niklové kolony
- 8) Kolona byla zavřena a skladována při teplotě 4 °C

#### **4.2.3.3 Purifikace proteinů na koloně s Ni-INDIGO náplní**

Fúzní proteiny s histidinovou kotvou byly čištěny pomocí afinitní chromatografie. Pro afinitní chromatografii byly využívány komerčně dodávané Ni-NTA pryskyřičné kuličky na agarózovém nosiči s navázanými nikelnatými ionty

- 1) Supernatant připravený podle kapitoly 4.2.2.4 byl nalit na kolonu přes kterou byl nechán volně prokapat. Krok byl opakován ještě 2×.
- 2) Kolona byla promyta 20 ml promývacím puforem pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8)
- 3) Z kolony byl protein eluován elučním puforem pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) a to objemem 1 ml 10×. Tyto frakce byly sbírány do mikrozkušavek
- 4) Vzorky jednotlivých frakcí byly následně vizualizovány na SDS-PAGE gelu (viz kapitola 4.2.3.4)

#### **4.2.3.4 SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je metoda využívaná k dělení proteinů v elektrickém poli podle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny jsou nejprve denaturovány a smíchány s dodecylsíránem sodným (SDS), jež jim dodá záporný náboj. Takto připravené vzorky proteinů jsou naneseny na polyakrylamidový gel a putují jím směrem ke kladné elektrodě, cestou se dělí podle molekulové hmotnosti. Proteiny s nejmenší molekulovou hmotností doputují gelem nejdále, proteiny o nejvyšší molekulové hmotnosti překonají nejkratší úsek gelu.

##### **4.2.3.4.1. Příprava SDS-PAGE polyakrylamidového gelu**

- 1) Byla namíchána směs na separační gel podle tabulky 16

- 2) Podložní a krycí sklo bylo odmaštěno alkoholem a vsazeno do stojánku
- 3) Mezi tato skla byla nanesena směs na gel do výšky cca 1,5 cm pod vrchní okraj
- 4) Směs byla převrstvena ethanolem a ponechána po dobu 30 min polymerizovat
- 5) Následně byla připravena směs na nanášecí gel
- 6) Z již zpolymerizovaného separačního gelu byl slit ethanol a tento gel byl převrstven připravenou směsí na nanášecí gel a to až po okraj skel
- 7) Mezi skla byl nasazen hřebínek a gel byl ponechán polymerizovat po dobu 30 min

<b>Složení SDS-PAGE polyakrylamidového gelu</b>			
<b>Separací gel</b>		<b>Nanášecí gel</b>	
<b>Složka</b>	<b>Objem</b>	<b>Složka</b>	<b>Objem</b>
Akrylamid 40% 37 : 5 : 1	2 ml	Akrylamid 40% 37 : 5 : 1	360 µl
Pufř Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,16 ml	Pufř Tris-HCl 1M pH 6,8	360 µl
H <sub>2</sub> O	3,68 ml	H <sub>2</sub> O	2,2 ml
SDS 10 %	80 µl	SDS 10 %	30 µl
Temed	8 µl	Temed	3 µl
APS 10 %	80 µl	APS 10 %	30 µl
		Bromfenolová modř nasycený roztok	10 µl

Tabulka 16 Složení SDS-PAGE polyakrylamidového gelu

#### 4.2.3.4.2. Příprava vzorků proteinů na SDS-PAGE elektroforézu

- 1) 10 µl vzorku s proteinem bylo smícháno s 10 µl 2× koncentrovaného SDS-PAGE vzorkového pufru (viz kapitola 4.1.8) a promícháno pipetováním
- 2) Vzorek byl zahříván na 95 °C po dobu 10 min
- 3) Vzorek byl zcentrifugován na 10 000 g po dobu 30 vteřin za využití rotoru eppendorf FA-45-24-11 a centrifugy eppendorf centrifuge 5424R

#### 4.2.3.4.3. SDS-PAGE elektroforetická separace proteinů a jejich barvení

- 1) Připravený polyakrylamidový gel nebo komerční gel Mini-PROTEAN TXG od BIORADu byl vložen do elektroforetické vany naplněné SDS pufrem
- 2) Do jamek v gelu bylo naneseno po 10 µl vzorku připraveného podle kapitoly 4.2.3.4.2. (což se rovná 5 µl vzorku proteinu a 5 µl 2× koncentrovaného SDS-PAGE vzorkového pufru) nebo 20 µl vzorku u vzorků elucí metody pulldown, a do jedné z prázdných jamek bylo naneseno 5 µl PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

- 3) Elektroforetická separace byla prováděna po dobu 10 min při napětí 130 voltů, následně byla síla napětí zvýšena na 200 voltů a za těchto podmínek byla elektroforetická separace prováděna po dobu dalších 50 min u připravovaného gelu / 35 min u komerčního gelu
- 4) Gel byl vyjmut a vložen do krabičky naplněné vodou
- 5) Krabička s vodou s gelem byla zahřáta v mikrovlnné troubě po dobu 30 s
- 6) Voda byla slita a gel byl ponořen do roztoku pro barvení proteinů – Commassie (viz kapitola 4.1.8). Krabička, ve které byl gel ponořen v barvicím roztoku byla zahřáta v mikrovlnné troubě po dobu 30 s
- 7) Gel byl v zahřátém barvicím roztoku inkubován po dobu 10 min za konstantního třepání o rychlosti 150 RPM
- 8) Barva byla slita, gel byl 3× opláchnut vodou a následně ponořen do teplé vody. Na gel byl vložen savý ubrousek o několika vrstvách a gel byl ponechán za neustálého třepání až do odbarvení

#### **4.2.3.5 Koncentrování proteinů**

Proteiny byly koncentrovány pomocí komerčně dodávaných centrifugačních filtrů Amicon® Ultra (cut-off 30 kDa a 10 kDa). Centrifugační filtry s hodnotou cut-off 30 kDa byly použity na proteiny LmbF a CcbF, na zakoncentrování proteinu LmbG byl použit centrifugační filtr s cut-off hodnotou 10 kDa.

#### **4.2.3.6 Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie je metodou sloužící k dělení vysokomolekulárních látek a to zejména proteinů na základě jejich molekulových hmotností. Kolona je naplněna stacionární fází skládající se z malých děrovaných gelových částic. Jednotlivé složky dělené směsi jsou unášeny konstantním průtokem mobilní fáze kolonou. Velké částice dělené směsi prochází kolem gelových částic stacionární fáze a putují tak nejrychleji, menší a nízkomolekulární částice dělené směsi prochází i skrz otvory v gelových částicích stacionární fáze a putují tedy pomaleji a jsou eluovány později než vysokomolekulární složky dělené směsi.

Metoda byla prováděna za pomoci programu ChromLab a NGC chromatografického systému na koloně ENrich SEC 650 10× 300 o objemu 24 ml od firmy BIORAD.

- 1) Systém byl promyt vodou a to objemem 20 ml rychlostí 5 ml/min a pod tlakem 3,5 MPa

- 2) K systému byla připojena kolona, která byla promyta vodou a to objemem 30 ml rychlostí 0,8 ml/min
- 3) Kolona byla promyta ekvilibračním pufrem pro purifikaci proteinů II (viz kapitola 4.1.8) a to objemem 30 ml a rychlostí 0,8 ml/min
- 4) Vzorky proteinu k purifikaci byly injektovány po objemech 1 ml
- 5) Eluce probíhala elučním pufrem pro purifikaci proteinů II (viz kapitola 4.1.8) o objemech 1 ml x 30, jednotlivé frakce byly zachytávány automaticky systémem NGC Discover
- 6) Podle UV detekce o vlnové délce 215 nm byly vybrány frakce obsahující protein zájmu a ty byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.4)

#### **4.2.3.7 Pulldown metoda**

- 1) Kolona s Ni-INDIGO náplní připravená podle kapitoly 4.2.3.1 byla promyta 20 ml ekvilibračního pufru (viz kapitola 4.1.8)
- 2) Na kolonu uzavřenou víčkem bylo nanášeno 0,5 ml proteinu LmbF připraveného podle kapitoly 4.2.3.3 a 1 ml supernatantu z lyzátu *Streptomyces lincolnensis* připraveného podle kapitoly 4.2.2.9
- 3) Kolona byla uzavřena a inkubována po dobu 20 hod za konstantní teploty 10 °C a za třepání na valivé třepačce o rychlosti 20 RPM
- 4) Po ukončení inkubace byla směs LmbF a lyzátu na koloně nechána protéct přes kolonu
- 5) Kolona byla promyta 20 ml promývacího pufru (viz kapitola 4.1.8)
- 6) Byla provedena gradientová eluce elučním pufrem (viz kapitola 4.1.8). Na kolonu bylo vždy nanášeno 0,5 ml elučního pufru o odpovídající koncentraci imidazolu (50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 225 mM, 3× 250 mM) a frakce byly sbírány do mikrozkušavek
- 7) Tyto frakce byly následně vizualizovány na SDS-PAGE gelu (viz kapitola 4.2.3.4) a změřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

#### **4.2.3.8 *In vitro* reakce**

- 1) Nejprve byly dle tabulky 19 nebo 20 namíchány jednotlivé reakční směsi. U *in vitro* reakcí s časovým průběhem byla každá z těchto směsí byla namíchána v 5násobném objemu a následně rozdělena na 4 jednotlivé reakce po 50 µl

- 2) Tyto reakce byly inkubovány ve 30 °C po dobu 2 hod u *in vitro* reakcí zastavených po 2 hod nebo do dobu 10 min, 60 min, 120 min a 24 hod u *in vitro* reakcí s časovým průběhem
- 3) Po ukončení každé inkubace byly do reakční směsi přidány 2 µl kyseliny mravenčí a 100 µl ledově studeného acetonitrilu pro precipitaci proteinů, čímž došlo k zastavení reakce
- 4) Tyto reakční směsi byly centrifugovány rychlostí 4000 g po dobu 10 min
- 5) Na měření na kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí by nanášen supernatant

#### **4.2.4 Příprava vzorků na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je technika sloužící k separaci jednotlivých složek vzorku v tekutém stavu. Účelem této separace je stanovení přítomnosti dané složky i její koncentrace. Během této separace dochází k průtoku mobilní fáze kolonou obsahující stacionární fázi. Jednotlivé složky se dělí podle doby, po kterou jsou zadržovány stacionární fází v koloně.

##### **4.2.4.1 Příprava buněk *Streptomyces caelestis* z kultivace v tekutém médiu pro měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí**

- 1) Narostlá kultura v AVM médiu s propyl-prolinem byla centrifugována po dobu 10 min rychlostí 3220 g
- 2) 1 g pelety byl rozpuštěn v 1 ml 50 % methanolu a tato suspenze byla sonikována
- 3) Sonikace probíhala za využití sonikátoru UP200S, Hielscher v 5 cyklech, každý cyklus trval 20 vteřin, mezi cykly byl vzorek chlazen po dobu 20 vteřin na ledu
- 4) Vzorky byly centrifugovány po dobu 10 min rychlostí 20 000 g
- 5) Dále bylo pracováno se supernatantem (viz kapitola 4.2.4.3)

##### **4.2.4.2 Extrakce z pevných půd pro měření obsahu metabolitů na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí**

- 1) Pevné půdy, na nichž probíhala inkubace *Streptomyces caelestis*, byly rozpuštěny ve 100 % methanolu
- 2) Směs byla centrifugována rychlostí 3220 g po dobu 10 min
- 3) Supernatant byl odebrán a na vakuovém koncentrátu byl odpařen do sucha

- 4) Zbylé pelety byly rozpuštěny v 1 ml 50 % methanolu a sonikovány po dobu 10 min ve vodní lázni
- 5) Vzorke byly vortexovány a centrifugovány rychlostí 20 000 g po dobu 10 min
- 6) 90  $\mu$ l supernatantu bylo smícháno s 10  $\mu$ l vnitřního standardu o koncentraci 30  $\mu$ l/ml a měřeno na kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií

#### **4.2.4.3 Příprava vzorků obsahujících celesticetin, CELIN, ODCELIN a linkomycin na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí**

K přečištění a ke koncentraci vzorků supernatantů, u kterých byl očekáván výskyt linkosamidů, byly využity SPE kolonky (SPE HLB 3cc (60mg), Waters, OASIS). Jako vzorky byl používán supernatant po centrifugaci kultivace *Streptomyces ssp.* v AVM médiu nebo supernatant po centrifugaci po rozbití buněk sonikací z pelety z té stejné kultivace.

- 1) SPE kolonkami se nejprve nechaly protéct 3 ml methanolu, poté 3 ml MiliQ vody
- 2) U vzorků u kterých měl být měřen linkomycin bylo upraveno pH na hodnotu 9 – 10 přidáním 6  $\mu$ l 28 % hydroxidu amonného k 3 ml supernatantu
- 3) Na SPE kolonky byly nanoseny 3 ml vzorku supernatantu, které se nechaly volně prokapat kolonkou
- 4) Kolonky byly promyty 3 ml MiliQ vody
- 5) Byla provedena eluce pomocí 1,5 ml methanolu
- 6) Eluovaný vzorek byl evaporován ve speedvacu do odpaření
- 7) Peleta zbylá po odpaření methanolu byla rozpuštěna v 300  $\mu$ l 50 % methanolu a následně byl takto připravený vzorek 10 min sonikován ve vodní lázni
- 8) Vzorek byl vortexován a centrifugován po dobu 10 min při 20 000 g
- 9) Supernatant byl měřen pomocí kapalinové chromatografie s hmotností detekcí

#### **4.2.5 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využitá pro měření produkce CELINu a *in vitro* reakcí zastavených po 2 hod**

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí byla prováděna na Waters Acquity M-class HPLC System připojenému k Synapt G2-Si Q-TOF mass spectrometer (Waters Corporation, Manchester, UK). Použitou kolonou pro kapalinovou chromatografii byla ACQUITY™ UPLC® BEH C18 (1.0 mm×100 mm) 1.7 $\mu$ m VanGuard™ FIT. Vzorek byl nanášen po 5  $\mu$ l za teploty 40 °C. Byla používána dvou složková mobilní fáze obsahující acetonitril a 0,1 % kyseliny mravenčí. Použitá rychlost průtoku byla 80  $\mu$ l/min. Hmotnostní spektrometr

byl používán v pozitivním módu za napětí +3 kV. Analýza byla provedena za využití Waters MassLynx 4.2 (Manchester, UK). Měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí bylo prováděno Anindou Mazumdarem, PhD.

#### **4.2.6 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využita pro měření *in vitro* reakcí s časovým průběhem**

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí byla prováděna na Agilent 1290HPLC systému (Agilent, Santa Barbara, USA) připojeném k TimsTOF HT hmotnostnímu spektrometru (Bruker, Bremen, Německo). Použitou kolonou pro kapalinovou chromatografii byla ACQUITY™ UPLC® PREMIER CSH C18 (2.7 mm×100 mm). Na kolonu o teplotě 40 °C byly nanášeny 3 µl vzorku. Byla využívána dvou složková mobilní fáze obsahující acetonitril a 1 mM mravenčnan amonný. Rychlost průtoku byla 0,4 ml/min. Hmotnostní spektrometr byl používán v pozitivním i v negativním módu za využití napětí ±4,5 kV, do této práce byl vložen vždy reprezentativnější z chromatogramů. Analýza byla provedena pomocí Bruker DataAnalysis software. Měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí bylo prováděno Anindou Mazumdarem, PhD.

#### **4.2.7 Substrát C-2 pro *in vitro* reakce**

Substrát C-2 byl připraven Ing. Michaelou Plechatou z Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky izolací ze supernatantu kultury kmenu *Streptomyces lincolnensis* s deletovaným genem *lmbF* kultivované po dobu 12 dní v AVM médiu. Substrát C-2 byl ze supernatantu vyzolován následujícími kroky. Nejprve byla provedena extrakce na HBL 35cc kolonách, poté byly provedeny dvě preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie na koloně Triart Prep C18 (250×20 mm) a Xterra Prep RP 18 (7,8×150), v obou případech byla využita gradientová eluce rostoucí koncentrací acetonitrilu. Na konec byla provedena isokratická eluce na vysokoúčinné kapalinové chromatografii na koloně Xterra Prep RP 18 (7,8×150) s manuálním sběrem frakcí.

## 5. Výsledky

### 5.1 *In vivo* produkce CELINu

CELIN je hybridní antibiotikum obsahující propylový zbytek na prolinu z linkomycinu a kyseliny salicylovou z celesticetinu (viz kapitola 3.4). *Streptomyces lincolnensis*, produkující linkomycin, a *Streptomyces caelestis*, produkující celesticetin, sdílí ve svých biosyntetických genových shlucích homologní geny pro biosyntézu těchto linkosamidů. V genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu jsou navíc geny pro biosyntézu propyl-prolinu z L-tyrozinu, genový shluk pro biosyntézu celesticetinu obsahuje navíc geny pro biosyntézu a připojení kyseliny salicylové (viz kapitola 3.3). Teoreticky je tedy možné pomocí vnesení chybějících genů připravit producenta CELINu jak ve *Streptomyces lincolnensis*, tak ve *Streptomyces caelestis*. Do *Streptomyces caelestis* je nutno vnést gen *lmbC*, jehož produkt LmbC je schopen aktivovat propyl-prolin. CcbC jakožto homolog LmbC má striktní substrátovou specifitu pro svůj přirozený substrát L-prolin a prolin s navázaným propylovým zbytkem neaktivuje (viz kapitola 3.3.3.2). K pokusu o vytvoření mutanta produkujícího CELIN v naší laboratoři již došlo (viz kapitola 3.4). Tento již provedený pokus byl založený na mutacích prováděných na *Streptomyces lincolnensis* a byl neúspěšný. Zde bylo mým cílem co nejjednodušeji otestovat, zda je možné připravit producenta CELINu ve *Streptomyces caelestis*. Do *Streptomyces caelestis* byl tedy vnesen gen *lmbC* a propyl-prolin, pro jehož biosyntézu geny vnášeny nebyly, byl dodáván jako substrát v kultivačním médiu.

#### 5.1.1 Vnesení genu *lmbC* do *Streptomyces caelestis*, kultivace a měření produkce CELINu

Očekávali jsme, že při měření produkovaných metabolitů této mutanty pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií detekujeme jak CELIN, tak přirozeně produkovaný celesticetin, jehož biosyntézu jsme nijak neinaktivovali.

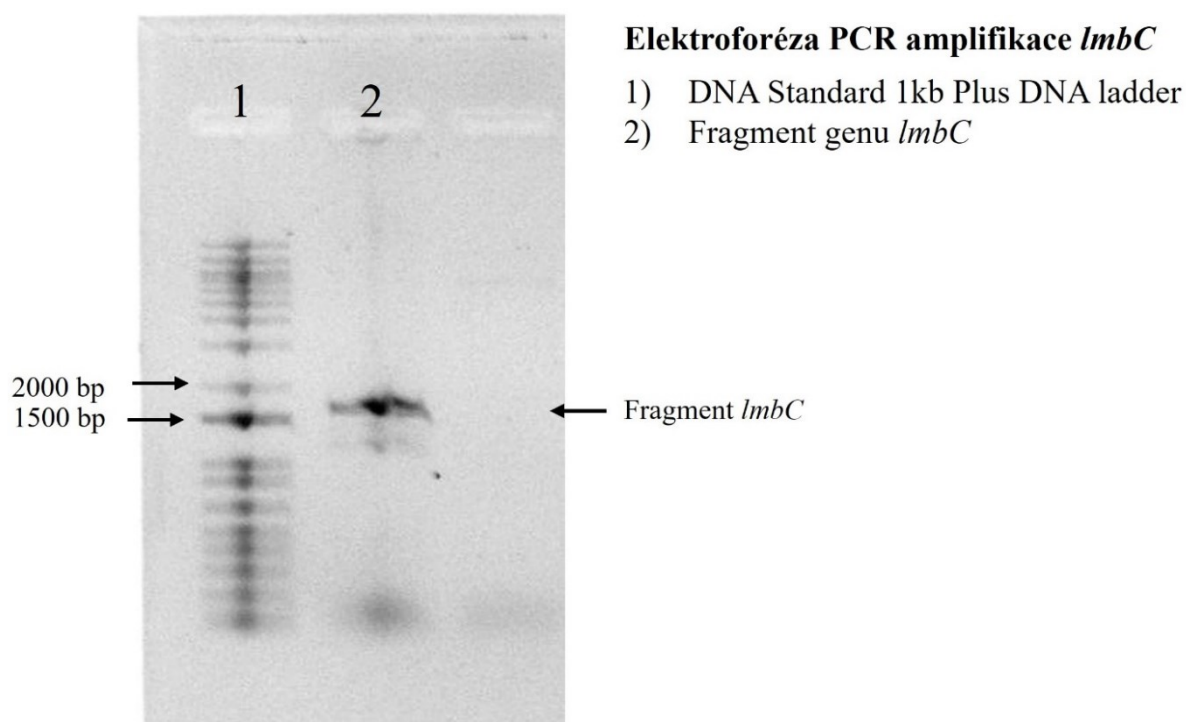
Testování produkovaných metabolitů celesticetinu a CELINu probíhalo jak z média, tak ze sonikací lyzovaných buněk, jelikož je možné, že buňka *Streptomyces caelestis* nedokáže molekulu CELINu transportovat do prostředí.

##### 5.1.1.1 Vnesení genu *lmbC* do *Streptomyces caelestis*

Nejprve bylo provedeno namnožení genu *lmbC* pomocí PCR za využití templátu LK06 a primerů pMK039\_LmbC\_pIJ10257\_for a pMK040\_LmbC\_pIJ10257\_rev (viz. kapitola

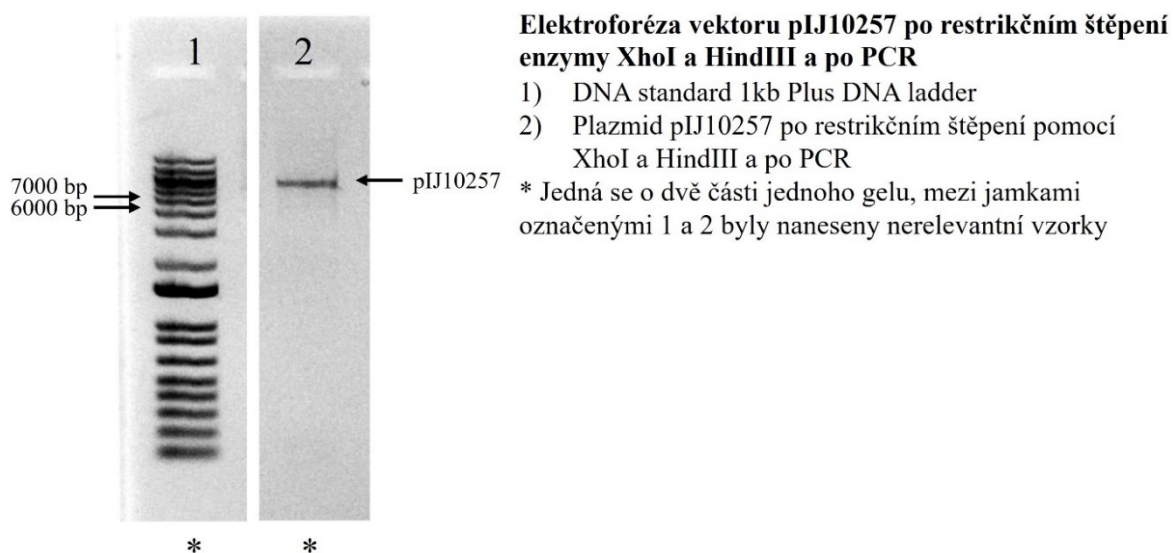


4.2.1.3). Pomocí primerů, které měly na 3'konci vloženou sekvenci homologní s oblastí vektoru, byl gen *lmbC* prodloužen. Poté bylo k PCR produktu přidáno 0,5  $\mu$ l restriční endonukleázy Dpn1, která štěpí pouze metylovanou DNA, aby byla směs zbavena původní templátové DNA (viz kapitola 4.2.1.4). Následně byla provedena elektroforetická separace v agarózovém gelu (viz kapitola 4.2.1.6) (viz obrázek 17) pro vizualizaci separovaných nukleových kyselin. Očekávaná velikost PCR produktu byla 1579 bp. Poté byl takto upravený PCR produkt přečištěn pomocí komerčního kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.



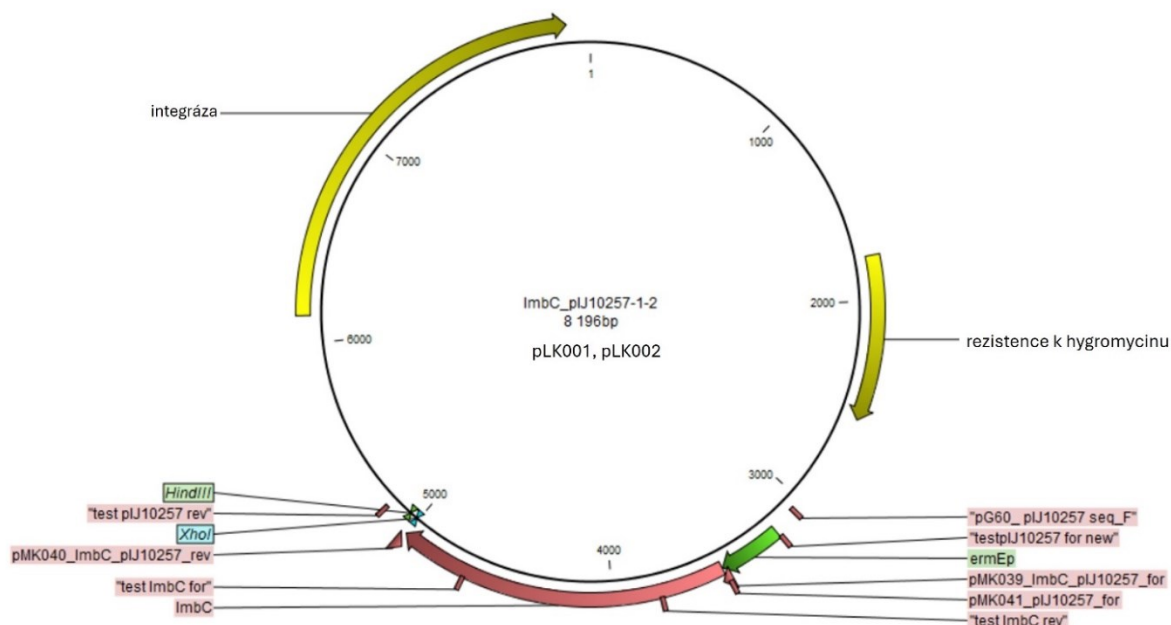
Obrázek 17 Elektroforéza PCR produktu *lmbC*, PCR provedeno s primery pMK039\_*LmbC*\_pIJ10257\_for a pMK040\_*LmbC*\_pIJ10257\_rev, nanášeno 5  $\mu$ l vzorku

Plazmid pIJ10257 byl nejprve linearizován pomocí restričních endonukleáz HindIII a XhoI (viz kapitola 4.2.1.2). Po této linearizaci bylo provedeno namnožení sekvence DNA pomocí PCR za využití primerů pMK041\_pIJ10257\_for a pMK042\_pIJ10257\_rev (viz kapitola 4.2.1.3). Poté byla naštěpena templátová DNA za využití restriční endonukleázy Dpn1 štěpící metylovanou DNA a PCR produkt byl vizualizován na agarózovém gelu (viz kapitola 4.2.1.4 a 4.2.1.6) (viz obrázek 18). Očekávaná velikost PCR produktu byla 6608 bp. Následně byla DNA vyčištěna pomocí komerčního kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.



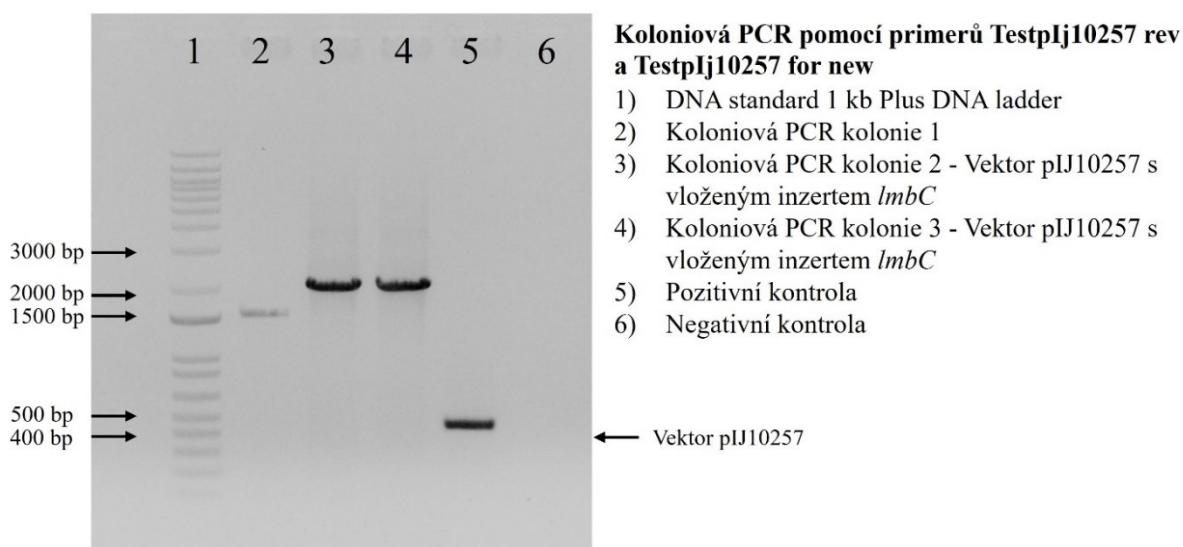
Obrázek 18 Elektroforéza PCR amplifikace vektoru pIJ10257 po restrikčním štěpení enzymy XhoI a HindIII, PCR provedeno pomocí primerů pMK041\_pIJ10257\_for a pMK042\_pIJ10257\_rev, nanášeno 5  $\mu$ l vzorku

Následně byly tyto dva DNA fragmenty spojeny do jednoho konstruktů pomocí komerčního kitu NEBuilder® HiFi DNA Assembly (viz kapitola 4.2.1.7). Principem této metody je rekombinace mezi přesahy insertu *lmbC* s komplementárními okrajovými sekvencemi vektoru pIJ10257. Gen *lmbC* byl vložen pod konstitutivní promotor *ermE*\* (viz obrázek 19). Poté byl vytvořený konstrukt transformován pomocí teplotního šoku do kompetentních buněk *Escherichia coli* XL-10 (viz kapitola 4.2.2.1.2.). Selekcce transformovaných buněk byla provedena inkubací přes noc při teplotě 37 °C na selekčním LB médiu s obsahem hygromycinu, ke kterému nese vektor pIJ10257 rezistenci, o výsledné koncentraci 100 mg/l.



Obrázek 19 Vektor pIJ10257 s vloženým inzertem lmbC/ pLK001/ pLK002, vytvořeno v programu CLC

Na třech takto transformovaných hygromycin rezistentních koloniích *Escherichia coli* byla následně provedena koloniová PCR pomocí primerů TestpIJ10257 rev a TestpIJ10257 for new (viz kapitola 4.2.1.3) k otestování přítomnosti genu *lmbC* na plazmidu. Produkt PCR byl následně vizualizován na gelu pomocí elektroforetické separace nukleových kyselin v agarózovém gelu (viz kapitola 4.2.1.6) (viz obrázek 20). V případě pozitivního výsledku by délka prepisovaného úseku byla 1998 bp, v případě negativního výsledku by délka tohoto prepisovaného úseku byla 474 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit prázdný plazmid pIJ10257, jako negativní kontrola byla použita stejná PCR směs bez templátu.



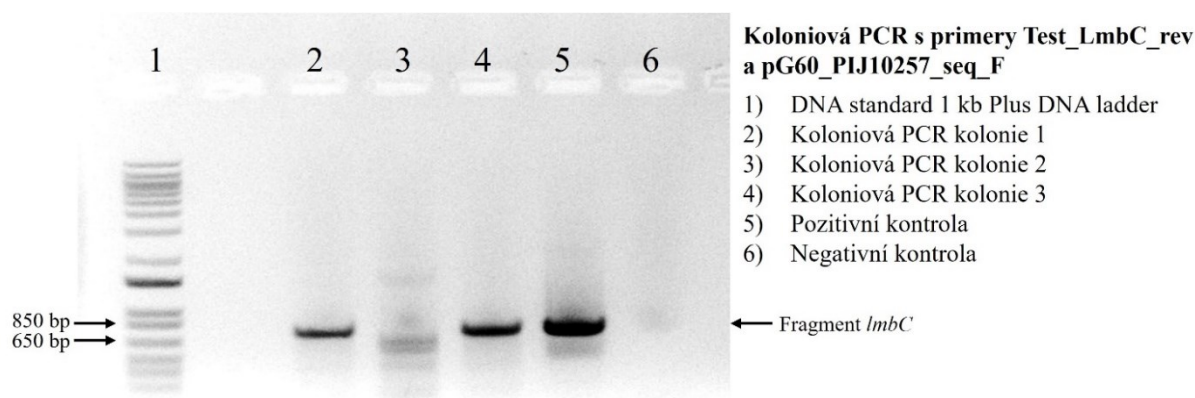
Obrázek 20 Elektroforéza PCR s primery TestpIj10257 rev a TestpIj10257 for new, nanášeno 5  $\mu$ l vzorku

Ze dvou pozitivních kolonií (2 a 3) byla vyizolována plazmidová DNA pomocí komerčního kitu Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System. Izolované plazmidy byly pojmenovány pLK001 a pLK002 a zkontrolovány sekvenací. Sekvence potvrdila přítomnost genu *lmbC*.

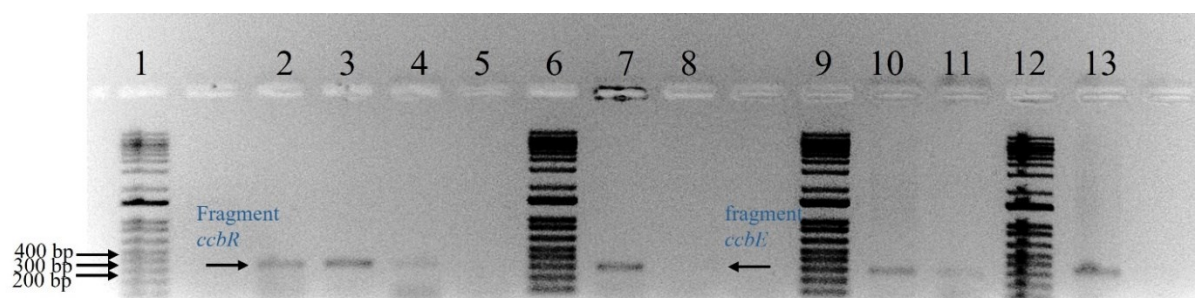
Plazmid pLK001 s inzertovaným *lmbC* byl transformován do kmene *Escherichia coli* ET10257/pUZ8002 a následně byla provedena konjugace do *Streptomyces caelestis* (viz kapitola 4.2.2.5.1.). Směs donora a akceptora byla kultivována na MS agaru s  $MgCl_2$  při 30 °C přes noc a následně byla miska převrstvena 1 ml sterilní vody obsahující selekční antibiotika (kyselinu nalidixovou o finální koncentraci 25 mg/l a hygromycin o finální koncentraci 40 mg/l). Poté bylo pokračováno v kultivaci.

Integrace plazmidu pLK001 do genomu *Streptomyces caelestis* byla ověřena pomocí koloniové PCR s následnou vizualizací na elektroforetickém agarózovém gelu u třech kolonií (viz kapitola 4.2.1.3 a 4.2.1.6). Koloniová PCR byla provedena s několika páry primerů. Primery Test\_LmbC\_rev a pG60\_PIJ10257\_seq\_F (viz obrázek 21) sloužily k potvrzení vložení inzertu, jako pozitivní kontrola sloužil plazmid pLK001, jako negativní kontrola sloužila stejná PCR směs bez templátu. Délka prepisovaného úseku těmito primery činila 738 bp. Primery LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev a dvojice primerů LK03\_test\_lmbE\_for a LK04\_test\_lmbE\_rev (viz obrázek 22) sloužily pro potvrzení, že se jedná o *Streptomyces caelestis*. Velikost prepisovaného úseku těmito dvojicemi primerů byla 326 bp a 287 bp. Tyto primery sloužily k prepisu genů z genového shluku pro biosyntézu celesticetinu. Jako pozitivní kontrola sloužil plazmid CK2, který nese geny genového shluku pro biosyntézu celesticetinu, a jako negativní kontrola sloužila stejná PCR směs bez templátu.

Byly připraveny dva kmeny *Streptomyces caelestis* BN9500 a BN9501, s nimiž se dále pracovalo.



Obrázek 21 Elektroforéza PCR s primery Test\_LmbC\_rev a pG60\_PIJ10257\_seq\_F, nanášeno 5  $\mu$ l vzorku



**Koloniová PCR s primery LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev, LK03\_test\_lmbe\_for a LK04\_test\_lmbe\_rev**

- 1) DNA standard 1 kb Plus DNA ladder
- 2) Koloniová PCR kolonie 2 LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 3) Koloniová PCR kolonie 3 LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 4) Koloniová PCR kolonie 1 LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 5) Negativní kontrola LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 6) DNA standard 1 kb Plus DNA ladder
- 7) Koloniová PCR kolonie 1 LK03\_test\_lmbe\_for a LK04\_test\_lmbe\_rev
- 8) Negativní kontrola LK03\_test\_lmbe\_for a LK04\_test\_lmbe\_rev
- 9) DNA standard 1 kb Plus DNA ladder
- 10) Pozitivní kontrola s plazmidem CK2 LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 11) Pozitivní kontrola s plazmidem CK1 LK01\_test\_lmbR\_for a LK02\_test\_lmbR\_rev
- 12) DNA standard 1 kb Plus DNA ladder
- 13) Pozitivní kontrola s plazmidem CK2 LK03\_test\_lmbe\_for a LK04\_test\_lmbe\_rev

Obrázek 22 Elektroforéza PCR prováděného pro ověření *Streptomyces caelestis* s primery LK01\_test\_lmbR\_for, LK02\_test\_lmbR\_rev, LK03\_test\_lmbe\_for a LK04\_test\_lmbe\_rev, nanášeno 5  $\mu$ l vzorku

### 5.1.1.2 Kultivace mutanty *Streptomyces caelestis* s vneseným genem *lmbC*

Z kmenů BN9500 a BN9501 s integrovaným genem *lmbC* byly připraveny konzervy (viz kapitola 4.2.2.7)

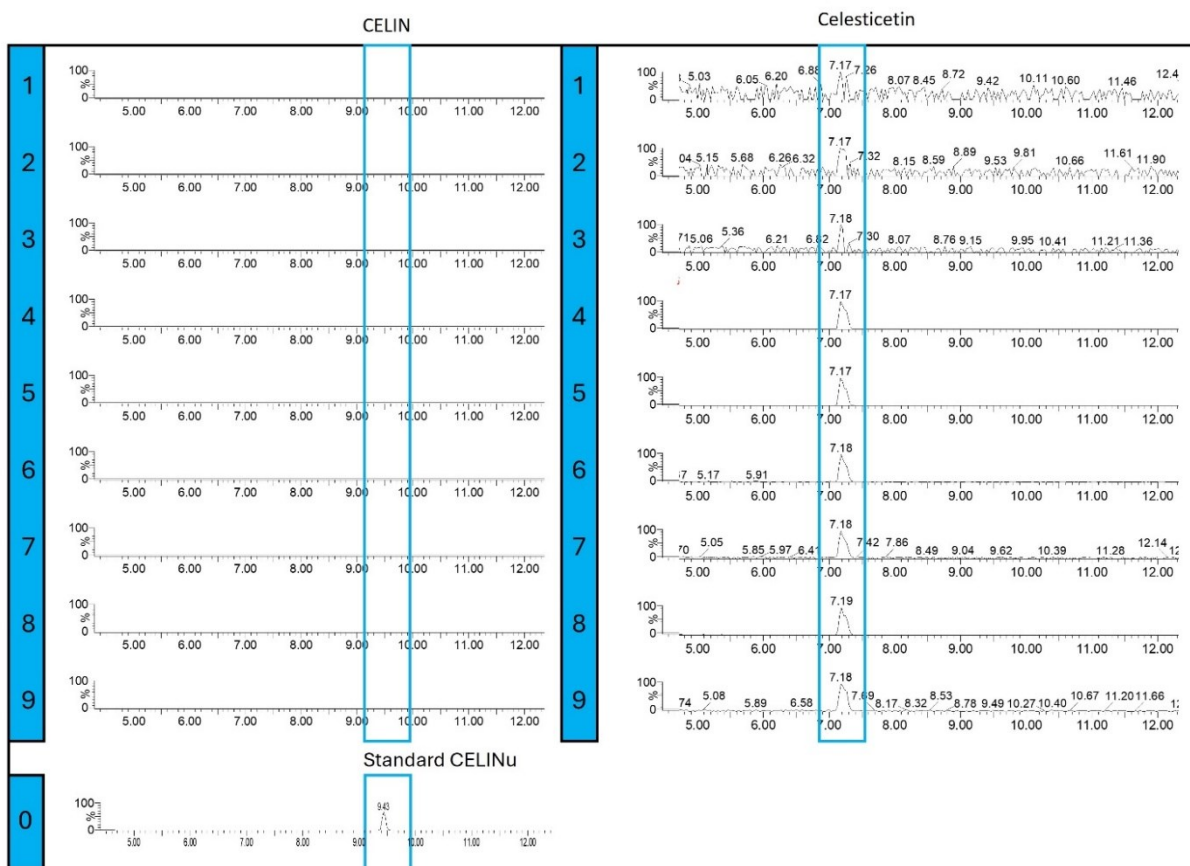
Produkce CELINu kmeny BN9500 a BN9501 byla testována v tekutém médiu i na pevné půdě za následujících podmínek. Jako pevné půdy byly požívány MS agar a GYM agar. Kultivace probíhala na 0,5 ml agaru ve 24 jamkové destičce. První den bylo do jamek zaočkováno po 10  $\mu$ l spor a destička byla inkubována při teplotě 30 °C po dobu 36 hod. Po dokončené inkubaci byly všechny jamky přelity sterilním roztokem propyl-prolinu o koncentraci 1 M tak, aby výsledná koncentrace v celém objemu agaru byla 200 mg/l. Poté byla destička opět inkubována při teplotě 30 °C, tentokrát po dobu 48 hod. Následně byly všechny jamky opět přelity sterilním roztokem propyl-prolinu tak, aby výsledná koncentrace propyl-prolinu opět byla 200 mg/l agaru. Poté opět probíhala inkubace při teplotě 30 °C po dobu 72 hod. Po dokončené inkubaci byla média rozpuštěna ve 100 % methanolu a směs byla připravena na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 4.2.4.2) jako vzorky číslo 3 u kmene BN9500 a 2 u kmene BN9501.

Pro kultivaci v tekutém médiu byla nejprve provedena germinizace (viz kapitola 4.2.2.8) a kultivována prekultura v YEME P médiu při teplotě 30 °C za konstantního třepání o rychlosti 200 RPM po dobu 48 hod. Po ukončení této kultivace bylo přeočkováno 2,5 ml této kultury do 47,5 ml AVM média v prolamované erlenmeyerově baňce a kultura byla kultivována po dobu 24 hod za konstantního třepání o rychlosti 200 RPM při teplotě 30 °C. Poté byl do média přidán sterilní roztok propyl-prolinu o koncentraci 1 M tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu byla 200 mg/l a bylo pokračováno v kultivaci po dobu dalších 96 hod. Po uplynutí těchto 96 hod byl do média opět přidán sterilní roztok propyl-prolinu tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu byla 200 mg/l. Následně bylo pokračováno v kultivaci dalších 24 hod. Případná kontaminace byla zkontrolována pod mikroskopem. Poté byly kultury centrifugovány po dobu 10 min rychlostí 3220 g. Supernatant (kultivace BN9500 byla měřena jako vzorek 6, kultivace BN9501 byla měřena jako vzorek 5) a peleta (vzorek 9 (BN9500) a vzorek 8 (BN9501)) byly skladovány zvlášť při teplotě -80 °C.

Jako negativní kontrola produkce CELINu a pozitivní kontrola produkce celesticetinu byla za stejných podmínek jako kmeny BN9500 a BN9501 kultivována *Streptomyces caelestis* WT.

Supernatant a peleta byly připraveny na měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 4.2.4.1 a 4.2.4.3) (viz obrázek 23).

Obě tyto kultivace byly zopakovány dvakrát se stejnými výsledky. V obou opakováních byl detekován celesticetin, ale CELIN detekován nebyl (výsledky níže).



Obrázek 23 Měření produkce CELINu a celesticetinu na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí, na ose x je retenční čas, na ose y je intenzita

- Vzorky:
- 1) Negativní kontrola pro CELIN, pozitivní kontrola pro celesticetin – kultivace *Streptomyces caelestis* WT na pevném médiu
  - 2) Kmen BN9501, kultivace na pevném médiu s propyl-prolinem
  - 3) Kmen BN9500, kultivace na pevném médiu s propyl-prolinem
  - 4) Negativní kontrola pro CELIN, pozitivní kontrola pro celesticetin – kultivace *Streptomyces caelestis* WT v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z média
  - 5) Kmen BN9501, kultivace v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z média
  - 6) Kmen BN9500, kultivace v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z média
  - 7) Negativní kontrola pro CELIN, pozitivní kontrola pro celesticetin - kultivace *Streptomyces caelestis* WT v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z lyzovaných buněk
  - 8) Kmen BN9501, kultivace *Streptomyces caelestis* WT v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z lyzovaných buněk
  - 9) Kmen BN9500, kultivace *Streptomyces caelestis* WT v tekutém médiu s propyl-prolinem, měření metabolitů celesticetinu a CELINu z lyzovaných buněk

Ve všech vzorcích byl detekován celesticetin (o molekulové hmotnosti 529). V žádném z testovaných vzorků nebyla detekována produkce CELINu (o molekulové hmotnosti 571).

Metodami, které máme k dispozici, nebyla detekována schopnost mutanty *Streptomyces caelestis* produkovat CELIN.

## 5.2 Vyhledávání proteinů interagujících s proteinem LmbF

Po vložení *ccbF* do mutanty *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF připravené naší laboratoří byla obnovena produkce linkomycinu (viz kapitola 3.4). Možným vysvětlením této produkce linkomycinu mutantou je nezbytnost proteinové interakce mezi proteinem LmbF/ CcbF a dalším proteinem z příslušného biosyntetického genového shluku. Tento interakční partner by mohl ovlivňovat výsledný produkt preferencí jedné z konkurenčních biosyntetických drah. Případný homolog tohoto interakčního partnera z genového shluku pro biosyntézu druhého linkosamidu možná nedokáže tohoto interakčního partnera zastoupit. Tudiž enzymy rozhodujícími o výběru metabolické dráhy v jejich větvení u substrátu C-2 by nebyly pouze enzymy LmbF a CcbF jak se předpokládalo, ale tyto enzymy v kombinaci s jejich interakčním partnerem.

### 5.2.1 Vyhledávání interakčních partnerů proteinu LmbF pomocí metody pulldown

Metoda pulldown je využívána ke studiu proteinových interakcí. Principem této metody je zachycení proteinu interagujícího s proteinem zájmu, který je zachycen na koloně. Protein zájmu je zachycen na koloně díky interakcím mezi histidinovou kotvou a nikelnými ionty v náplni kolony.

Touto metodou byla testována hypotéza, že protein LmbF potřebuje ke své správné funkci interakci s dalším proteinem z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu.

K proteinovým interakcím s proteinem LmbF by pravděpodobně docházelo s proteinem z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, proto byla metoda pulldown prováděna s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* nakultivovaným do produkční fáze. Protein LmbF a jeho interakční partner by mohly v buňce být v poměru 1 : 1, tudíž by interakční partner LmbF mohl interagovat s proteinem LmbF vyskytujícím se přirozeně v *Streptomyces lincolnensis* a nevázal by se na rekombinantní fúzní LmbF protein s histidinovou kotvou navázaný na koloně. Proto byla metoda pulldown prováděna také s kmenem *Streptomyces lincolnensis* s deletovaným genem *lmbF* nazvaným  $\Delta$ lmbF.

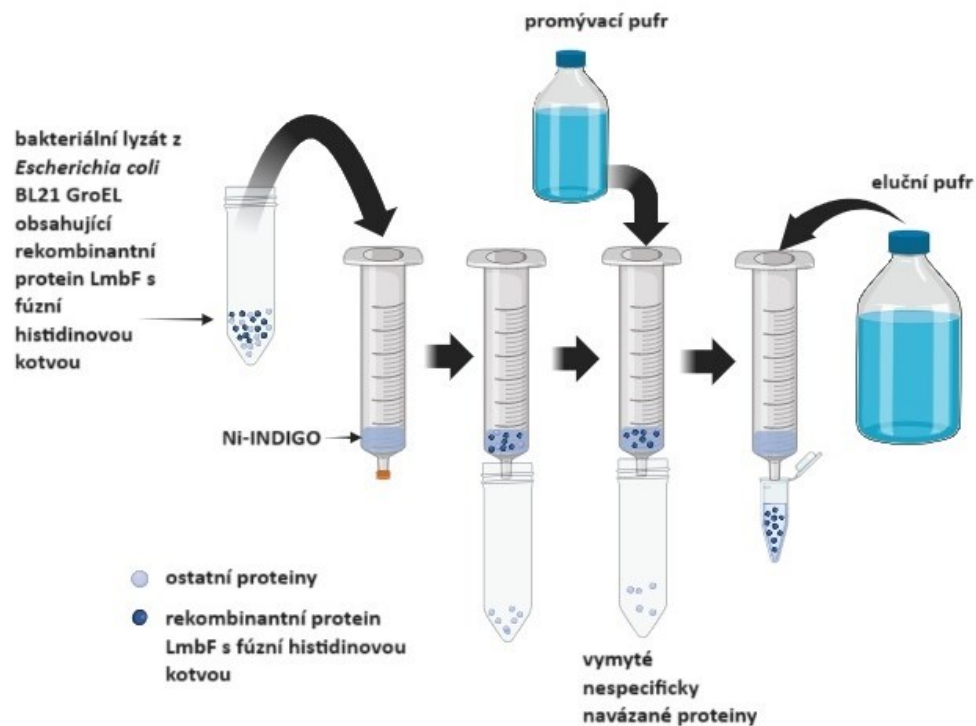


### 5.2.1.1 Heterologní exprese a purifikace proteinu LmbF

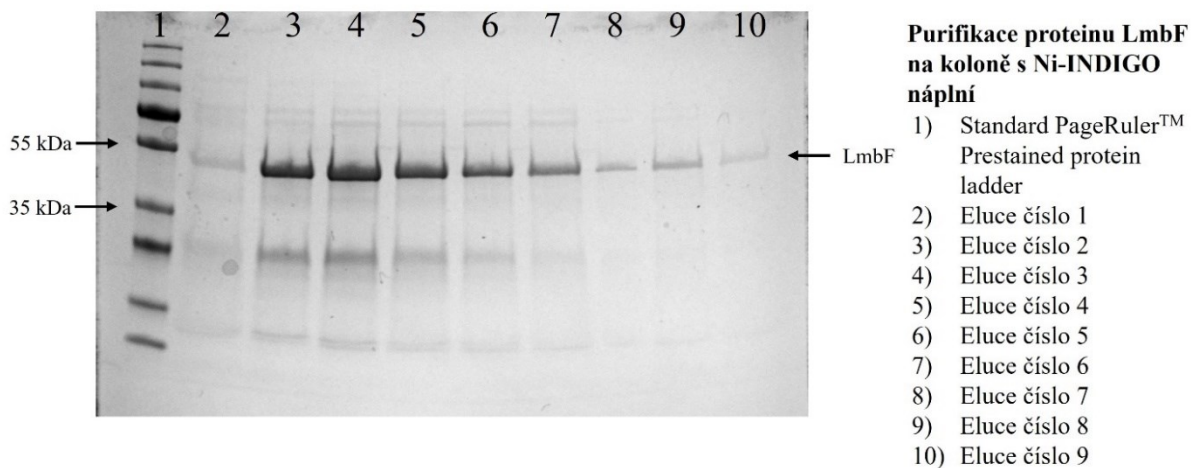
Plazmid PET-48 s kanamycinovou rezistencí obsahující gen pro protein LmbF s vloženou sekvencí pro histidinovou kotvu obsahující 6 aminokyselin histidinů na C-konci proteinu byl transformován pomocí tepelného šoku do kompetentních buněk *Escherichia coli* BL21 GroEL s rezistencí k chloramfenikolu (viz kapitola 4.2.2.1.1.). Transformované kolonie byly kultivovány a kultivace následně centrifugovány podle protokolu v kapitole 4.2.2.4. Další práce probíhala pouze s peletou, která byla uchovávána při teplotě -80 °C.

Z pelety byl připraven lyzát. Peleta byla nejprve rozpuštěna v lyzačním pufru pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8), buňky byly rozbity sonikací a následně byla suspenze centrifugována rychlostí 40000 g po dobu 30 min (viz kapitola 4.2.2.4). Dále se pracovalo se supernatantem bakteriálního lyzátu obsahujícím rekombinantní protein LmbF s fúzní histidinovou kotvou.

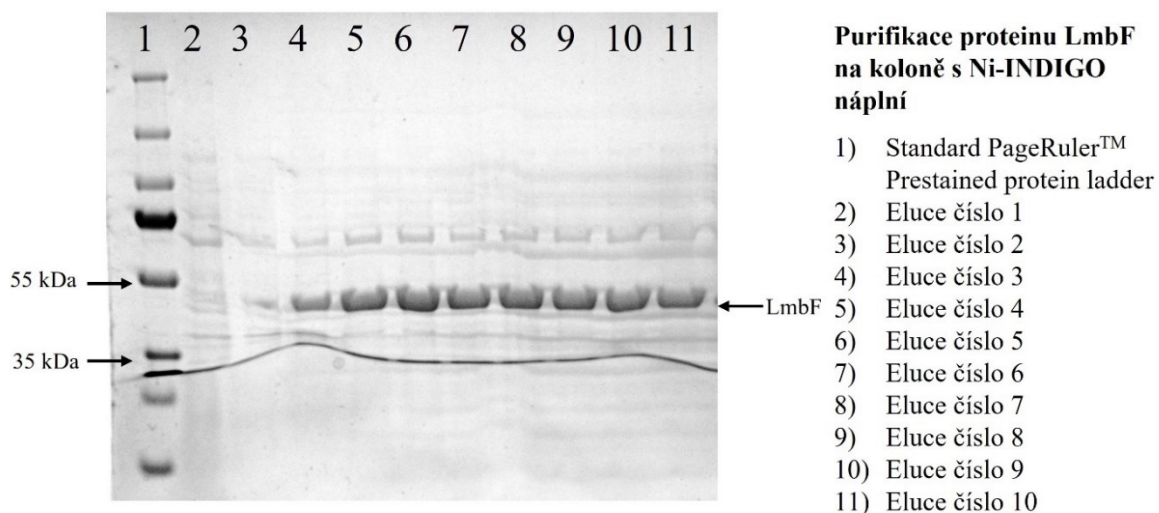
Z tohoto supernatantu bakteriálního lyzátu byl purifikován rekombinantní protein LmbF s fúzní histidinovou kotvou o celkové velikosti 48,16 kDa. Protein byl purifikován pomocí afinitní chromatografie za využití kolony s komerčně dodávanou Ni-INDIGO náplní (viz kapitoly 4.2.3.1 a 4.2.3.3) (viz obrázek 24). Kolona obsahující 2 ml Ni-INDIGO náplně byla nejprve ekvilibrována 20 ml ekvilibračního pufru pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) a poté na ni byl nanesen supernatant o objemu 60 ml. Tento supernatant byl na kolonu nanesen celkem 3×. Poté byla kolona promyta promývacím pufrem pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) a rekombinantní protein s histidinovou fúzní kotvou na C-konci byl z kolony eluován elučním roztokem pro purifikaci proteinů. Eluční roztok pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) byl na kolonu nanášen v objemu 1 ml a to celkem 10×. Jednotlivé frakce byly sbírány a následně vizualizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.4) (viz obrázky 25, 26 a 27). Byly identifikovány frakce obsahující protein LmbF a ty byly smíchány a zakoncentrovány na pětina objem pomocí Amicon® Ultra centrifugačního filtru (cut-off 30 kDa) (viz kapitola 4.2.3.5). Pro každé ze tří opakování metody pulldown byl purifikován čerstvý protein LmbF.



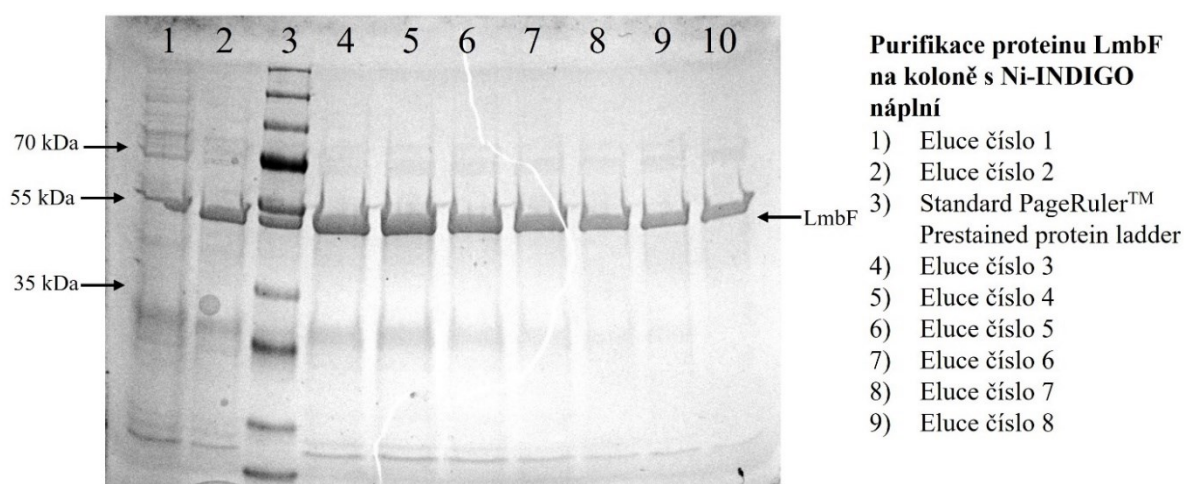
Obrázek 24 Purifikace proteinu LmbF, vypracováno v Biorenderu



Obrázek 25 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely pulldown metody 1, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



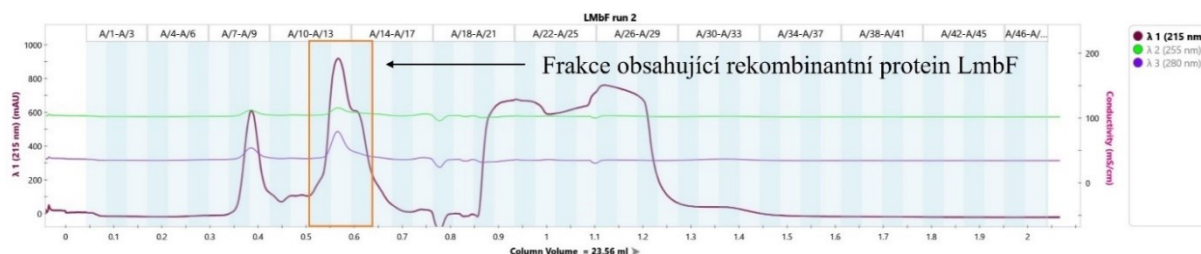
Obrázek 26 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely pulldown metody 2, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



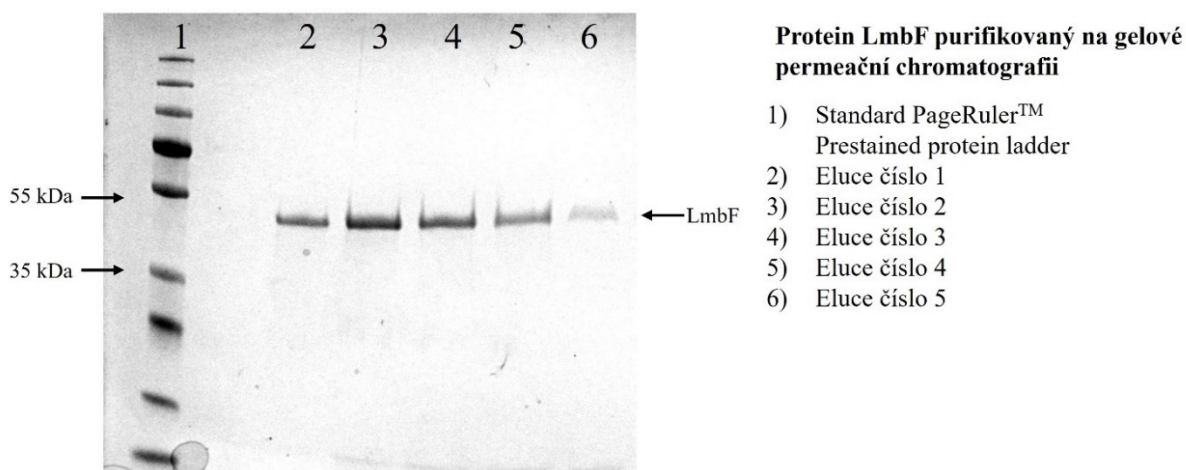
Obrázek 27 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely pulldown metody 3, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu

Takto připravený protein byl následně přečištěn a odsolen pomocí gelové permeační chromatografie za pomoci NGC chromatografického systému na koloně ENrich SEC 650 10 $\times$  300 (viz kapitola 4.2.3.6). Tato kolona byla nejprve promyta vodou a ekvilibrována pomocí ekvilibračního pufru pro purifikaci proteinů II (viz kapitola 4.1.8). Vzorek proteinu byl poté nanášen po objemu 1 ml, eluce pomocí elučního pufru pro purifikaci proteinů II (viz kapitola 4.1.8) probíhala po frakcích o objemu 1 ml. Frakce, jež pravděpodobně obsahovaly protein LmbF byly identifikovány podle grafu tvořeného na základě UV detekce (viz obrázek 28). Takto identifikované frakce byly vizualizovány na SDS-PAGE gelu (viz kapitola 4.2.3.4) (viz obrázky 29, 30 a 31). Frakce obsahující LmbF protein

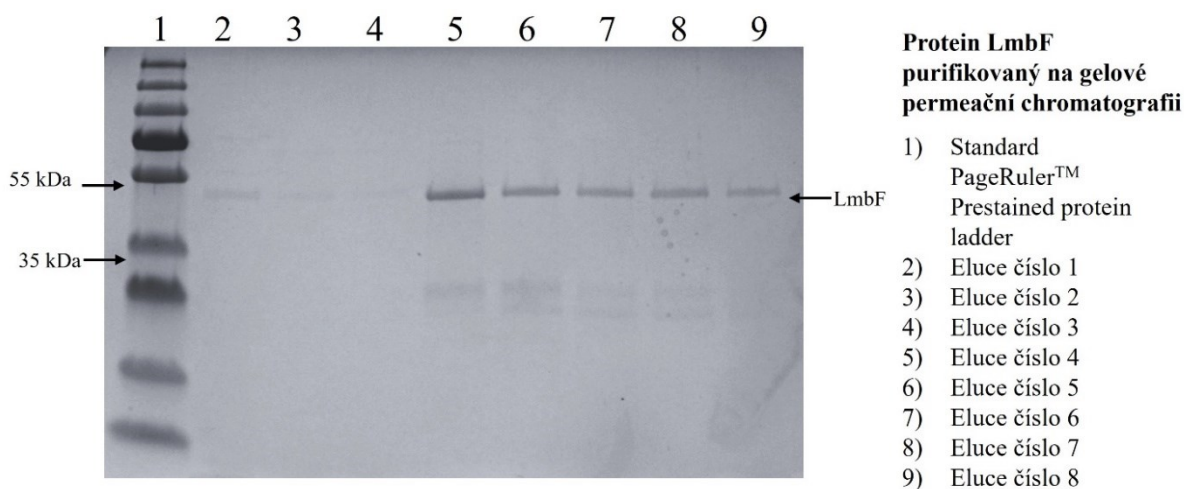
byly poté smíchány a zakoncentrovány na poloviční objem pomocí Amicon® Ultra centrifugačního filtru (cut-off 30 kDa) (viz kapitola 4.2.3.5). Takto připravený protein byl uchováván v elučním pufru pro purifikaci proteinů II při teplotě 10 °C po dobu maximálně 14 dní.



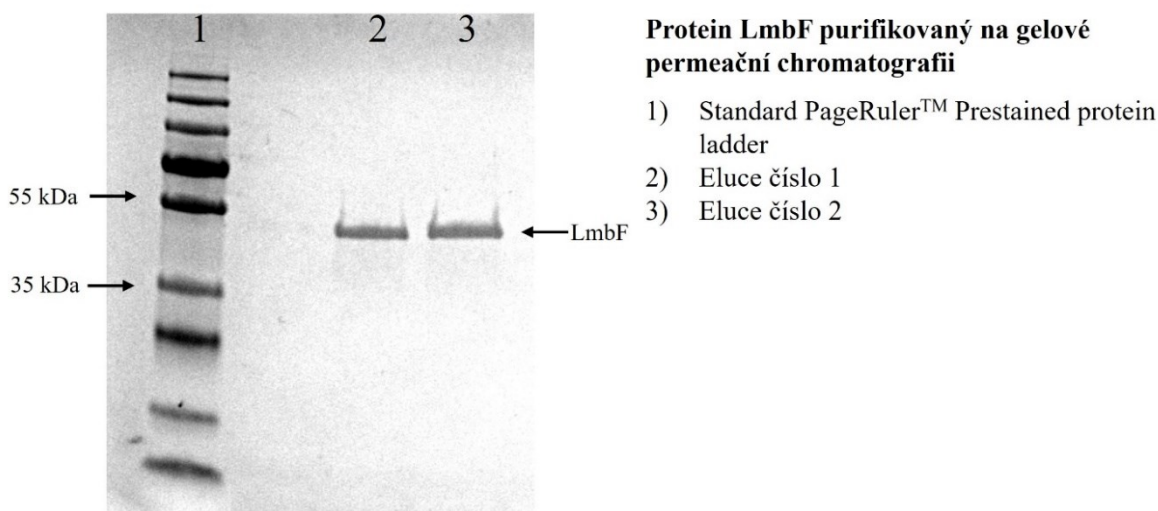
Obrázek 28 UV detekce frakcí eluovaných z gelové permeační chromatografie



Obrázek 29 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného gelovou permeační chromatografií 1, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



Obrázek 30 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného gelovou permeační chromatografií 2, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



Obrázek 31 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného gelovou permeační chromatografií 3, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu

### 5.2.1.2 Příprava lyzátu ze *Streptomyces lincolnensis*

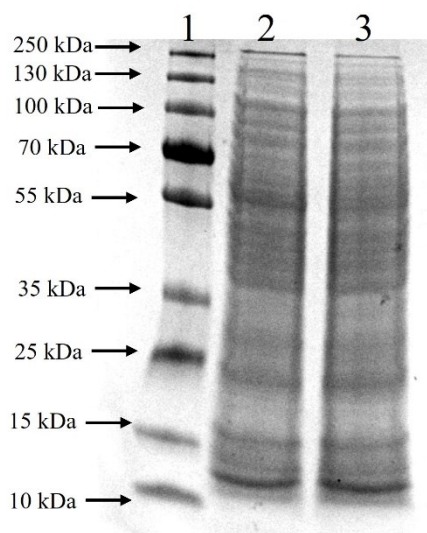
U kmenů *Streptomyces lincolnensis* WT a  $\Delta$ lmbF byla nejprve provedena germinizace a byla kultivována prekultura (viz kapitola 4.2.2.8). Po ukončení kultivace bylo 2,5 ml této prekultury inokulováno do 47,5 ml AVM média a exprese genů genového shluku pro biosyntézu linkomycinu a produkce linkomycinu byla indukována přidáním klindamycinu o výsledné koncentraci 0,5 mg/l. Tato kultura byla kultivována po dobu 60 hod při teplotě 30 °C za konstantního třepání o rychlosti 200 RPM. Kultura byla poté centrifugována po dobu 10 min na 3220 g. Dále se pracovalo pouze s peletou.

0,5 g pelety bylo odebráno a rozpuštěno v 1 ml lyzačního pufru (viz kapitola 4.1.8). Buňky byly rozrušeny pomocí sonikace a suspenze byla centrifugována (viz kapitola 4.2.2.9.), byl odebrán supernatant tohoto bakteriálního lyzátu. Tento supernatant byl následně vizualizován pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.4) (viz obrázek 32) a změřen pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Toto měření bylo provedeno servisní laboratoří Strukturní hmotnostní spektrometrie (RNDr. Petr Pompach, Ph.D.) v centru BIOCEV. Byly změřeny bakteriální lyzáty z více nezávislých kultivací. Pro další práci byly vybrány lyzáty *Streptomyces lincolnensis* WT a *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF, v nichž bylo detekováno nejvíce proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. Jednalo se tedy o peletu WT 4 a  $\Delta$ lmbF 2 (viz tabulka 17). Zbytek pelety byl uchováván při teplotě -80 °C.

Bakteriální lyzát byl připravován vždy čerstvý.

VZOREK:		21	22	23	24	25	26	27	28
		WT 1	WT 2	$\Delta$ lmbF 1	$\Delta$ lmbF 2	WT 3	$\Delta$ lmbF 3	WT 4	$\Delta$ lmbF 4
Protein Lmb_:	A		+	+	+	+	+	+	+
	B1		+	+	+			+	+
	B2			+	+			+	+
	C			+	+	+		+	+
	D			+	+			+	+
	E	+	+	+	+	+	+	+	+
	F					+		+	
	G			+	+	+	+	+	+
	IH				+			+	+
	J			+	+	+	+	+	+
	K								
	L				+	+		+	+
	M		+	+	+		+	+	+
	N	+	+	+	+	+	+	+	+
	O								
	P				+			+	
	Q				+			+	+
	R				+	+	+	+	+
	S							+	
	T								
	U				+		+	+	+
	V				+	+	+	+	+
	W		+	+	+	+	+	+	
	X		+	+	+	+	+	+	+
	Y		+		+	+		+	+
	Z				+	+	+	+	

Tabulka 17 Obsah proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu v jednotlivých bakteriálních lyzátech *Streptomyces lincolnensis*



#### Lyzáty *Streptomyces lincolnensis*

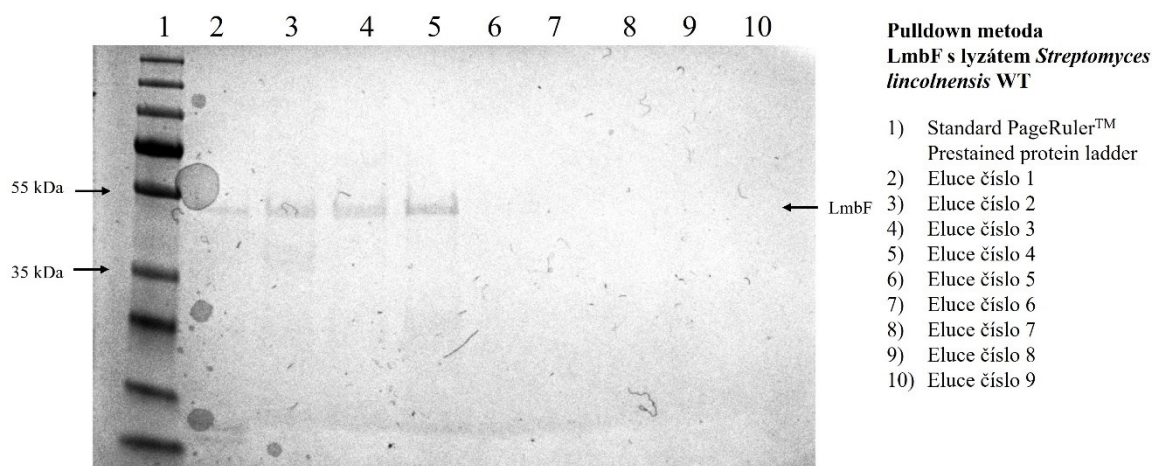
- 1) Standard PageRuler™ Prestained protein ladder
- 2) Lyzát *Streptomyces lincolnensis* WT
- 3) Lyzát *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF

Obrázek 32 SDS elektroforéza lyzátů *Streptomyces lincolnensis*, nanášeno 5  $\mu$ l lyzátu

### 5.2.1.3 Metoda pulldown

Kolona s Ni-INDIGO náplní připravená podle kapitoly 4.2.3.1 byla nejprve ekvilibrována 20 ml ekvilibračního pufru (viz kapitola 4.1.8). Na uzavřenou kolonu bylo následně naneseno 0,5 ml rekombinantního proteinu LmbF s fúzní histidinovou kotvou a 1 ml bakteriálního lyzátu *Streptomyces lincolnensis* WT nebo  $\Delta$ lmbF. Uzavřená kolona byla inkubována ve vodorovné poloze za stálého promíchávání na valivé třepačce třepající rychlostí 20 RPM při teplotě 10 °C po dobu 2 hod.

Po uplynutí doby inkubace byla kolona dána do svislé polohy a otevřena, aby směs lyzátu a proteinu mohla vykat. Poté byla kolona promyta 20 ml promývacího pufru (viz kapitola 4.1.8) a následně byla provedena eluce 10 $\times$  0,5 ml elučního pufru (viz kapitola 4.1.8) s imidazolem o koncentraci 250 mM. Po vizualizaci pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz obrázek 33) a měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno, že při využívání tohoto protokolu se pravděpodobně netvoří dostatečně silná vazba mezi proteinem LmbF s histidinovou fúzní kotvou a jeho interakčním partnerem. Navíc se protein LmbF s histidinovou fúzní kotvou vymýval nárazově během 3 – 4 elucí ihned na začátku a nebylo možno sledovat úbytek proteinů eluovaných spolu s ním. Měření na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí bylo provedeno servisní laboratoří Strukturní hmotnostní spektrometrie (RNDr. Petr Pompach, Ph.D.) v centru BIOCEV.

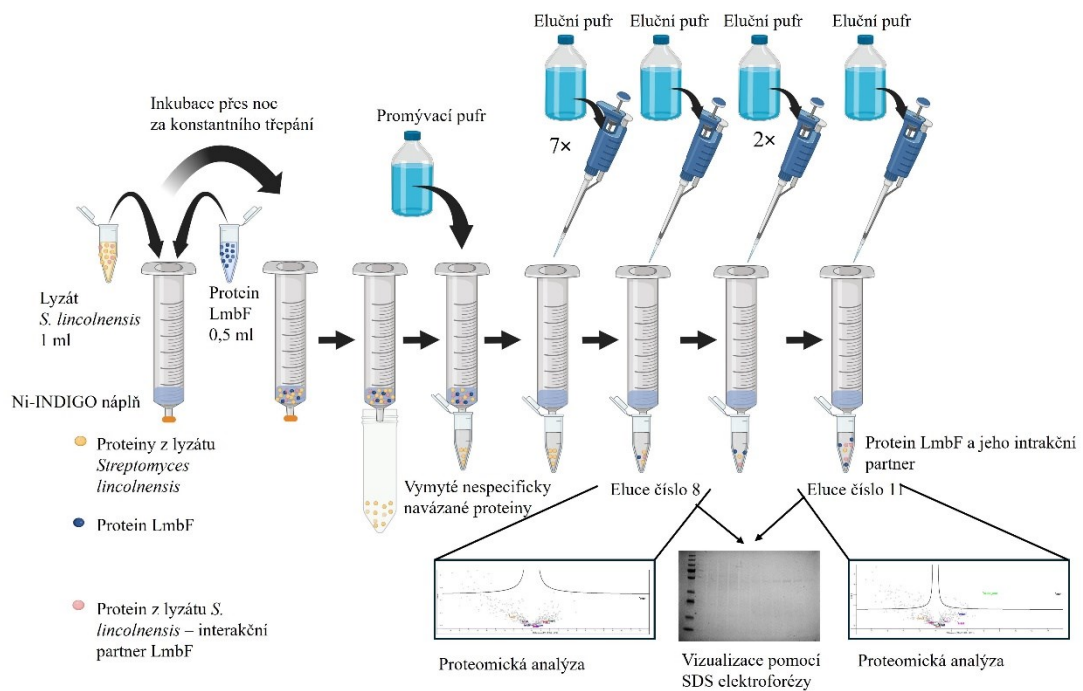


Obrázek 33 SDS elektroforéza pulldown metody při níž byla kolona s proteinem LmbF a lyzátem *Streptomyces lincolnensis* inkubována pouze po dobu 2 hod a eluce probíhala elučním pufrům s koncentrací imidazolu 250 mM, nanášeno 10  $\mu$ l vzorku

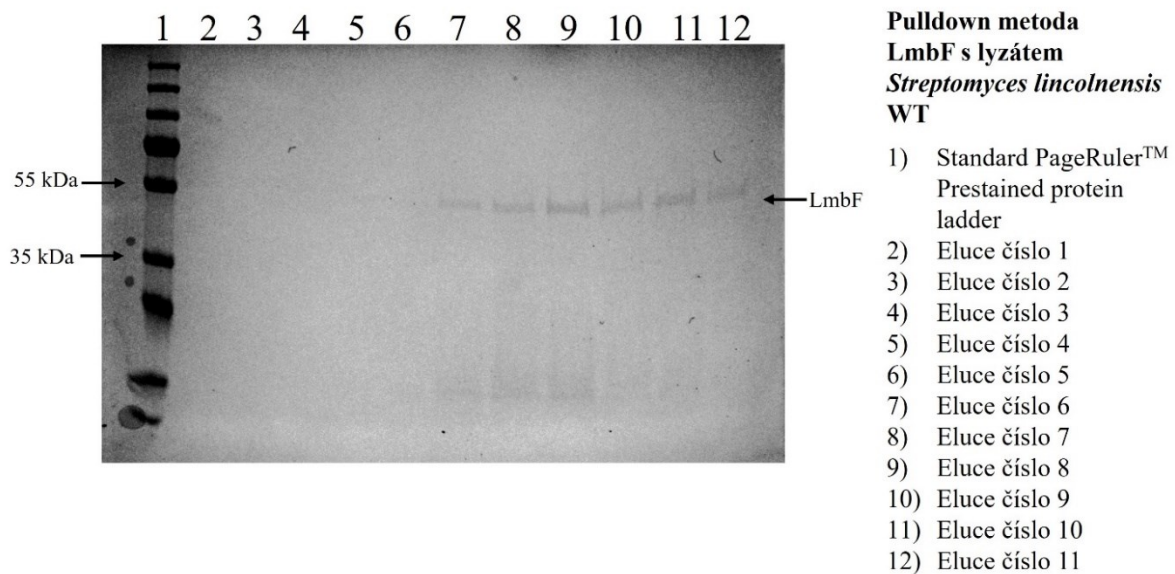
Protokol byl tedy upraven a kolona byla inkubována po dobu 18 hod a po následném promytí kolony byla provedena gradientová eluce elučním pufrům (viz kapitola 4.1.8) (viz obrázek 34). Na kolonu bylo vždy nanášeno 0,5 ml elučního pufru o odpovídající koncentraci imidazolu (50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 225 mM, 3  $\times$  250 mM) a frakce byly sbírány do mikrozkušavek. Metoda byla provedena v technickém triplikátu. Jednotlivé frakce byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.4) (viz obrázky 35 – 40) a následně změřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Tato analýza byla provedena servisní laboratoří Strukturní hmotnostní spektrometrie (RNDr. Petr Pompach, Ph.D.) v centru BIOCEV. K bioinformatické analýze byl použit program Perseus (v. 2.0.11) (Tyanova a Cox, 2018).

Pro detekci nespécifických interakcí a jako negativní kontrola sloužila kolona, se kterou bylo pracováno stejně jako s kolonami pro pulldown metodu. Na tuto kolonu však nebyl nanášen žádný rekombinantní protein LmbF. Na kolonu byl nanášen pouze lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF a s ním byla kolona také inkubována (viz obrázek 41). Tato negativní kontrola byla provedena 3 $\times$ .

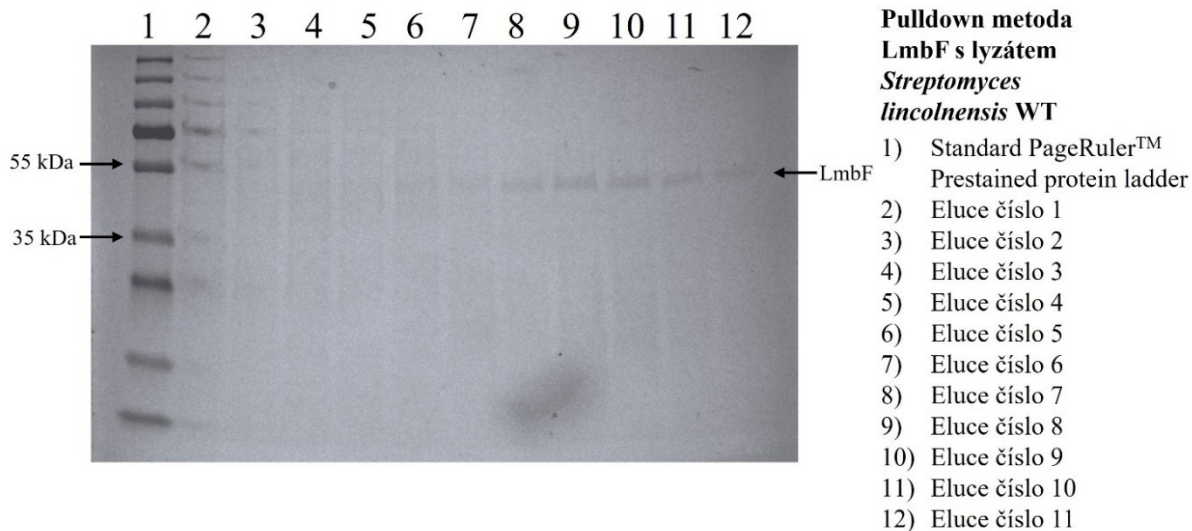




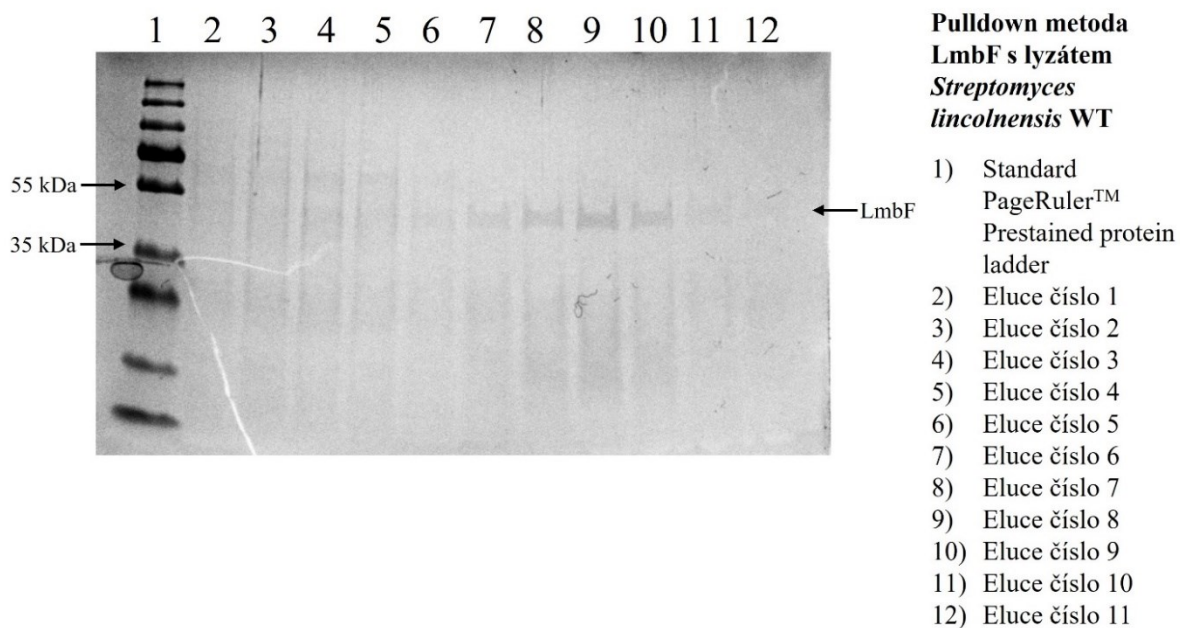
Obrázek 34 Provedení metody pull-down, vytvořeno v programu Biorender



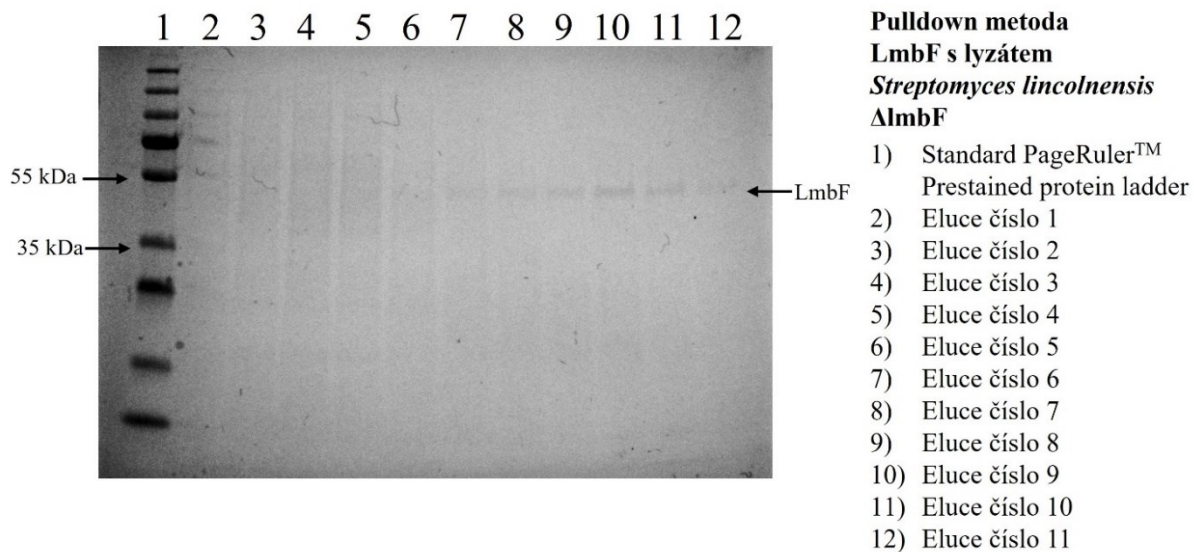
Obrázek 35 SDS elektroforéza pull-down metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* WT 1, nanášeno 10 µl vzorku



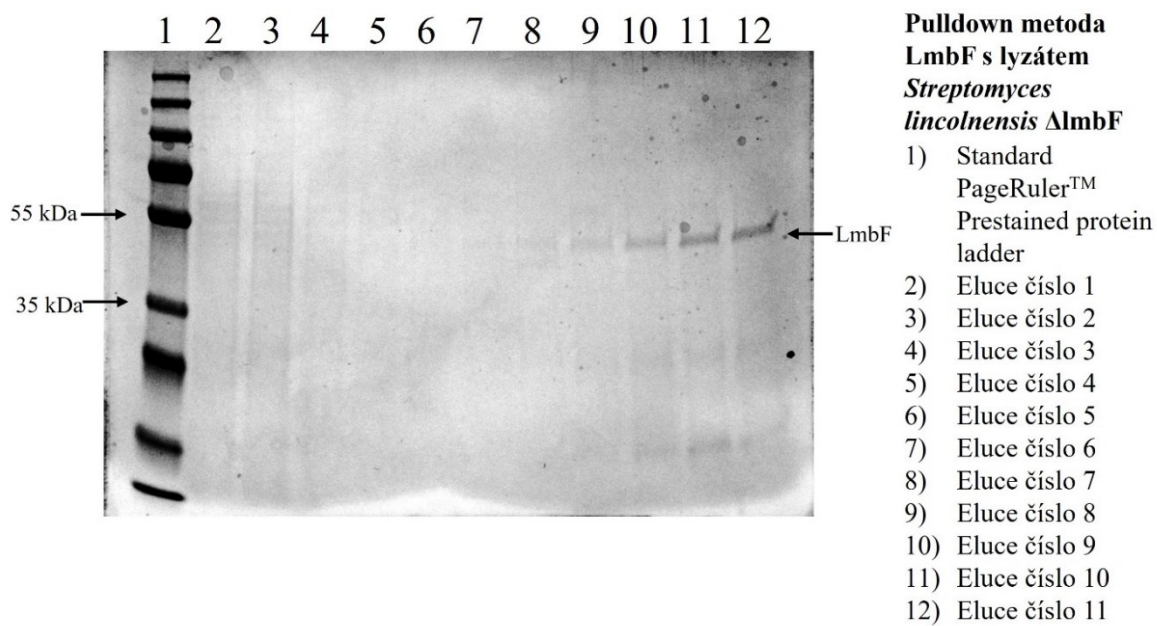
Obrázek 36 SDS elektroforéza pull-down metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* WT 2, nanášeno 10  $\mu$ l vzorku



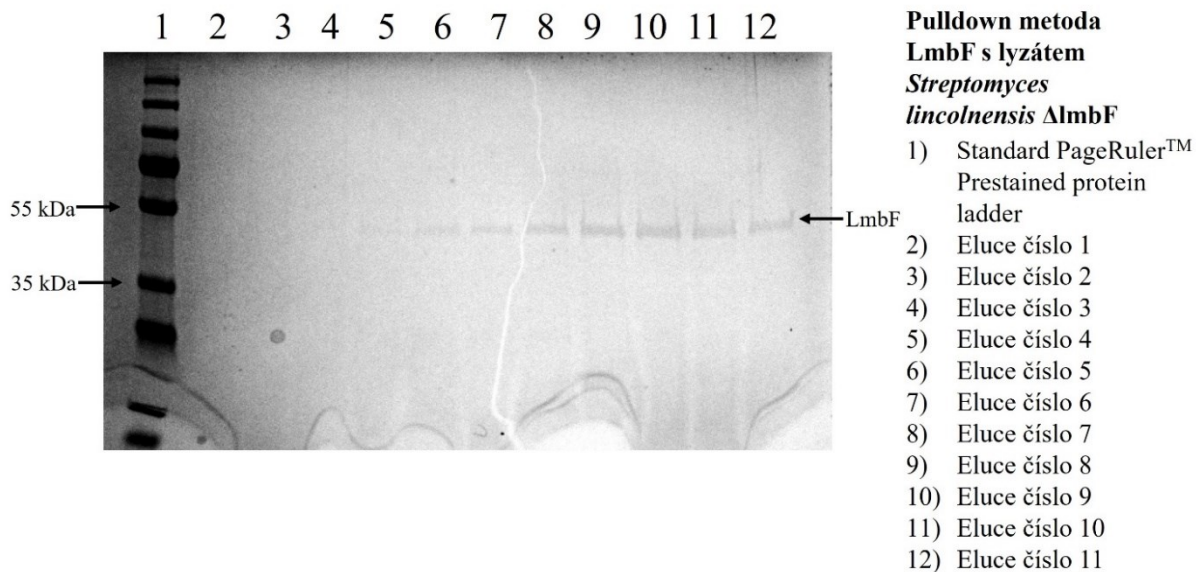
Obrázek 37 SDS elektroforéza pull-down metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* WT 3, nanášeno 10  $\mu$ l vzorku



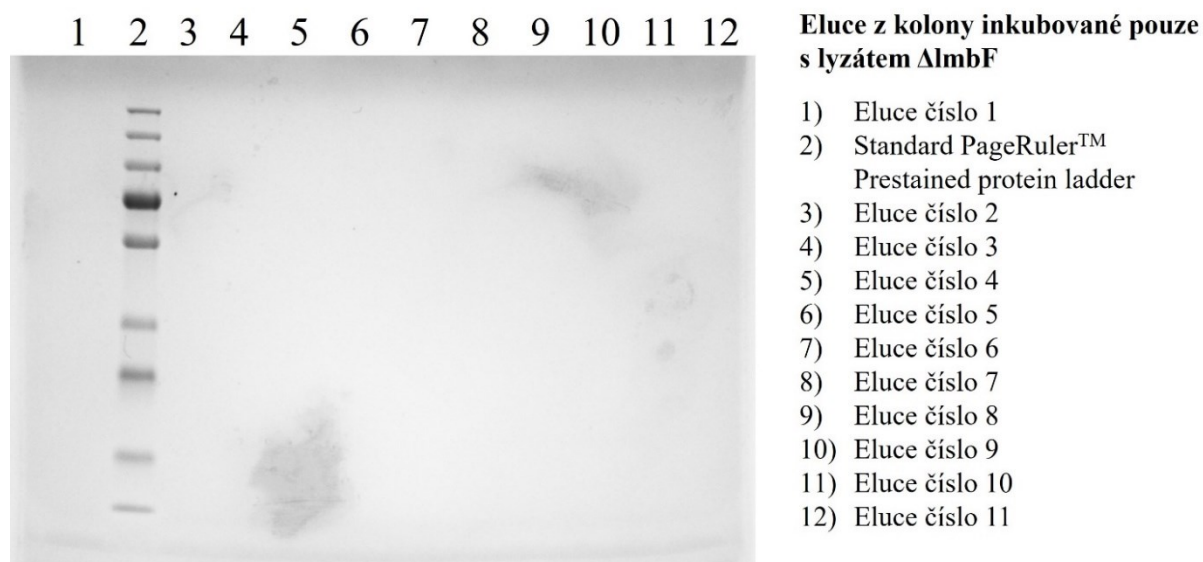
Obrázek 38 SDS elektroforéza pulldown metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF 1, nanášeno 10  $\mu$ l vzorku



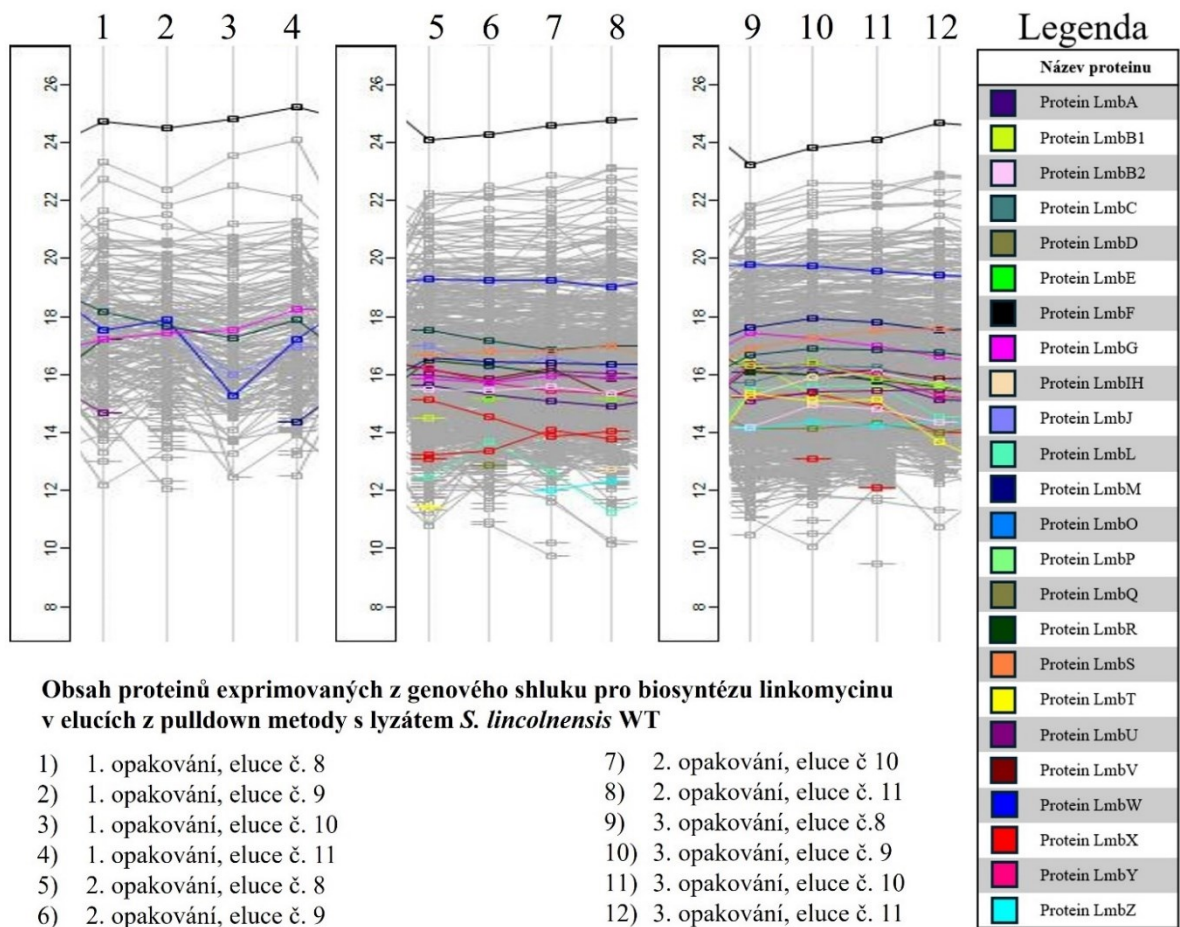
Obrázek 39 SDS elektroforéza pulldown metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF 2, nanášeno 10  $\mu$ l vzorku



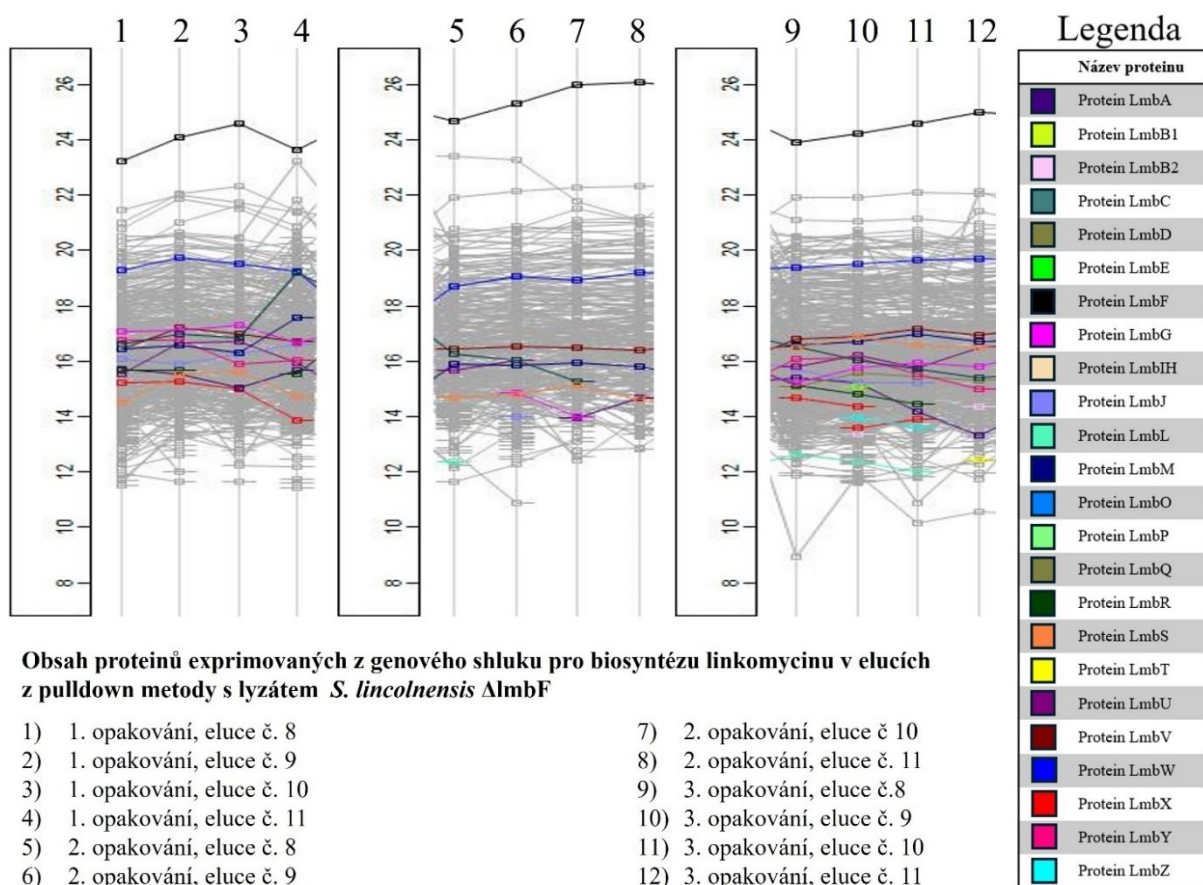
Obrázek 40 SDS elektroforéza pull-down metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF 3 nanášeno 10  $\mu$ l vzorku



Obrázek 41 Reprezentativní výsledek SDS elektroforézy negativní kontroly pro pull-down metodu ze tří opakování

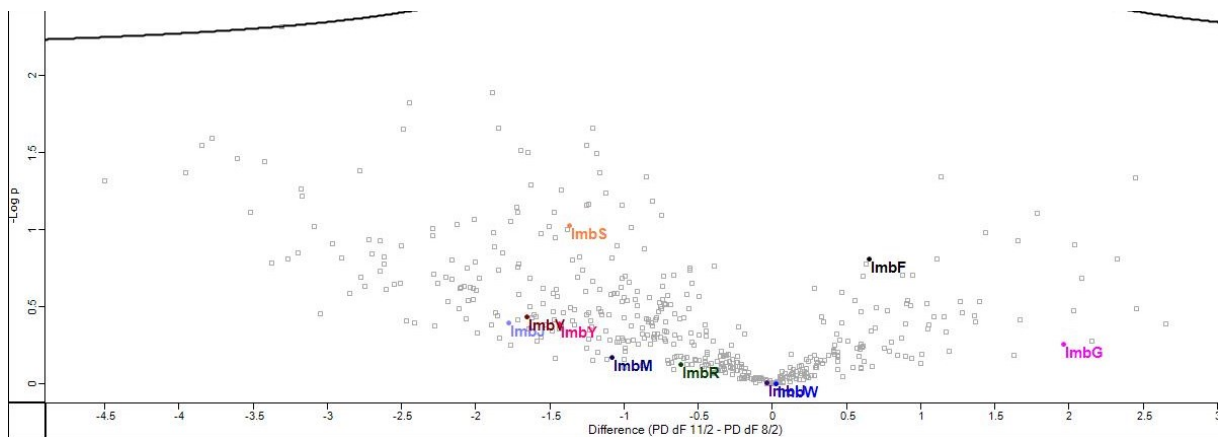


Obrázek 42 Obsah proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu v elucích z pulldown metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis* WT, osa y je LFQ intenzita, koncentrace imidazolu v elučním pufru pro jednotlivé frakce byla: 225 mM ve frakcích 8, 250 mM ve frakcích 9, 10 a 11



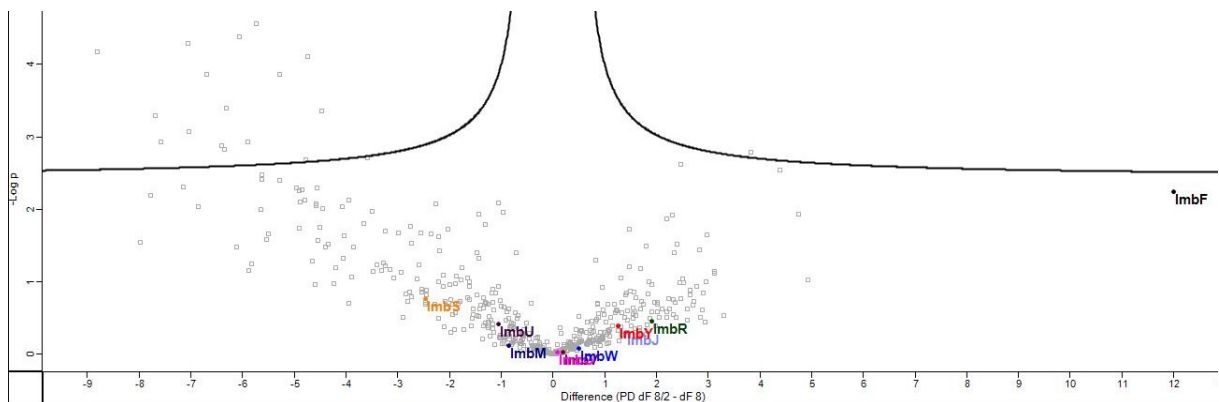
Obrázek 43 Obsah proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu v elucích z pull-down metody s lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF, osa y je LFQ intenzita, koncentrace imidazolu v elučním pufru pro jednotlivé frakce byla: 225 mM ve frakcích 8, 250 mM ve frakcích 9, 10 a 11

Vizualizace úrovně intenzit jednotlivých proteinů pomocí profilových grafů na obrázcích 42 a 43 ukazuje, že mezi zobrazenými frakcemi se obsah proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu výrazně nemění, žádný z proteinů shluku není v poslední frakci obsažen ve výrazně vyšším množství než ve frakci 8. Dále lze vyvodit, že mezi jednotlivými opakováními jsou menší rozdíly při použití lyzátu ze *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF než při použití lyzátu ze *Streptomyces lincolnensis* WT.



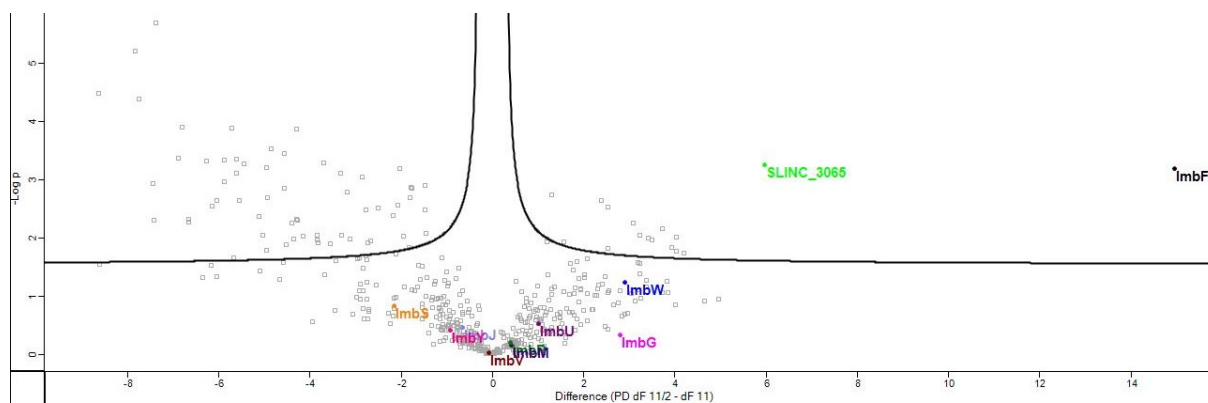
Obrázek 44 Volcano plot reprezentující rozdíl v obsahu proteinů v elucích v metodě pulldown prováděné s proteinem LmbF a lyzátem *S. lincolnensis*  $\Delta$ lmbF, konkrétně rozdíl mezi elucemi číslo 8 a elucemi číslo 11, na levé straně grafu se nachází proteiny, které byly více vymývány v eluci 8, na pravé straně grafu se nachází proteiny, jež byly více vymývány v eluci 11, jedná se o statistickou analýzu provedenou z výsledků technického triplikátu, vytvořeno v programu Perseus

Na grafu na obrázku 44 je možno identifikovat proteiny, které byly více vymývány v eluci číslo 11 (na pravé straně) (eluční pufr o koncentraci imidazolu 250 mM) než v eluci číslo 8 (na levé straně) (eluční pufr o koncentraci imidazolu 225 mM). Všechny tyto proteiny se nachází pod hranicí významnosti (FDR = 0,05). Stejně jako z profilového grafu na obrázku 43 je možno vyvodit, že žádný z proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu není ve frakci 11 obsažen ve výrazně vyšším množství než ve frakci 8. Z grafu je ale i tak vidět, že s vyšším vymýváním proteinu LmbF dochází také k vyššímu vymývání proteinu LmbG.



Obrázek 45 Volcano plot reprezentující rozdíl v obsahu proteinů mezi elucemi číslo 8 v metodě pulldown prováděné s LmbF a lyzátem *S. lincolnensis*  $\Delta$ lmbF a negativní kontrolou, na levé straně se nacházejí proteiny, které byly více vymývány v negativní kontrole (tedy proteiny nespecificky navázané na kolonu), na pravé straně se nachází proteiny, které byly detekovány ve větším množství v elucích z kolony obsahující protein LmbF a bakteriální lyzát, jedná se o statistickou analýzu provedenou na základě výsledků měření technického triplikátu, vytvořeno v programu Perseus

Na Volcano plotu na obrázku 45 lze vidět, že všechny proteiny exprimované z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu se nachází pod hranicí významnosti (FDR = 0,05).



Obrázek 46 Volcano plot reprezentující rozdíl v obsahu proteinů mezi elucemi číslo 11 v metodě pulldown prováděné s LmbF a lyzátem *S. lincolnensis*  $\Delta$ lmbF a negativní kontrolou, na levé straně se nacházejí proteiny, které byly více vymývány v negativní kontrole (tedy proteiny nespecificky navázané na kolonu), na pravé straně se nachází proteiny, které byly detekovány ve větším množství v elucích z kolony obsahující protein LmbF a bakteriální lyzát, jedná se o statistickou analýzu provedenou na základě výsledků měření technického triplikátu, vytvořeno v programu Perseus

Z grafu na obrázku 46 lze vyčíst, že proteiny LmbS, LmbJ, LmbY a LmbV byly detekovány ve vyšším množství v elucích číslo 11 (eluční pufr o koncentraci imidazolu 250 mM) v negativní kontrole, tudíž se na kolonu vážou nespecificky. Proteiny LmbR a LmbM byly detekovány v podobném množství v elucích negativní kontroly jako v elucích metody pulldown prováděných s proteinem LmbF a lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF. Proteiny LmbU, LmbW a LmbG byly detekovány ve vyšším množství v elucích prováděných z pulldown metody s proteinem LmbF a s lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF než v elucích negativní kontroly. Všechny tyto proteiny exprimované z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu se nachází pod hranicí významnosti (FDR = 0,05). Nad hranicí významnosti se z proteinů exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu nachází pouze protein LmbF. Z proteinů, které nejsou exprimované z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, a které se nachází nad hranicí významnosti, by s biosyntézou, nebo s případnou degradací intermediátů linkomycinu, mohl souviset protein SLINC\_3065, aminopeptidáza, jejíž jednou z uváděných funkcí je odštěpování prolinové aminokyseliny (viz tabulka 18).



Proteiny nacházející se nad hladinou významnosti		
Název genu	Název proteinu	Katalytická aktivita vyplněná dle databáze Uniprot
<i>lmbF</i>	LmbF protein	
<i>SLINC_0619</i>	Předpokládaný ABC transportérový protein vázající substrát	
<i>SLINC_1463</i>	Necharakterizovaný protein	
<i>SLINC_1716</i>	Threonin-tRNA ligáza (EC 6.1.1.3) (Threonyl-tRNA syntetáza) (ThrRS)	Katalyzuje reakci: ATP + L-threonin + tRNA(Thr) = AMP + difosfát + H <sup>+</sup> + L-threonyl-tRNA(Thr).
<i>SLINC_2033</i>	Alanindehydrogenáza (EC 1.4.1.1)	Katalyzuje reverzibilní reduktivní aminaci pyruvátu na L-alanin
<i>SLINC_2513</i>	Pravděpodobná cytosol aminopeptidáza (EC 3.4.11.1) (Leucin aminopeptidáza) (LAP) (EC 3.4.11.10) (Leucyl aminopeptidáza)	Odštěpuje N-koncovou aminokyselinu, Xaa- -Yaa-, ve které Xaa je převážně leucin.
<i>SLINC_3065</i>	Aminopeptidáza N (EC 3.4.11.2) (alanin aminopeptidáza) (lysyl aminopeptidáza)	Odštěpuje N-koncovou aminokyselinu, Xaa- -Yaa- z peptidu, amidu nebo arylamidu. Xaa je alanin, ale může jím být většina aminokyselin včetně prolinu. Pokud za koncovým hydrofobním zbytkem následuje propylový zbytek, pak může být odštěpen intaktní dipeptid Xaa-Pro.
<i>SLINC_4279</i>	Podjednotka A DNA gyrázy (EC 5.6.2.2)	Topoizomeráza typu II, která zavádí negativní nadšroubovicové vinutí uzavřené kruhové dvouvláknové DNA způsobem závislým na ATP, aby modulovala topologii DNA a udržovala chromozomy v podvinutém stavu.
<i>SLINC_5096</i>	Protein související s N5,N10-methylentetrahydromethanopterin reduktázou	
<i>SLINC_5136</i>	Inozitol-5-monofosfátdehydrogenáza	
<i>SLINC_5493</i>	Extracelulární protein	
<i>SLINC_6185</i>	Glutamát vázající periplazmatický protein	
<i>SLINC_6446</i>	Dekarboxyláza (EC 1.3.98.5) (oxidativní dekarboxyláza Coprohem III) (hemsyntáza závislá na peroxidu vodíku)	Podílí se na biosyntéze hemu b závislé na koproporfyriu. Katalyzuje dekarboxylaci Fe-koproporfyriu III (koprohem) na hem b (protohem IX), poslední krok dráhy.
<i>SLINC_6745</i>	Urikáza (EC 1.7.3.3) (urát oxidáza)	Katalyzuje oxidaci kyseliny močové na 5-hydroxyisourát, který se dále zpracovává na (S)-alantoin.
<i>SLINC_6819</i>	Fenylhydantoináza	
<i>SLINC_4620</i>	Adenylosukcinátsyntetáza (AMPSáza) (AdSS) (EC 6.3.4.4) (IMP--aspartát ligáza)	Hraje důležitou roli v <i>de novo</i> dráze biosyntézy purinových nukleotidů.

Tabulka 18 Proteiny nacházející se nad hladinou významnosti ve Volcano plotu v obrázku 46, data převzata z databáze Uniprot

## 5.3 *In vitro* reakce katalyzované proteiny LmbF, CcbF a LmbG

Pro další otestování hypotézy o možných proteinových interakcích byly využity *in vitro* reakce. Naše hypotéza se zakládala na předpokladu, že mezi proteinem LmbF a LmbG by mohlo docházet k substrate channelingu (viz kapitola 3.5). Odebírání produktu proteinu LmbF proteinem LmbG, který tento produkt využívá jako substrát, by mohlo urychlovat reakci katalyzovanou proteinem LmbF. Protein LmbG by teoreticky mohl stejným způsobem interagovat také s proteinem CcbF a tím reakci směřovat k výslednému produktu linkomycinu. Tento mechanismus by vysvětloval syntézu linkomycinu u mutantních kmenů *Streptomyces lincolnensis* s deletovaným genem *lmbF* a vloženým genem *ccbF* (viz kapitola 3.4).

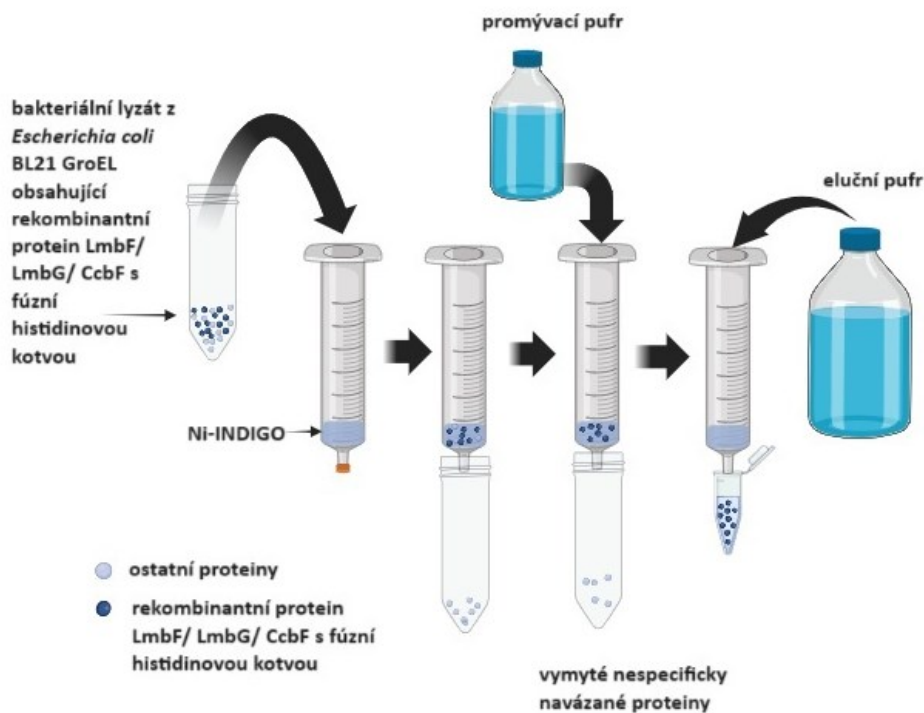
### 5.3.1 Heterologní exprese proteinů LmbF, CcbF a LmbG

Plazmidy pET-48 s kanamycinovou rezistencí obsahující gen pro protein LmbF s vloženou sekvencí pro histidinovou kotvu obsahující 6 aminokyselin histidinů na C-konci proteinu, pET-48 s kanamycinovou rezistencí nesoucí gen pro protein LmbG prodloužený o sekvenci pro histidinovou kotvu o 6 histidinech na C-konci proteinu a pET-42 také nesoucí kanamycinovou rezistenci a nesoucí gen *ccbF* na 3'konci prodloužený o sekvenci kódující histidinovou kotvu složenou ze 6 histidinů byly jednotlivě transformovány pomocí tepelného šoku do kompetentních buněk *Escherichia coli* BL21 GroEL s rezistencí k chloramfenikolu (viz kapitola 4.2.2.1.1.). Tyto plazmidy byly dříve připraveny naší laboratoří. Transformované buňky byly vysety na LB agary se selekčními antibiotiky a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Vybrané kolonie byly následně kultivovány a kultivace centrifugovány podle protokolu v kapitole 4.2.2.3. Pelety byly uchovávány při teplotě -80 °C.

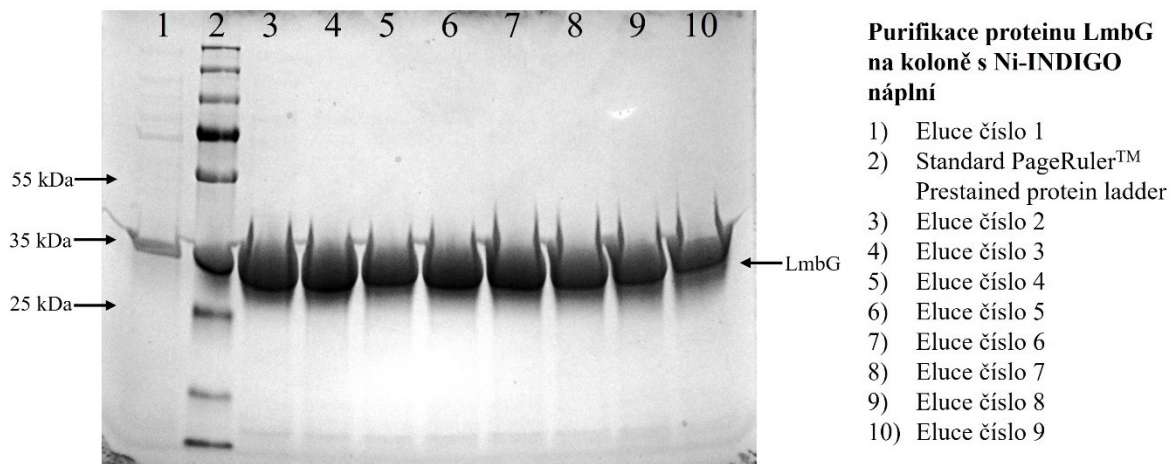
Z těchto pelet byly připraveny bakteriální lyzáty. Nejprve byly pelety rozpuštěny v lyzačním pufru pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8), bakteriální buňky byly rozrušeny sonikací a suspenze byly následně centrifugovány po dobu 30 min rychlostí 40000 g (viz kapitola 4.2.2.4). Další práce probíhala pouze se supernatanty těchto bakteriálních lyzátů.

K purifikaci jednotlivých heterologně exprimovaných rekombinantních proteinů LmbF (o velikosti 47,36 kDa + 0,8 kDa histidinová kotva), CcbF (o velikosti 46,66 kDa + 0,8 kDa histidinová kotva) a LmbG (o velikosti 29,27 kDa + 0,8 kDa histidinová kotva) fúzovaných s histidinovou kotvou ze supernatantů bakteriálních lyzátů byla využita afinitní chromatografie pomocí kolony s komerčně dodávanou Ni-INDIGO náplní (viz kapitola 4.2.3.1 a 4.2.3.3) (viz obrázek 47). Jednotlivé kolony obsahující 2 ml Ni-INDIGO náplně byly nejprve ekvilibrovány pomocí 20 ml ekvalibračního pufru pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8)

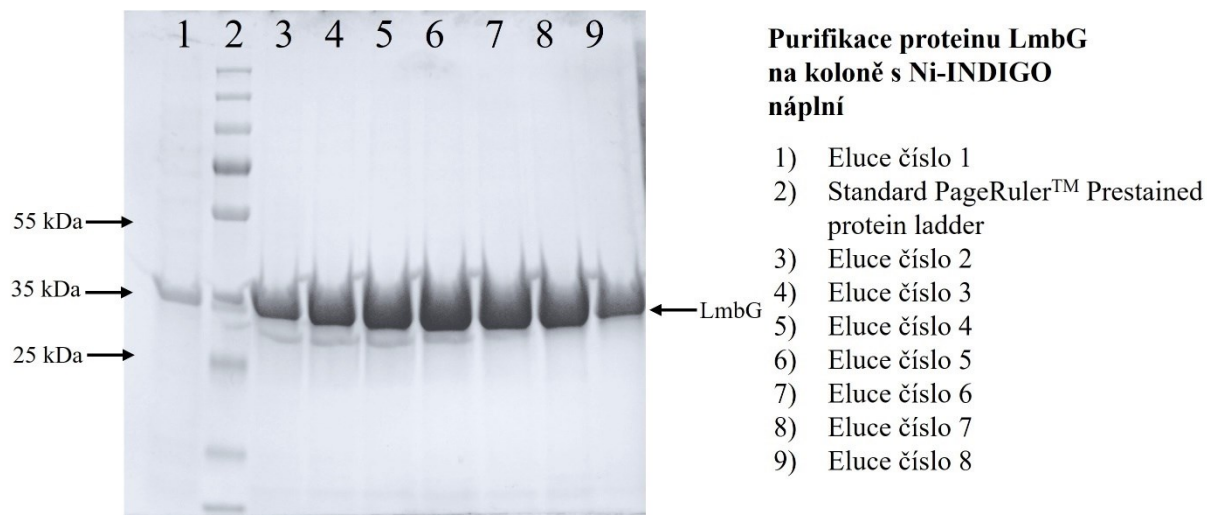
a následně byly na jednotlivé kolony naneseny supernatanty z bakteriálních lyzátů obsahující rekombinantní proteiny. Po prokapání kolonou byly supernatanty naneseny ještě 2×. Poté byly kolony promyty promývacím pufr pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) a rekombinantní proteiny s histidinovou fúzní kotvou na C-konci byly z kolon eluovány elučním roztokem pro purifikaci proteinů. Eluční roztok pro purifikaci proteinů (viz kapitola 4.1.8) byl na kolony nanášen v objemu 1 ml a to celkem 10×. Jednotlivé frakce byly sbírány a následně vizualizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (viz kapitola 4.2.3.4) (viz obrázky 48 – 53). Byly identifikovány frakce obsahující purifikované proteiny. Všechny frakce obsahující daný protein byly následně smíchány a zakoncentrovány na poloviční objem pomocí Amicon® Ultra centrifugačního filtru (cut-off 30 kDa a 10 kDa) (viz kapitola 4.2.3.5) (viz obrázky 54 a 55). Protein LmbF byl uchováván při teplotě 10 °C a proteiny CcbF a LmbG byly uchovávány při teplotě 4 °C po dobu 3 dní než s nimi bylo pracováno dále.



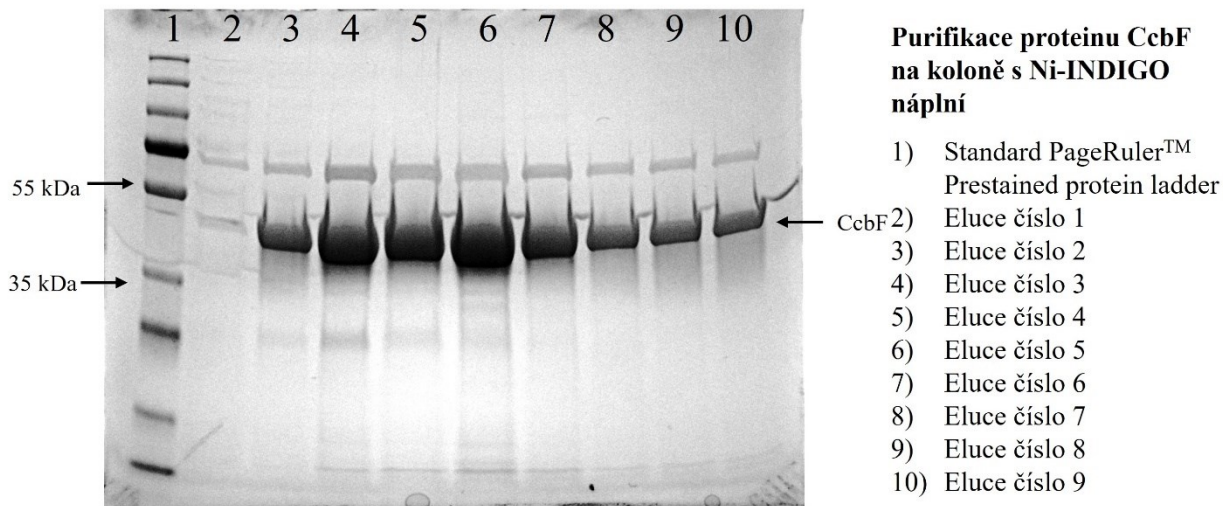
Obrázek 47 Purifikace proteinů LmbF, LmbG a CcbF, vypracováno v Biorenderu



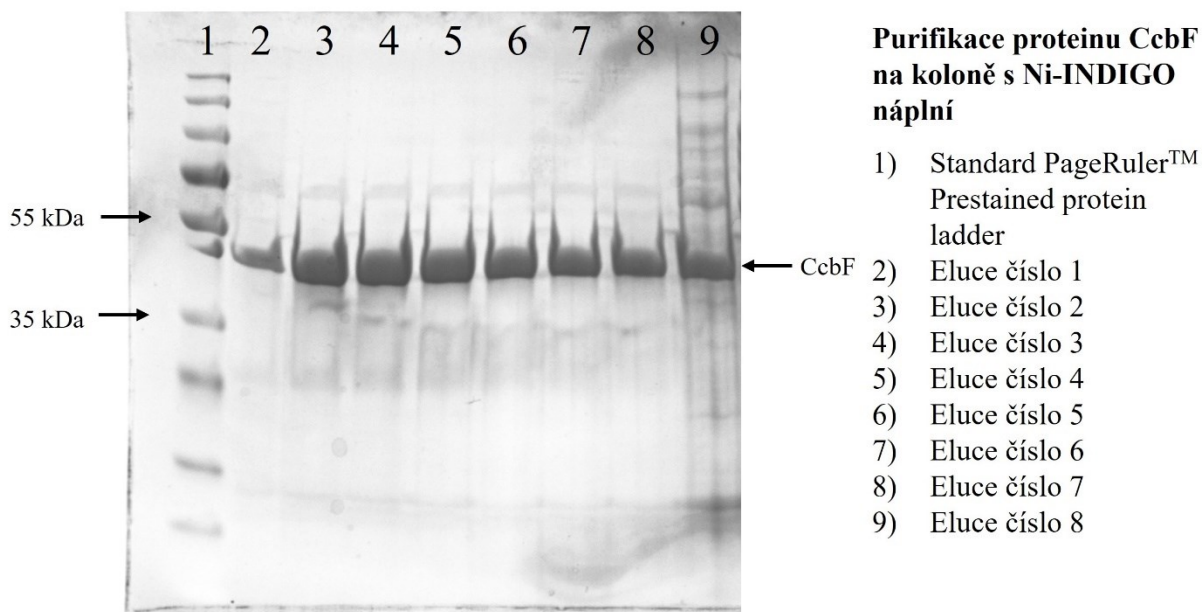
Obrázek 48 SDS elektroforéza LmbG purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely *in vitro* reakcí 1, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



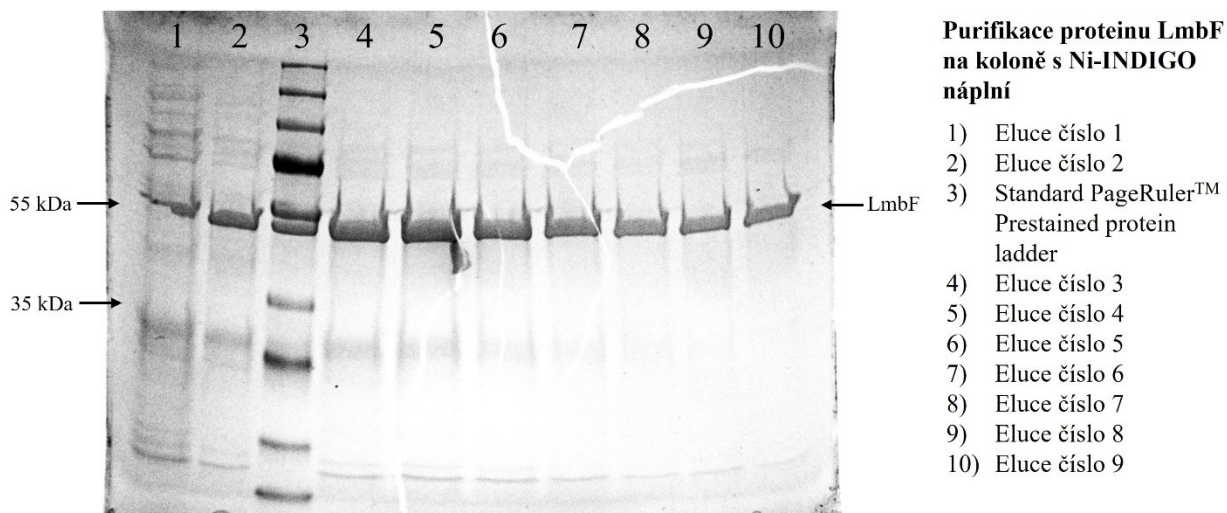
Obrázek 49 SDS elektroforéza LmbG purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely *in vitro* reakcí 2, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



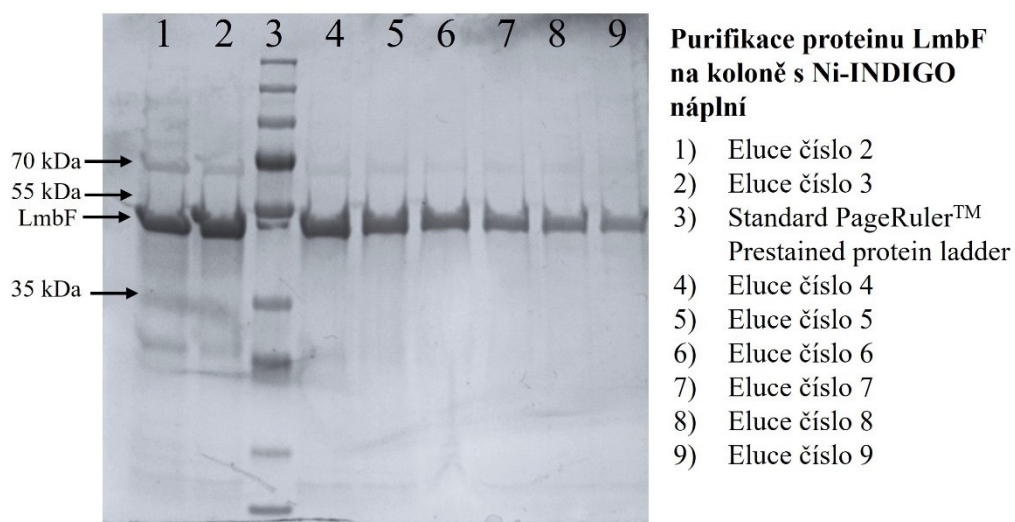
Obrázek 50 SDS elektroforéza CcbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro *in vitro* reakce 1, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



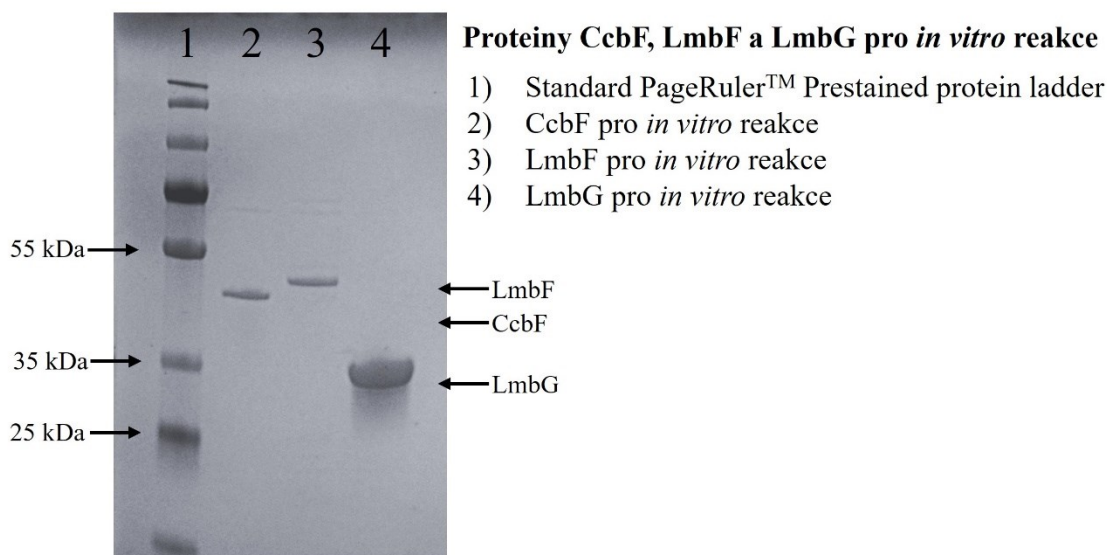
Obrázek 51 SDS elektroforéza CcbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro *in vitro* reakce 1, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



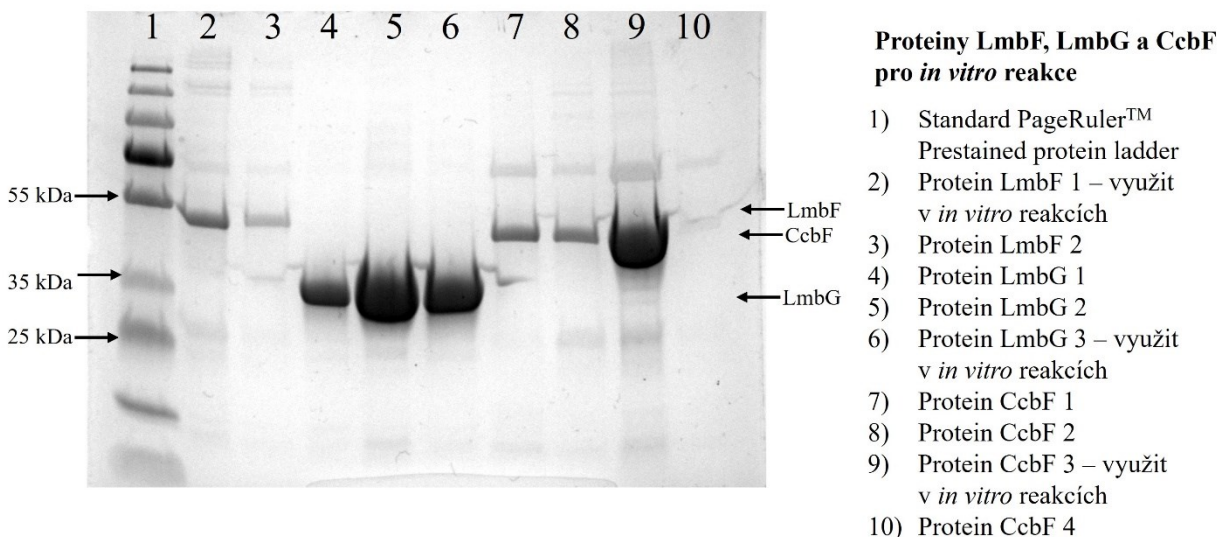
Obrázek 52 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely *in vitro* reakcí 2, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



Obrázek 53 SDS elektroforéza LmbF purifikovaného na koloně s Ni-INDIGO náplní pro účely *in vitro* reakcí 2, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu



Obrázek 54 SDS elektroforéza zakoncentrovaných proteinů CcbF, LmbF, LmbG určených na *in vitro* reakce, zde výjimečně nanášeny pouze 2  $\mu$ l proteinu



Obrázek 55 SDS elektroforéza zakoncentrovaných proteinů LmbF, LmbG, CcbF určených pro *in vitro* reakce, nanášeno 5  $\mu$ l proteinu

### 5.3.2 *In vitro* reakce

*In vitro* reakce byly prováděny v pěti různých kombinacích. Základní složení všech reakčních směsí bylo stejné a skládalo se z pyridoxal-5-fosfátu, Tris-HCl o pH 8, substrátu pro LmbF C-2 (přípraven dle 4.2.7) rozpuštěného v 50 % methanolu a z pufru složeného z Tris-HCl o pH 8 a NaCl (viz protokol v kapitole 4.2.3.8).

Složení jednotlivých reakčních směsí se lišilo v obsahu jednotlivých proteinů. První reakční směs obsahovala pouze protein CcbF. U této směsi nás zajímalo, zda samotný protein CcbF dokáže zpracovávat pro něj nepřírozený substrát C-2, jež oproti pro CcbF přirozenému substrátu obsahuje propylový zbytek na prolinu. Kombinace druhá obsahovala protein CcbF

a protein LmbG ke zjištění, zda přidání proteinu LmbG umožní proteinu CcbF zpracovávat substrát C-2, případně zda bude vznikat linkomycin. Třetí reakční směs obsahovala protein LmbF sloužící jako pozitivní kontrola pro zpracovávání substrátu C-2 a čtvrtá reakční směs obsahovala protein LmbF v kombinaci s proteinem LmbG sloužící jako pozitivní kontrola pro syntézu linkomycinu. Do poslední reakční směsi nebyl přidán žádný protein a tato reakční směs sloužila jako negativní kontrola. Každá reakční směs byla připravena ve výsledném objemu 50  $\mu$ l.



### 5.3.2.1 *In vitro* reakce zastavené po 2 hodinách

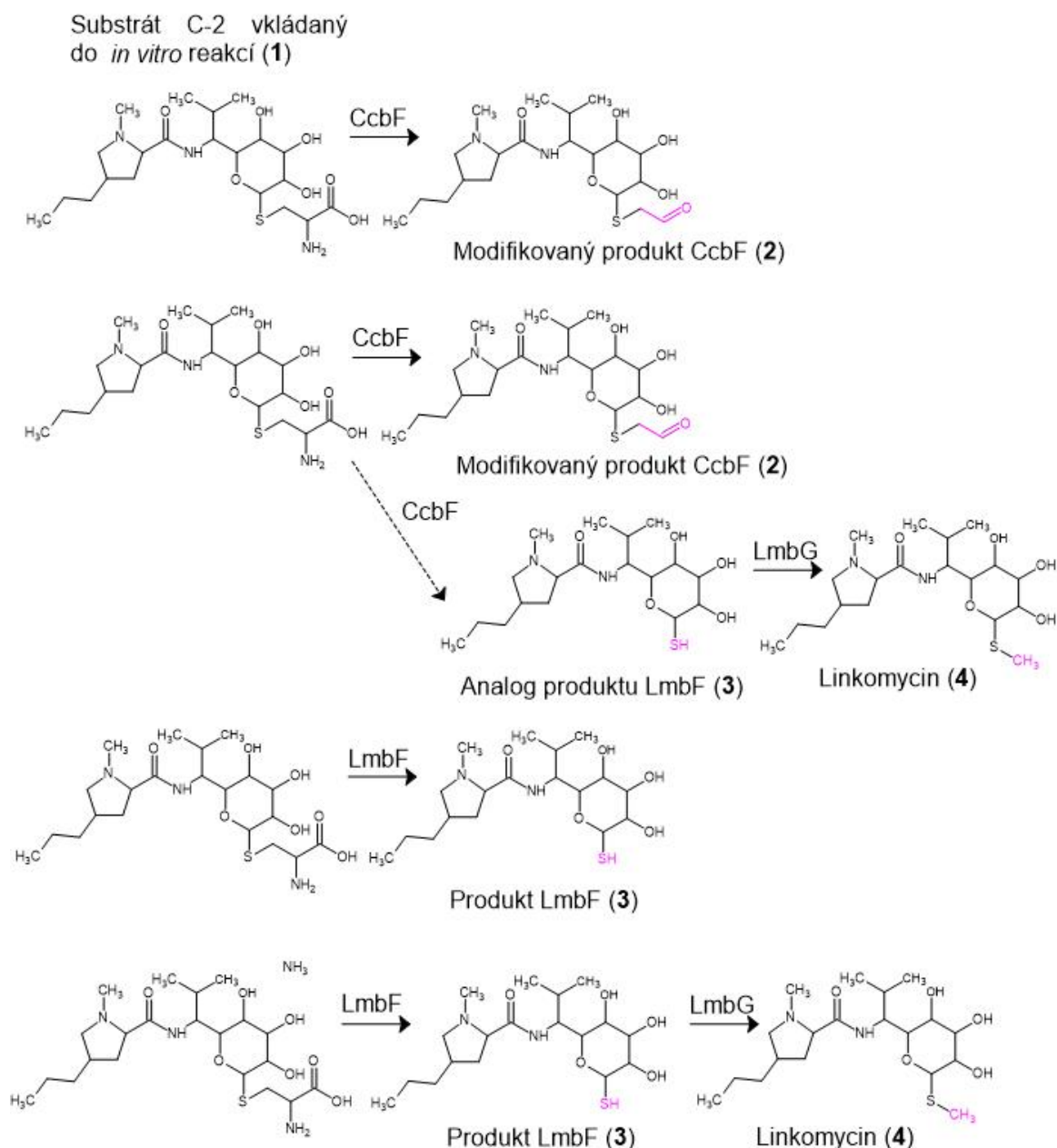
Složení <i>in vitro</i> reakcí zastavených po 2 hod ( <i>in vitro</i> reakce typ 1)							
Složka	Vstupní koncentrace	Finální koncentrace	Objem v reakční směsi 1	Objem v reakční směsi 2	Objem v reakční směsi 3	Objem v reakční směsi 4	Objem v reakční směsi 0
Pyridoxalfosfát rozpuštěn v Tris- HCl 100mM	0,5 mM	50 µM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Tris-HCl pH 8	2 M	0,1 M	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
LmbF v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	-	-	5 µl	5 µl	-
LmbG v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	-	5 µl	-	5 µl	-
CcbF v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	5 µl	5 µl	-	-	-
Substrát C-2 rozpuštěný v 50 % methanolu	9,49 mM	190 µM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Reakční pufr pro <i>in vitro</i> reakce (viz kapitola 4.1.8)			36,5 µl	31,5 µl	36,5 µl	31,5 µl	41,5 µl

Tabulka 19 Složení *in vitro* reakcí zastavených po 2 hod

Tyto reakční směsi byly namíchaný podle tabulky 19 a to sice tak, že nejprve byl namíchan premix společný pro všechny reakční směsi obsahující pyridoxal-5-fosfát, Tris-HCl, substrát C-2 a reakční pufr pro *in vitro* reakce (viz kapitola 4.1.8). Tento premix byl následně rozdělen do jednotlivých reakčních směsí a do těchto jednotlivých reakčních směsí byly přidány odpovídající proteiny a doplněn odpovídající chybějící objem reakčního pufru pro *in vitro* reakce. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány po dobu 2 hod při teplotě 30 °C. Poté byly reakce zastaveny precipitací proteinů, čehož bylo dosaženo přidáním 2 µl kyseliny mravenčí a 100 µl ledově studeného acetonitrilu ke každé reakční směsi. Následně byly tyto reakční směsi centrifugovány při 4000 g po dobu 10 min. Supernatant byl měřen na kapalinové

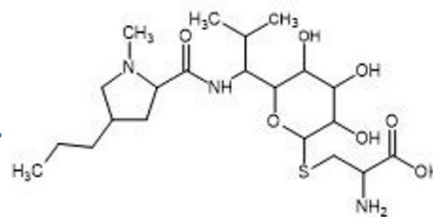
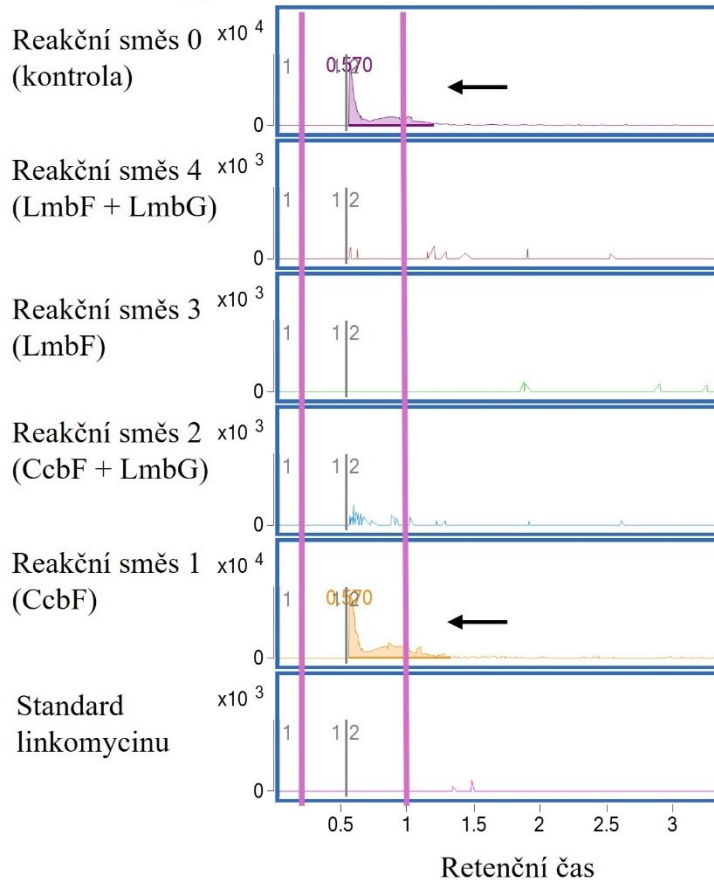
chromatografii s hmotnostní detekcí (viz 4.2.5) (viz obrázky 57 – 61), toto měření prováděl Aninda Mazumdar, PhD. z Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky.

Byl měřen obsah substrátu pro LmbF C-2 (obrázek 56, sloučenina **1**), obsah produktu LmbF (**3**), obsah produktu CcbF, obsah linkomycinu (**4**) a obsah substrátu pro CcbF.



Obrázek 56 Předpokládaný průběh *in vitro* reakcí, vytvořeno v programu Chemskech

Substrát C-2 (**1**) o molekulové hmotnosti 479,2



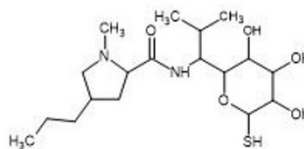
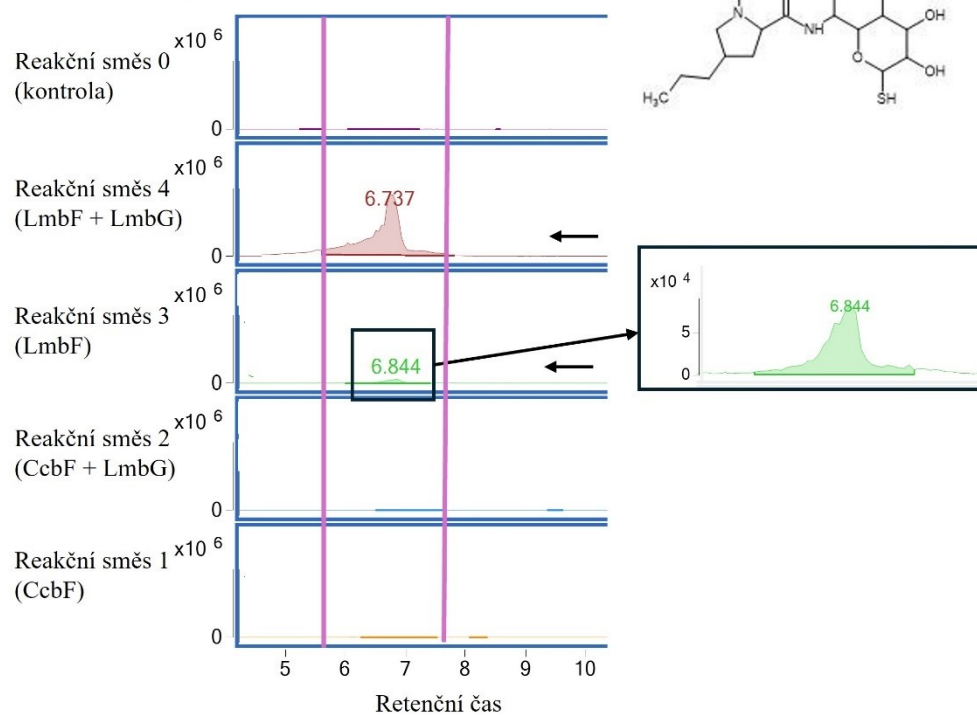
Obrázek 57 Měření obsahu substrátu C-2 (**1** v obr. 56) v reakčních směsích *in vitro* reakcí zastavených po 2 hodinách, na ose x se nachází retenční čas, na ose y intenzita

Substrát C-2 (**1**) byl detekován v reakční směsi 0, jež představovala negativní kontrolu. V této reakční směsi byl C-2 očekáván, jelikož nemohl být zpracováván žádnými proteiny. Tato reakční směs sloužila také jako referenční hodnota vstupní koncentrace substrátu C-2.

Substrát C-2 (**1**) byl detekován také v reakční směsi 1 obsahující protein CcbF. V této reakční směsi tedy nebyl substrát využíván a přeměňován na jinou sloučeninu.

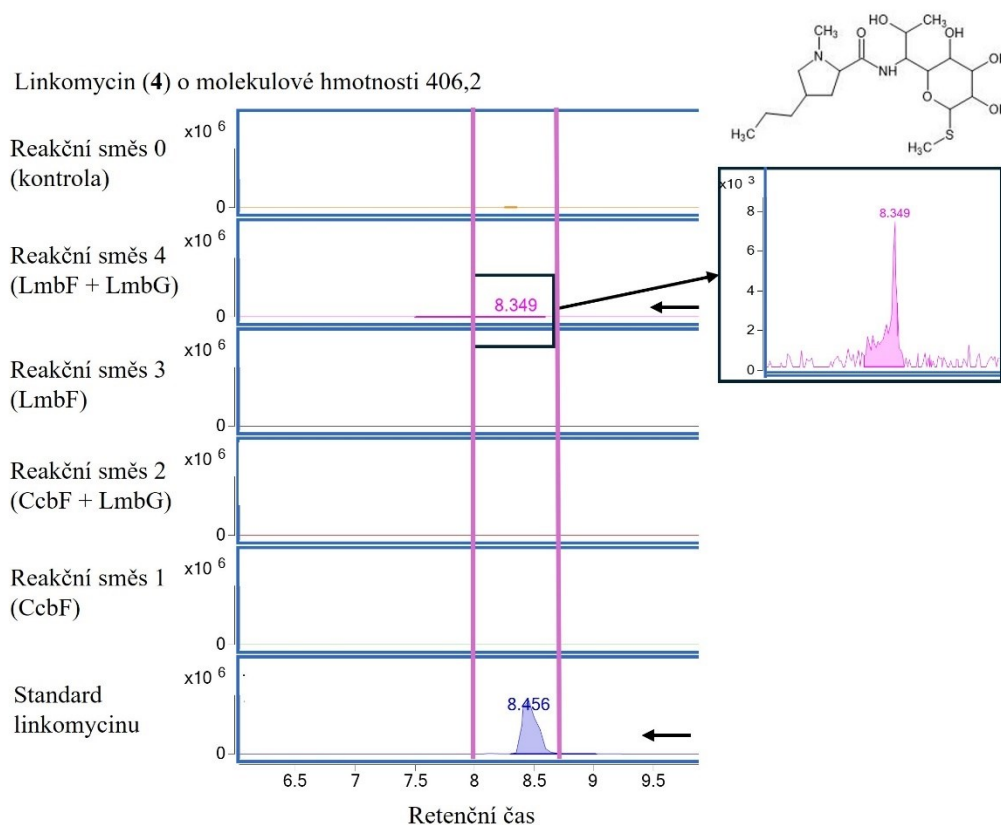
V reakčních směsích 4 (kombinace proteinů LmbF a LmbG), 3 (obsahující protein LmbF) a 2 (obsahující kombinaci proteinů CcbF a LmbG) nebyl substrát C-2 (**1**) detekován, z čehož vyplývá, že byl v těchto reakcích zpracováván pomocí enzymů LmbF a CcbF.

Produkt LmbF (**3**) o molekulové hmotnosti 392,2



Obrázek 58 Měření obsahu produktu LmbF (**3** v obr. 56) v reakčních směsích *in vitro* reakcí zastavených po 2 hodinách, na ose x je retenční čas, na ose y se nachází intenzita

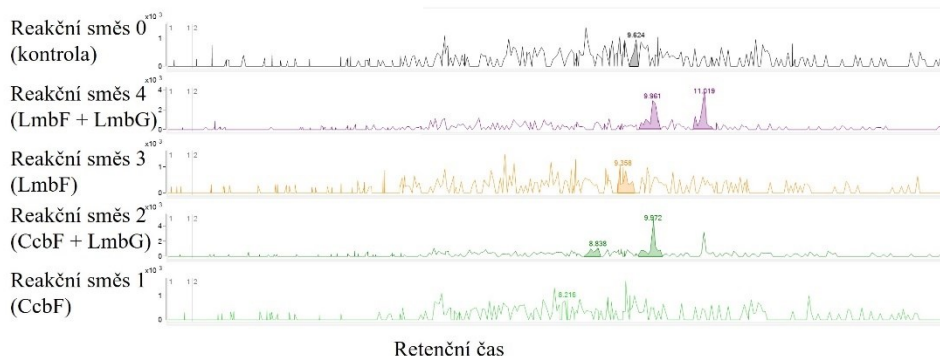
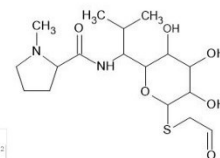
Produkt enzymu LmbF (**3**) byl detekován v reakčních směsích 4 (obsahující kombinaci proteinů LmbF a LmbG) a 3 (obsahující protein LmbF), což je v souladu s naším očekáváním.



Obrázek 59 Měření obsahu linkomycinu (**4** v obr. 56) v reakčních směsích *in vitro* reakcí zastavených po 2 hodinách, na ose *x* je retenční čas, na ose *y* je intenzita

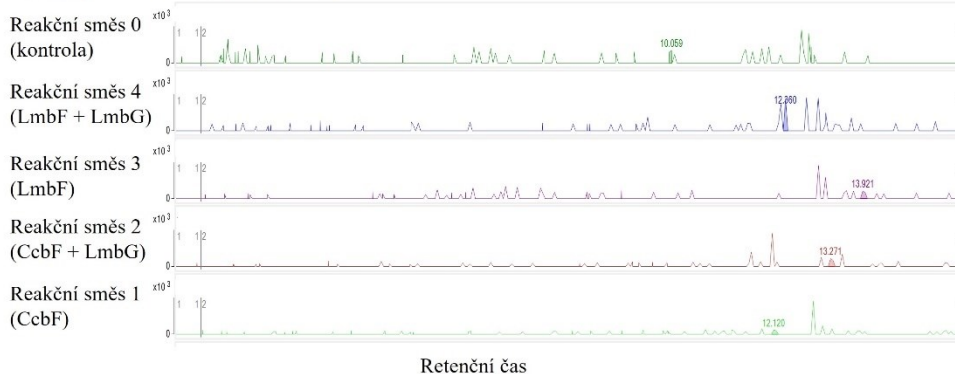
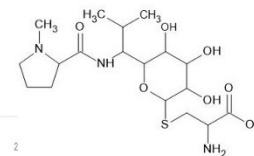
Linkomycin (**4**) byl detekován pouze v reakční směsi obsahující proteiny LmbF a LmbG. V této směsi byl linkomycin očekáván a tato směs sloužila také jako pozitivní kontrola. Předpoklad byl, že linkomycin bude detekován taktéž v reakční směsi obsahující kombinaci proteinů CcbF a LmbG. Tento předpoklad se nevyplnil. Naše hypotéza je, že tato kombinace proteinů může potřebovat delší čas inkubace k syntéze linkomycinu (bude testováno dále).

Produkt CcbF o molekulové hmotnosti 392,1



Obrázek 60 Měření obsahu produktu CcbF v reakčních směsích in vitro reakcí zastavených po 2 hodinách, na ose x je retenční čas, na ose y je intenzita

Substrát pro CcbF o molekulové hmotnosti 437,1



Obrázek 61 Měření obsahu substrátu pro CcbF v reakčních směsích in vitro reakcí zastavených po 2 hodinách, na ose x se nachází retenční čas, na ose y intenzita

Produkt enzymu CcbF (obrázek 60) a substrát pro CcbF (obrázek 61) nebyly detekovány v žádné reakční směsi. Toto měření bylo prováděno pouze jako kontrola, že nedošlo ke kontaminaci substrátu C-2.

### 5.3.2.2 Časový průběh *in vitro* reakcí

Složení <i>in vitro</i> reakcí – časový průběh ( <i>in vitro</i> reakce typ 2)							
Složka	Vstupní koncentrace	Finální koncentrace	Objem v reakční směsi 1	Objem v reakční směsi 2	Objem v reakční směsi 3	Objem v reakční směsi 4	Objem v reakční směsi 0
Pyridoxalfosfát rozpuštěn v Tris- HCl 100mM	0,5 mM	50 µM	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Tris-HCl pH 8	2 M	0,1 M	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
LmbF v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	-	-	5 µl	5 µl	-
LmbG v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	-	5 µl	-	5 µl	-
CcbF v reakčním pufru pro <i>in vitro</i> reakce	500 mg/l	50 mg/l	5 µl	5 µl	-	-	-
Substrát C-2 rozpuštěný v 50 % methanolu	9,49 mM	190 µM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Reakční pufr pro <i>in vitro</i> reakce (viz kapitola 4.1.8)			36,25 µl	30,875 µl	36,25 µl	30,875 µl	41,25 µl
S-adenosylmethionin	40 mM	0,3 mM	-	0,375 µl	-	0,375 µl	-
Ditriotreitol	100 mM	0,5 mM	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl

Tabulka 20 Složení *in vitro* reakcí – časový průběh

Dále byla provedena 2 opakování (u reakčních směsí 0, 3 a 4) a 3 opakování (u reakčních směsí 1 a 2) *in vitro* reakcí se zaměřením na časový průběh těchto reakcí. Jednotlivé reakční směsi byly namíchány podle tabulky 20 a to v pětinasobném objemu (opět byl nejprve připraven premix, jak je již popsáno výše, zde byl součástí premixu také ditriotreitol). 250 µl reakční směs byla následně rozdělena do 4 mikrozkušavek po 50 µl, z nichž každá byla zastavena v jiný čas. Všechny 5 kombinací reakčních směsí bylo inkubováno při 30 °C a to po dobu 10 min, 60 min, 120 min a 24 hod.

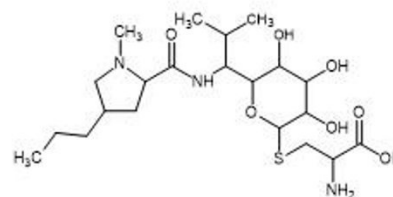
Po ukončení jednotlivých inkubací byly reakce zastaveny přidáním 2 µl kyseliny mravenčí na vysrážení proteinů. Pro ještě důkladnější precipitaci proteinů byly následně přidány

2 objemy (100  $\mu$ l) ledově studeného acetonitrilu ke každé reakci. Poté byly reakce centrifugovány na 4000 g po dobu 10 min a následně byl odebrán supernatant. Tento supernatant byl dáván na měření na kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí (viz kapitola 4.2.6) (viz obrázky 62 – 76). Měření prováděl Aninda Mazumdar, PhD. z Laboratoře antibiotické rezistence a mikrobiální metabolomiky.

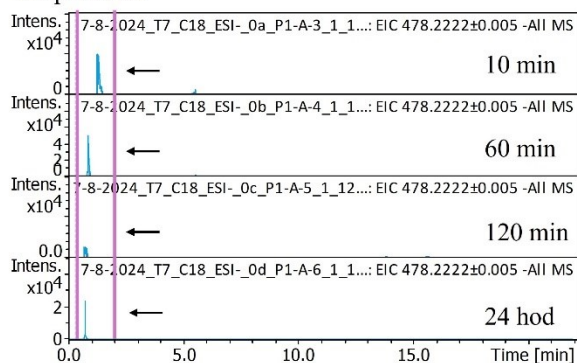


### 5.3.2.2.1. Výsledky měření reakční směsi 0 (negativní kontrola)

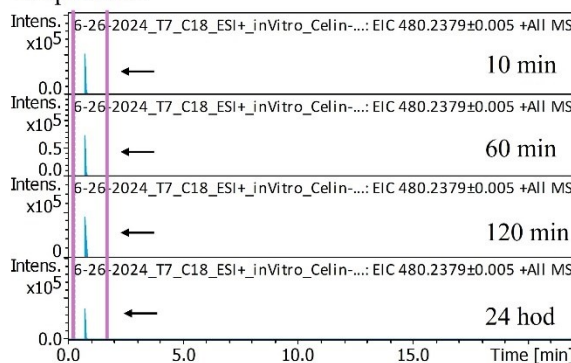
Substrát C-2 (**1**) vkládaný do *in vitro* reakcí, molekulová hmotnost sloučeniny je 479,2



1. opakování

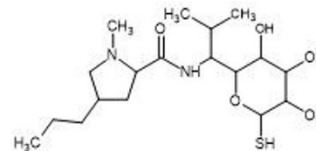


2. opakování

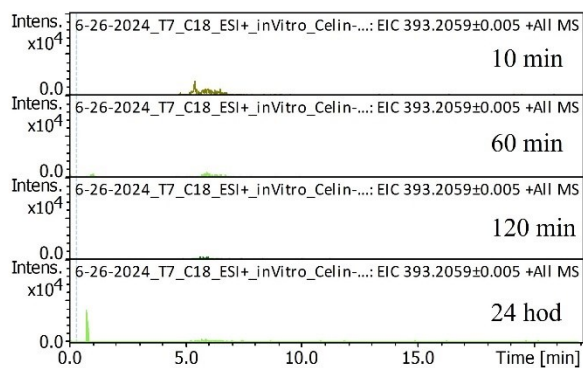


Obrázek 62 Výsledek měření obsahu substrátu C-2 (1 v obr. 56) v reakční směsi 0, na ose x je retenční čas, na ose y je intenzita

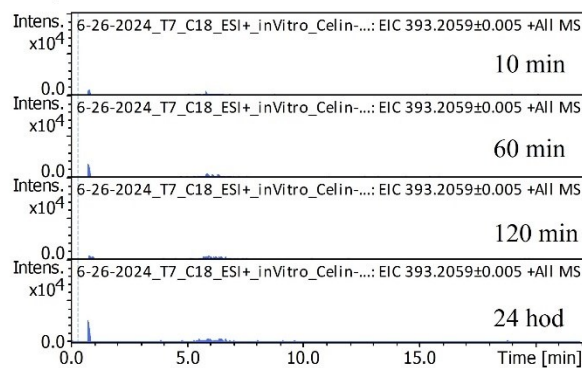
Produkt enzymu LmbF (**3**) o molekulové hmotnosti 392,2



1. opakování

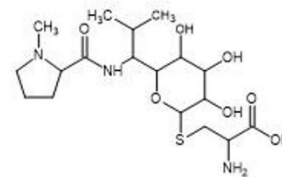


2. opakování

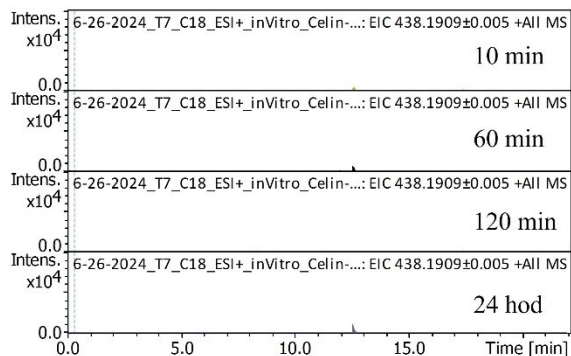


Obrázek 63 Výsledek měření obsahu produktu enzymu LmbF (3 v obr. 56) v reakční směsi 0, na ose x je retenční čas, na ose y je intenzita

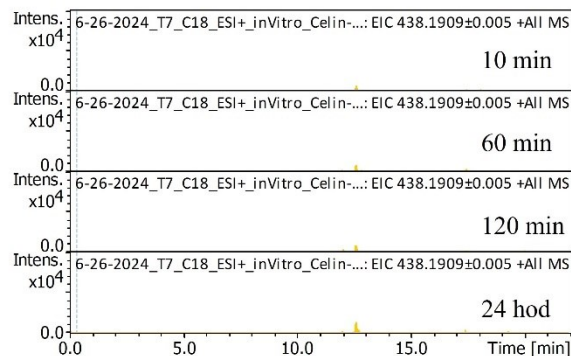
Přirozený substrát pro enzym CcbF o molekulové hmotnosti 437,2



1. opakování

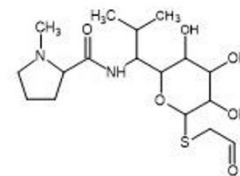


2. opakování

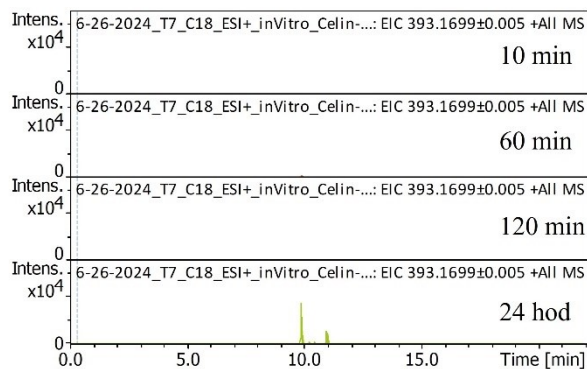


Obrázek 64 Výsledek měření obsahu přirozeného substrátu CcbF v reakční směsi 0, na ose x je retenční čas, na ose y je intenzita

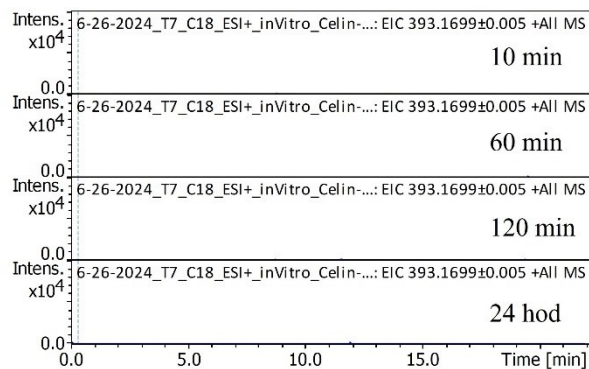
Přirozený produkt enzymu CcbF o molekulové hmotnosti 392,1



1. opakování

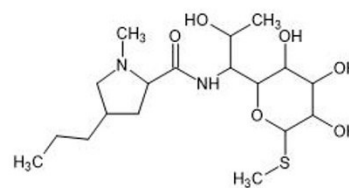


2. opakování

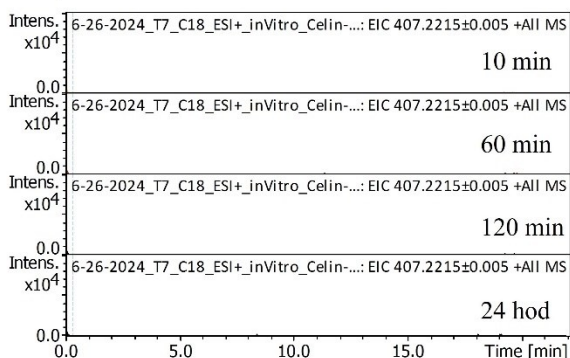


Obrázek 65 Výsledek měření obsahu přirozeného produktu enzymu CcbF v reakční směsi 0, na ose x je retenční čas, na ose y se nachází intenzita

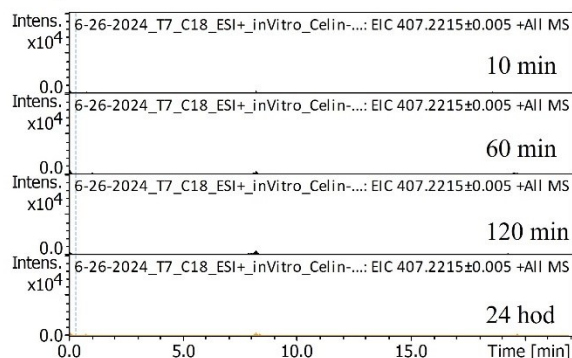
Linkomycin (**4**) o molekulové hmotnosti 406,2



1. opakování



2. opakování

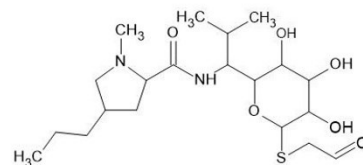


Obrázek 66 Výsledek měření obsahu linkomycinu (**4** v obr. 56) v reakční směsi 0, na ose *x* je retenční čas, na ose *y* je intenzita

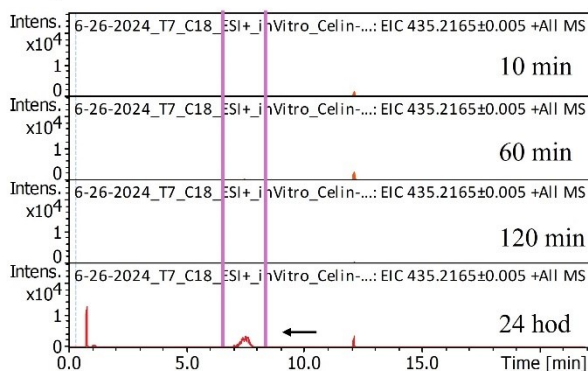
V reakční směsi 0, jež sloužila jako negativní kontrola, byl detekován pouze substrát C-2 (**1**), který byl do reakční směsi vkládán. Nižší naměřená koncentrace substrátu C-2 (**1**) v 1. opakování v reakci inkubované po dobu 120 min je pravděpodobně způsobená chybou měření. Produkty enzymů LmbF (**3**) a CcbF (**2**, **3**), přirozený substrát pro enzym CcbF a linkomycin (**4**) v reakční směsi detekovány nebyly. Tyto výsledky jsou v souladu s naším očekáváním. Přirozený substrát pro enzym CcbF, produkty enzymů LmbF (**3**) a CcbF (**2**, **3**) a linkomycin (**4**) byly měřeny pro kontrolu, že nedošlo ke kontaminaci.

### 5.3.2.2.2. Výsledky měření reakční směsi 1 (obsahuje protein CcbF)

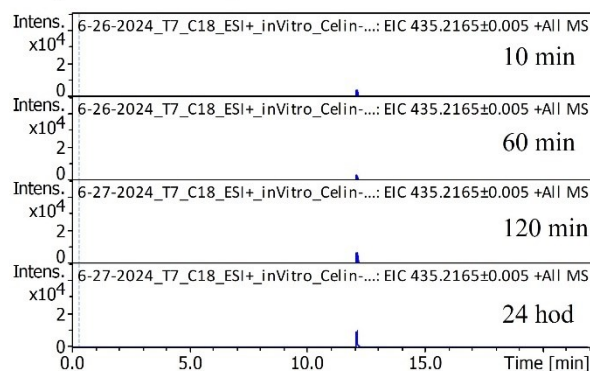
Modifikovaný produkt enzymu CcbF (2) o molekulové hmotnosti 434,2



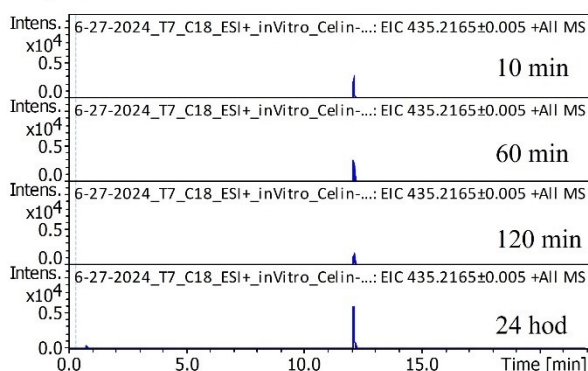
1. opakování



2. opakování

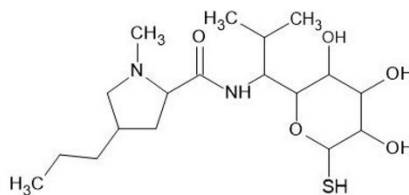


3. opakování

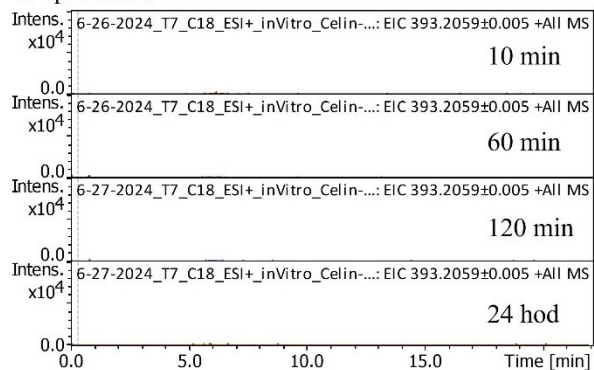


Obrázek 67 Výsledek měření obsahu modifikovaného produktu enzymu CcbF (2 v obr. 56) v reakční směsi 1, na ose x se nachází retenční čas, na ose y je intenzita

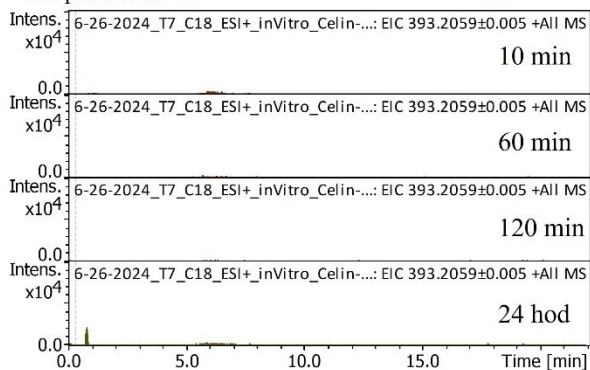
Produkt enzymu LmbF (jeho analog produkovaný enzymem CcbF) (3)  
o molekulové hmotnosti 392,2



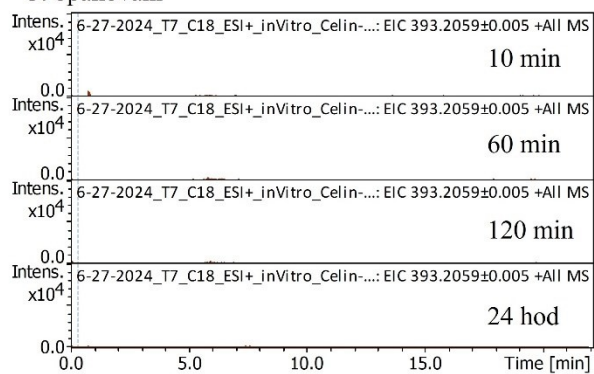
### 1. opakování



### 2. opakování

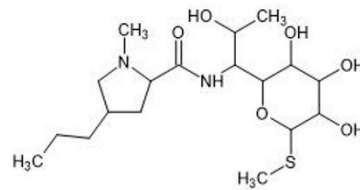


### 3. opakování

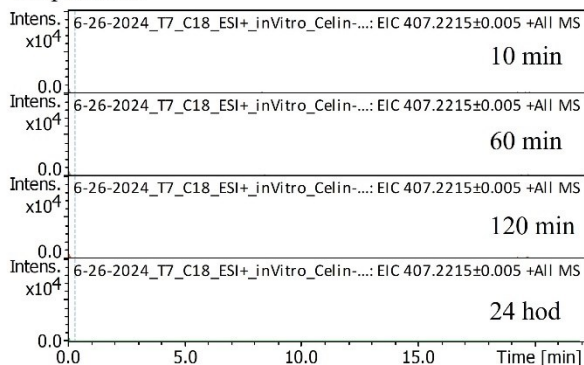


Obrázek 68 Výsledek měření obsahu produktu enzymu LmbF (3 v obr. 56) v reakční směsi 1, na ose x je retenční čas, na ose y se nachází intenzita

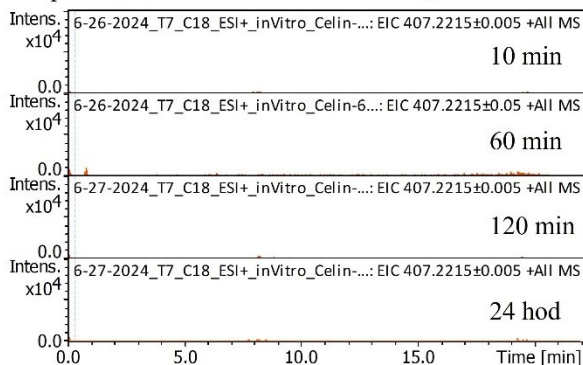
Linkomycin (4) o molekulové hmotnosti 406,2



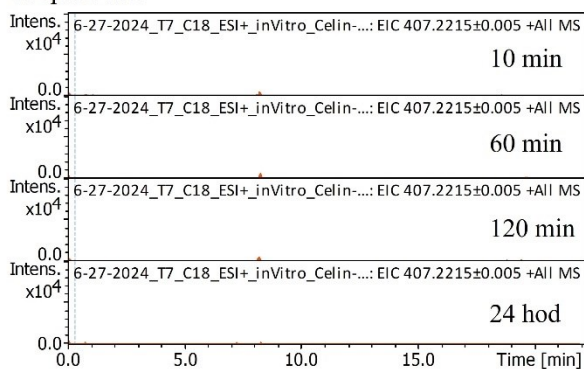
### 1. opakování



### 2. opakování



### 3. opakování

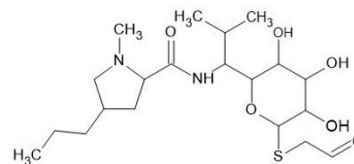


Obrázek 69 Výsledek měření obsahu linkomycinu (4 v obr. 56) v reakční směsi 1, na ose x je retenční čas, na ose y se nachází intenzita

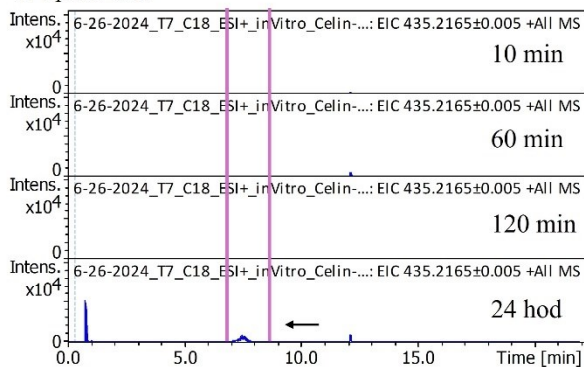
V reakční směsi 1 byl detekován pouze modifikovaný produkt enzymu CcbF (2) (prodloužený oproti přirozenému produktu o propylový zbytek na prolinu). Tato sloučenina byla detekována pouze v jednom ze tří opakování, a to pouze v reakci, která byla inkubována po dobu 24 hodin. Tato sloučenina je špatně detekovatelná a díky aldehydové skupině nestabilní, což vysvětluje její nekonzistentní detekci.

### 5.3.2.2.3. Výsledky měření reakční směsi 2 (obsahuje proteiny CcbF + LmbG)

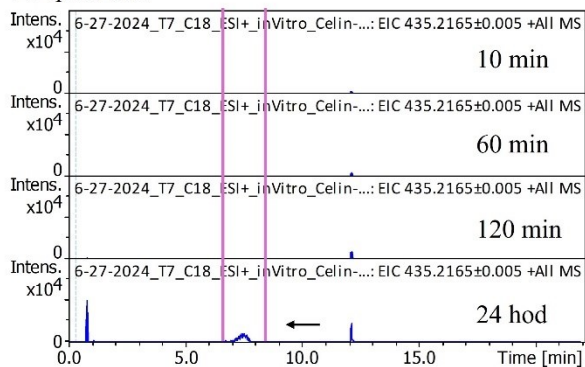
Modifikovaný produkt enzymu CcbF (2) o molekulové hmotnosti 434,2



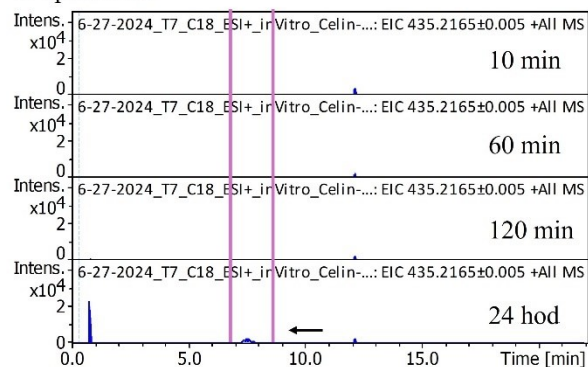
1. opakování



2. opakování

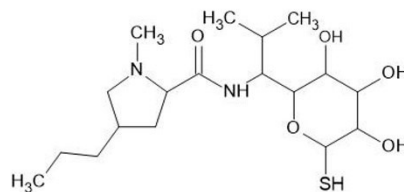


3. opakování

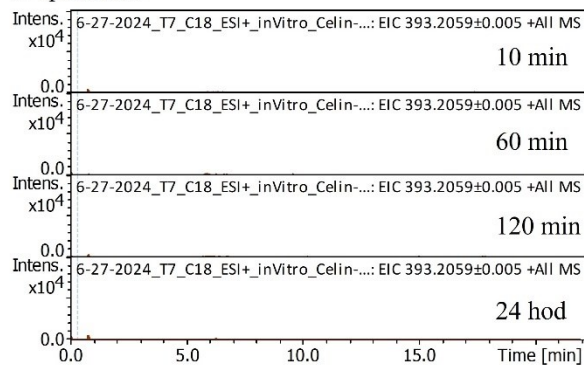


Obrázek 70 Výsledek měření obsahu modifikovaného produktu enzymu CcbF (2 v obr. 56) v reakční směsi 2, na ose x je retenční čas, na ose y se nachází intenzita

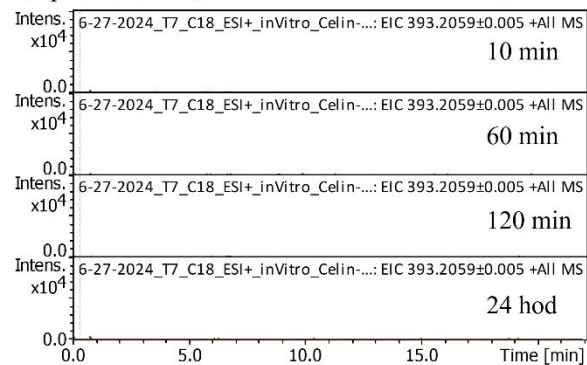
Produkt enzymu LmbF (jeho analog produkovaný enzymem CcbF) (3)  
o molekulové hmotnosti 392,2



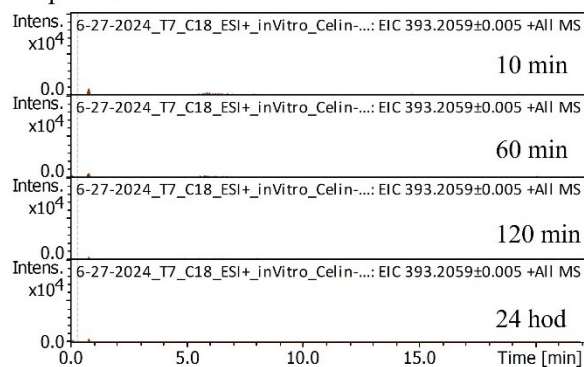
### 1. opakování



### 2. opakování



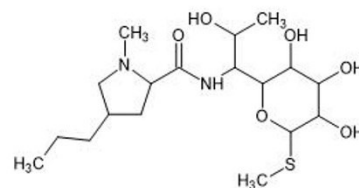
### 3. opakování



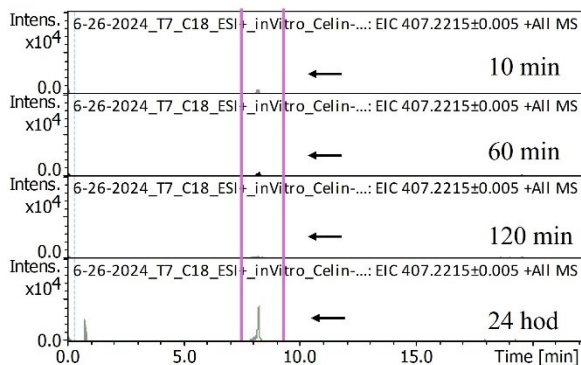
Obrázek 71 Výsledek měření obsahu produktu enzymu LmbF (3 v obr. 56) v reakční směsi 2, na ose x je vyobrazen retenční čas, na ose y je intenzita



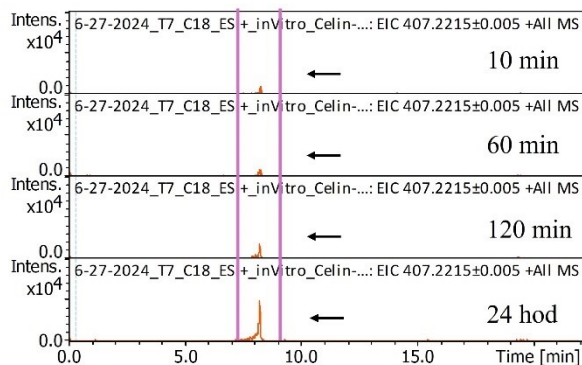
Linkomycin (**4**) o molekulové hmotnosti 406,2



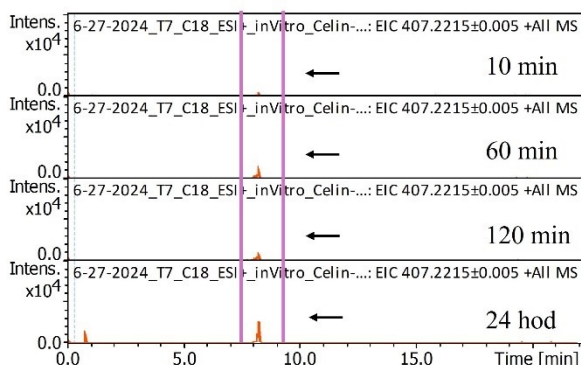
1. opakování



2. opakování



3. opakování



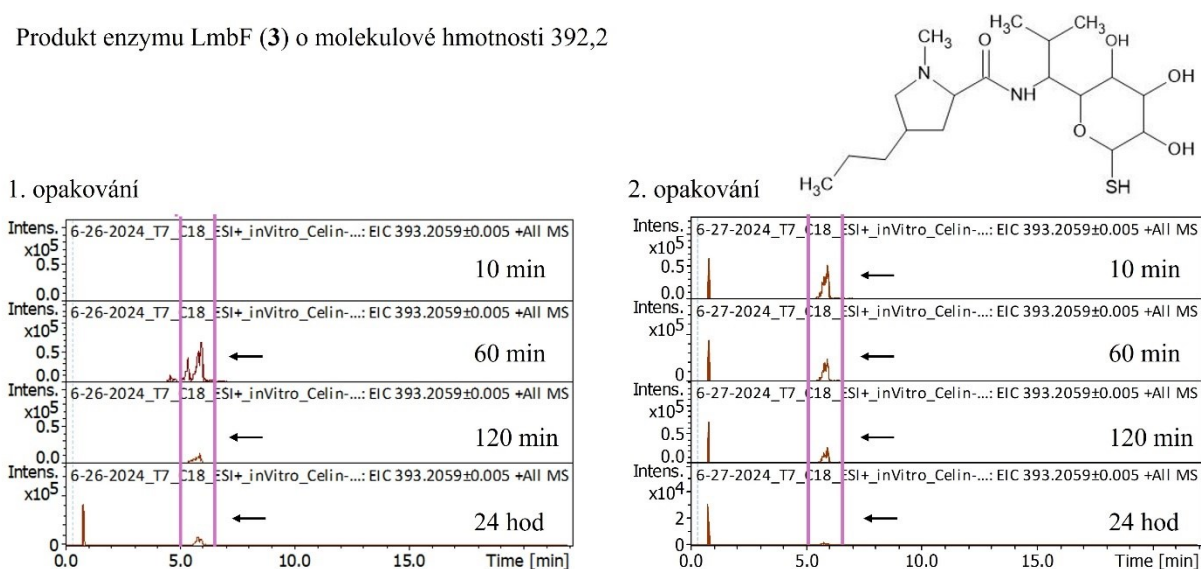
Obrázek 72 Výsledek měření obsahu linkomycinu (**4** v obr. 56) v reakční směsi 2, na ose x je vyobrazen retenční čas, na ose y je intenzita

V reakční směsi 2 byl detekován modifikovaný produkt enzymu CcbF (**2**) (který je oproti přirozenému produktu prodloužený o propylový zbytek na prolinu). Tento produkt byl detekován ve všech třech opakováních, vždy v reakci inkubované po dobu 24 hodin.

V této reakční směsi byl detekován také linkomycin (**4**). Linkomycin byl detekován ve všech třech opakováních, jeho množství bylo nejvyšší v reakcích inkubovaných po dobu 24 hodin. Přirozený produkt enzymu LmbF (**3**), jehož analog musí enzym CcbF produkovat vzhledem k produkci linkomycinu touto reakcí, detekován nebyl. Tento produkt (**3**) má ve své struktuře thiolovou skupinu, díky níž je nestabilní, protože přes ni dimerizuje. Dále může docházet pouze k nízké produkci tohoto produktu (**3**), který je ihned dále zpracováván enzymem LmbG a proto jej nejsme schopni detekovat.

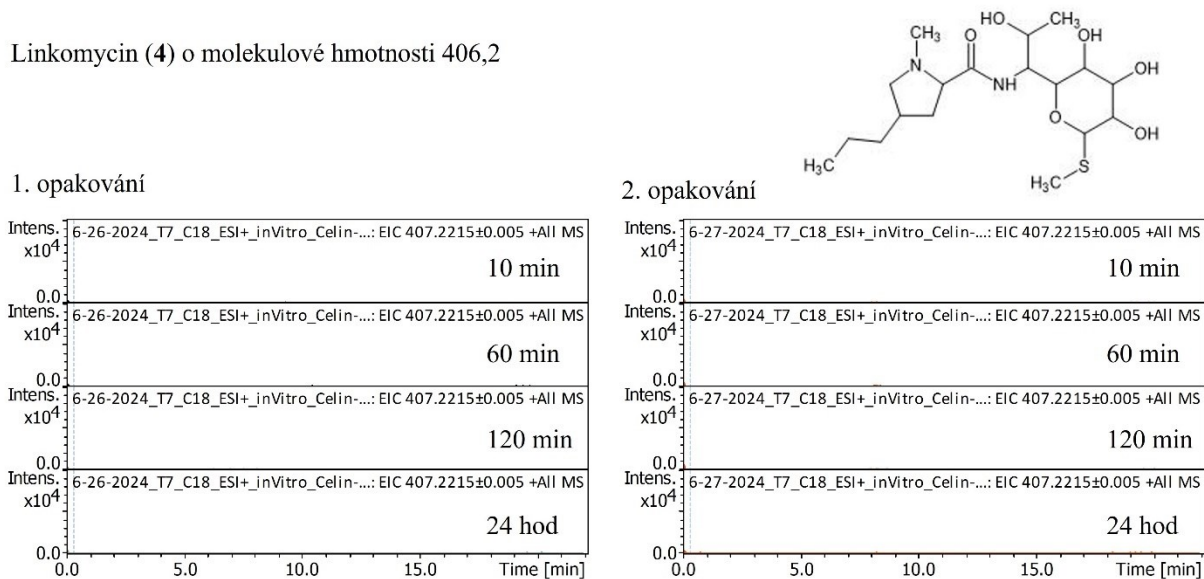
### 5.3.2.2.4. Výsledky měření reakční směsi 3 (obsahuje protein LmbF)

Produkt enzymu LmbF (3) o molekulové hmotnosti 392,2



Obrázek 73 Výsledek měření obsahu produktu enzymu LmbF (3 v obr. 56) v reakční směsi 3, na ose x je zobrazen retenční čas, na ose y intenzita

Linkomycin (4) o molekulové hmotnosti 406,2

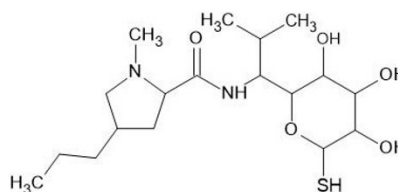


Obrázek 74 Výsledek měření obsahu linkomycinu (4 v obr. 56) v reakční směsi 3, na ose x je retenční čas, na ose y intenzita

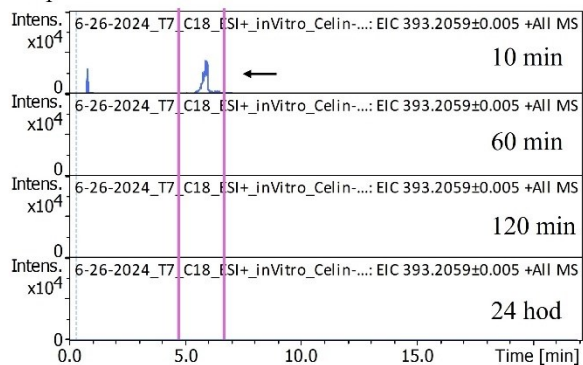
V reakční směsi 3 byl detekován produkt enzymu LmbF (3) v obou opakováních, linkomycin detekován nebyl, což je v souladu s naším očekáváním. Obsah produktu enzymu LmbF v čase klesá, což může být vysvětleno nestabilitou této sloučeniny.

### 5.3.2.2.5. Výsledky měření reakční směsi 4 (obsahuje proteiny LmbF + LmbG)

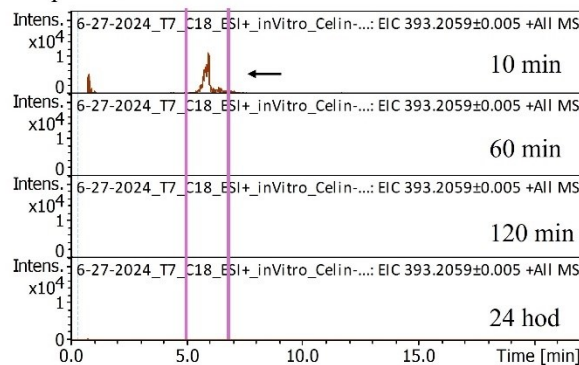
Produkt enzymu LmbF (3) o molekulové hmotnosti 392,2



1. opakování

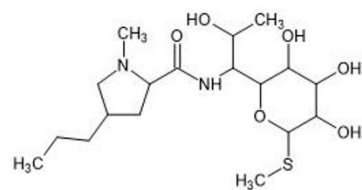


2. opakování

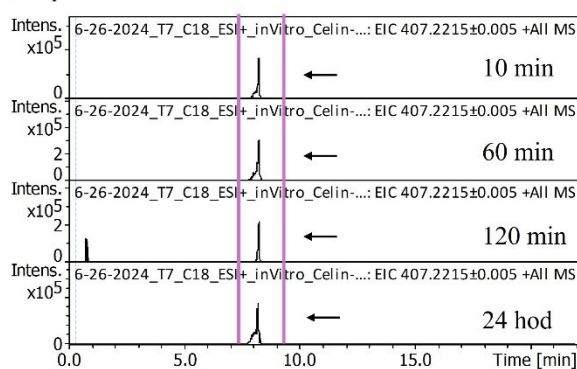


Obrázek 75 Výsledek měření obsahu produktu enzymu LmbF (3 v obr. 56) v reakční směsi 4, na ose x je vyobrazen retenční čas, na ose y je intenzita

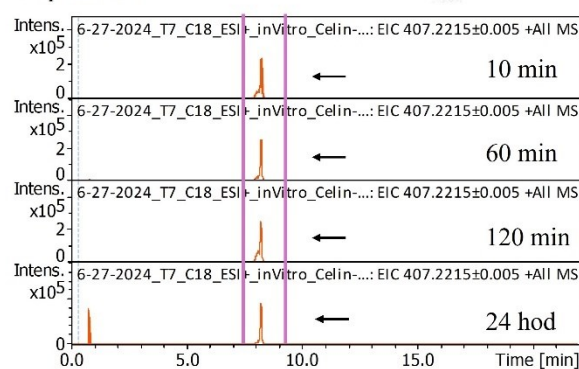
Linkomycin (4) o molekulové hmotnosti 406,2



1. opakování



2. opakování



Obrázek 76 Výsledek měření obsahu linkomycinu (4 v obr. 56) v reakční směsi 4, na ose x se nachází retenční čas, na ose y je intenzita

V reakční směsi 4, jež sloužila také jako pozitivní kontrola, byl detekován jak produkt enzymu LmbF (3), tak linkomycin (4). Obě tyto sloučeniny byly detekovány v obou opakováních. Produkt enzymu LmbF (3) byl detekován pouze v reakcích inkubovaných po dobu 10 minut. V reakcích inkubovaných delší dobu je pravděpodobně spotřebován enzymem LmbG. Linkomycin (4) byl detekován ve všech reakcích ve srovnatelném množství.

#### 5.3.2.2.6. Shrnutí výsledků *in vitro* reakcí

Z naměřených výsledků *in vitro* reakcí je nejdůležitějším poznatkem pravděpodobná produkce analogu produktu LmbF (**3**) enzymem CcbF, kterou vyvozujeme z detekce linkomycinu (**4**) v reakční směsi 2 obsahující proteiny CcbF a LmbG (viz obrázek 72). Linkomycin (**4**) byl detekován v nižších koncentracích než v reakční směsi 4 obsahující proteiny LmbF a LmbG (viz obrázek 76), což je pravděpodobně důsledkem toho, že enzym CcbF pravděpodobně zpracovává substrát C-2 na dva produkty (**2** a **3**). Tento výsledek vysvětluje produkci linkomycinu dříve připravenou mutantou *Streptomyces lincolnensis* (viz kapitola 3.4).

## 6. Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo identifikovat klíčové body pro přípravu producenta hybridního antibiotika CELINu s důrazem na funkci proteinu LmbF, který katalyzuje klíčový krok biosyntézy linkomycinu. V první, dílčí části jsem se zaměřila na ověření možnosti biosyntézy hybridního antibiotika v kmeni *Streptomyces caelestis*, druhá, hlavní část se zabývá detekcí možného interakčního partnera proteinu LmbF.

V první části diplomové práce byla testována schopnost vytvořeného mutantního kmenu *Streptomyces caelestis* produkovat hybridní antibiotikum CELIN. Antibiotikum CELIN se od přirozeně produkováného celesticetinu liší zařazením propyl-prolinu (viz kapitola 3.4). Do kultivačního média byl tedy přidáván propyl-prolin a zároveň bylo potřeba do genomu zařadit gen *lmbC*. LmbC v biosyntéze linkomycinu katalyzuje aktivaci a přenos 4-propyl-L-prolinu, substrátová specifita CcbC neumožňuje zařadit propyl-prolin do výsledného antibiotika (Kadlčík et al., 2013). Mutanta byla připravena vložením genu *lmbC* pod konstitutivní promotor *ermE\** do integrativního vektoru pIJ10257 a následnou transformací tohoto vektoru do *Streptomyces caelestis* ATCC 15084 (viz kapitola 5.1.1). Tato mutanta byla následně kultivována a její metabolity byly měřeny kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Mutanta byla kultivována v tekutém médiu i na pevné půdě, v obou případech médium obsahovalo propyl-prolin. V případě pozitivního výsledku jsme očekávali, že bude mutanta produkovat směs přirozeného linkosamidu celesticetinu a hybridního antibiotika CELINu. Nicméně produkce CELINu nebyla námi dostupnými metodami detekována.

Tato metoda, při které je do média dodávána sloučenina, která je následně zakomponována do výsledné produkované látky, byla již v naší laboratoři úspěšně použita pro přípravu hybridního antibiotika produkovaného *Streptomyces lincolnensis* (Ulanová et al., 2010). V zařazení dodávaného substrátu do výsledné molekuly by tedy problém vznikat neměl.

V této mutantě nebyl deletován gen nepotřebný pro biosyntézu CELINu (*ccbC*), tudíž celesticetinová biosyntetická dráha je nenarušená, a gen *lmbC* se v genomu nachází mimo daný biosyntetický genový shluk. Je tedy možné, že celesticetinová biosyntetická dráha je preferovaná, a proto nedochází k biosyntéze CELINu. Dalším možným postupem by bylo provést in cis mutaci, tedy vyměnit gen *ccbC* za gen *lmbC*. Tím by pravděpodobně došlo k omezení biosyntézy celesticetinu a zároveň by byl tento potřebný gen vložen přímo do daného biosyntetického genového shluku.

Další možností je, že CELIN je pro buňku příliš toxický, a tudíž pro buňky, jež ho biosyntetizují a hromadí je jeho biosyntéza letální. Tato možnost je málo pravděpodobná, předběžné testy v naší laboratoři ukazují, že methylace ribozomu 23S rRNA monomethylázou Ccr1 by měla buňce zajišťovat dostatečnou rezistenci.

Bylo prokázáno, že bez zavedení dalších časově náročných mutací není kmen *Streptomyces caelestis* vhodný pro produkci CELINu. Z tohoto důvodu laboratoř neplánuje pokračovat v tomto směru výzkumu.

V další části této diplomové práce byla zkoumána možnost interakce mezi proteinem LmbF a dalším proteinem exprimovaným z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu. Tato interakce by vysvětlovala neschopnost mutanty *Streptomyces lincolnensis* připravené laboratoří v minulosti produkovat hybridní antibiotikum CELIN (viz kapitola 3.4). LmbIH a LmbQ jsou N-deacetylázy účastníci se biosyntézy linkomycinu resp. celesticetinu. Jedná se o enzymy z rodiny TldD/PmbA enzymů. Jejich inaktivace vede k akumulaci intermediátů následných kroků biosyntézy linkomycinu, ale nevede k úplnému zastavení jeho biosyntézy (Vobruba et al., 2020). Vzhledem k tomu, že reakce katalyzovaná LmbF je jedním z následných kroků, zvažovali jsme, zda odpovídající kombinace enzymů LmbF-LmbIH/Q a CcbF-CcbIH/Q není pro správný průběh biosyntézy důležitá. Dále jsme uvažovali nad možností substrate channelingu (viz kapitola 3.5) mezi enzymem LmbF a enzymem katalyzujícím následný biosyntetický krok, LmbG. Během substrate channelingu jsou aktivní místa obou enzymů v těsné blízkosti a dochází a dochází tak k předání intermediátu přímo z jednoho katalytického místa do katalytického místa druhého enzymu, což je stěžejní např. u nestabilních sloučenin (Schoffelen a Van Hest, 2012). Produkt enzymu LmbF takovou nestabilní sloučeninou je, díky thiolové skupině, přes kterou dochází k dimerizaci. Díky substrate channelingu dochází taktéž k regulaci toku intermediátu mezi kompetitivními metabolickými dráhami (Zhang a Fernie, 2021).

Pro otestování této hypotézy bylo využito pulldown metody. Byl heterologně exprimován a následně purifikován rekombinantní protein LmbF. Protein LmbF s histidinovou kotvou byl následně inkubován na koloně s Ni-INDIGO náplní s bakteriálním lyzátem *Streptomyces lincolnensis* WT nebo s bakteriálním lyzátem *Streptomyces lincolnensis*  $\Delta$ lmbF (viz kapitola 5.2). Tento lyzát byl připraven z kmene v produkční fázi, docházelo v něm tedy k biosyntéze linkomycinu. V případě interakce by byl interakční partner zachycen proteinem LmbF na koloně s Ni-INDIGO náplní a eluován spolu s LmbF. Kolona byla po ukončení inkubace nejprve promyta a následně byly provedeny jednotlivé eluce. Proteiny v jednotlivých elucích byly následně měřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Detekované

proteiny v jednotlivých elucích byly porovnávány s negativní kontrolou, aby byly vyloučeny proteiny, které se na koloně zachytávají nespecificky.

V testované frakci 11, která byla eluována elučním pufrem o koncentraci imidazolu 250 mM, bylo detekováno několik proteinů v množství nad hranici významnosti. Žádný z proteinů, kromě LmbF, exprimovaných z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu však nebyl identifikován jako významný. Proteiny LmbG a LmbW byly však detekovány ve vyšším množství ve frakci s proteinem LmbF a nenacházejí se v negativní kontrole. Proteiny LmbG a LmbW byly identifikovány pouze ve dvou opakováních ze třech, i přesto že v bakteriálním lyzátu byly prokazatelně přítomny. Aby byla vyloučena technická chyba měření, je potřeba pokus v budoucnu zopakovat v hexaplikátu. Interakce proteinu LmbF s proteinem LmbG se nabízí, jelikož tento enzym katalyzuje následný biosyntetický krok. Interakci proteinu LmbF s proteinem LmbW si biologicky vysvětlit nedokážeme. Protein LmbW katalyzuje metylaci na propyl-prolinové části molekuly linkomycinu (Jirásková et al., 2016) a účastní se tak kroku v jiné větvi biosyntetické dráhy než enzym LmbF. Z proteinů detekovaných v množství nacházejícím se nad hladinou významnosti má jediný protein exprimovaný z genu *SLINC\_3065* podle anotace v databázi Uniprot funkci naznačující možnou souvislost s biosyntézou linkomycinu. Konkrétně se jedná o aminopeptidázu katalyzující uvolnění terminální prolinové skupiny. Lze tedy uvažovat o roli tohoto enzymu ve štěpení některého z intermediátů biosyntézy linkomycinu. Nicméně nejedná se o protein exprimovaný z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu, a již dříve bylo heterologní expresí prokázáno, že žádné další proteiny nejsou pro utvoření molekuly linkomycinu potřeba (Koběřská et al., 2008).

Je pravděpodobné, že mezi proteiny exprimovanými z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu se jedná o příliš slabou interakci, kterou nejsme schopni zachytit metodou pulldown. Případná interakce může být taktéž rozrušena vysokou koncentrací imidazolu. V opakování tohoto pokusu by se tedy mohla provádět eluce změnou pH.

Dále v případě, kdy bychom chtěli potvrdit interakci konkrétně s proteinem LmbG, by bylo možné přidat do kultivačního média pro *Streptomyces lincolnensis*, ze které bude následně připravován lyzáat pro metodu pulldown, SAM, což je kofaktor enzymu LmbG. Přidání kofaktoru by mohlo vést ke zvýšené produkci LmbG (Zhao et al., 2015) a tedy zvýšené šanci jeho zachycení na koloně.

Pro detekci slabých proteinových interakcí by bylo možno využít metodu FRET (fluorescenční přenos rezonanční energie), která je vhodná i pro detekci v živých buňkách. Touto metodou je možné měřit vzdálenost mezi molekulami v desítkách angstromů a měřit

procento těchto interakcí. Tato metoda využívá dvou fluorochromů (donoru a akceptoru). Donor je excitován specifickou vlnovou délkou, energie z něj je následně přenesena na akceptor, který následně vyzáří tuto přijatou energii v podobě fluorescence. Tyto fluorochromy jsou připojeny ke studovaným proteinům (Ems-McClung a Walczak, 2020; Sekar a Periasamy, 2003).

V poslední části této diplomové práce byla ověřována hypotéza o možných proteinových interakcích mezi proteiny genového shluku pro biosyntézu linkomycinu pomocí *in vitro* reakcí. Byly heterologně exprimovány a purifikovány proteiny LmbF, LmbG a CcbF (viz kapitola 5.3). *In vitro* reakce byly připraveny v 5 kombinacích a sice jako reakční směs obsahující pouze protein CcbF, v kombinaci obsahující proteiny CcbF a LmbG, jako reakční směs obsahující pouze protein LmbF, v kombinaci obsahující proteiny LmbF a LmbG, jež sloužila také jako pozitivní kontrola, a poslední reakční směs neobsahující žádný z proteinů, jež sloužila jako negativní kontrola. Všechny kombinace reakčních směsí obsahovaly přirozený substrát pro protein LmbF nazvaný C-2 (**1**), který se v porovnání s přirozeným substrátem pro CcbF liší propylovým zbytkem navázaným na prolinu (viz obrázek 8). V první fázi byly tyto reakce inkubovány po dobu 2 hodin. Následující experimenty byly modifikovány tak, abychom mohli sledovat také časových průběh *in vitro* reakcí, a proto byly tyto reakční směsi inkubovány po dobu 10 minut, 60 minut, 2 hodin a 24 hodin. Proteiny v reakčních směsích byly po ukončení inkubace precipitovány přidáním kyseliny mravenčí a ledově studeného acetonitrilu a následně byly reakční směsi měřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Enzym LmbF může zpracovávat také substrát pro CcbF a enzym CcbF je schopen zpracovávat substrát pro LmbF, jež je prodloužený o propylový zbytek na prolinu, Tato skutečnost byla již demonstrována v roce 2016. V tomto roce byl substrát pro CcbF inkubován s enzymem LmbF, případně také v různé kombinaci s LmbF a s enzymy LmbG a Ccb4, čímž vznikaly různé linkosamidové produkty (Ushimaru et al., 2016). V jiném článku také z roku 2016 bylo popsáno, že substrát pro CcbF byl inkubován s enzymy LmbF, LmbG a Ccb4, čímž došlo k biosyntéze Bu-2545. Ve stejné práci byla popsána také inkubace substrátu pro LmbF s enzymy CcbF a Ccb5, čímž došlo k biosyntéze nového linkosamidového produktu obsahujícího propylový zbytek na prolinu a alkoholový zbytek navázaný na sírném atomu (Wang et al., 2016). Tato možnost byla také dokázána v článku o přípravě hybridního antibiotika CELINu, na který navazuje celá tato diplomová práce, v němž byla popsána kombinace substrátu pro LmbF a enzymů CcbF, Ccb1, Ccb2, Ccb3, Ccb4 a Ccb5 vyústila právě biosyntézou nové antimikrobiální látky CELINu (Kadlcik et al., 2017).



Naše výsledky ukazují, že pokud je v reakční směsi protein CcbF v kombinaci s proteinem LmbG, pak dochází k biosyntéze linkomycinu (4). CcbF zpracovává substrát C-2 (1) (Wang et al., 2016) pravděpodobně na dva produkty (viz obrázek 56). Produkt totožný s přirozeným produktem LmbF (3) je pravděpodobně nestabilní thiol, který dimerizuje a proto ho na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí nedetekujeme. Nicméně v reakci s LmbG je tento produkt methylován, a tím je chráněn proti dimerizaci. Na přítomnost této dráhy v reakci obsahující proteiny CcbF a LmbG usuzujeme z přítomnosti linkomycinu (4). Tyto výsledky lze interpretovat tak, že přítomnost enzymu LmbG a tedy odčerpávání substrátu 3 může *in vivo* vést k upřednostnění této biosyntetické dráhy. Tato situace odpovídá situaci *in vivo* v mutantě *Streptomyces lincolnensis* s deletovaným genem *lmbF* a vloženým genem *ccbF* (viz kapitola 3.4). *In vitro* vidíme nižší produkci linkomycinu pro kombinaci enzymů CcbF a LmbG a to v pozdějším čase reakce než v reakční směsi obsahující proteiny LmbF a LmbG. *In vivo* jsme viděli produkci linkomycinu srovnatelnou (nepublikovaná data laboratoře). Nicméně při pokusech *in vivo* byl měřen linkomycin akumulovaný v médiu po pěti dnech kultivace, kde již rozdíly v efektivitě enzymů nebyly patrné.

Pokud má tedy enzym CcbF schopnost katalyzovat syntézu obou prekurzorů (2 a 3 v obrázku 56), pak tedy otázkou zůstává, proč *in vivo* v mutantě *Streptomyces lincolnensis*, kde jsou přítomné všechny proteiny potřebné pro biosyntézu CELINu jeho produkce nebyla detekována. Dalším krokem by bylo zopakovat *in vitro* reakce v kombinaci proteinů CcbF s Ccb5, Ccb4, Ccb3, Ccb2 a Ccb1 a v kombinaci CcbF, Ccb5, Ccb4, Ccb3, Ccb2, Ccb1 s LmbG. Tím by došlo k ověření, zda nedochází mezi proteiny Ccb5 a LmbG ke kompetici a zda tento krok nebrání biosyntéze CELINu *in vivo* ve *Streptomyces lincolnensis*.

Celkové výsledky této diplomové práce tedy ukazují, že v přípravě producenta hybridního antibiotika CELINu je třeba pokračovat se *Streptomyces lincolnensis*. Výsledky metody pulldown naznačují možnou interakci proteinu LmbF s proteinem LmbG, ač se jedná o detekci pod hranicí významnosti. Výsledky *in vitro* reakcí naznačují, že enzym CcbF má schopnost produkovat analog produktu enzymu LmbF (3), i když v minoritním množství. V kombinaci s enzymem LmbG poté dochází k biosyntéze linkomycinu a tato dráha je *in vivo* pravděpodobně upřednostňována. Klíčovým bodem, kde se přirozené biosyntézy linkosamidů linkomycinu a celesticetinu rozcházejí, je reakce katalyzovaná enzymy LmbF / CcbF (Kadlcik et al., 2017). Situace se mění v případě kombinace enzymů CcbF a LmbG, která se v přírodě nevyskytuje. V tomto případě se jako klíčový bod ukazuje nejen reakce katalyzovaná enzymy LmbF a CcbF, ale také následná reakce katalyzovaná enzymem LmbG. Pro přípravu producenta CELINu bude nutno inaktivovat gen *lmbG* v již připravené mutantě

s deletovaným *lmbF* a vloženými geny *ccbF*, *ccb1*, *ccb2*, *ccb3*, *ccb4* a *ccb5*. Následně by tato mutanta teoreticky měla produkovat CELIN.

## 7. Souhrn

- *Semi-vivo* produkce CELINu připravenou mutantou *Streptomyces caelestis*, do níž byl vložen gen *lmbC*, a která byla kultivována na médiu s propyl-prolinem, nebyla detekována. Bez další časově náročné mutagenese tudíž není kmen *Streptomyces caelestis* vhodný jako producent CELINu.
- Metoda pulldown naznačuje možnou interakci proteinu LmbF s proteiny LmbG a LmbW exprimovanými z genového shluku pro biosyntézu linkomycinu a s Aminopeptidázou N exprimovanou z genu *SLINC\_3065*, který se nenachází v tomto genovém shluku.
- Výsledky *in vitro* reakcí ukazují, že protein CcbF je schopen utilizace substrátu pro LmbF. Tento substrát je enzymem CcbF pravděpodobně zpracováván na dva produkty, a to sice reakcí přirozenou pro protein CcbF a poté reakcí produkující analog produktu enzymu LmbF, který je v přítomnosti LmbG zpracováván na linkomycin. Pro přípravu producenta CELINu je tedy třeba v *Streptomyces lincolnensis* vyřadit nejen gen kódující LmbF, ale i gen kódující enzym pro následný krok, LmbG.

## 8. Použitá literatura

1. ADDY, L. D. a MARTIN, M. V. Clindamycin and dentistry. *British Dental Journal*. 2005, roč. 199, č. 1, s. 23-26. ISSN 0007-0610. 10.1038/sj.bdj.4812535.
2. ACHARYA, P. C. a KUROSU, M. Medicinal Chemistry of Chemotherapeutic Agents. Academic press, 2023. ISBN 9780323905756. 10.1016/C2020-0-03892-2.
3. ALAM, K.; MAZUMDER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y.; HAO, J. et al. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*. 2022, roč. 13. ISSN 1664-3024. 10.3389/fmicb.2022.968053.
4. ARMENGOL ÁLVAREZ, L.; VAN DE SIJPE, G.; DESMET, S.; METSEMAKERS, W.; SPRIET, I. et al. Ways to Improve Insights into Clindamycin Pharmacology and Pharmacokinetics Tailored to Practice. *Antibiotics*. 2022, roč. 11, č. 5. ISSN 2079-6382. 10.3390/antibiotics11050701.
5. BRODIAZHENKO, T.; TURNBULL, K. J.; WU, K. J. Y.; TAKADA, H.; TRESKO, B. I. C. et al. Synthetic oxepanoprolinamide iboxamycin is active against *Listeria monocytogenes* despite the intrinsic resistance mediated by VgaL/Lmo0919 ABCF ATPase. *JAC-Antimicrobial Resistance*. 2022, roč. 4, č. 3. ISSN 2632-1823. 10.1093/jacamr/dlac061.
6. COLABROY, K. L.; SMITH, I. R.; VLAHOS, A. H.S.; MARKHAM, A. J. a JAKUBIK, M. E. Defining a kinetic mechanism for l-DOPA 2,3 dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from *Streptomyces lincolnensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2014, roč. 1844, č. 3, s. 607-614. ISSN 15709639. 10.1016/j.bbapap.2013.12.005.
7. DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; GAYA, M. S.; ALAV, I. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*. 2023, roč. 21, č. 5, s. 280-295. ISSN 1740-1526. 10.1038/s41579-022-00820-y.
8. DE LIMA PROCÓPIO, R. E.; DA SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; DE AZEVEDO, J. L. a DE ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012, roč. 16, č. 5, s. 466-471. ISSN 14138670. 10.1016/j.bjid.2012.08.014.
9. DEL CARRATORE, F.; ZYCH, K.; CUMMINGS, M.; TAKANO, E.; MEDEMA, M. H. et al. Computational identification of co-evolving multi-gene modules in microbial biosynthetic gene clusters. *Communications Biology*. 2019, roč. 2, č. 1. ISSN 2399-3642. 10.1038/s42003-019-0333-6.
10. DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R. A. et al. *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. *Microbiology Research*. 2022, roč. 13, č. 3, s. 418-465. ISSN 2036-7481. 10.3390/microbiolres13030031.
11. EMS-MCCLUNG, S. C. a WALCZAK, C. E. In Vitro FRET- and Fluorescence-Based Assays to Study Protein Conformation and Protein-Protein Interactions in Mitosis. In: MAIATO, Helder (ed.). *Cytoskeleton Dynamics. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2020, s. 93-122. ISBN 978-1-0716-0218-8.10.1007/978-1-0716-0219-5\_7
12. EYLER, R. F. a SHVETS, K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2019, roč. 14, č. 7, s. 1080-1090. ISSN 1555-9041. 10.2215/CJN.08140718.

13. FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O. A. et al. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science*. 2012, roč. 337, č. 6098, s. 1107-1111. ISSN 0036-8075. 10.1126/science.1220761.
14. GEDEON, A.; KARIMOVA, G.; AYOUB, N.; DAIROU, J.; GIAI GIANETTO, Q. et al. Interaction network among de novo purine nucleotide biosynthesis enzymes in *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*. 2023, roč. 290, č. 12, s. 3165-3184. ISSN 1742-464X. 10.1111/febs.16746.
15. GHOSH, D.; VEERARAGHAVAN, B.; ELANGO VAN, R. a VIVEKANANDAN, P. Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020, roč. 64, č. 2, s. e02225-19. ISSN 0066-4804. 10.1128/AAC.02225-19.
16. GIL-GIL, T.; LABORDA, P.; SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; BLANCO, P. et al. Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. *MicrobiologyOpen*. 2019, roč. 8, č. 11. ISSN 2045-8827. 10.1002/mbo3.945.
17. HENDRICKSON, O. D.; ZVEREVA, E. A.; POPRAVKO, D. S.; ZHERDEV, A. V.; XU, C. et al. An immunochromatographic test system for the determination of lincomycin in foodstuffs of animal origin. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1141. ISSN 15700232. 10.1016/j.jchromb.2020.122014.
18. HIRAI, Y.; MAEBASHI, K.; YAMADA, K.; WAKIYAMA, Y.; KUMURA, K. et al. Characterization of compound A, a novel lincomycin derivative active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*. 2021, roč. 74, č. 2, s. 124-132. ISSN 0021-8820. 10.1038/s41429-020-00375-1.
19. HOU, B.; LIN, Y.; WU, H.; GUO, M.; PETKOVIC, H. et al. The Novel Transcriptional Regulator LmbU Promotes Lincomycin Biosynthesis through Regulating Expression of Its Target Genes in *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Bacteriology*. 2018, roč. 200, č. 2. ISSN 0021-9193. 10.1128/JB.00447-17.
20. HOU, B.; WANG, R.; ZOU, J.; ZHANG, F.; WU, H. et al. A putative redox-sensing regulator Rex regulates lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Basic Microbiology*. 2021, roč. 61, č. 9, s. 772-781. ISSN 0233-111X. 10.1002/jobm.202100249.
21. HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W. a WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, roč. 51, s. 72-80. ISSN 13695274. 10.1016/j.mib.2019.10.008.
22. HWANG, K.; KIM, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. Ø. a LEE, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2014, roč. 32, č. 2, s. 255-268. ISSN 07349750. 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008
23. CHENG, B.; JIANG, F.; SU, M.; ZHOU, L.; ZHANG, H. et al. Effects of lincomycin hydrochloride on the neurotoxicity of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020, roč. 201. ISSN 01476513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110725>.
24. CHEVRETTE, M. G.; GUTIÉRREZ-GARCÍA, K.; SELEM-MOJICA, N.; AGUILAR-MARTÍNEZ, C.; YAÑEZ-OLVERA, A. et al. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Natural Product Reports*. 2020, roč. 37, č. 4, s. 566-599. ISSN 0265-0568. 10.1039/C9NP00048H.
25. JANATA, J.; KADLČIK, S.; KOBERSKA, M.; ULANOVA, D.; KAMENIK, Z. et al. Lincosamide Synthetase—A Unique Condensation System Combining Elements of Nonribosomal Peptide Synthetase

- and Mycothiol Metabolism. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 3. ISSN 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0118850.
26. JANATA, J.; KAMENIK, Z.; GAZAK, R.; KADLČIK, S. a NAJMANOVA, L. Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products. *Natural Product Reports*. 2018, roč. 35, č. 3, s. 257-289. ISSN 0265-0568. 10.1039/C7NP00047B.
27. JIAN, Z.; ZENG, L.; XU, T.; SUN, S.; YAN, S. et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*. 2021, roč. 61, č. 12, s. 1049-1070. ISSN 0233-111×. 10.1002/jobm.202100201.
28. JIRASKOVA, P.; GAZAK, R.; KAMENIK, Z.; STEININGEROVA, L.; NAJMANOVA, L. et al. New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a  $\gamma$ -Glutamyltransferase Cleave the C–C Bond? *Frontiers in Microbiology*. 2016, roč. 7. ISSN 1664-302×. 10.3389/fmicb.2016.00276.
29. KADLČIK, S.; KAMENIK, Z.; VASEK, D.; NEDVED, M. a JANATA, J. Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics. *Chemical Science*. 2017, roč. 8, č. 5, s. 3349-3355. ISSN 2041-6520. 10.1039/C6SC04235J.
30. KADLČÍK, S.; KUČERA, T.; CHALUPSKÁ, D.; GAŽÁK, R.; KOBĚRSKÁ, M. et al. Adaptation of an L-Proline Adenylation Domain to Use 4-Propyl-L-Proline in the Evolution of Lincosamide Biosynthesis. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 12. ISSN 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0084902.
31. KAMENIK, Z.; KADLČIK, S.; RADOJEVIC, B.; JIRASKOVA, P.; KUZMA, M. et al. Deacetylation of mycothiol-derived ‘waste product’ triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics. *Chemical Science*. 2016, roč. 7, č. 1, s. 430-435. ISSN 2041-6520. 10.1039/C5SC03327F.
32. KOBĚRSKÁ, M.; KOPECKÝ, J.; OLŠOVSKÁ, J.; JELÍNKOVÁ, M.; ULANOVA, D. et al. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiologica*. 2008, roč. 53, č. 5, s. 395-401. ISSN 0015-5632. 10.1007/s12223-008-0060-8.
33. KOBERSKA, M.; VESELA, L.; VIMBERG, V.; LENART, J.; VESELA, J. et al. Beyond Self-Resistance: ABCF ATPase LmrC Is a Signal-Transducing Component of an Antibiotic-Driven Signaling Cascade Accelerating the Onset of Lincomycin Biosynthesis. *MBio*. 2021, roč. 12, č. 5, s. e01731-21. ISSN 2150-7511. 10.1128/mBio.01731-21.
34. KUMMER, M. J.; LEE, Y. S.; YUAN, M.; ALKOTAINI, B.; ZHAO, J. et al. Substrate Channeling by a Rationally Designed Fusion Protein in a Biocatalytic Cascade. *JACS Au*. 2021, roč. 1, č. 8, s. 1187-1197. ISSN 2691-3704. 10.1021/jacsau.1c00180.
35. LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell*. 2020, roč. 181, č. 1, s. 29-45. ISSN 00928674. 10.1016/j.cell.2020.02.056.
36. LI, J.; WANG, N.; TANG, Y.; CAI, X.; XU, Y. et al. Developmental regulator BldD directly regulates lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019, roč. 518, č. 3, s. 548-553. ISSN 0006291×. 10.1016/j.bbrc.2019.08.079.

37. LI, M. M.; RAY, P.; KNOWLTON, K. F.; PRUDEN, A.; XIA, K. et al. Fate of pirlimycin and antibiotic resistance genes in dairy manure slurries in response to temperature and pH adjustment. *Science of The Total Environment*. 2020, roč. 710. ISSN 00489697. 10.1016/j.scitotenv.2019.136310.
38. LIN, C. I.; SASAKI, E.; ZHONG, A. a LIU, H. W. In vitro characterization of LmbK and LmbO: identification of GDP-D-erythro- $\alpha$ -D-glucosyl-erythrose as a key intermediate in lincomycin A biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 2014, roč. 136, č. 3, s. 906-909. ISSN 0002-7863. 10.1021/ja412194w.
39. LIN, C.; PANG, A.; ZHANG, Y.; QIAO, J. a ZHAO, G. Comparative transcriptomic analysis reveals the significant pleiotropic regulatory effects of LmbU on lincomycin biosynthesis. *Microbial Cell Factories*. 2020, roč. 19, č. 1. ISSN 1475-2859. 10.1186/s12934-020-01298-0. (a)
40. LIU, L.; LIU, H.; GAO, H.; YANG, Z.; FENG, X. et al. Genome-based analysis of the type II PKS biosynthesis pathway of xanthenes in *Streptomyces caelestis* and their antifungal activity. *RSC Advances*. 2019, roč. 9, č. 64, s. 37376-37383. ISSN 2046-2069. 10.1039/C9RA07345K.
41. LIU, L.; XU, Y.; HAN, Z.; LI, Y.; LU, L. et al. Four New Antibacterial Xanthenes from the Marine-Derived Actinomycetes *Streptomyces caelestis*. *Marine Drugs*. 2012, roč. 10, č. 12, s. 2571-2583. ISSN 1660-3397. 10.3390/md10112571.
42. MACLEAN, R. C. a SAN MILLAN, A. The evolution of antibiotic resistance. *Science*. 2019, roč. 365, č. 6458, s. 1082-1083. ISSN 0036-8075. 10.1126/science.aax3879.
43. MAGERLEIN, B. J.; BIRKENMEYER, R. D. a KAGAN, F. Lincomycin. VI. 4'-Alkyl Analogs of Lincomycin. Relationship between Structure and Antibacterial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1967, roč. 10, č. 3, s. 355-359. ISSN 0022-2623. 10.1021/jm00315a015.
44. MARTÍN, J. F. a LIRAS, P. The Balance Metabolism Safety Net: Integration of Stress Signals by Interacting Transcriptional Factors in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2020, roč. 10. ISSN 1664-302X. 10.3389/fmicb.2019.03120.
45. MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2014, roč. 11, s. 33-39. ISSN 17406749. 10.1016/j.ddtec.2014.02.001.
46. MASON, J. D.; TERWILLIGER, D. W.; POTE, A. R. a MYERS, A. G. Practical Gram-Scale Synthesis of Iboxamycin, a Potent Antibiotic Candidate. *Journal of the American Chemical Society*. 2021, roč. 143, č. 29, s. 11019-11025. ISSN 0002-7863. 10.1021/jacs.1c03529.
47. MATZOV, D.; EYAL, Z.; BENHAMOU, R. I.; SHALEV-BENAMI, M.; HALFON, Y. et al. Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*. 2017, roč. 45, č. 17, s. 10284-10292. ISSN 0305-1048. 10.1093/nar/gkx658.
48. MCINNIS, R. S; MCCALLUM, G. E; LAMBERTE, L. E a VAN SCHAİK, W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*. 2020, roč. 53, s. 35-43. ISSN 13695274. 10.1016/j.mib.2020.02.002.
49. MIETHKE, M.; PIERONI, M.; WEBER, T.; BRÖNSTRUP, M.; HAMMANN, P. et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*. 2021, roč. 5, č. 10, s. 726-749. ISSN 2397-3358. 10.1038/s41570-021-00313-1.

50. MILANI, M.; PESCE, A.; BOLOGNESI, M.; BOCEDI, A. a ASCENZI, P. Substrate channeling: Molecular bases. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2003, roč. 31, č. 4, s. 228-233. ISSN 1470-8175. 10.1002/bmb.2003.494031040239.
51. MILES, E. W.; RHEE, S. a DAVIES, D. R. The Molecular Basis of Substrate Channeling. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, roč. 274, č. 18, s. 12193-12196. ISSN 00219258. 10.1074/jbc.274.18.12193.
52. MITCHELTREE, M. J.; PISIPATI, A.; SYROEGIN, E. A.; SILVESTRE, K. J.; KLEPACKI, D. et al. A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance. *Nature*. 2021, roč. 599, č. 7885, s. 507-512. ISSN 0028-0836. 10.1038/s41586-021-04045-6. (b)
53. MITCHELTREE, M. J.; STEVENSON, J. W.; PISIPATI, A. a MYERS, A. G. A Practical, Component-Based Synthetic Route to Methylthiolincosamine Permitting Facile Northern-Half Diversification of Lincosamide Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*. 2021, roč. 143, č. 18, s. 6829-6835. ISSN 0002-7863. 10.1021/jacs.1c03536. (a)
54. MORI, T. a ABE, I. Lincosamide Antibiotics: Structure, Activity, and Biosynthesis. *ChemBioChem*. 2024, roč. 25, č. 6. ISSN 1439-4227. 10.1002/cbic.202300840.
55. MORI, T.; SUN, X.; KADLCIK, S.; JANATA, J. a ABE, I. Structure-Function Analysis of the S-Glycosylation Reaction in the Biosynthesis of Lincosamide Antibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*. 2023, roč. 62, č. 29. ISSN 1433-7851. 10.1002/anie.202304989.
56. MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A.; KUDVA, I. T. a ZHANG, Q. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016, roč. 4, č. 2. ISSN 2165-0497. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
57. MUTEEB, G.; REHMAN, M. T.; SHAHWAN, M. a AATIF, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*. 2023, roč. 16, č. 11. ISSN 1424-8247. 10.3390/ph16111615.
58. NAJMANOVÁ, L.; KUTEJOVÁ, E.; KADLEC, J.; POLAN, M.; OLŠOVSKÁ, J. et al. Characterization of N -Demethylincosamide Methyltransferases LmbJ and CcbJ. *ChemBioChem*. 2013, roč. 14, č. 17, s. 2259-2262. ISSN 1439-4227. 10.1002/cbic.201300389.
59. NOVOTNA, J.; OLISOVSKA, J.; NOVAK, P.; MOJZES, P.; CHALOUPKOVA, R. et al. Lincomycin Biosynthesis Involves a Tyrosine Hydroxylating Heme Protein of an Unusual Enzyme Family. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 12. ISSN 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0079974.
60. OSBOURN, Anne. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. Online. *Trends in Genetics*. 2010, roč. 26, č. 10, s. 449-457. ISSN 01689525. 10.1016/j.tig.2010.07.001.
61. OWENS, W.E. a NICKERSON, S.C. Mastitis Therapy and Control. Medical Therapy Options. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, s. 435-439. ISBN 9780123744074. 10.1016/B978-0-12-374407-4.00304-6.
62. PANG, A.-P.; DU, L.; LIN, C.-Y.; QIAO, J. a ZHAO, G.-R. Co-overexpression of lmbW and metK led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 2015, roč. 119, č. 4, s. 1064-1074. ISSN 13645072. 10.1111/jam.12919.



63. PAREEK, V.; SHA, Z.; HE, J.; WINGREEN, N. S. a BENKOVIC, S. J. Metabolic channeling: predictions, deductions, and evidence. *Molecular Cell*. 2021, roč. 81, č. 18, s. 3775-3785. ISSN 10972765. 10.1016/j.molcel.2021.08.030.
64. PARRA, J.; BEATON, A.; SEIPKE, R. F.; WILKINSON, B.; HUTCHINGS, M. I. et al. Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*. 2023, roč. 76. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102385>.
65. PARTRIDGE, S. R.; KWONG, S. M.; FIRTH, N. a JENSEN, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018, roč. 31, č. 4, s. e00088-17. ISSN 0893-8512. 10.1128/CMR.00088-17.
66. POSHYVAILO, L.; VON LIERES, E.; KONDRAT, S. a ZHANG, Y-H Percival. Does metabolite channeling accelerate enzyme-catalyzed cascade reactions? *PLOS ONE*. 2017, roč. 12, č. 2. ISSN 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0172673.
67. RADKE, J. B.; BURROWS, J. N.; GOLDBERG, D. E. a SIBLEY, L. D. Evaluation of Current and Emerging Antimalarial Medicines for Inhibition of *Toxoplasma gondii* Growth in Vitro. *ACS Infectious Diseases*. 2018, roč. 4, č. 8, s. 1264-1274. ISSN 2373-8227. 10.1021/acsinfecdis.8b00113.
68. ROSENBERG, M. G. Clindamycin. *Pediatrics in Review*. 1996, roč. 17, č. 10, s. 373-374. ISSN 0191-9601. 10.1542/pir.17-10-373.
69. SASAKI, E.; LIN, C.-I.; LIN, K.-Y. a LIU, H.. Construction of the Octose 8-Phosphate Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis: Characterization of the Reactions Catalyzed by LmbR and LmbN. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, roč. 134, č. 42, s. 17432-17435. ISSN 0002-7863. 10.1021/ja308221z.
70. SEIDLOVÁ, B. Ergothionein a mykothiol v biosyntéze linkosamidů. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova, 2020.
71. SEKAR, R. B. a PERIASAMY, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*. 2003, roč. 160, č. 5, s. 629-633. ISSN 1540-8140. 10.1083/jcb.200210140.
72. SCHOFFELEN, S. a VAN HEST, J. C. M. Multi-enzyme systems: bringing enzymes together in vitro. *Soft Matter*. 2012, roč. 8, č. 6, s. 1736-1746. ISSN 1744-683×. 10.1039/C1SM06452E
73. SPÍŽEK, J. a ŘEZANKA, T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, roč. 64, č. 4, s. 455-464. ISSN 0175-7598. 10.1007/s00253-003-1545-7.
74. STEININGEROVA, L.; KAMENIK, Z.; GAZAK, R.; KADLČIK, S.; BASHIRI, G. et al. Different Reaction Specificities of F 420 H 2 -Dependent Reductases Facilitate Pyrrolobenzodiazepines and Lincomycin To Fit Their Biological Targets. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, roč. 142, č. 7, s. 3440-3448. ISSN 0002-7863. 10.1021/jacs.9b11234.
75. SWEETLOVE, L. J. a FERNIE, A. R. The role of dynamic enzyme assemblies and substrate channelling in metabolic regulation. *Nature Communications*. 2018, roč. 9, č. 1. ISSN 2041-1723. 10.1038/s41467-018-04543-8.
76. TIFFERT, Y.; SUPRA, P.; WURM, R.; WOHLLEBEN, W.; WAGNER, R. et al. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular Microbiology*. 2008, roč. 67, č. 4, s. 861-880. ISSN 0950-382×. 10.1111/j.1365-2958.2007.06092.x.

77. TYANOVA, S. a COX, J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In: VON STECHOW, Louise (ed.). *Cancer Systems Biology. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2018, s. 133-148. ISBN 978-1-4939-7492-4. 10.1007/978-1-4939-7493-1\_7.
78. ULANOVA, D.; NOVOTNÁ, J.; SMUTNÁ, Y.; KAMENÍK, Z.; GAŽÁK, R. et al. Mutasyntesis of Lincomycin Derivatives with Activity against Drug-Resistant Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, roč. 54, č. 2, s. 927-930. ISSN 0066-4804. 10.1128/AAC.00918-09.
79. USHIMARU, R.; LIN, C.-I.; SASAKI, E. a LIU, H. Characterization of Enzymes Catalyzing Transformations of Cysteine S -Conjugated Intermediates in the Lincosamide Biosynthetic Pathway. *ChemBioChem*. 2016, roč. 17, č. 17, s. 1606-1611. ISSN 1439-4227. 10.1002/cbic.201600223.
80. VOBRUBA, S.; KAMENIK, Z.; KADLČIK, S. a JANATA, J. N-Deacetylation in Lincosamide Biosynthesis Is Catalyzed by a TldD/PmbA Family Protein. *ACS Chemical Biology*. 2020, roč. 15, č. 8, s. 2048-2054. ISSN 1554-8929. 10.1021/acscchembio.0c00224.
81. VOBRUBA, Š. Studium klíčových bodů biosyntézy linkomycinu a celesticetinu, Dizertační práce. Praha: Univerzita Karlova, 2020. dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/125485.
82. WAKIYAMA, Y.; KUMURA, K.; UMEMURA, E.; UEDA, K.; WATANABE, T. et al. Synthesis and structure–activity relationships of novel lincomycin derivatives. Part 4: synthesis of novel lincomycin analogs modified at the 6- and 7-positions and their potent antibacterial activities. *The Journal of Antibiotics*. 2017, roč. 70, č. 8, s. 888-906. ISSN 0021-8820. 10.1038/ja.2017.54.
83. WANG, M.; ZHAO, Q.; ZHANG, Q. a LIU, W. Differences in PLP-Dependent CysteinyI Processing Lead to Diverse S -Functionalization of Lincosamide Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*. 2016, roč. 138, č. 20, s. 6348-6351. ISSN 0002-7863. 10.1021/jacs.6b01751.
84. WANG, R.; ZHAO, J.; CHEN, L.; YE, J.; WU, H. et al. LcbR1, a newly identified GntR family regulator, represses lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023, roč. 107, č. 24, s. 7501-7514. ISSN 0175-7598. 10.1007/s00253-023-12756-1.
85. WANG, S.; LIN, C.-I.; ZHANG, J.; USHIMARU, R.; SASAKI, E. et al. Studies of lincosamide formation complete the biosynthetic pathway for lincomycin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020, roč. 117, č. 40, s. 24794-24801. ISSN 0027-8424. 10.1073/pnas.2009306117.
86. WEEKS, A; LUND, L a RAUSHEL, F. Tunneling of intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, roč. 10, č. 5, s. 465-472. ISSN 13675931. 10.1016/j.cbpa.2006.08.008.
87. WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B. a MYERS, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014, roč. 53, č. 34, s. 8840-8869. ISSN 1433-7851. 10.1002/anie.201310843.
88. WU, K. J. Y.; TRESCO, B. I. C.; RAMKISSOON, A.; ALEKSANDROVA, E. V.; SYROEGIN, E. A. et al. An antibiotic preorganized for ribosomal binding overcomes antimicrobial resistance. *Science*. 2024, roč. 383, č. 6684, s. 721-726. ISSN 0036-8075. 10.1126/science.adk8013.
89. YAGÜE, P.; LÓPEZ-GARCÍA, M. T.; RIOSERAS, B.; SÁNCHEZ, J. a MANTECA, Á. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiology Letters*. 2013, roč. 342, č. 2, s. 79-88. ISSN 03781097. 10.1111/1574-6968.12128.

90. ZHANG, D.; TANG, Z. a LIU, W. Biosynthesis of Lincosamide Antibiotics: Reactions Associated with Degradation and Detoxification Pathways Play a Constructive Role. *Accounts of Chemical Research*. 2018, roč. 51, č. 6, s. 1496-1506. ISSN 0001-4842. 10.1021/acs.accounts.8b00135.
91. ZHANG, J.; SHIN, J.; TAGUE, N.; LIN, H.; ZHANG, M. et al. Visualization of a Limonene Synthesis Metabolon Inside Living Bacteria by Hyperspectral SRS Microscopy. *Advanced Science*. 2022, roč. 9, č. 32. ISSN 2198-3844. 10.1002/advs.202203887.
92. ZHANG, Y. a FERNIE, A. R. Metabolons, enzyme–enzyme assemblies that mediate substrate channeling, and their roles in plant metabolism. *Plant Communications*. 2021, roč. 2, č. 1. ISSN 25903462. 10.1016/j.xplc.2020.100081.
93. ZHANG, Y.-H. Percival. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2011, roč. 29, č. 6, s. 715-725. ISSN 07349750. 10.1016/j.biotechadv.2011.05.020.
94. ZHAO, Q.; WANG, M.; XU, D.; ZHANG, Q. a LIU, W. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*. 2015, roč. 518, č. 7537, s. 115-119. ISSN 0028-0836. 10.1038/nature14137.
95. ZHAO, S.; JONES, J. A.; LACHANCE, D. M.; BHAN, N.; KHALIDI, O. et al. Improvement of catechin production in *Escherichia coli* through combinatorial metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 2015, roč. 28, s. 43-53. ISSN 10967176. 10.1016/j.ymben.2014.12.002.
96. ZHONG, G.; ZHAO, Q.; ZHANG, Q. a LIU, W. 4-alkyl-L-(Dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage. *Nature Communications*. 2017, roč. 8, č. 1. ISSN 2041-1723. 10.1038/ncomms16109.
97. ZOU, J.; MAO, Y.; HOU, B.; KANG, Y.; WANG, R. et al. DeoR regulates lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2023, roč. 39, č. 12. ISSN 0959-3993. 10.1007/s11274-023-03788-w.