



**UNIVERZITA KARLOVA, Praha**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

*Katedra genetiky a mikrobiologie*

*Studium biosyntetické dráhy antibiotika  
linkomycinu*

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Vypracovala  
Školitel

Mgr. Jitka Novotná  
Prof. RNDr. Jaroslav Spížek, Dr.Sc.

Praha. 2008

---

---

Tato dizertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu pod odborným vedením Prof. RNDr. Jaroslava Spížka, DrSc. a to v období říjen 2000 až září 2008.

Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (1M06011).

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně a použila výhradně prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Dále prohlašuji, že tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného titulu.

V Praze, září 2008

.....  
Mgr. Jitka Novotná

---

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Jaroslavu Spížkovi, Dr.Sc. za vedení práce, cenné rady a laskavý přístup.

Dále děkuji Ing. Jiřímu Janatovi, C.Sc. za kritické připomínky. Děkuji též všem členům Laboratoře biologie sekundárního metabolismu, kteří svými radami, pomocí a především vytvořením skvělé atmosféry přispěli k dokončení této práce.

Děkuji RNDr. Janě Olšovské, Ph.D., Mgr. Aleši Hozátkovi, Ph.D., Mgr. Petru Novákovi, Ph.D., Doc. Petru Bednářovi, Ph.D. a RNDr. Petru Mojzešovi, Ph.D. za spolupráci a aplikaci metod, jimiž naše laboratoř nedisponuje a které umožnily dokončení této práce.

Velký dík patří mé rodině za trpělivost, lásku a podporu.

---

## OBSAH

<b>I. ÚVOD</b>	7
<b>II. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	10
2.1. Rod Streptomyces	10
2.1.1. Streptomycety se vyznačují složitým životním cyklem	11
2.1.2. Genom streptomycet, streptomycety jako producenti antibiotik	13
2.1.3. Geny pro biosyntézu antibiotik jsou organizovány a koregulovány ve shlucích	16
2.2. Biosyntetické enzymy sekundárního metabolismu; příbuzné enzymy; získávání nových antibiotik manipulací; hybridní antibiotika	22
2.2.1. Syntéza hybridních antibiotik	23
2.2.1.1. Modulární enzymy	23
2.2.1.2. Vícepodjednotkové enzymy	24
2.2.1.3. Využití genových manipulací k přípravě nových antibiotik. Hybridní antibiotika.	26
2.2.2. Oxygenasy	28
2.2.2.1. Oxygenasy hydroxylojící aromatické sloučeniny	28
2.2.2.2. Syntasa oxidu dusného – „nevlatní dítě rodiny P450“	35
2.2.1.3. Dioxygenasy	37
2.2.1.3.1. Dioxygenasy katecholu	37
2.2.1.3.1.1. Extradiolové dioxygenasy katecholu	38
2.3. Linkosamidová antibiotika, chemická struktura linkosamidových antibiotik	40
2.3.1. Producenti linkosamidových antibiotik	40
2.3.2. Deriváty linkomycinu	40
2.3.3. Mechanismus účinku linkomycinu	42
2.3.4. Mechanismus rezistence k linkomycinu	43
2.3.5. Využití linkosamidových antibiotik v klinické praxi	44
2.3.6. Biosyntéza linkomycinu	45
2.3.6.1. Biosyntéza aglykonu linkomycinu (aminokyselinová větev biosyntézy linkomycinu)	45
2.3.6.2. Biosyntéza cukerné složky linkomycinu (cukerná větev biosyntézy linkomycinu)	46
2.3.6.3. Kondenzace propylprolinu a methylthiolinkosamidu na N-demethyllinkomycin	47
2.3.6.4. Methylace N-demethyllinkomycinu, vznik linkomycinu	48
2.3.7. Biosyntéza antibiotik strukturálně příbuzných linkomycinu	49
2.3.7.1. Biosyntéza celesticetinu	49
2.3.7.2. Biosyntéza pyrolo[1,4]benzodiazepinových antibiotik	49
2.3.8. Genetický základ biosyntézy linkomycinu	51
<b>III. VÝSLEDKY</b>	56
1. L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intra-molecular cyclization in lincomycin biosynthesis	56
2. LmbB2 - a unique heme-containing tetrahydrobiopterin dependent enzyme hydroxylating tyrosine aromatic ring in lincomycin biosynthesis (pracovní název publikace v přípravě)	63
3. Vyhledávání podjednotek NDJ-syntetázy - klíčového enzymu biosyntetické dráhy linkomycinu (data pro připravovanou publikaci)	83
<b>IV. DISKUZE</b>	91
4.1. První reakce aminokyselinové větve biosyntézy linkomycinu – syntéza DOPA	91
4.2. Druhý krok aminokyselinové větve biosyntézy linkomycinu – štěpení aromatického kruhu a tvorba kyseliny 4-(3-karboxy-3-oxopropenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrol-2-karboxylové	96
4.3. Klíčová reakce biosyntézy linkomycinu – kondenzace PPL a MTL na NDJ	97
<b>V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	101

---

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	acyl nosičový protein
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
BMM	bakteriální vícetřídňové monooxygenasy
CE	kapilární elektroforéza
CE-ESI-MS	kapilární elektroforéza spřažená s hmotnostní spektrometrií s ionizační elektrosprej
FMO	flavinové monooxygenasy
MS	hmotnostní spektrometrie
MTL	methylthiolinkosamid
NDL	N-demethylkomycin
NMR	nukleární magnetická resonance
NRPS	syntetasy neribozomálních peptidů
PHA	kyselina propylhygrová
PKS	polyketid syntetasy
PPL	propylprolin
(p)ppGpp	guanozin(penta)tetrafosfát
SARP	drahově specifické regulátory
SMILE	ostrůvky sekundárního metabolismu
THFA	kyselina tetrahydrofolová

---

## I. ÚVOD

---

## I. ÚVOD

Jako antibiotika byly původně označovány nízkomolekulární (Mw nižší než 2000 Da) metabolity mikroorganismů s různou chemickou strukturou, které v nízkých koncentracích inhibují růst nebo zabíjejí jiné mikroorganismy a zároveň neovlivňují své producenty (WAKSMAN a LECHEVALIER, 1949). Tato definice byla postupem času měněna, protože např. některá peptidová antibiotika (nisin, tendamistat atd.) jsou podstatně větší. Navíc nejsou mikroorganismy jedinými producenty antibiotik; mezi producenty antibiotik totiž patří také houby, lišejníky, řasy, vyšší rostliny a dokonce živočichové. V roce 1992 se počet známých antibiotik odhadoval na více než 10 000 antibiotik a podobných biologicky aktivních sloučenin z mikroorganismů, rostlin a živočichů, z nichž vycházelo více než 100 000 semisyntetických a syntetických derivátů (GRAFE, 1992). Berdy (BERDY, 2005) uvádí, že do roku 2002 bylo popsáno 16 500 přirozených antibiotik z mikroorganismů. Z tohoto počtu se však prakticky využívá asi jen 150 sloučenin (v lidské terapii je to asi 100), protože použití mnohých z nich je omezeno jejich toxicitou, nižší účinností při stejném mechanismu účinku jako mají už klinicky zavedená antibiotika, nebo je jejich výroba příliš nákladná atd.

Objev antibiotik ve 30-tých letech minulého století byl pravděpodobně jedním z nejvýznamnějších pokroků v historii medicíny (MUKHOPADHYAY a PETERSON, 2006). Antibiotika umožnila léčení infekcí, které byly kdysi fatální a ochranné postupy, které byly dříve nemyslitelné. Několik desetiletí proto panovalo přesvědčení, že infekční onemocnění přestávají být závažným problémem. Rychle rostoucí počet bakteriálních patogenů k antibiotikům rezistentních však naši schopnost kontrolovat infekční onemocnění podstatně omezil a v současnosti už představuje jeden z nejzávažnějších problémů veřejného zdravotnictví (WHO, 2001; AMINOV a MACKIE, 2007). Dnes se popisuje rezistence mikroorganismů (zejména bakterií) ke všem známým třídám přirozených i syntetických antibiotik (D'COSTA *et al.*, 2006) a rychle roste i počet patogenů rezistentních k několika antibiotikům současně (CHARLES a GRAYSON, 2004). Zřejmým evolučním faktorem vedoucím k šíření rezistenčních genů je rostoucí produkce a spotřeba samotných antibiotik. Tento tlak selektuje bakterie nesoucí rezistenční geny a navíc se ukazuje, že jednou získané rezistenční geny, přestane-li selekční tlak působit, nejsou z populace bakterií eliminovány tak rychle, jak se původně očekávalo (SALYERS a AMABILE-CUEVAS, 1997; AMINOV a MACKIE, 2007).

Paralelně s rozšířením různých typů rezistence došlo v posledních dvaceti letech k znepokojivému snížení vývoje nových antibiotik (CHARLES a GRAYSON, 2004). Např. během let 1983-2002 poklesl počet nových antimikrobních agens povolených FDA (US Food and Drug Administration) o 56% a v letech 2004-2006 byla FDA povolena pouze 3 nová antimikrobní agens (MUKHOPADHYAY a PETERSON, 2006; <http://www.fda.gov/cder/rdmt/default.htm>).

Tento pokles produktivity lze připsat na vrub jednak tomu, že mnohé velké farmaceutické firmy pod tlakem trhu ustoupily od výzkumu antibiotik a orientovaly se na vývoj léčiv s jinou indikací vykazujícím větší návratnost investic (CHARLES a GRAYSON, 2004; LUZHETSKYY *et al.*, 2007), jednak i špatné volbě strategií při hledání nových antibiotik (BALZ, 2006). V posledních 10-20 letech byla v programech hledání nových antibiotik pro generování chemické diverzity např. patrná tendence upřednostňovat kombinatoriální chemii. Šíří se ale názor, že kombinatoriální chemie nedokáže zastoupit jako primární zdroj chemické diverzity přírodní produkty, jejichž hlavní výhodou je často velmi složitá struktura a chirální povaha (LARSEN *et al.*, 2005). Stejně tak genomický

---

přístup k hledání nových antibiotik se ukazuje jako málo schůdná cesta (COATES a HU, 2007).

Za jednu z nadějných cest k rozšíření spektra antimikrobních látek jsou dnes považovány cílené zásahy do biosyntetických drah antibiotik pomocí metod molekulární biologie – kombinatoriální genetika (COATES a HU, 2007). Tak lze vytvářet nové kombinace genů pocházejících z různých genových shluků *in vivo*, které vedou k produkci hybridních látek s novými biologickými aktivitami. Úspěšné použití této strategie je však podmíněno detailní znalostí biosyntetických drah antibiotik a také enzymů, které katalyzují jejich jednotlivé reakce (WEBER *et al.*, 2003).

Tato dizertační práce byla vypracována v rámci projektů studia biosyntézy linkosamidových a pyrrolo[1,4]benzodiazepinových antibiotik, potenciálních zdrojů hybridních látek s antibakteriálními, antimalarickými, nebo protinádorovými účinky. Má přispět k detailnímu poznání aminokyselinové větve a kondenzačního kroku biosyntetické dráhy linkomycinu A. Výsledky studia jsou shrnuty v přijaté a připravovaných publikacích, které jsou prezentovány v předkládané dizertační práci. Jejich součástí je identifikace tří intermediátů biosyntetické dráhy linkomycinu A, identifikace a charakterizace jednoho jejího enzymu s aktivním centrem neobvyklým pro katalyzovanou reakci a dále studium interakcí podjednotek hlavního kondenzačního enzymu dráhy.



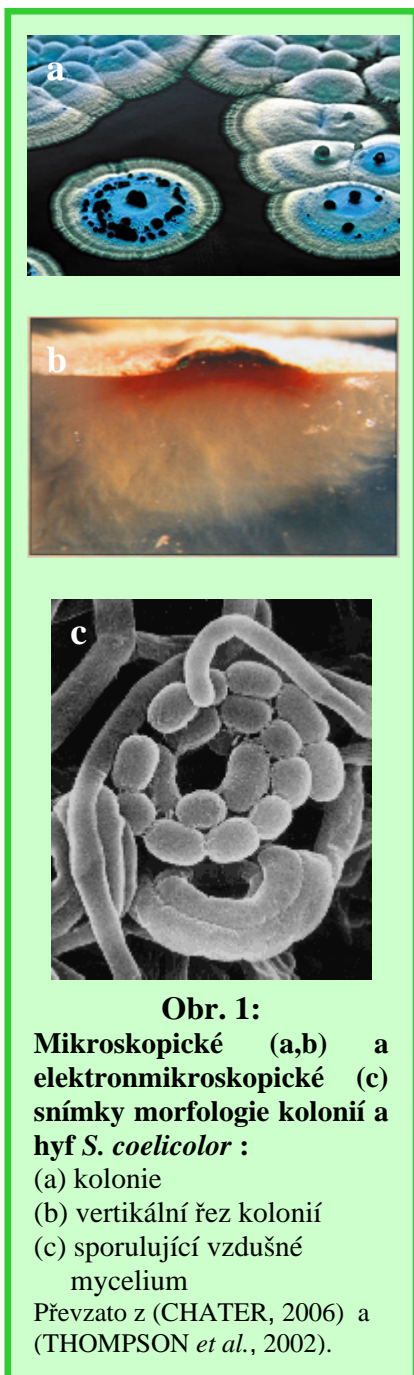
---

## **II. LITERÁRNÍ ÚVOD**

## II. LITERÁRNÍ ÚVOD

### 2.1. Rod *Streptomyces*

*Streptomyces* (Obr. 1), druhově nejbohatší bakteriální rod, je definován na základě fenotypových a genotypových znaků. Nejvýznamnějším nástrojem taxonomie streptomycet se vedle analýzy složení buněčné stěny a profilů mastných kyselin zdá být sekvenční analýza 16S rRNA (WILLIAMS *et al.*, 1989; WELLINGTON *et al.*, 1992; KIESER, 2000; ANDERSON a WELLINGTON, 2001). Právě touto metodou se podařilo prokázat, že aktinomycety, ačkoli mají složitou morfologii a komplikovaný životní cyklus, nejsou skupinou odělenou od ostatních bakterií, ale jsou fylogeneticky příbuzné gram-pozitivním tyčinkám a kokům (*Micrococcus*, *Arthrobacter*) (Atlas of actinomycetes, 1997). Dnes je rod *Streptomyces* taxonomicky řazen (Bergey's manual of systematic bacteriology, 2001) do :



**Obr. 1:**

**Mikroskopické (a,b) a elektronmikroskopické (c) snímky morfologie kolonií a hyf *S. coelicolor* :**

- (a) kolonie
- (b) vertikální řez kolonií
- (c) sporulující vzdušné mycelium

Převzato z (CHATER, 2006) a (THOMPSON *et al.*, 2002).

říše: *Bacteria*

kmene: *Actinobacteria*

třídy: *Actinobacteria*

podtřídy: *Actinobacteridae*

řádu: *Actinomycetales*

podřádu: *Streptomycineae*

čeledi: *Streptomycetaceae*

Zástupci rodu *Streptomyces* jsou gram-pozitivní nepohyblivé vláknité aerobní organizmy s obsahem G+C párů v DNA 69-78 mol %, které lze od jiných aktinomycet odlišit typem buněčné stěny. Ta obsahuje kyselinu L,L-diaminopimelovou a glycin, neobsahuje některé charakteristické cukry (arabinosu, galaktosu nebo xylosu) a acyl jejích muramylových zbytků je acetyl (ANDERSON a WELLINGTON, 2001; SEDLÁČEK, 2007).

Streptomycety jsou v přírodě všudypřítomné (KIESER, 2000). Je známa řada fytopatogenních druhů (např. *S. scabies*, *S. ipomea*, *S. turgidiscabies*, *S. stelliscabiei*) a byl nalezen také lidský patogen *S. somaliensis* (KIESER, 2000; LORIA *et al.*, 2003); většina streptomycet jsou však saprofytické bakterie obývající především půdní biotopy, kde se díky své schopnosti produkovat řadu extracelulárních lytických enzymů významnou měrou podílejí na degradaci organického materiálu (MCCARTHY, 1987;

---

CRAWFORD, 1988; WANG *et al.*, 1989). Ke kolonizaci půdy jsou zástupci rodu *Streptomyces* dobře přizpůsobeni. Vytvářejí totiž spory (Obr. 1 c), odolné ke snížení koncentrace živin i vody, které usnadňují rozšíření a dlouhodobě v půdě přežívají (MAYFIELD *et al.*, 1972; ENSIGN, 1978; KARAGOUNI *et al.*, 1993). Relativně vysoký počet streptomycet existuje v půdě většinou právě ve stádiu spor (MAYFIELD *et al.*, 1972; KIESER, 2000). Vedle sypké půdy streptomycety velmi dobře kolonizují i rhizosféru a navíc jsou, jako jen málo bakterií, velmi úspěšné i jako patogeny napadající kořeny rostlin. Kořeny, na rozdíl od nadzemních částí rostlin, mají jen málo otvorů, jimiž do nich mohou patogeny proniknout. Řada fytopatogenních druhů streptomycet řeší tento problém produkcí fytotoxinu thaxtominu, který inhibuje tvorbu buněčné stěny v rostoucích rostlinných tkáních a umožňuje streptomycetám do nich pronikat (LORIA *et al.*, 2003).

Výrazným rysem rodu *Streptomyces* je schopnost produkovat širokou škálu sekundárních metabolitů, z nichž řada je farmaceuticky důležitá a zahrnuje protivirové a protinádorové látky, modulatory imunitní odpovědi, herbicidy, insekticidy, protiparazitní látky a většinu současně dostupných antibiotik (THOMPSON *et al.*, 2002).

### 2.1.1. Streptomycety se vyznačují složitým životním cyklem

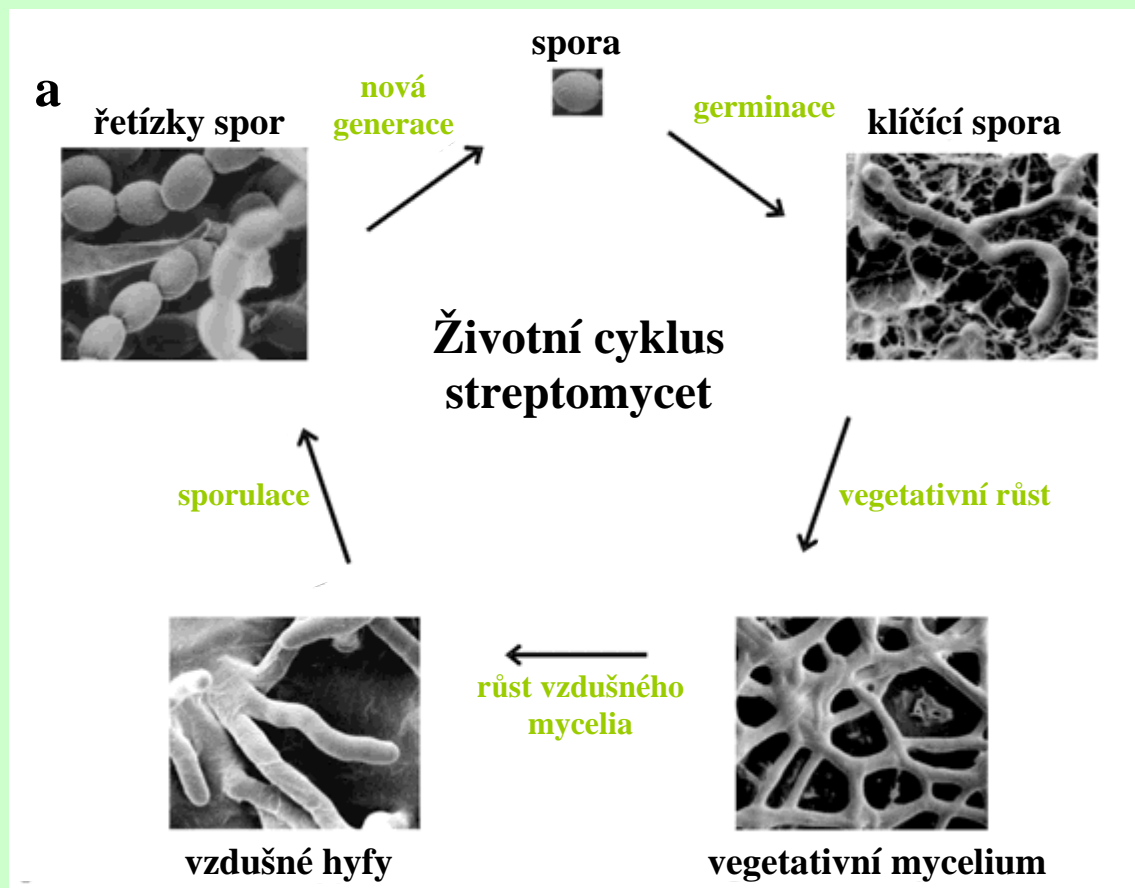
Latinské jméno rodu *Streptomyces*, navržené Waksmanem a Henricim (WAKSMAN a HENRICI, 1948) lze přeložit jako „ohnutá houba“. Streptomycety se skutečně vyznačují pro bakterie neobvyklým životním cyklem, v mnoha ohledech připomínajícím životní cyklus některých nižších eukaryot (CHATER, 1997). Jejich kolonie jsou mnohobuněčné diferencované organizmy, které vykazují časovou a prostorovou kontrolu genové exprese, morfogeneze a metabolismu, což jsou všechno znaky mnohobuněčných eukaryot (KIESER, 2000).

Vývojový cyklus streptomycet, nejlépe prostudovaný u modelového organismu *S. coelicolor*, začíná na pevné půdě (Obr. 2a) klíčením spor, které dávají vznik spleti dlouhých větvených vláken nazývaných vegetativní mycelium (fáze rychlého růstu I). Vegetativní hyfy jsou multinukleoidální syncytia, jen nepravidelně rozdělená často neúplnými přepážkami (WILDERMUTH, 1970). Po vytvoření vegetativního mycelia se přechodně snižuje akumulace biomasy (přechodová (T) fáze). Zároveň dochází k lyzi některých kompartmentů vegetativního mycelia, v hyfách na povrchu kolonie se ukládají zásobní látky, zvyšuje se produkce vybraných extracelulárních proteinů a začíná syntéza sekundárních metabolitů i tvorba nevětveného vzdušného mycelia. Vzdušné hyfy mají hydrofobní povrch a vykazují typický spirálový způsob růstu (KIESER, 2000; VAN WEZEL a VIJGENBOOM, 2004) (fáze rychlého růstu II). Vzdušné hyfy se nakonec mění na řetízky spor nesoucích jedinou kopii chromozomu (fáze sporulační).

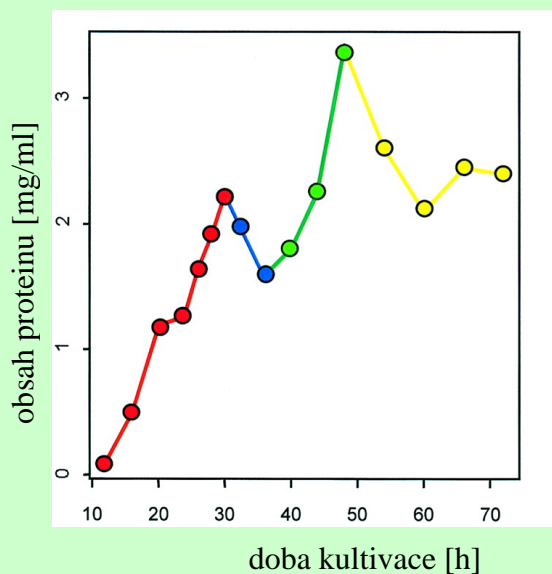
V tekutém médiu vykazují streptomycety charakteristickou diauxickou růstovou křivku, na níž lze, podobně jako při sledování růstu na pevné půdě, rozlišit 4 růstové fáze (Obr. 2b) (PUGLIA *et al.*, 1995; VOHRADSKY *et al.*, 2000), ačkoli vzdušné hyfy nejsou v tekutém médiu diferencovány a některé druhy (např. *S. coelicolor*) ani nesporulují.

T fáze představuje v obou typech kultur vývojový „kontrolní bod“ pro fyziologické signály i signály z okolního prostředí, které vedou k aktivaci diferenciačního programu. Tato růstová fáze je příbuzná „stringentní odpovědi“, jak ukazuje akumulace ppGpp (HOLT *et al.*, 1992) a stacionární fázi, jak ukazuje snížení rychlosti syntézy ribozomálních proteinů (BLANCO *et al.*, 1994). T fáze je také spojována s aktivací genů řídících biosyntézu antibiotik (HOLT *et al.*, 1992) a regulačních prvků řídících expresi antibiotiky indukovaných genů vícenásobné („multidrug“) rezistence (SALAHBEY *et al.*, 1995).

Produkce antibiotik na pevném médiu koinciduje s vývojem vzdušných hyf, v tekutém médiu je obecně spojena se stacionární fází (BIBB, 2005). Regulace



**b**



## OBR. 2:

**a** Životní cyklus streptomycet na pevné půdě. Převzato z

[http://opennetware.org/wiki/Streptomyces:Other\\_Bits/An\\_Introduction\\_to\\_Streptomyces](http://opennetware.org/wiki/Streptomyces:Other_Bits/An_Introduction_to_Streptomyces)

**b** Vývojové fáze *Streptomyces coelicolor* J1501 v definovaném tekutém minimálním médiu.

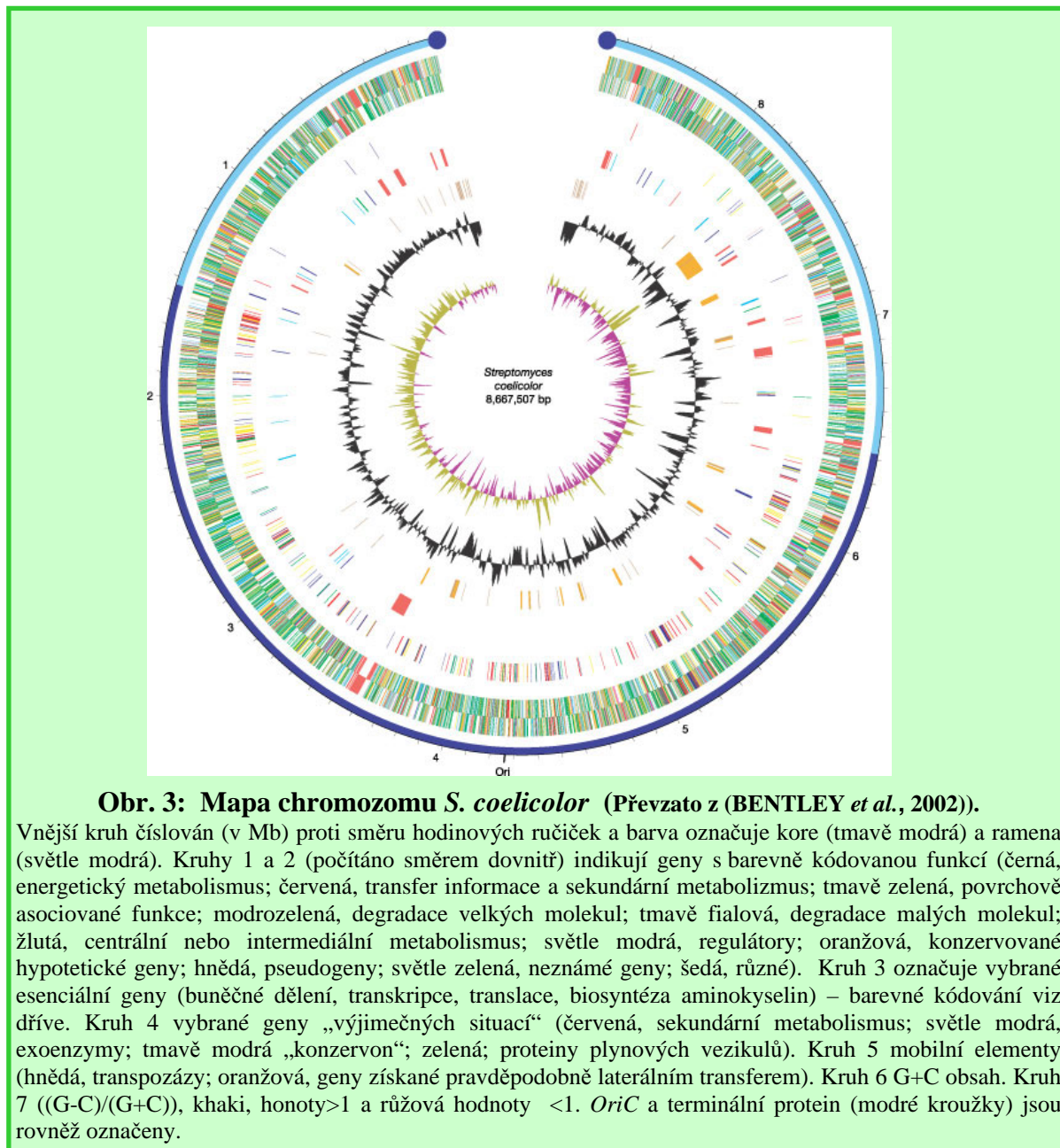
Červená část křivky indikuje fázi rychlého růstu I, modrá T-fázi, zelená odpovídá fázi rychlého růstu II a žlutá stacionární fázi.

Převzato z (VOHRADSKY *et al.*, 2000).

sekundárního metabolismu streptomycet je tedy do jisté míry koordinována s regulací jejich životního cyklu.

### 2.1.2. Genom streptomycet, streptomycety jako producenti antibiotik

Genom *S. coelicolor*, prvního zástupce streptomycet, jehož genom byl osekvenován (BENTLEY *et al.*, 2002) (Obr. 3), svědčí o významné roli streptomycet v koloběhu uhlíku i o složitém životním cyklu rodu *Streptomyces*:



**Obr. 3: Mapa chromozomu *S. coelicolor* (Převzato z (BENTLEY *et al.*, 2002)).**

Vnější kruh číslován (v Mb) proti směru hodinových ručiček a barva označuje kore (tmavě modrá) a ramena (světle modrá). Kruhy 1 a 2 (počítáno směrem dovnitř) indikují geny s barevně kódovanou funkcí (černá, energetický metabolismus; červená, transfer informace a sekundární metabolismus; tmavě zelená, povrchově asociované funkce; modrozelená, degradace velkých molekul; tmavě fialová, degradace malých molekul; žlutá, centrální nebo intermediální metabolismus; světle modrá, regulátory; oranžová, konzervované hypotetické geny; hnědá, pseudogeny; světle zelená, neznámé geny; šedá, různé). Kruh 3 označuje vybrané esenciální geny (buněčné dělení, transkripce, translace, biosyntéza aminokyselin) – barevné kódování viz dříve. Kruh 4 vybrané geny „výjimečných situací“ (červená, sekundární metabolismus; světle modrá, exoenzymy; tmavě modrá „konzervon“; zelená; proteiny plynových vezikulů). Kruh 5 mobilní elementy (hnědá, transpozázy; oranžová, geny získané pravděpodobně laterálním transferem). Kruh 6 G+C obsah. Kruh 7 ((G-C)/(G+C)), khaki, hodnoty >1 a růžová hodnoty <1. *OriC* a terminální protein (modré kroužky) jsou rovněž označeny.

- Svou velikostí (8 667 Mb) a počtem genů (7 825) řadí *S. coelicolor* mezi známými bakteriemi k těm s největším kódujícím potenciálem.
- Ve srovnání s jinými bakteriemi je na chromozomu velký počet regulačních genů. Ty jsou pravděpodobně zodpovědné za odpověď na stres a podněty z okolního prostředí.

- Chromozom *S. coelicolor* obsahuje i mnoho duplikovaných genových sad. Ty reprezentují „tkáňově specifické“ izoformy operující v odlišných fázích vývoje kolonie.
- 614 chromozomálně lokalizovaných transportérů (pro transport cukrů, aminokyselin a také „drug efflux proteiny“), které byly předpovězeny na základě sekvenční analýzy, nejspíše odráží mnohočetnost interakcí se složitým půdním prostředím.
- Schopnost využívat živiny v půdě je demonstrována 819 potenciálně sekretovanými proteiny, mezi nimiž jsou zvláště početné hydrolázy.

Chromozom je lineární s *oriC* přibližně uprostřed. V centrální části, o rozsahu *cca* jedné poloviny chromozomu, jsou lokalizovány geny, kódující primární buněčné funkce (buněčné dělení, replikaci, transkripci, translaci, biosyntézu aminokyselin, atd). Naopak, neesenciální lokusy kódující sekundární metabolity, hydrolázy aj., leží na ramenech chromozomu. Ramena jsou různě dlouhá 1,5Mb (levé) a 2,3 Mb (pravé) a nesou terminální repetice s kovalentně vázanými proteiny na 5'-koncích. Studie této oblasti chromozomu streptomycet ukazují, že se v úseku DNA o rozsahu více než 1 milion pb DNA na každém rameni v laboratorních podmínkách vyskytují rozsáhlé delece a amplifikace (VOLFF a ALTENBUCHNER, 1998).


S přibývajícím informacemi ze sekvenačních projektů (přehled viz. např. volně dostupná databáze „GOLD“ (BERNAL *et al.*, 2001) je zřejmé, že chromozomy streptomycet vykazuje v centrální části syntentii (konzervovanost genového uspořádání díky společnému předkovi) jednak vzájemnou, jednak sdílenou s chromozomy příbuzných organismů *Mycobacterium tuberculosis* a *Corynebacterium diptheriae* (FRIEND a HOPWOOD, 1971).

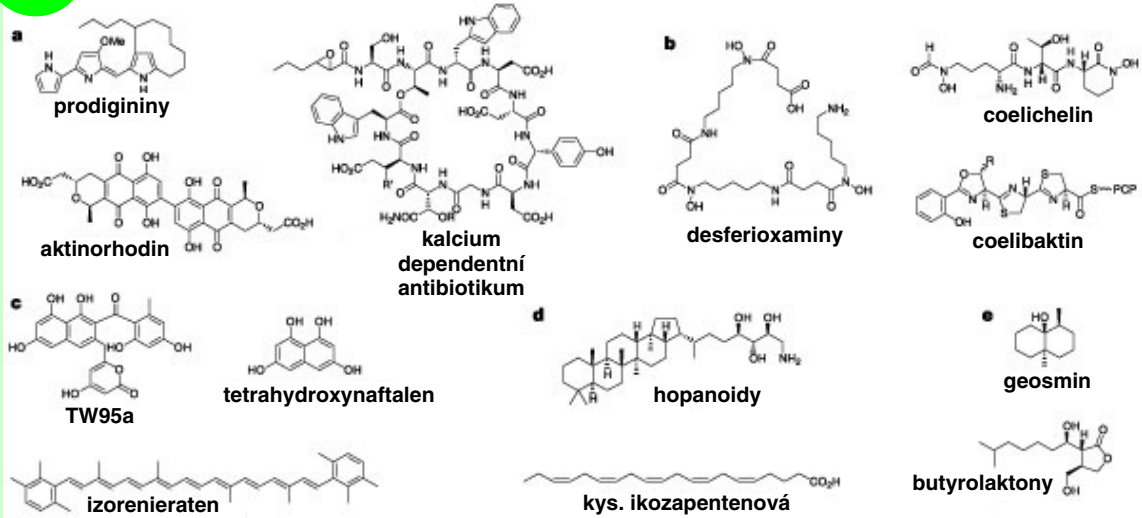
Jak již bylo zmíněno, genom *S. coelicolor* vykazuje silný důraz na regulace. Nachází se tu 965 (12,3%) genů s regulační funkcí. Tak vysoký počet je v souladu s pozorováním, že s rostoucí velikostí genomu roste i počet regulačních genů (STOVER *et al.*, 2000). Zároveň lze pozorovat jasnou preferenci určité skupiny regulátorů.

Zajímavý je např. počet  $\sigma$ -faktorů, proteinů, které se vážou ke kóře RNA-polymerázy a ovlivňují její promotorovou specifitu, čímž řídí selektivní transkripci genů. *S. coelicolor* kóduje 65  $\sigma$ -faktorů, z nichž 45 jsou tzv. ECF (extra cytoplasmic function). ECF  $\sigma$ -faktory odpovídají na externí podněty a aktivují geny zahrnuté v disulfidovém stresu, tvorbě vzdušného mycelia atd. (PAGET *et al.*, 2002). Většina zbylých  $\sigma$ -faktorů spadá do jedné skupiny, jejíž členové jsou obvykle zahrnuti v regulaci odpovědi na různé stresy. Tento počet „stresových“  $\sigma$ -faktorů může svědčit o nezávislé regulaci různých regulonů odpovědi na stres.

*S. coelicolor* disponuje také četnými dvousložkovými systémy. Bylo identifikováno 85 sensorových kinas a 79 regulátorů odpovědi, včetně 53 párů sensorová kinasa-regulátor odpovědi. Další zajímavostí genomu *S. coelicolor* je přítomnost 44 domnělých serin/threonin protein kináz. Tyto typicky eukaryotní regulátory jsou dnes sice známy i u jiných bakterií, ale jsou v nich výrazně méně četné.

Dalším zajímavým rysem chromozomu *S. coelicolor* je přítomnost více než dvaceti genových shluků determinujících syntézu známých i předpovídaných sekundárních metabolitů (Obr. 4). Ve druhém, plně osekvenovaném genomu streptomycet, genomu druhu *S. avermitilis* (IKEDA *et al.*, 2003), bylo takových shluků nalezeno 30. Zjištění, že v jediném kmeni je přítomnost více genových shluků pro různé sekundární metabolity podporuje představu, že k velké diverzitě sekundárních metabolitů u streptomycet přispívá horizontální genový transfer a výrazná výměna genetického materiálu (DONADIO *et al.*, 2002).

A


B


**Obr. 4: Sekundární metabolity streptomycet.**

A. Typický vzhled kolonií streptomycet izolovaných z půdy. Kolonie často exkretují různobarevné pigmenty, čímž poskytují možnost vizuální inspekce biosyntézy sekundárních metabolitů. Převzato z Thompson *et.al.*, 2002.

B. Sekundární metabolity známé nebo predikované z *S. coelicolor* A3(2), seskupené podle jejich pravděpodobné funkce: (a) antibiotika (b) siderofory (c) pigmenty (d) lipidy a (e) jiné molekuly. Převzato z (BENTLEY *et al.*, 2002).

- 15 -

---

Schopnost produkce sekundárních metabolitů je u streptomycet obecně velice rozšířená. Rod *Streptomyces* produkuje mnoho farmaceuticky a průmyslově využívaných látek s protinádorovou, imunosupresivní, herbicidní, antifungální aj. aktivitou a více než dvě třetiny dnes využívaných antibiotik přírodního původu (BENTLEY *et al.*, 2002). S pomocí matematického modelování (WATVE *et al.*, 2001) bylo odhadnuto, že ze všech antibakteriálních agens, syntetizovaných zástupci rodu *Streptomyces*, byla dosud popsána pouhá 3%.

### 2.1.3. Geny pro biosyntézu antibiotik jsou organizovány a koregulovány ve shlucích

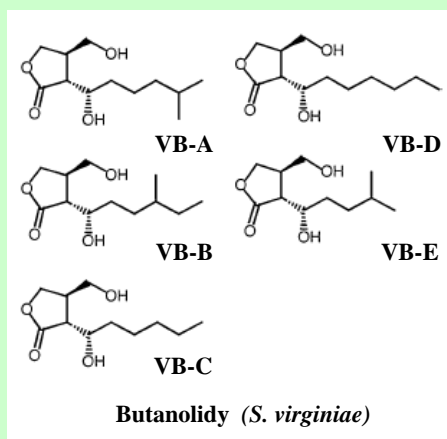
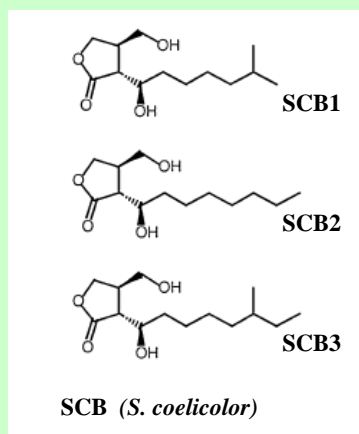
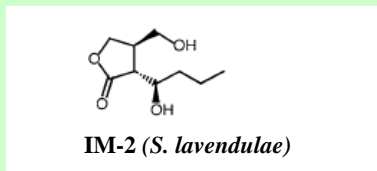
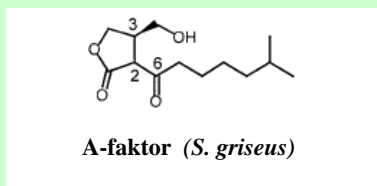
Geny pro produkci jednotlivých sekundárních metabolitů jsou, až na výjimky (BIBB, 2005), uspořádány ve shlucích (HOPWOOD *et al.*, 1995), jejichž velikost se pohybuje od několika málo do více než 100 kb (BENTLEY *et al.*, 2002). Geny kódující biosyntetické enzymy jsou ve shlucích doprovázeny geny pro rezistenci k produkovanému antibiotiku a někdy také geny regulačními, tzv. drahově specifickými regulátory. Tyto genové shluky, označované jako ostrůvky sekundárního metabolismu (*secondary metabolic islands*, SMILE) (THOMPSON *et al.*, 2002), jsou obvykle lokalizovány na chromozomu, jsou koregulované a funkční v heterologních druzích. SMILE byly pravděpodobně získány horizontálním přenosem, o čemž svědčí geny nelegitimní rekombinace (integrázy, transposázy) nalézané příležitostně uvnitř, nebo v sousedství genových shluků (OMURA *et al.*, 2001; BENTLEY *et al.*, 2002).

Charakteristickými rysy regulace sekundárního metabolismu streptomycet jsou pestrost a komplikovanost. Sekundární metabolity udělují adaptivní výhody, jejichž podstata není často ještě ani plně pochopena. To platí i pro antibiotika, jejichž antibiotická aktivita nemusí být primární funkcí těchto látek v přírodě (BIBB, 2005). Různé genové shluky sekundárního metabolismu tedy pravděpodobně reagují na stres a pestré soubory fyziologických a environmentálních signálů. Navíc je sekundární metabolismus obvykle koordinován s fází životního cyklu, která podléhá vlastním regulačním prvkům, což regulaci dále komplikuje.

Přes tuto složitost lze v regulaci produkce antibiotik vysledovat alespoň několik obecných motivů (CHATER a BIBB, 1997). Některé z nich jsou uvedeny níže.

- Geny pro biosyntézu antibiotik se zdají být regulovány především na úrovni transkripce (CHATER a BIBB, 1997).
- Mnohé, ne-li všechny streptomycety produkují  $\gamma$ -butyrolaktony (BIBB, 2005; HORINOUCI a BEPPU, 2007) (Obr. 5), které u řady druhů hrají roli v počátku produkce sekundárních metabolitů. Je předmětem sporu, zda tyto molekuly fungují jako indikátory populační hustoty nebo jsou produkovány spíše jako odpověď na nějaký signál (např. limitaci živinami). Nejprostudovanějším  $\gamma$ -butyrolaktonem je tzv. A-faktor (2-izokapryloyl-3R-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolakton); přehledné publikace viz. (HORINOUCI a BEPPU, 2007; NISHIDA *et al.*, 2007). Tento  $\gamma$ -butyrolakton je potřebný pro morfologickou diferenciaci a produkci streptomycinu a grizazonu u *S. griseus*. Pro svou syntézu vyžaduje produkt genu *afsA* (ANDO *et al.*, 1997) a před počátkem biosyntézy streptomycinu se hromadí v médiu. Volně difunduje přes cytoplasmatickou membránu a s vysokou afinitou se váže na cytoplasmatický protein ArpA (ONAKA *et al.*, 1995). Po navázání A-faktoru ArpA uvolňuje transkripční represi pleiotropního regulačního genu *adpA*, kodujícího transkripční faktor. AdpA přímo aktivuje transkripci genů sekundárního metabolismu (*strR*) a morfologické diferenciaci (*amfR*) (OHNISHI *et al.*, 1999; OHNISHI *et al.*, 2005).





**Obr. 5:** A - faktor a některé jeho homology produkované streptomycetami.

Převzato z (HORINOUCHI a BEPPU, 2007)

Podobné kaskády zahrnující  $\gamma$ -butyrolaktony byly identifikovány ve *S. virginiae* (OKAMOTO *et al.*, 1995), *S. lavendulae* (KITANI *et al.*, 2001) aj. Ty však většinou regulují jen produkci sekundárních metabolitů, nikoli morfologickou diferenciaci (BIBB, 2005).

- Vedle  $\gamma$ -butyrolaktonů existují i jiné extracelulární signální molekuly, které ovlivňují syntézu sekundárních metabolitů u streptomycet. Např. PI faktor, 2,3-diamino 2,3-bis(hydroxymethyl) -1,4-butanediol, vyvolává syntézu antifungálního glykosylovaného polyenu pimaricinu u *S. natalensis* (RECIO *et al.*, 2004).

- Další třídu malých signálních molekul představují oligopeptidy. Akumulace exogenního S-adenosyl-methioninu zvyšuje hladinu transportérů oligopeptidů zahrnutých v regulaci produkce aktinorhodinu a undecylprodigiozinu ve *S. coelicolor*. Detailní mechanismus není znám (PARK *et al.*, 2005).

- Literární prameny svědčí o tom, že redukce růstové rychlosti je důležitým signálem pro spuštění sekundárního metabolismu.

U řady bakterií bývá s regulací genové exprese růstovou rychlostí spojována akumulace vysoce fosforylovaného guanozinového nukleotidu (p)ppGpp (GRALLA, 2005). U *S. coelicolor* je v podmínkách limitace dusíkem pro produkci antibiotik vyžadována syntetáza ppGpp (RelA) asociovaná s ribozómem (CHAKRABURTTY a BIBB, 1997). Není jasné, zda je v tomto případě, ppGpp přímo zahrnut v regulaci transkripce genů biosyntézy antibiotik, nebo zda je produkce antibiotik jen nepřímým následkem snížení růstové rychlosti

---

podníčené inhibicí syntézy rRNA zprostředkovanou pomocí ppGpp. Dosud nejpřesvědčivější důkaz o přímé roli ppGpp v aktivaci biosyntetických genů antibiotik podal pokus, v němž byl použit modifikovaný gen *relA* k indukci syntézy ppGpp v *S. coelicolor* při nesnížené růstové rychlosti. V takových podmínkách zároveň došlo k transkripci *actIII-orf4*, drahově specifického regulátorového genu pro produkci aktinorhodinu (HESKETH *et al.*, 2001). Mechanismus není přesně znám, ale je zajímavé zmínit, že mutace v  $\beta$ -podjednotce RNA-polymerázy (XU *et al.*, 2002) udílející rezistenci k rifampicinu a umožňující obejít požadavek syntézy ppGpp pro aktivaci produkce antibiotik, pravděpodobně napodobují efekt vazby ppGpp k RNA polymeráze (TOULOKHONOV *et al.*, 2001) a uzamykají ji tak v konformaci dovolující či upřednostňující transkripci shluků genů sekundárního metabolismu.

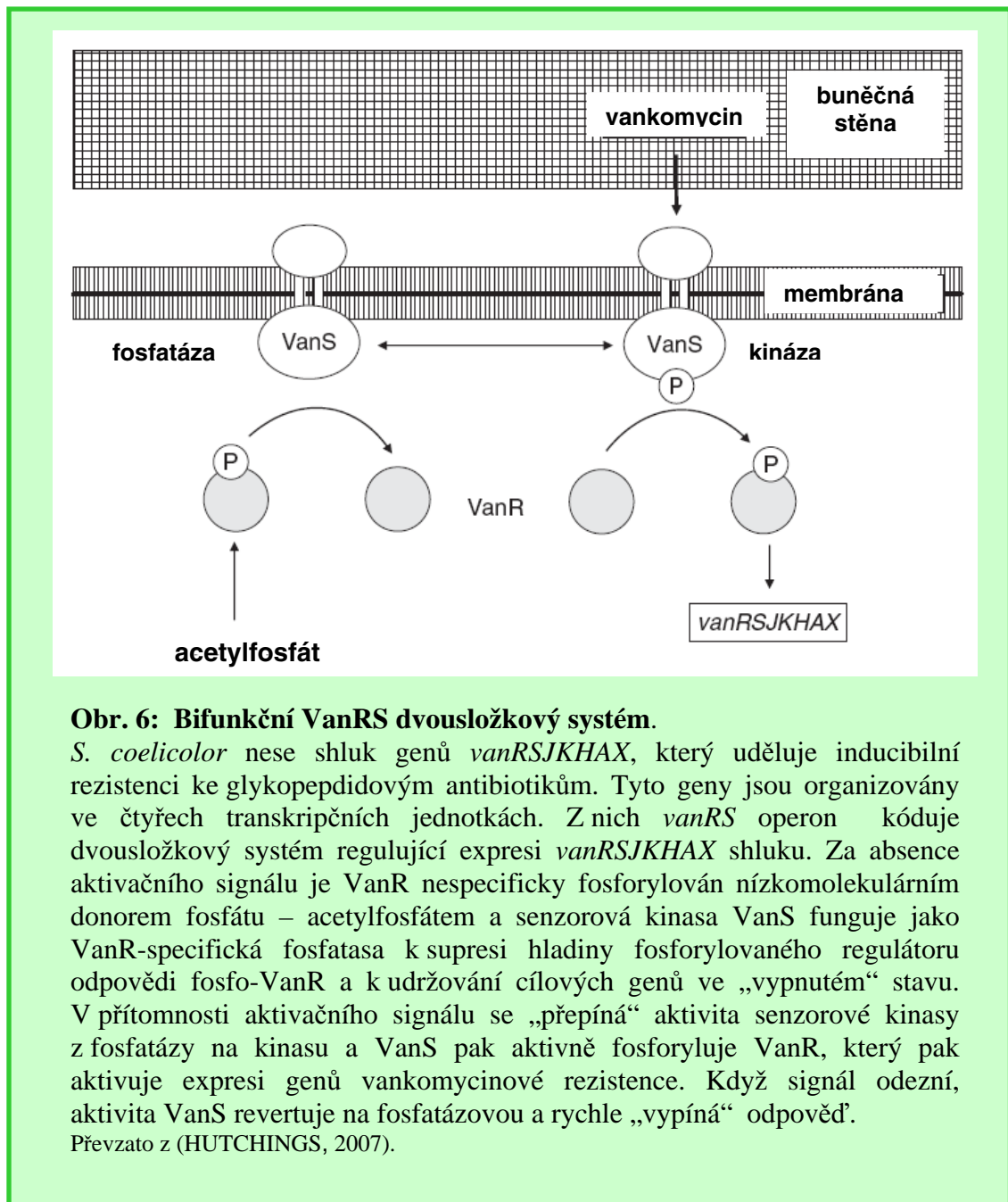
Zatímco RelA je v podmínkách limitace dusíkem pro produkci antibiotik ve *S. coelicolor* absolutně vyžadován, v podmínkách limitace fosfátem je postradatelný. Tvorbu antibiotik tedy musí iniciovat mechanismus nezávislý na ppGpp. Nadměrná hladina anorganického fosfátu v kultivačním médiu brání produkci mnoha strukturálně nezávislých sekundárních metabolitů (MARTIN, 2004) a alespoň v některých případech se to odráží v represi transkripce biosyntetických genových shluků (MCDOWALL *et al.*, 1999; GIL a CAMPELO-DIEZ, 2003). Mechanismus potlačení sekundárního metabolismu zvýšenou hladinou intracelulárního fosfátu není dosud znám.

- cAMP slouží v prokaryotních i eukaryotních mikroorganizmech jako nízkomolekulární signální molekula. Studium mutanty *S. coelicolor* defektní v genu kódujícím adenylát cyklázu ukázalo, že nejzřetelnější změny zprostředkované cAMP zahrnovaly pro T fázi specifický přechod od acidogenního k alkaligennímu metabolismu. Podle modelu navrženého autory pokusu, zprostředkovává cAMP „přepnutí“ metabolismu uhlíku důležitého pro germinaci, obnovení růstu během tvorby vzdušného mycelia i biosyntézu antibiotik (SUSSTRUNK *et al.*, 1998).
- Dalším regulačním principem, zahrnutým v aktivaci biosyntézy antibiotik, je fosforylace proteinů. Jedná se zejména o využívání členů rodiny tzv. dvousložkových systémů sensorová kinasa/regulátor odpovědi.

V klasickém modelu dvousložkového systému extracelulární doména transmembránové sensorové kiny, jako odpověď na specifický signál autofosforyluje svou intracelulární doménu a převede fosfátovou skupinu na rozpoznávaný regulátor odpovědi. Aktivovaný regulátor odpovědi pak „přepíná“ cílové geny. U bakterií se počet environmentálních podnětů, na něž mohou odpovídat, zdá být ve vztahu s počtem sensorových kinas kódovaných jejich genomem (KIM a FORST, 2001). Modelový organismus *S. coelicolor* nese 164 genů pro dvousložkový přenos signálu. Ty zahrnují 84 sensorových kinas a 80 regulátorů odpovědi, z nichž 67 leží na chromozomu v sousedství a předpokládá se, že tvoří dvousložkové systémy (HUTCHINGS *et al.*, 2004).

Nyní se ukazuje, že ne všechny dvousložkové systémy aktinobakterií, mezi něž jsou streptomycety taxonomicky řazeny, vyhovují výše zmíněnému klasickému modelu. Variace komponent samotných zahrnují bifunkční sensorové kiny, které mohou fungovat jako kinázy i fosfatázy (obr.6). Ukázalo se, že disrupce genu pro bifunkční sensorovou kinasu může vést k dialogu mezi regulátorem odpovědi a nepříbuznou sensorovou kinasou nebo k fosforylaci nízkomolekulárním donorem fosfátu jako je acetylfosfát. Byly popsány i větvené dráhy, v nichž jedna sensorová kinasa může aktivovat více regulátorů odpovědi, nebo kde více sensorových kinas

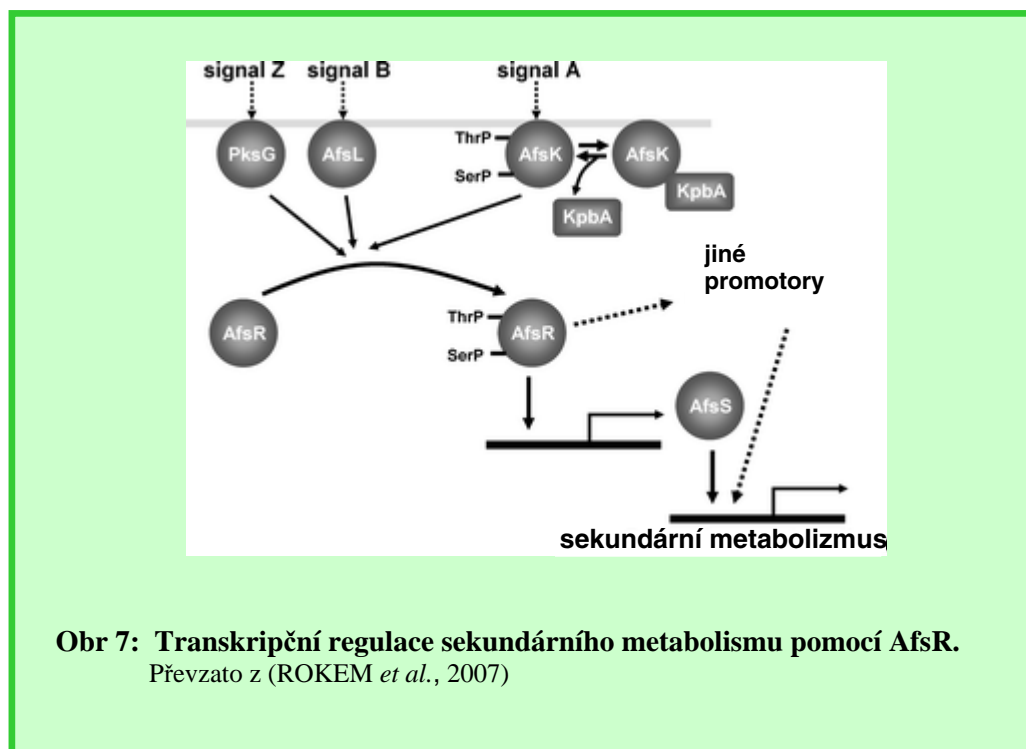
může komunikovat s jedním regulátorem odpovědi. Byly popsány i tříložkové systémy, v nichž je aktivita sensorové kinasy či regulátoru odpovědi modulována přídatným proteinem (HUTCHINGS, 2007).



- Ačkoli jsou minoritní  $\sigma$ -faktory často vyžadovány pro transkripci genů pro produkci antibiotik, neexistuje žádný důkaz, že se jich účastní nějaká speciální vývojová větev  $\sigma$  faktorů (CHATER a BIBB, 1997) Streptomycey obsahují velký počet různých  $\sigma$  faktorů (63 *S. coelicolor* (BENTLEY *et al.*, 2002) a 60 *S. avermitilis* (IKEDA *et al.*, 2003) navíc, jsou jejich promotory velmi odlišné co do sekvence i složitosti (STROHL,

1992), takže se zdá pravěpodobné, že regulace sekundárního metabolismu se může účastnit více minoritních  $\sigma$  faktorů.

- Kromě biosyntetických enzymů kódují geny shluků biosyntézy antibiotik často i tzv. drahově specifické regulátory. Mnoho z nich jsou členové proteinové rodiny SARP (streptomycete antibiotic regulatory protein) (WIETZORREK a BIBB, 1997). Jde o transkripční aktivátory, jejichž molekula obsahuje na N-konci motiv „helix-turn-helix“. Příkladem takových regulátorů u *S. coelicolor* jsou proteiny kódované geny *actII-orf4* (řídí biosyntézu aktinorhodinu) (FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 1991; ARIAS *et al.*, 1999) a *redD* (řídí biosyntézu undecylprodigiozinu) (TAKANO *et al.*, 1992; WHITE a BIBB, 1997).
- Regulační geny tzv. „vyšší úrovně“ uplatňují pleiotropní efekt na produkci mnohých sekundárních metabolitů. Příkladem je protein AfsR ze *S. coelicolor* (Obr 7). AfsR je součástí regulační kaskády operující následovně: AfsK, protein volně spojený s membránou se aktivuje autofosforylací s pomocí KbpA a poté fosforyluje protein AfsR, volně přítomný v cytoplasmě, čímž podstatně zvýší jeho DNA-vazebnou schopnost. Fosforylovaný AfsR pak vytváří komplex s RNA-polymerázou a aktivuje transkripci transkripčního faktoru AfsS, který dále aktivuje transkripci genů kódujících drahově specifické regulátory, např. ActII-orf4 a RedD (detaily viz. výše). AfsR je fosforylován i jinými kinasami, což naznačuje jeho důležitou roli v četných aktivitách buňky. Příslušné kinasy byly již identifikovány, signály pro jejich aktivaci nikoli (ROKEM *et al.*, 2007).



**Obr 7: Transkripční regulace sekundárního metabolismu pomocí AfsR.**

Převzato z (ROKEM *et al.*, 2007)

- Společné prvky genetické kontroly morfologické diferenciaci streptomycet a biosyntézy antibiotik vykazují pleiotropní mutanty *S. coelicolor* řady *bld*. Tyto mutanty jsou defektní v tvorbě vzdušného mycelia nikoliv však v růstu (KELEMEN a BUTTNER, 1999; CHATER, 2001) a většina z nich i v produkci antibiotik

aktinorhodinu, prodigiozinu a methylenomycinu (CHAMPNESS a CHATER, 1994). U některých tříd *bld* mutant může být defekt v morfologické diferenciaci potlačen výživově nebo někdy křížovou stimulací difuzibilními faktory. Potlačení pleiotropního defektu v produkci antibiotik bylo pozorováno jen v několika případech a až na výjimky (např. *bldH*) obecně ne v podmínkách, které potlačují morfologickou deficienci (CHATER a BIBB, 1997).

Relativně nejvíce je efekt mutace prozkoumán v případě *bldA* (Obr.8). *bldA* gen *S. coelicolor* kóduje, podle sekvenční studie a kodon-antikodon rozpoznávacích pravidel (CRICK, 1966; BENTLEY *et al.*, 2002), jedinou tRNA, která ve *S. coelicolor* účinně překládá řídké se vyskytující kodon pro leucin UUA (LESKIW *et al.*, 1991a; LESKIW *et al.*, 1991b). Tato tRNA není nezbytně nutná pro růst, ale je vyžadována pro některé aspekty sekundárního metabolismu a morfologické diferenciaci, jak bylo zjištěno na základě studia fenotypu *bldA* mutant v různých streptomycetách (LESKIW *et al.*, 1991a; KWAK *et al.*, 1996; TREPANIER *et al.*, 2002).

Na základě informací ze čtyř projektů sekvenace genomu streptomycet se teď zdá, že:



**Obr. 8: Efekt mutace v *bldA* genu.**

Kolonie vlevo je normální, s „práškovitým“ sporovým povrchem a částmi zbarvenými pigmentovaným antibiotikem. Kolonie vpravo postrádá *bldA* gen, je svraštělá, lesklá, na povrchu nesporulující a nepigmentovaná.

Převzato z (CHATER, 2006).

1) streptomycety obvykle obsahují asi 2-3% genů s TTA kodony, z nichž většina byla získána horizontálním přenosem (CHATER a CHANDRA, 2006; HESKETH *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007).

2) TTA kodony jsou ve streptomycetách málo četné ve srovnání s jinými genomy aktinobakterií, včetně *Frankia* a *Nocardia farcinica* (CHATER a CHANDRA, 2006; LI *et al.*, 2007), které mají srovnatelně vysoký obsah GC v DNA.

3) Pozice TTA kodonů uvnitř genů vykazují silnou tendenci k lokalizaci na počátku kódující sekvence než v genech u jiných aktinomycet (LESKIW *et al.*, 1991a; FUGLSANG, 2005), což může být účinnější při eliminaci translace v případě, že je snížena hladina *bldA* tRNA (LESKIW *et al.*, 1991a; CHATER a CHANDRA, 2008).

Přítomnost UUA kodonu v mRNA streptomycet obecně zapříčiňuje zpoždění v jejich translaci a to ve vztahu ke stáří kultury. (Leskiw *et al.*, 1993). *BldA* tRNA je pak hojnější ve stacionární fázi, než během růstu (Leskiw *et al.*, 1993 a Trepainer 1997), což obecně není pravidlem pro běžné tRNA, které se řídí pravidly stringentní kontroly (Strauch *et al.* 1991; Chakraburty and Bibb, 1997).

Bylo popsáno několik různých způsobů zprostředkování vlivu *bldA* na produkci sekundárních metabolitů:

- 1) Vliv na produkci antibiotik aktinorhodinu, undecylprodigiozinu a methylenomycinu ve *S. coelicolor* je zprostředkován pomocí TTA-obsahujících „drahově specifických regulačních genů“ (Fernandez-Moreno *et al.*, 1991; O'Rourke, 2003; Chater, 2006). Produkce aktinorhodinu i undecylprodigiozinu je však obnovitelná zvýšením genové dávky genu pro příslušný „drahově specifický“ regulátor (WHITE a BIBB, 1997). Do určité míry je tedy *bldA* nezávislá translace možná, vysvětluje se však mistranslací kodonu na bohatém médiu či na minimálním médiu se sníženou hladinou fosfátu (GUTHRIE a CHATER, 1990; WHITE a BIBB, 1997).
- 2) Produkce streptomycinu ve *S. griseus* závisí na *bldA* na více úrovních (TTA kodony obsahuje gen *adpA* - globální regulátor i gen *strR* - drahově specifický regulátor) (CHATER a CHANDRA, 2008).
- 3) Dále např. v biosyntéze puromycinu ve *S. alboniger* byla *bldA* dependence připisána strukturálním genům (*pur6* a *pur10*) (CHATER a CHANDRA, 2008).

Pokud jde o roli TTA obsahujících genů, zdá se, že udělují adaptační výhodu v určitých prostředích či okolnostech, které se obvykle v laboratoři nedaří reprodukovat (přítomnost jiných mikroorganismů, rostlin, účinek bakteriofágů, přítomnost chemických antagonistů či působení fyzikálních faktorů). Z tohoto pohledu může být hladina *bldA* tRNA citlivá k nějakému spíše obecnému odchýlení od ideálních růstových podmínek, snad přímo přes senzorový systém jako je stringentní odpověď, nebo nepřímo pomocí sledování rychlosti růstu. Jednotlivé TTA obsahující geny by pak pravděpodobně byly také podrobeny různým senzorovým vstupům. To odpovídá představě, že posloupnost vývoje *S. coelicolor* řídí mnohočetné kontrolní body (CHATER a CHANDRA, 2008).

Závěrem je třeba připomenout, že současné práce svědčí o mnohem větší složitosti regulace sekundárního metabolismu, než jaká se původně předpokládala. Tradiční představa hierarchického uspořádání kontroly antibiotické produkce, kde pleiotropní regulátory „vyšší úrovně“ aktivují „drahově specifické“ regulátory lokalizované uvnitř příslušných genových shluků, je dnes vyvrácena studiemi, které svědčí pro přítomnost rozsáhlého dialogu mezi různými drahami pro přenos signálu. Bylo např. zjištěno, že regulátory, původně považované za „drahově specifické“ ovlivňují nejen jiné genové shluky (a tedy pleiotropní efekt), ale i regulátory „vyšší úrovně“ jako je *afsR2/afsS*. Navíc se zdá, že klíčové aspekty genové exprese v *S. coelicolor* jsou na úrovni procesování RNA modulovány činností homologu RNázy III, AbsB (HUANG *et al.*, 2005).

## **2.2. Biosyntetické enzymy sekundárního metabolismu; příbuzné enzymy; získávání nových antibiotik manipulací; hybridní antibiotika**

Jak již bylo řečeno v úvodu, rozvoj rezistencí (CHARLES a GRAYSON, 2004; D'COSTA *et al.*, 2006) na straně jedné a omezení produkce nových antibiotik (CHARLES a GRAYSON, 2004; MUKHOPADHYAY a PETERSON, 2006) na straně druhé, představují podle WHO závažný problém veřejného zdravotnictví (WHO, 2001).

Za jednu z velmi nadějných cest k rozšíření spektra antimikrobních látek jsou dnes považovány cílené zásahy do biosyntetických drah antibiotik pomocí metod molekulární biologie – tzv. kombinatoriální genetika (COATES a HU, 2007). Takto lze vytvářet kombinace genů pocházejících z různých genových shluků *in vivo*, které vedou k produkci hybridních látek s novými biologickými aktivitami.

## 2.2.1. Syntéza hybridních antibiotik

Nejprostudovanějším modelem pro přípravu hybridních antibiotik jsou polyketidová a peptidová antibiotika (BALTZ, 1998; HUTCHINSON, 1998; WEISSMAN a LEADLAY, 2005).

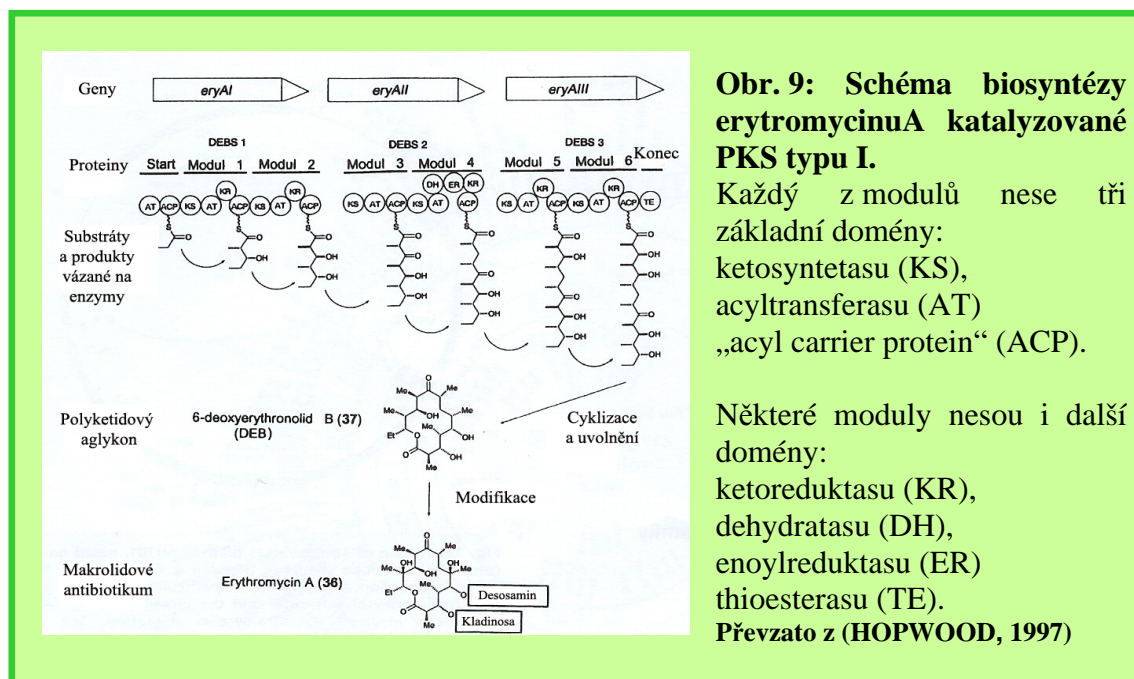
Přestože jde o strukturálně velmi odlišné látky, mechanismus jejich biosyntézy je v některých ohledech podobný (CANE a WALSH, 1999) (Obr. 9). Biosyntéza jejich základních skeletů je řízena modulárními nebo vícepodjednotkovými enzymy – syntasami. Syntetasy v obou případech katalyzují opakovanou kondenzaci malých základních jednotek. V případě polyketidů jsou thioesterovou vazbou vzájemně spojovány aktivované jednoduché karboxylové kyseliny, v případě neribozomálně syntetizovaných peptidů jsou peptidovou vazbou spojovány aminokyseliny, aktivované ve formě aminoacyladenylátu. Základní skelet bývá dále modifikován (tzv. kosmetickými úpravami, cosmetic after events) pomocí enzymů jako jsou glykosyltransferasy, methyltransferasy, oxygenasy, halogenasy atd. (BALTZ, 1998; RIX *et al.*, 2002).

### 2.2.1.1. Modulární enzymy

Tento typ syntasy, kam jsou řazeny polyketid syntetasy (PKS, polyketide synthase) typu I a syntetasy neribozomálních peptidů (NRPS, nonribosomal polypeptide synthase), je tvořen jedním nebo několika velkými proteinovými řetězci. Každý řetězec je organizován v tzv. moduly (skupiny několika aktivních míst). Každý modul nese všechny enzymatické aktivity (označované jako domény) nutné k rozpoznání, aktivaci, kovalentnímu navázání a někdy i modifikaci jedné základní jednotky (MOOTZ *et al.*, 2002). Každé aktivní místo na všech modulech pracuje během syntézy pouze jednou (neiterativní enzymy).

Modulární proteiny jsou kódovány modulárními geny (Obr. 9).

Zdrojem strukturální pestrosti syntetizovaných látek je počet, druh, pořadí a různé modifikace (methylace, redukce, cyklizace, dehydratace,...) prováděné některými moduly, ale také modifikace základního skeletu po ukončení jeho syntézy (tzv. kosmetické úpravy; cosmetic after events).



---

Produkty NRPS, na rozdíl od peptidů syntetizovaných ribozomálně, mají inkorporovány vedle proteinogenních i hydroxy- či karboxylové kyseliny. Mohou být nejen lineární, nýbrž i cyklické nebo větvené, .. (MOOTZ *et al.*, 2002).

PKS typu I se podílejí na syntéze např. erytromycinu, avermektinu, tylozinu atd. NRPS se účastní biosyntézy např. cyklosporinu, gramicidinu S, bacitracinu, atd. (CANE a WALSH, 1999; MOOTZ *et al.*, 2000).

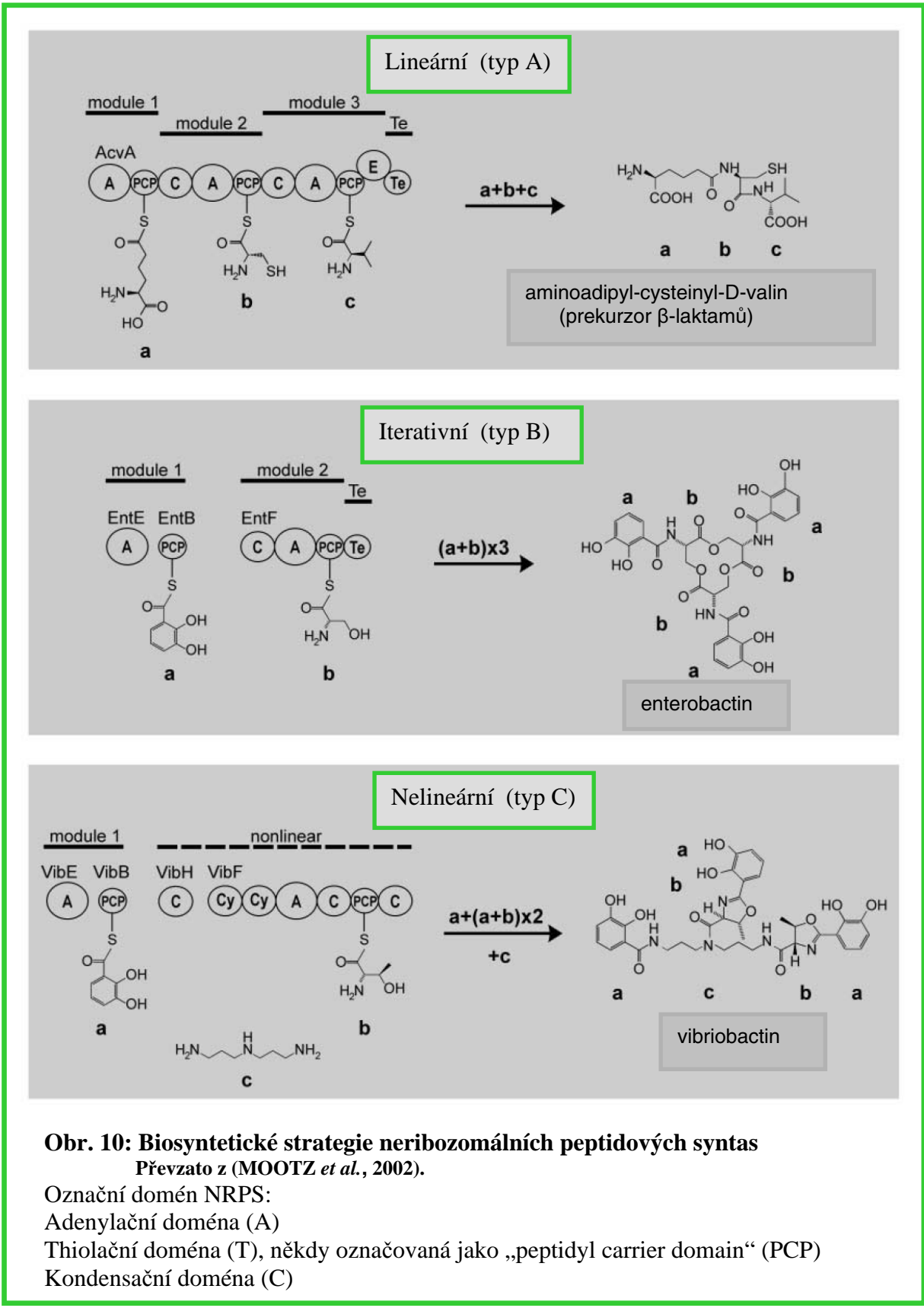
### **2.2.1.2. Vícepodjednotkové enzymy**

K vícepodjednotkovým enzymům jsou počítány polyketid syntetasy (PKS, polyketide synthase) typu II. Jsou složeny z několika velkých polypeptidových řetězců (podjednotky enzymu), obvykle monofunkčních. Zařazení každé jedné základní jednotky do vznikajícího polyketidu je opakovaně katalyzováno vždy stejnou sadou podjednotek enzymu.

PKS typu II se podílejí na syntéze aktinorodinu, daunorubicinu, tetracenomycinu, atd. (BALTZ, 1998).

Postupem času se ukazuje, že výše zmíněné enzymy mají mnohem větší strukturální a funkční diverzitu, než plyne z výše popsaných základních typů (SHEN, 2003). Např. kromě zmíněných dvou typů PKS existuje typ III, který nepotřebuje tzv. acyl nosičový protein; „acyl carrier protein“ (ACP) k aktivaci acylCoA substrátů (FUNA *et al.*, 1999; SHEN, 2003). Byly popsány také PKS, které vytvářejí namísto obvyklých C-C vazeb také vazby C-O, iterativní PKS typu I, neiterativní PKS typu II atd. (SHEN, 2003). V biosyntéze leinamycinu byl nalezen i PKS-NRPS hybridní enzym (TANG *et al.*, 2004). Vedle základního typu NRPS byly popsány také iterativní NRPS (označované jako typ B) a nelineární NRPS (označované jako typ C) (MOOTZ *et al.*, 2002) (Obr. 10).





---

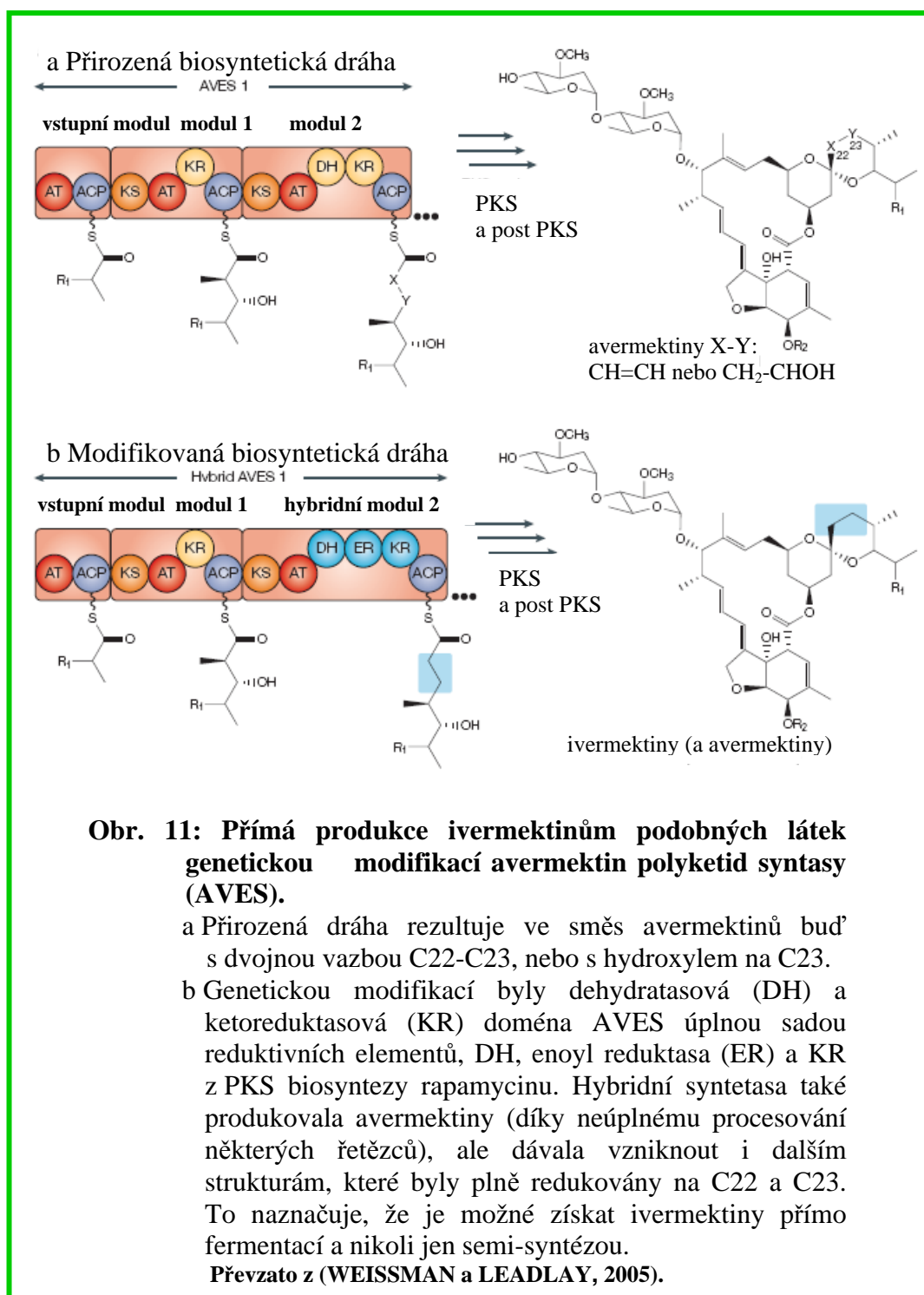
### 2.2.1.3. Využití genových manipulací k přípravě nových antibiotik. Hybridní antibiotika.

Jak již bylo zmíněno, rozvoj rezistencí vyžaduje vývoj stále nových antimikrobních látek, které se od těch známých liší mechanismem účinku ale i jinými vhodnými vlastnostmi. Dobrým zdrojem dlouhým vývojem „ověřených“ „základních skeletů struktur“ jsou přírodní látky (WEIST a SUSSMUTH, 2005). Nové (a v přírodě obvykle neznámé) kombinace takových „osvědčených“ strukturálních prvků představují také tzv. hybridní antibiotika, která Hutchinson (HUTCHINSON, 1997) vymezuje jako nové metabolity vznikající z nově sestavených kombinací genů, kterých je dosaženo buď zavedením genů z jednoho mikroorganismu do jiného, nebo cílenou mutagenézí genů sekundárního metabolismu v rámci jednoho producenta.

Princip přípravy hybridních antibiotik poprvé demonstrovali Hopwood a spolupracovníci (HOPWOOD *et al.*, 1985), kteří transformovali producenta granaticinu *S. violaceoruber* souborem genů pro biosyntézu aktinorhodinu. Výsledkem byla produkce dihydrogranatirhodinu. Stejná skupina popsala také zavedení části genového shluků pro biosyntézu aktinorhodinu do medermycin produkujícího kmene, což vedlo k produkci medenorhodinů A a B. Další přístupů a strategií jak generovat nové metabolity bylo již popsáno mnoho (pro přehled uvádím některá review: (STROHL, 2001; WEISSMAN a LEADLAY, 2005; BALTZ, 2006; OH *et al.*, 2007).

Nejpestřejší paleta nových látek byla získána v případě polyketidů, modulární organizace jejich syntetáz (PKS) totiž skýtá jedinečnou možnost produkovat nové chemické entity. Řízenou manipulací domén bylo možno zkrátit (MARTIN *et al.*, 2003) a prodloužit (ROWE *et al.*, 2001) délku řetězce, změnit výběr startovací jednotky (LONG *et al.*, 2002) a stavebních kamenů (DEL VECCHIO *et al.*, 2003; PETKOVIC *et al.*, 2003) a také modifikovat úroveň  $\beta$ -ketoredukce (GAISSER *et al.*, 2003) (Obr 11). Přesun celých modulů nebo subjednotek PKS v divokých i mutovaných formách dal vznik dalším hybridům několika polyketidů (REEVES *et al.*, 2004).

Produkce nových metabolitů výše uvedenými postupy bývá označována jako „kombinatoriální biosyntéza“ a uvádí se, že takto bylo připraveno již několik stovek nových polyketidů (WEISSMAN a LEADLAY, 2005).



---

### 2.2.2. Oxygenasy

V biosyntéze antibiotik jsou oxygenasy využívány jak k syntéze základních skeletů (biosyntesa novobiocinu, (PACHOLEC *et al.*, 2005)), tak k tzv. kosmetickým úpravám („cosmetic after events“, biosyntéza polyketidů, (KATZ, 1997)). Jejich další významnou rolí v buňkách je např. detoxikace.

Oxygenasy jsou systematicky řazeny do třídy oxidoreduktas. Katalyzují oxidativní reakce, v nichž jsou atomy molekuly kyslíku přímo inkorporovány do molekuly substrátu (NELSON a COX, 2000). Tento typ oxidace není nikdy spojen s možností konzervovat energii pro další použití a svědčí spíše o regulačním a syntetickém významu oxygenačních reakcí (JINDRA *et al.*, 1985).

Substráty oxygenas jsou ve srovnání s intermediárními metabolity, které mají převážně charakter iontů, často nepolární nebo málo polární sloučeniny, u nichž je z energetických důvodů prakticky nemožné uskutečnit např. hydroxylaci kombinací dehydrogenace a hydratace, jako v intermediárním metabolismu. Zde je třeba využít mnohem účinnější oxidační činidlo – molekulární kyslík (ŠÍPAL *et al.*, 1992).

Molekulární kyslík je pro biologické systémy výhodné reagens, neboť jeho vysoká potenciální reaktivita je „držena na uzdě“ jeho molekulární strukturou. Podle teorie molekulových orbitalů má totiž molekulární kyslík v elektronovém základním stavu dva nespárované elektrony v nejvyšších obsazených molekulových orbitalech (proto je označován jako tripletní biradikál). Naopak, organické látky jsou obvykle v singletním základním stavu se spárovanými elektrony a přímá reakce tripletního kyslíku se singletní organickou molekulou by porušila základní fyzikální princip, zachování momentu hybnosti. Proto je tzv. „spinově zakázaná“.

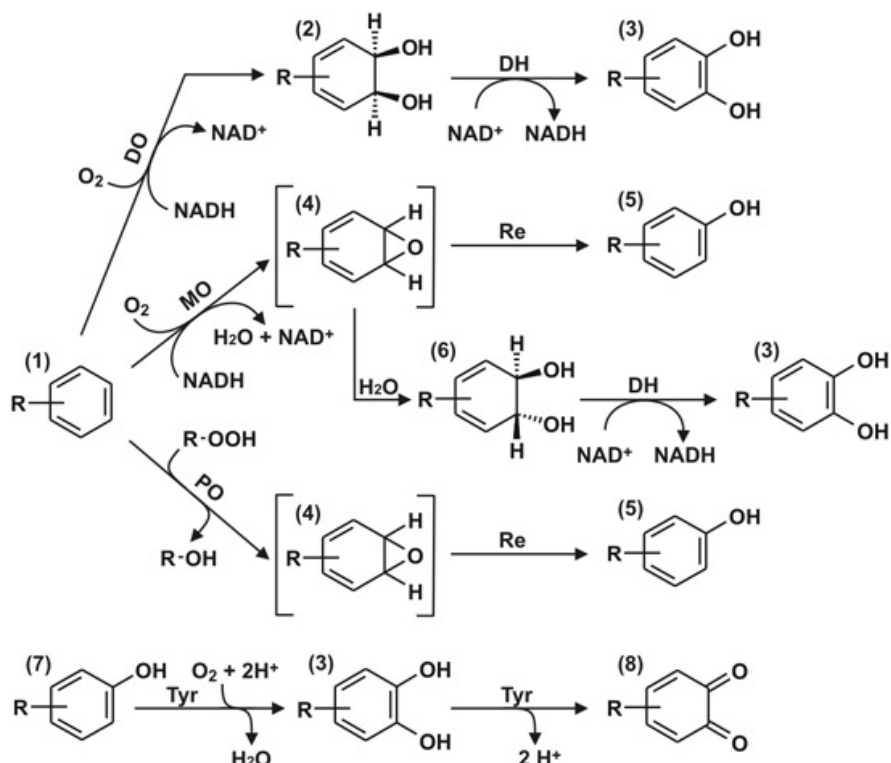
Aby mohla molekula organické látky v singletním stavu reagovat s molekulárním kyslíkem, musí pomoci překonat tuto spinovou bariéru katalyzátor (např. oxygenasa) s jehož pomocí je kyslík aktivován z tripletního základního na reaktivní singletní či dubletní (radikálové) druhy. Mnohdy tyto katalyzátory generují i reaktivní druhy kyslíku s ještě větší reaktivitou štěpením O-O vazby. Specifické aktivace kyslíku je v nich dosaženo za přispění přechodných kovů (Fe, Cu, Mn, ...), organického kofaktoru (flavin, pterin), nebo vlastně obou - v případě hemu. Ve všech biologických systémech je molekula kyslíku aktivována reduktivně, protože jednoduchá inverze elektronu kyslíku pro dosažení sigletního stavu přímo je vysoce endotermická. Zdrojem aktivačních elektronů jsou pak např. kovy, organický substrát sám, kosubstrát, druhý redoxně aktivní kov či kofaktor, redukovaný pyridinový nukleotid (FETZNER, 2007; KOVALEVA a LIPSCOMB, 2008).

Vedle tohoto základního scénáře jsou popsány i oxygenázy na kofaktoru nezávislé. Mechanismus aktivace kyslíku je zde zatím málo prozkoumán, předpokládá se však, že substráty těchto enzymů jsou schopny tvořit stabilizovaný radikál (FETZNER, 2007).

#### 2.2.2.1. Oxygenasy hydroxylující aromatické sloučeniny

Hydroxylace aromatického kruhu je v živých systémech důležitou reakcí. Často se vyskytuje při aktivaci látek během katabolizmu i v biosyntéze přírodních produktů. Pro uskutečňování selektivní hydroxylace aromátů živé organizmy vyvinuly několik typů enzymů a mechanismů (Obr.12) využívajících buď molekulární kyslík (mono- a dioxygenázy), nebo peroxid vodíku (peroxidázy) jako donory kyslíku.

Monohydroxylaci aromátů s využitím pouze molekulárního kyslíku jako zdroje kyslíkových atomů až na výjimky (např. Fe<sup>2+</sup>/α-ketoglutarát-dependentní dioxygenasy), katalyzují monooxygenasy.



Obr. 12: Základní dráhy pro enzymatickou hydroxylaci aromátů.

DO= dioxygenasa, MO= monooxygenasa, PO= peroxidasa/peroxygenasa, Tyr= tyrosinasa, DH=dehydrogenasa, Re=přestavění. (1) aromatický substrát, (2) cis-dihydrodiol, (3) katecholový produkt, (4) epoxidový intermediát, (5) fenolický produkt, (6) cis,trans-dihydrodiol, (7) fenolický substrát, (8) benzochinonový produkt

Převzato z (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007).

Monooxygenasy katalyzují reakce, v nichž je jen jeden ze dvou atomů kyslíkové molekuly inkorporován do organického substrátu a druhý je redukován na H<sub>2</sub>O. Vyžadují tedy k redukcí kyslíkových atomů dva substráty. Hlavní substrát přijímá jeden ze dvou kyslíkových atomů a ko-substrát poskytuje redoxní ekvivalenty k redukcí druhého kyslíkového atomu na H<sub>2</sub>O. Protože většina monooxygenas katalyzuje reakce, v nichž je hlavní substrát hydroxylován, bývají nazývány také hydroxylasami. Někdy jsou označovány i jako oxygenasy se smíšenou funkcí, aby se naznačilo, že oxidují dva rozdílné substráty současně (NELSON a COX, 2000).

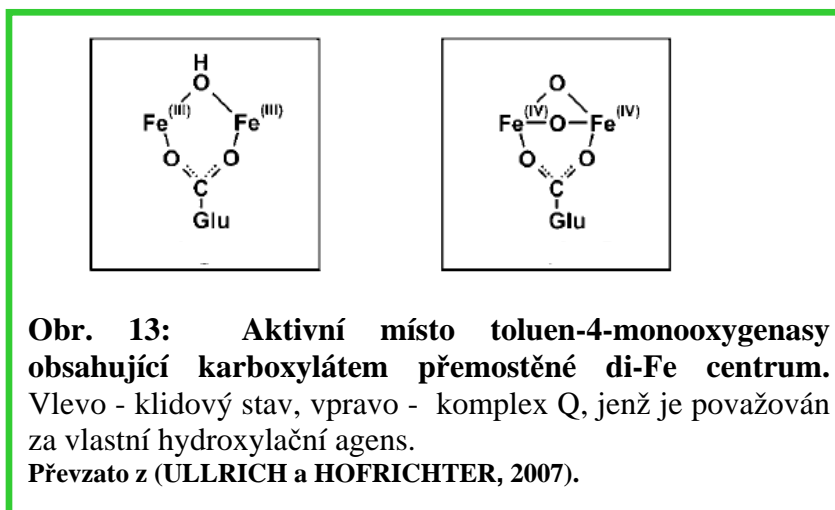
V závislosti na povaze prostetické skupiny se u bakterií rozlišují 4 typy monooxygenas aromátů. Tři z nich obsahují v aktivním místě Fe, flavinové monooxygenasy jsou nekovové biokatalyzátory (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007) :

- **Hydroxylasy s binukleárním-Fe centrem**

Bakteriální vícesložkové monooxygenasy (BMM, bacterial multicomponent monooxygenases) jsou velké rozpustné proteinové komplexy, transkribované z jednoho operonu, který kóduje 4-6 polypeptidů. Čtyři z nich představují obvykle konzervované složky  $\alpha$ ,  $\beta$ , N a R.  $\alpha$  a  $\beta$  (v některých případech je přítomna přídatná podjednotka  $\gamma$ ) tvoří komplex o vysoké molekulové hmotnosti ( $>200$  kDa), tzv. H-komplex, který je nositelem hydroxylasové aktivity. N složka (cca 300 aminokyselinových zbytků) obsahuje N-koncovou doménu podobnou feredoxinu a C-koncovou NAD(P)H-dependentní reduktasovou doménu, které spolupracují při transportu elektronů do aktivního místa. Složka R (malý regulační protein) o velikosti 90-140 aminokyselinových zbytků koordinuje spotřebu elektronů a oxidaci substrátu (NOTOMISTA *et al.*, 2003).

Ačkoli je pravděpodobné, že BMMO užívají velmi podobný katalytický mechanismus, jejich substrátová specifita se značně liší. Navíc se liší ve složení podjednotek a velikosti, uspořádání kódujících sekvencí a genomové lokalizaci (většinou chromozomální, někdy plazmidové). Obvykle jsou rozdělovány do 5-6 skupin (podle zastoupení podjednotek a uspořádání operonu, který je kóduje). Taková klasifikace koreluje s jejich funkčními vlastnostmi a sekvenční podobností (LEAHY *et al.*, 2003; NOTOMISTA *et al.*, 2003).

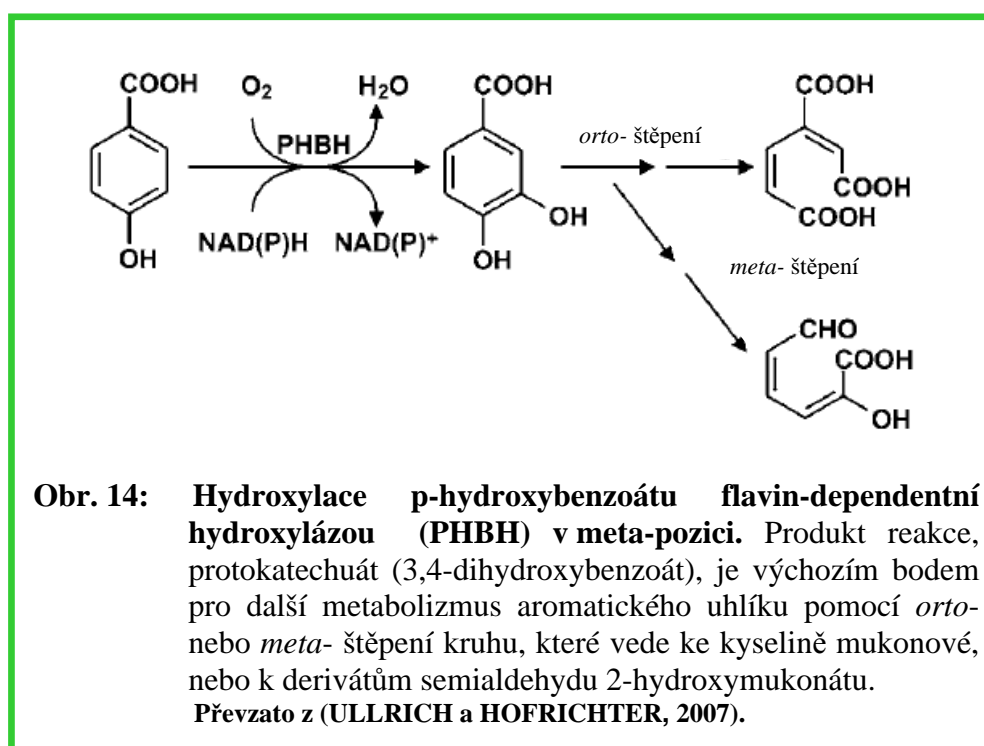
K aktivaci kyslíku pro hydroxylaci uhlovodíkového substrátu používají karboxylátem-přemostěné di-Fe centrum v hydroxylasové složce (Obr. 13) (LIPPARD, 2005; ULLRICH a HOFRIKTER, 2007).



- **Flavinové monooxygenasy (FMO) hydroxylující aromáty**

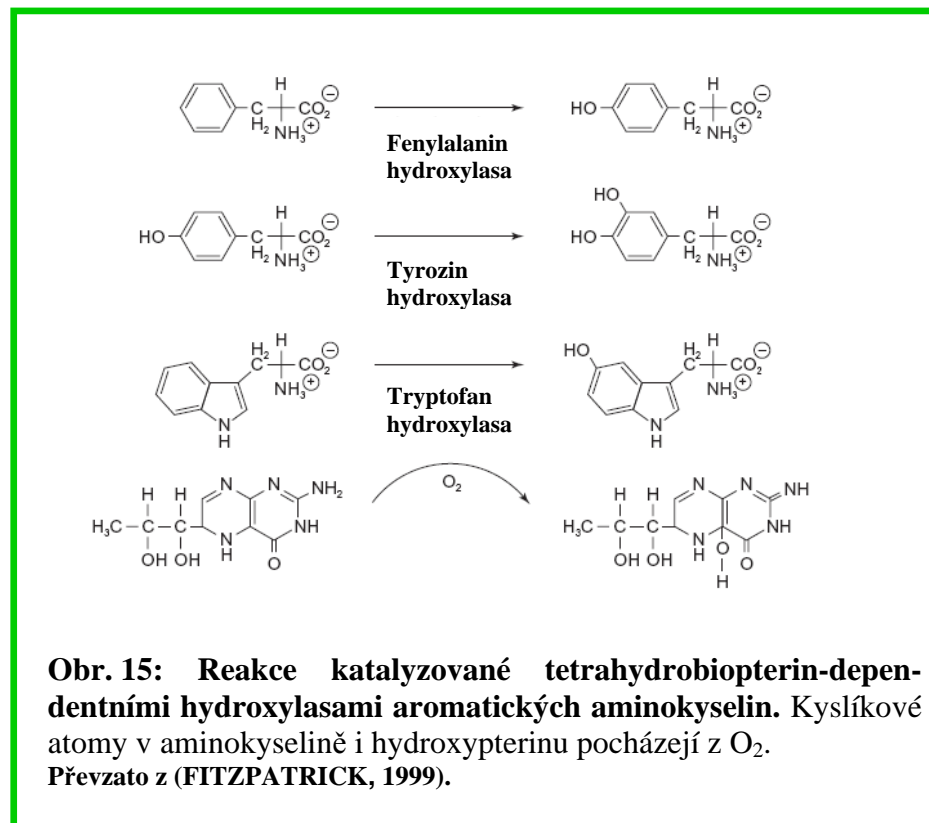
FMO jsou mezi mikroorganismy velmi rozšířené. Tyto enzymy aktivují kyslík v nepřítomnosti přechodného kovu. Jako prostetickou skupinu používají flaviny. Flaviny se mohou podrobovat jedno- i dvou- elektronovým redoxním reakcím což je činí velmi vhodnými pro hydroxylační reakce (WALSH, 1980; SARIASLANI, 1989; BUGG, 2001). Většina FMO jsou oxygenasy externího typu (tj. nepoužívají substrát zároveň jako akceptor

kyslíku a donor elektronů, ale vyžadují externí donor elektronů) (SARIASLANI, 1989). Flavinová složka je v průběhu reakce redukována pomocí NAD(P)H a redukovaný flavin reaguje s O<sub>2</sub> a vytváří se hydroperoxoflavinový intermediát [R-(FAD)-O-OH], který je pokládán za konečný oxygenační druh (BALLOU *et al.*, 2005; ULLRICH a HOFRICHTER, 2007). Flavinové aromatické hydroxylasy obvykle katalyzují konverze fenolů, nebo jejich substituovaných derivátů na katecholy (SARIASLANI, 1989). K podrobněji prostudovaným zástupcům této skupiny hydroxylas patří jednosložkové hydroxylasy: hydroxylasa kyseliny *p*-hydroxybenzoové (PHBH) a fenol hydroxylasa, které zavádějí druhou OH skupinu do *orto*- polohy vzhledem k už existující OH skupině (Obr 14). Druhá OH skupina aktivuje aromatický kruh a usnadňuje jeho následné štěpení specifickými dioxygenasami (Obr 14) (FRITSCHKE a HOFRICHTER, 2005; ULLRICH a HOFRICHTER, 2007). Pozoruhodným rysem těchto jednosložkových FMO je jejich schopnost katalyzovat obojí - redukcí i oxygenací - na 1 polypeptidu (ENTSCH *et al.*, 2005). V poslední době byla popsána i řada dvousložkových FMO, které používají flavin-reduktasu k redukcí flavinu, který pak difunduje, nebo je „dodán“ na monooxygenasovou složku.



- **Pterin-dependentní hydroxylasy**

Tvoří malou rodinu monooxygenas, které katalyzují oxygenaci aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrozinu a tryptofanu na tyrosin, dihydroxyfenylalanin (DOPA) a 5-hydroxytryptofan v tomto pořadí (Obr 15). Tyrosin hydroxylasa katalyzuje rychlost-limitující krok v biosyntéze katecholamínů.



Uvedené enzymy se nacházejí v lidských játrech a CNS, ale např. i v některých bakteriích (např. *Cromobacterium violaceum*, *Pseudomonas sp.*) (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007). Enzymy z eukaryotických zdrojů jsou tvořeny homologní katalytickou doménou, k níž jsou připojeny N-terminální regulační a C-terminální tetramerizační doména, zatímco bakteriální enzymy postrádají N- i C-terminální domény. Eukaryotické hydroxylasy jsou homotetramery, bakteriální fenylalanin hydroxyláza je monomerní (FITZPATRICK, 1999).

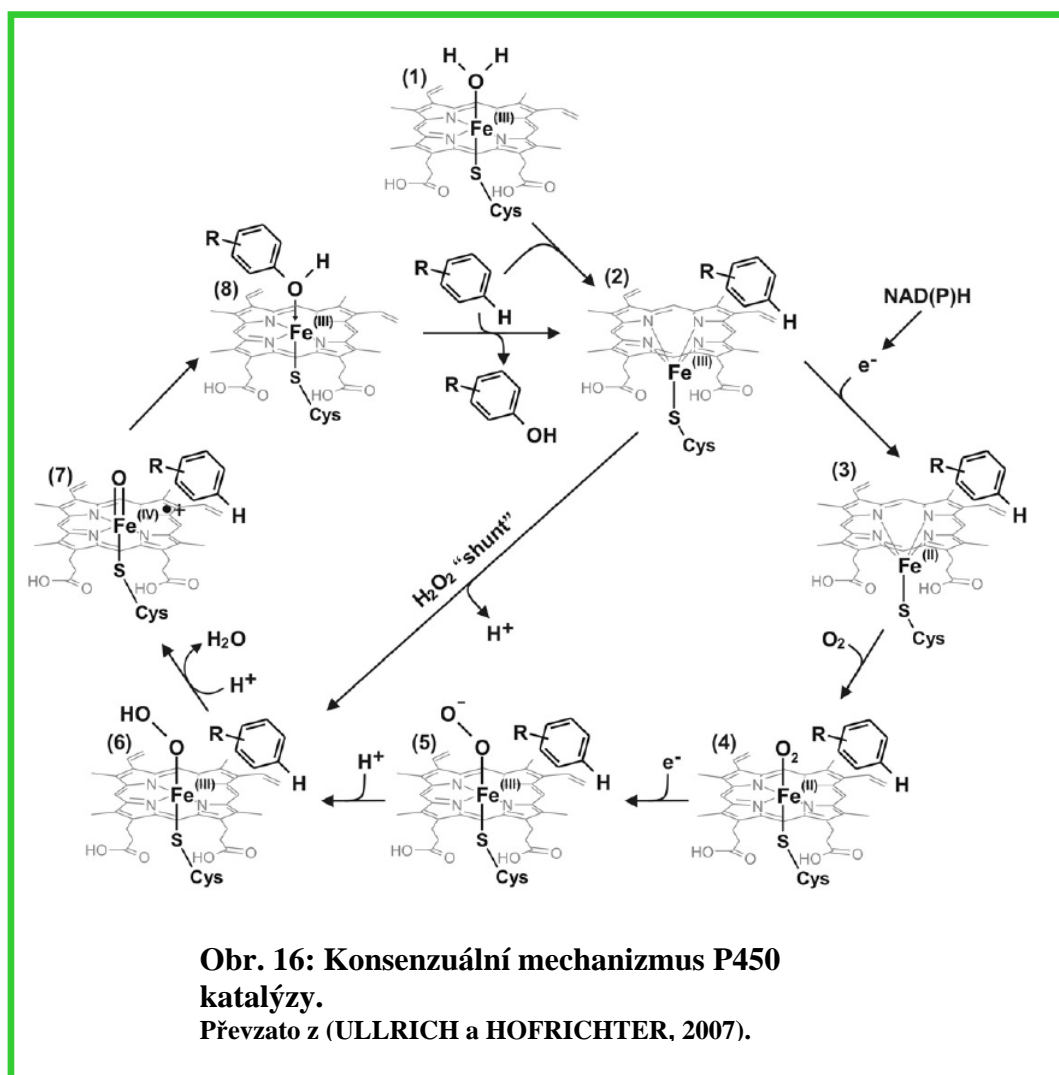
Aktivní místo pterin-dependentních hydroxylas obsahuje jeden ekvivalent nehemového Fe(II), vázaného na postranní řetězce 2 His a 1 Asp/Glu. Tuto klasickou podobu kanonického kov-koordinujícího motivu mají pterin-dependentní hydroxylasy společnou s většinou členů velké skupiny oxygenas obsahujících nehemové železo (KOVALEVA a LIPSCOMB, 2008). Ačkoli poslední hydroxylační intermediát pterin-dependentních hydroxylas nebyl dosud identifikován, předpokládá se, že železo je velmi pravděpodobně zahrnuto v přenosu kyslíku (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007).

V blízkosti Fe se na enzym váže i tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), který je během katalytického cyklu přeměňován na hydroxybiopterin. Do reakce dodává 2 elektrony vyžadované pro redukci druhého atomu kyslíku na vodu a chová se zde jako spíše ko-substrát, který se v každém cyklu váže a disociuje, než jako vázaný kofaktor. Bylo také popsáno, že tyrosin hydroxylasa může hydroxylovat tyrosin na dihydroxyfenylalanin i v nepřítomnosti BH<sub>4</sub>, a to s pomocí peroxidu vodíku (FITZPATRICK, 1999; KOVALEVA a LIPSCOMB, 2008).



- **Hemové monooxygenasy (systémy cytochromů P450, P450)**

Je to velmi početná nadrodina enzymů, která katalyzuje široké spektrum reakcí (MUNRO *et al.*, 2007). Zástupce P450 nalézáme ve všech říších a s výjimkou bakteriálních P450 a P450 z hub, je většina těchto enzymů membránově vázaná. Extracelulární P450 nebyly dosud popsány (ULLRICH a HOFRIKTER, 2007).

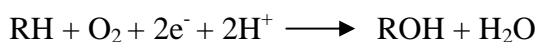


P450 patří do jedné z hlavních skupin hemoproteinů - hem-thiolátových proteinů (druhá je hem-imidazolová skupina). Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je totiž v proteinové molekule P450 totiž vázán hydrofobními interakcemi a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu (pátý ligand Fe) (STIBOROVÁ *et al.*, 2004). Elektron donorový charakter této vazby je důležitý pro P450 katalytickou aktivitu. Díky vlastnostem pátého ligandu je charakteristický posun hlavního (Soretova) absorpčního pásu hemu P450 v komplexu P450 s CO ke 450 nm (proto název Pigment 450, P450). Šestým ligandem Fe je molekula vody (MUNRO *et al.*, 2007).

Aby vykazoval katalytickou aktivitu musí být P450 asociován s elektron donorovým partnerem. Podle systémů, které používají pro přenos elektronů, jsou

P450 obecně děleny do 2 hlavních skupin (třídy I a II). Třída I zahrnuje bakteriální, mitochondriální a houbové enzymy, které popužívají dvousložkový elektrontransportní systém sestávající z [2Fe-2S]ferredoxinu a FAD-dependentní reduktasy. Enzymy třídy II jsou mikrozomální monooxygenasy získávající elektrony z membránově vázaných FAD/FMN-dependentních reduktas (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007). Ukazuje se však, že diverzita redoxních partnerů je mnohem větší, než se původně předpokládalo (MUNRO *et al.*, 2007).

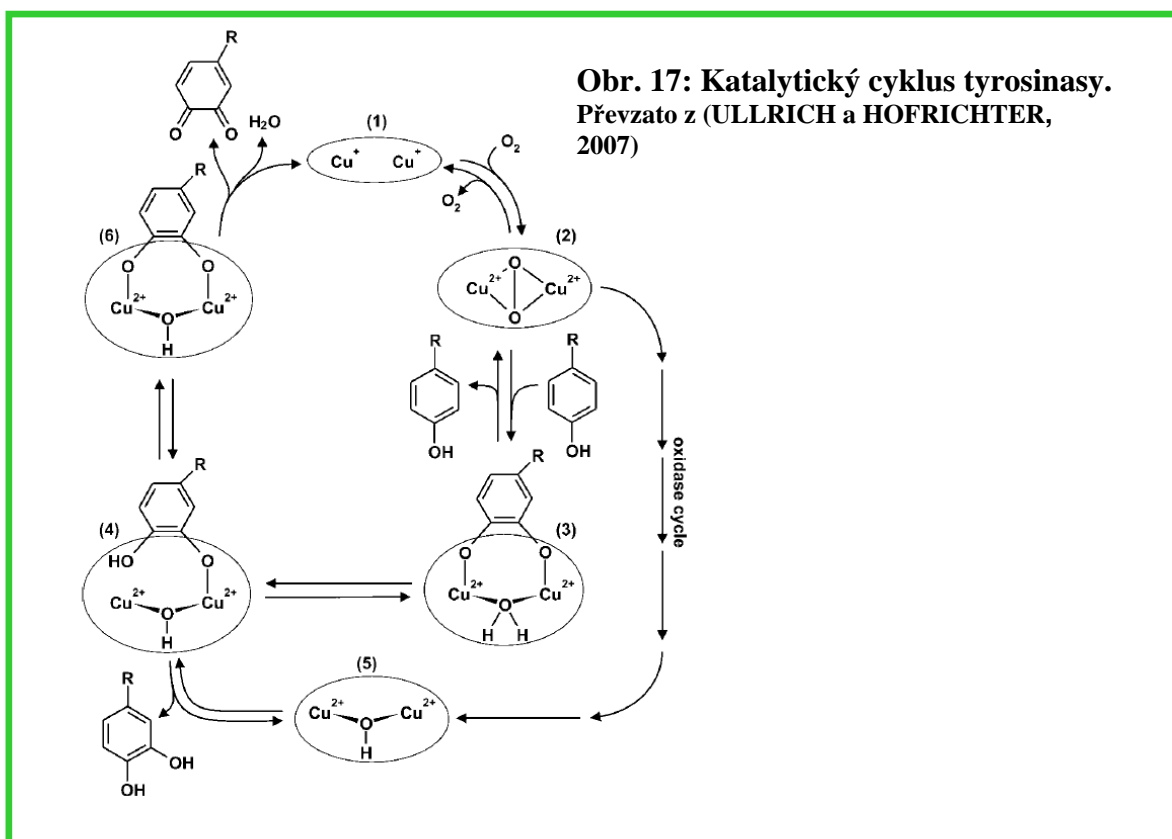
Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované P450 lze vyjádřit sumární rovnicí:



Pro reakční cyklus P450 byl navržen tzv. konsenzuální mechanismus shrnutý na (Obr. 16) (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007).

## Tyrosinasa

Tyrosinasy patří v přírodě k velmi rozšířeným enzymům. Jsou nezbytné pro pigmentaci (tvorbu melaninu) a jsou důležitými faktory při hojení rostlin a primární imunitní odpovědi u bezobratlých.



Tyto často extracelulární enzymy mají v aktivním místě pár Cu iontů (CuA a CuB), které jsou koordinovány každý se třemi HIS zbytky („Cu centrum typu 3“). Ukazuje se, že Cu vazebné regiony tyrosinasy prokaryotického a eukaryotického původu jsou vysoce konzervované (CLAUS a DECKER, 2006).

Dvojice Cu v aktivním centru tyrosinasy váže jednu molekulu atmosférického kyslíku ke katalýze dvou různých druhů reakcí: (1) *ortho*-hydroxylace monofenolů

---

(monofenolasová, kresolasová aktivita) na difenoly a (2) oxidace *o*-difenolů na *o*-dichinony (difenolasová, katecholasová aktivita). Nejlépe známá reakce je tvorba melaninů z tyrosinu *via* DOPA. Dva elektrony požadované pro redukci druhého kyslíkového atomu na vodu jsou dodávány substrátem – tyrosinasy jsou interní monooxygenasy (SOLOMON *et al.*, 1996).

Komplikovaný reakční mechanismus tyrosinasy není dosud dokonale pochopen. Ukazuje se však, že oxidace *o*-difenolu sleduje kinetiku Michaelis-Mentenové, zatímco hydroxylace monofenolu vykazuje lag fázi (ULLRICH a HOFRICHTER, 2007). Zjednodušený katalytický cyklus tyrosinasy s soustředěním na hydroxylázovou aktivitu je na (Obr.17).

Prokaryotické tyrosinasy jsou nemodifikované monomerní proteiny s nízkou molekulovou hmotností (cca 30 kDa). Jsou sekretovány do média, kde se účastní extracelulární tvorby melaninu.

Ve streptomycetách jsou tyrosinasové geny součástí *melC* operonu. Ten vedle tyrosinasového genu (*melC2*) obsahuje gen *melC1*, který je důležitý pro správnou expresi *melC2*. Kóduje malý, chaperonu podobný protein, který je zahrnut v sekreci a v inkorporaci Cu do tyrosinasy (CLAUS a DECKER, 2006).

#### 2.2.2.2. Syntasa oxidu dusného – „nevlatní dítě rodiny P450“

Z hlediska strukturálního a enzymologického je zajímavým „příbuzným“ rodiny cytochromů P450 tzv. NOS (nitric oxide synthase) katalyzující syntézu NO (Obr. 18), který hraje roli v řadě fyziologických procesů např. u člověka při přenosu signálu či imunitní odpovědi (GORREN a MAYER, 2007).

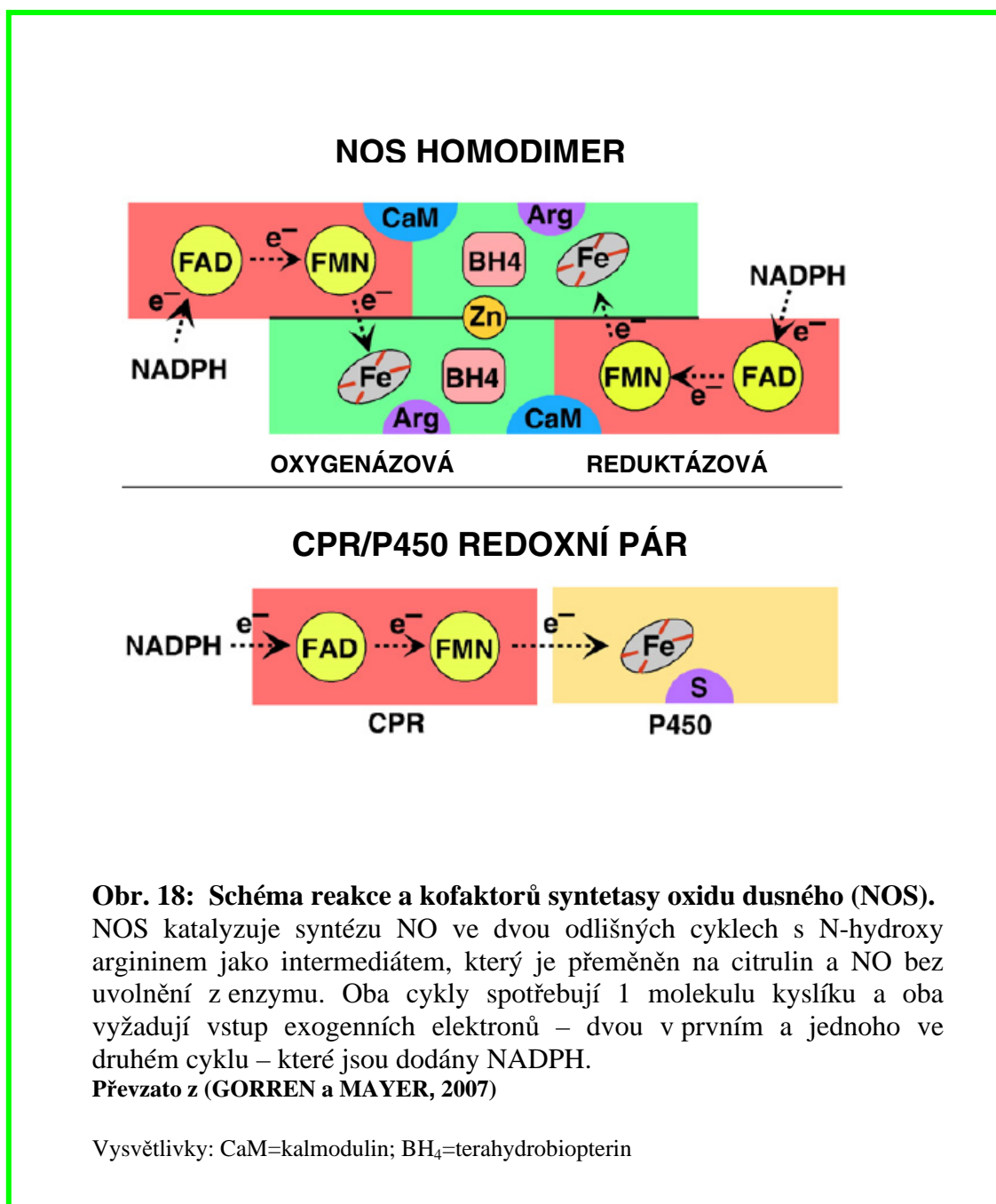
NOS není cytochrom P450, přesto má rysy překvapivě podobné těmto enzymům (Tab. 1): je to hem-thiolátový protein, využívající tutéž prostetickou skupinu k podobným chemickým procesům. Navíc s cytochromy P450 sdílí téhož redoxního partnera, diflavoprotein reduktasu, jež je v případě NOS součástí jednoho polypeptidového řetězce společně s oxygenasou. Mezi NOS a cytochromy P450 však na druhé straně existuje řada nápadných rozdílů (Tab. 1) jako je přítomnost přídatného kofaktoru BH<sub>4</sub> v NOS, který zabraňuje rozkladu O-Fe komplexu na hem a superoxid (GORREN a MAYER, 2007).

NOS jsou hojně rozšířeny v živočišné říši (TORREILLES, 2001). Bakteriální syntéza NO obvykle souvisí s denitrifikací a zahrnuje enzymy které nejsou NOS příbuzné (CUTRUZZOLA, 1999). U nokardií byl popsán enzym s mnoha podobnostmi s konstitutivně syntetizovanou NOS (CHEN a ROSAZZA, 1995).

S nástupem genomiky byly identifikovány proteiny s blízkou homologií pouze k oxygenační doméně NOS, a to u zástupců rodů *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Bacillus* a dalších. Některé z nich byly klonovány, exprimovány v *E. coli*, charakterizovány a srovnány se savčí NOS oxygenasovou doménou (GORREN a MAYER, 2007). Jsou to dimerní proteiny, které vážou arginin a BH<sub>4</sub>, jsou schopné produkovat dusitan z N-hydroxy argininu nebo přeměňují N-hydroxyarginin či arginin na NO a citrulin v přítomnosti NADPH a izolované NOS reduktasové domény. Určité podobnosti byly nalezeny i mezi UV/VIS a Ramanovými spektry savčích a bakteriálních proteinů (CHARTIER a COUTURE, 2004; SANTOLINI *et al.*, 2006). Jak již bylo zmíněno všechny tyto proteiny ale, vyžadují pro syntézu NO přidání NOS reduktázové domény a redukovaného pteridinu nebo nefyziologicky vysoké koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a jejich aktivita je obvykle nízká.

Existují pochybnosti o fyziologickém významu syntézy NO pomocí bakteriálních NOS oxygenasových homologů a zdá se, že NO, nebo jiné reaktivní druhy dusíku, by mohly být generovány spíše jako intermediáty, než jako finální produkty (GORREN a MAYER, 2007). V několika případech se opravdu prokázala odlišná funkce NOS

oxygenasových homologů. Např. enzym ze *S. turgidiscabies* je zahrnut v posledním kroku syntézy fytotoxinu thaxtominu A (KERS *et al.*, 2004).



Tab. 1 : Podobnosti a rozdíly mezi NOS a cytochromy P450 (převzato z (GORREN a MAYER, 2007))	
Podobnosti	Rozdíly
thiolát-ligandovaný hem	žádná sekvenční homologie
N-hydroxylace (ARG) spotřebovávající 2 e <sup>-</sup> e <sup>-</sup> dodávány z NADPH <i>via</i> reduktasa	oxidace (N-hydroxyARG) spotřebovávající 1 e <sup>-</sup> reduktasa a oxygenasa jsou součástí jednoho polypeptidového řetězce
spektroskopické vlastnosti	dimer (stabilizace Zn <sup>2+</sup> ) červený posun Soretova pásu
modulace hemového spinového stavu substráty	hem je bez substrátu většinou ve vysokospinovém stavu  nízká stabilita komplexu Fe(II)O <sub>2</sub>
podobné katalytické intermediáty	
	tertahydrobiopterin jako kofaktor

### 2.2.1.3. Dioxygenasy

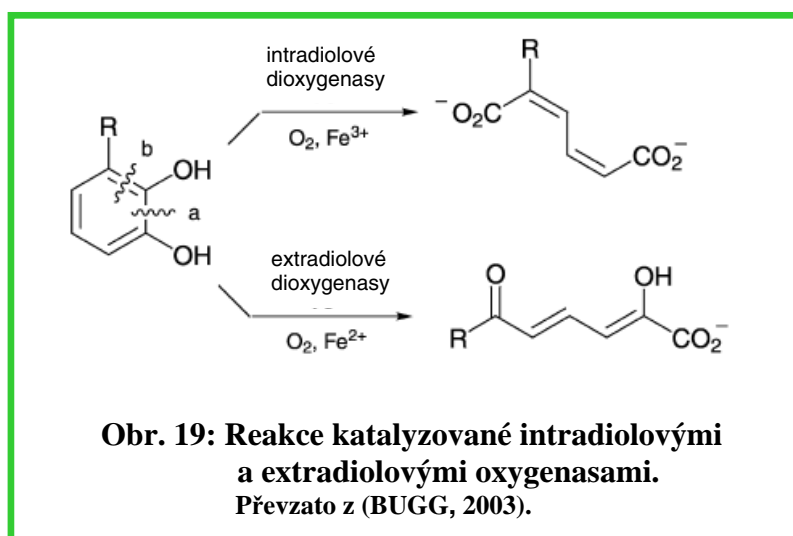
Dioxygenasy katalyzují ty oxygenační reakce, v nichž jsou oba atomy molekuly kyslíku inkorporovány do molekuly organického substrátu. Většina z nich vyžaduje jako kofaktor kov, nejčastěji Fe(II) či Fe(III) (BUGG, 2003).

Zavedením dvou atomů kyslíku do molekuly substrátu jsou produkovány buď metabolity s inkorporovanými dvěma atomy kyslíku, aniž přitom dojde k poškození základní struktury sloučeniny (jsou např. zachovány aromatické kruhy u aromatických uhlovodíků), nebo dojde k jejímu rozštěpení.

Substráty dioxygenas štěpících aromatické kruhy jsou intermediáty vzniklé zavedením buď dvou hydroxylových skupin do aromatického kruhu, nebo jedné do struktury fenolů. Tímto mechanismem se u mikroorganismů iniciuje většina metabolických cest vedoucích k degradaci aromatických sloučenin (STIBOROVÁ *et al.*, 2004). Mikroorganismy v zásadě používají různé katabolické dráhy k degradaci každé aromatické sloučeniny, aerobní katabolismus těchto látek však obvykle prochází *via* jednen ze čtyř intermediátů: katechol (vyskytuje se např. při degradaci benzenu, benzoátu, fenolu a jejich derivátů), protokatechuát, gentisát, a hydrochinon.

#### 2.2.1.3.1. Dioxygenasy katecholu

K rozštěpení kruhu aromatických dihydroxyderivátů, které jsou vůči sobě v *orto*- poloze, dochází buď tak, že se štěpí C-C vazba mezi fenolickými hydroxylovými skupinami a produktem štěpení je kyselina mukonová (intradiolové dioxygenasy), nebo se štěpí C-C vazba v sousedství fenolických hydroxylových skupin a jako produkt vzniká aldehyd kyseliny hydroxymukonové (Obr. 19). Intradiolové dioxygenasy vyžadují nehemové Fe(III) a extradiolové většinou nehemové Fe(II) jako kofaktor a mají mononukleární centra (BUGG, 2003).

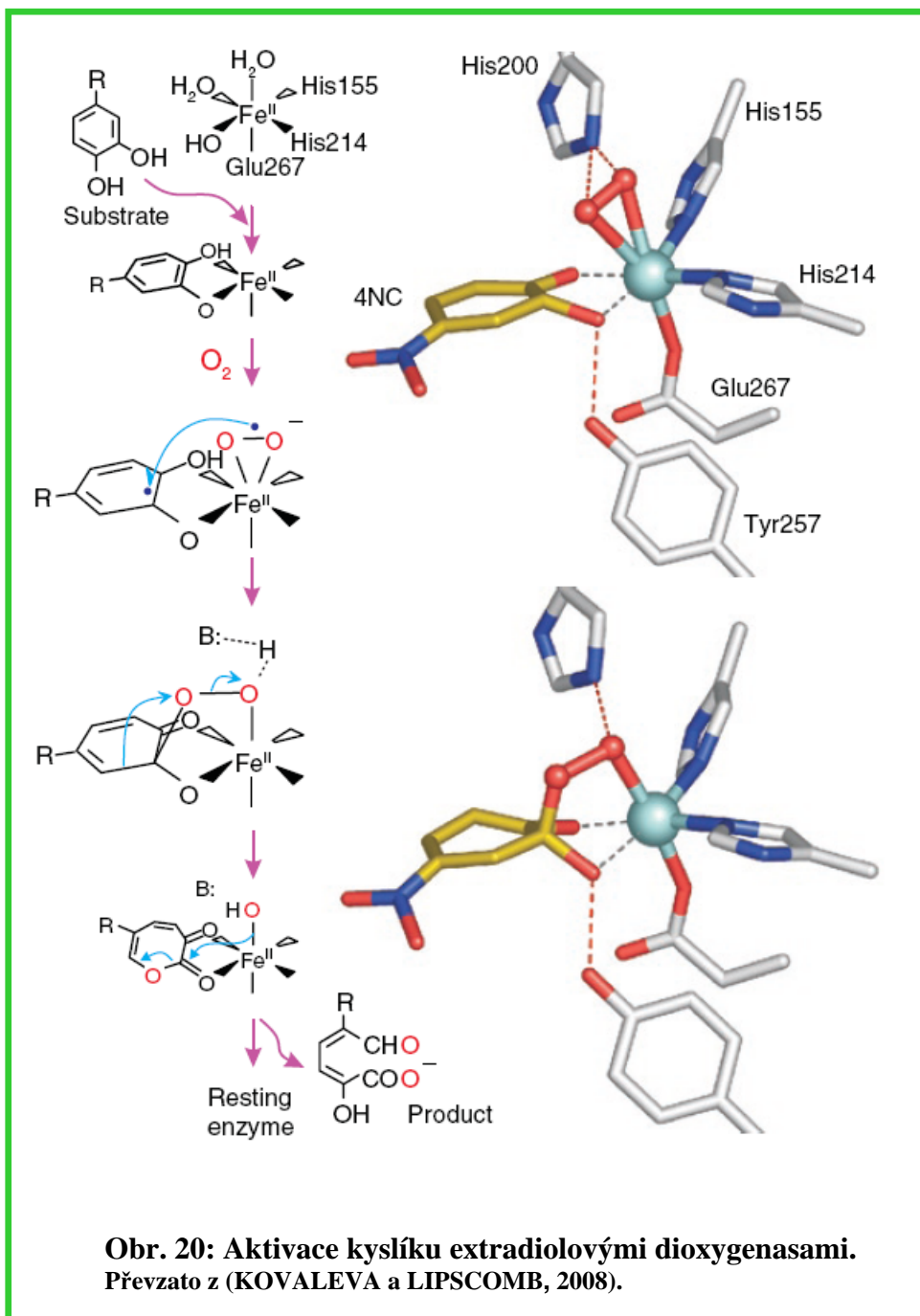


#### 2.2.1.3.1.1. Extradiolové dioxygenasy katecholu

Extradiolové dioxygenasy jsou celkově mnohostrannější než jejich intradiolové protějšky: štěpí širší paletu substrátů, nalézáme u nich větší počet strukturálních uspořádání (scaffold) a vyskytují se v širším spektru metabolických drah (včetně biosyntetických).

Extradiolové dioxygenasy patří alespoň ke třem evolučně nezávislým rodinám (Typ I-III). Nejlépe prozkoumaný „Typ I“ patří do VOC (vicinal oxygen chelate) nadrodiny. Všechny dosud identifikované enzymy typu I se sestávají z jednoho druhu podjednotek. Velikost podjednotky je 21/32,5 kDa pro jedno/dvou doménové enzymy. Drtivá většina dosud identifikovaných enzymů typu I jsou dvoudoménové enzymy. Jednodoménové enzymy jsou typicky dimerní, dvoudoménové existují v řadě oligomerních stavů (VAILLANCOURT *et al.*, 2006).

Navzdory fylogenetické diverzitě všechny extradiolové dioxygenasy obsahují 2-His-1-karboxylát kov-vazebný motiv (VAILLANCOURT *et al.*, 2006). V aktivním místě tvoří Fe(II)-chelátový komplex s katecholovým substrátem a pak vážou molekulární kyslík v sousedním ligandovém místě kovu, což dovolí současnou aktivaci substrátu a kyslíku transferem elektronů ze substrátu na kyslík přes Fe (Obr. 20).



---

## 2.3. Linkosamidová antibiotika, chemická struktura linkosamidových antibiotik

Linkomycin A (dále jen linkomycin), je řazen do skupiny tzv. linkosamidových antibiotik. Strukturálním prvkem, který dal celé skupině linkosamidových antibiotik (Obr. 21) název, je 6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- $\alpha$ -D-galaktooktopyranosid, triviálním názvoslovím označovaný jako methylthiolinkosamid (MTL, (SCHROEDER *et al.*, 1967)).

K uvedené cukerné složce je amidovou vazbou (HOEKSEMA *et al.*, 1964) připojen aglykon, v případě linkomycinu trans-*N*-methyl-4-*n*-propyl-L-prolin, triviálním názvem kyselina propylhygrová (PHA, (MAGERLEIN *et al.*, 1967). Aglykonem molekuly linkomycinu B, produkovaného společně s linkomycinem jako minoritní složka, je trans-*N*-methyl-4-*n*-ethyl-prolin (ARGOUDELIS *et al.*, 1965a; SPÍŽEK *et al.*, 2004) (Obr. 21). Další linkomyciny (Obr. 21), nalezené ve fermentačním médiu producentů, byly získány změnou složení média nebo použitím inhibitorů (ARGOUDELIS *et al.*, 1970; WRIGHT, 1983).

Základní skelet cukerné složky molekuly linkosamidových antibiotik (MTL) je poněkud modifikován v případě celesticetinů (Obr. 21)(ARGOUDELIS a BRODASKY, 1972), jež sdílejí prolin jako aglykon.

### 2.3.1. Producenti linkosamidových antibiotik

Prvním popsaným členem linkosamidové skupiny antibiotik byl celesticetin, produkovaný *S. caelestis* (HOEKSEMA *et al.*, 1955; HOEKSEMA, 1968).

Linkomycin, jediný komerčně vyráběný přírodní člen linkosamidové rodiny, byl poprvé popsán u *Streptomyces lincolnensis* (BERGY *et al.*, 1963). K dalším producentům linkomycinu patří např. *S. spinozus* (ARGOUDELIS *et al.*, 1972), *Actinomyces roseolus* (KUZNETSOV *et al.*, 1974), *Micromonospora halophytica* (BIBIKOVA *et al.*, 1989), *S. pseudogriseolus* (ARGOUDELIS a COATS, 1973).

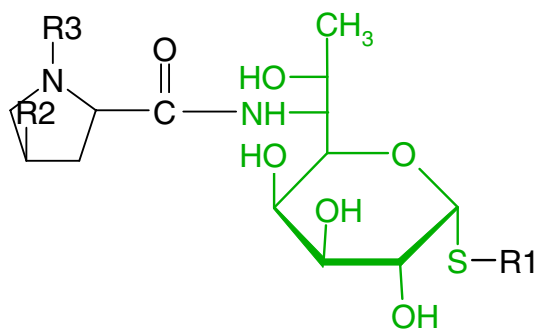
### 2.3.2. Deriváty linkomycinu

Linkomycin se komerčně vyrábí fermentací už od 60-tých let minulého století a jako v i případě jiných antibiotik, byly učiněny pokusy získat deriváty (Obr. 22) základní molekuly s vylepšenými vlastnostmi semisyntetickou cestou (MAGERLEIN, 1971; MAGERLEIN, 1977). Snaha po zlepšení sledovala dva různé cíle. Zaprvé ovlivnění farmaceutických vlastností molekuly jako absorpce, depotní aktivita, chuť atd. Látky spadající do této kategorie jsou různé estery linkomycinu. Zadruhé rozšíření spektra účinku, zvýšení účinnosti. Sem patří tzv. analogy linkomycinu; molekuly se skeletem linkomycinu, které se od něj liší jedním či více substituenty (MAGERLEIN, 1971).

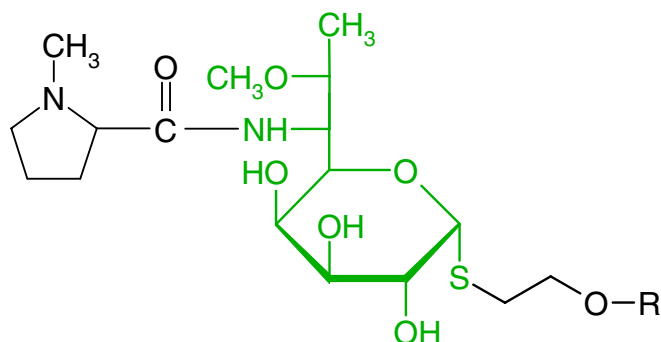
Jedním z nejzajímavějších analogů linkomycinu je klindamycin, antibiotikum, které bylo připraveno náhradou hydroxyskupiny v pozici C7 cukerné části linkomycinu chlórem. Klindamycin se oproti linkomycinu vyznačuje širším spektrem účinku, vyšší aktivitou a rychlejším vstřebáváním při perorálním podání (MAGERLEIN, 1971). Navíc je, často v kombinaci s jinými účinnými látkami, používán při léčení malárie (GUAY, 2007; IBEZIM a ODO, 2008).

Byly rovněž učiněny pokusy získat nové deriváty linkomycinu pomocí mikrobiálních transformací. Ve srovnání s chemickou modifikací byl však touto cestou získán menší počet a také menší diverzita derivátů. Příkladem derivátů linkomycinu spadajících do této



**A**

	R1	R2	R3
Linkomycin A	methyl	methyl	propyl
Linkomycin B	methyl	methyl	ethyl
Linkomycin C	ethyl	methyl	propyl
Linkomycin D	methyl	H	propyl
Linkomycin K	ethyl	H	propyl
Linkomycin S	ethyl	ethyl	propyl

**B**

derivát	R
Celesticetin A	salicylyl
Celesticetin B	isobutyryl
Celesticetin C	anthranilyl
Celesticetin D	acetyl

**Obr. 21: Chemická struktura vybraných linkosamidových antibiotik.**

A. Linkomycinová řada linkosamidových antibiotik

B. Celesticetinová řada linkosamidových antibiotik

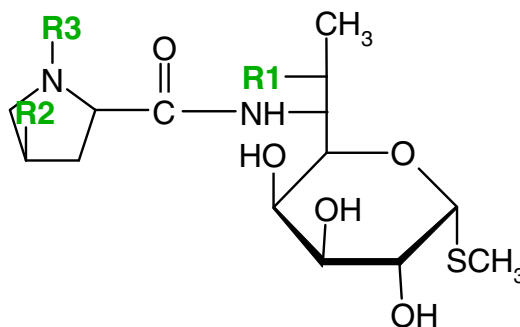
Společná část základního skeletu cukerné části molekuly linkosamidových antibiotik je vyznačena zeleně.

Převzato ze (SPIZEK a REZANKA, 2004).

skupiny jsou 7-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-linkomycin připravený glykosylací linkomycinu  $\alpha$ -mannosidasou z *Canavalia ensiformis* (WEIGNEROVA *et al.*, 2001), sulfoxid linkomycinu a 1-demethylthio-1-hydroxylkomycin získané přidáním linkomycinu do kultury *S. lincolnensis* (ARGOUDELIS. a MASON, 1969), 1'-demethylklindamycin, získaný přidáním klindamycinu ke kultuře *S. punipalus* (ARGOUDELIS *et al.*, 1969a), klindamycin sulfoxid, získaný transformací klindamycinu kulturou *S. armentosus* (ARGOUDELIS *et al.*, 1969a) a linkomycin-3-fosfát připravený konverzí linkomycinu kulturou *S. rochei* (ARGOUDELIS a COATS, 1969).

Jednou z nejúčinnějších skupin látek odvozených od linkomycinu jsou deriváty klindamycinu, které mají propyl v pozici 4' nahrazen delším (5-8 členným) alkylovým řetězcem. Nejvyšší aktivitu vykazovaly deriváty s pentylem jako substituentem.. Postrádají-li takové deriváty navíc methyl na dusíkovém atomu v pozici 1', jejich účinnost se dále zvyšuje. Tyto deriváty jsou účinnější než klindamycin i proti plazmodiím. Naopak N-demethylace linkomycinu v poloze 1' aktivitu derivátů významně snižuje. Např. N-demethylkomycin vykazuje jen 2% aktivity linkomycinu (MAGERLEIN, 1971). Příkladem takových derivátů je pirlimycin - 4'-pentyl-N-demethyl klindamycin (BIRKENMEYER *et al.*, 1984; DIVO *et al.*, 1985 ).

Využití řady derivátů linkomycinu limituje jejich nákladná a náročná syntéza. Příprava geneticky modifikovaných organismů schopných produkovat deriváty linkomycinové molekuly by mohla významně přispět k zavedení účinných, avšak dosud nerentabilních derivátů do klinické praxe.



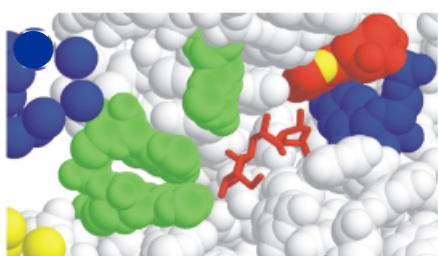
	R1	R2	R3
linkomycin	OH	propyl	methyl
klindamycin	Cl	propyl	methyl
N-demethylklindamycin	Cl	propyl	H
4'-pentyl-N-demethyl-4'-depropylklindamycin	Cl	H	pentyl

**Obr. 22: Linkomycin a příklady některých jeho účinných derivátů.**

### 2.3.3. Mechanismus účinku linkomycinu

Linkosamidy se stejně jako strukturálně nepodobné makrolidy a streptogramin B, vážou na velkou podjednotku 50S ribozomu blízko peptidyltransferázového centra, které je tvořeno výhradně RNA a katalyzuje tvorbu peptidových vazeb při elongaci proteinu. Všechna zmíněná antibiotika (řazená společně do tzv. MLS skupiny) zapřičiňují disociaci

peptidyl-tRNA z ribozomu. Zdá se totiž, že většina nascentních peptidů opouští ribozom tunelem v 50S podjednotce. Vazebná místa pro antibiotika MLS skupiny leží na začátku tohoto tunelu a zmíněná skupina antibiotik pak blokuje vstup nascentních peptidů do tohoto tunelu (Obr. 23) (TENSON *et al.*, 2003).



**Obr. 23:**

Převzato z (TENSON *et al.*, 2003)

#### **Krystalová struktura 50S podjednotky ribozomu v komplexu s klindamycinem.**

Barevné značení je následující: N-terminální Phe (červená); nukleotidy A2058, A2059 a A2062 (číslování dle *E. coli*) 23S rRNA důležité pro vazbu MLS skupiny antibiotik (zelená); A2451 - důležitá komponenta peptidyltransferázového centra (červená); C2452 (modrá); N3 z A2451 z 23S rRNA (žlutá); proteiny, které tvoří část „stěny tunelu“ : L4 (modrá) a L22 (žlutá), klindamycin (červená).

Detaily celého procesu nejsou zcela známy, ví se však, že trojrozměrná struktura klindamycinu se velmi podobá L-Pro-Met a D-ribosylovému kruhu adenosinu, molekulám, které se nacházejí k sobě nejbližší na 3'-konci L-Pro-Met a deacetylované – tRNA krátce po vytvoření peptidové vazby mezi L-Pro-tRNA a L-Met-tRNA. Tento fakt naznačuje, že základem interakce klindamycinu a dalších linkosamidů s ribozomem je napodobení 3'-konce L-Pro-Met a deacetylované tRNA tak, jak jsou umístěny během iniciační fáze pretranslokace v elongačním cyklu peptidu. Linkosamidy tedy působí jako strukturální analogy intermediátů proteosyntézy (FITZHUGH, 1998).

U senzitivních kmenů linkosamidy blokují proteosyntézu. Vliv těchto antibiotik na cílovou buňku je však vícenásobný. V subinhibičních koncentracích linkomycin, stejně jako další členové skupiny makrolidy-linkosamidy-streptogramin (MLS), moduluje činnost určitých promotorů cílového organismu. Mechanismus transkripční modulační není přesně znám, ale pravděpodobně zahrnuje bakteriální odpověď na stres a/nebo porušení a následné vyrovnání metabolického systému jako následek jemné interference s funkcí ribozomu (TSUI *et al.*, 2004).

#### **2.3.4. Mechanismus rezistence k linkomycinu**

Dosud byly popsány tři mechanismy rezistence k linkosamidům:

- 1) Modifikace cílového místa. Jedná se o tzv. MLS<sub>B</sub> rezistenci, kterou linkosamidy sdílejí s makrolidy a streptograminem B a která spočívá v methylaci N<sup>6</sup> specifického adeninového zbytku (A2058; číslování dle *E. coli*) molekuly 23S rRNA methyltransferasami dvou typů. Monomethyltransferasami, jejichž příkladem je LmrA, kódovaná genem linkomycinového biosyntetického shluku *S. lincolnensis* (PESCHKE *et al.*, 1995) a dimethyltransferasami, jejichž příkladem je Erm(C) stafylokoků (SHIVAKUMAR a DUBNAU, 1981). Zatímco monomethylace zmíněného adeninového zbytku zajišťuje rezistenci k vysokým (>1000 µg/ml) koncentracím linkosamidů a nižším (>50-200 µg/ml) koncentracím erythromycinu, tylosinu a

---

karbomycinu, dimethylace udělí rezistenci k vysokým (>1000 µg/ml) koncentracím všech pěti antibiotik (CALCUTT a CUNDLIFFE, 1990; BURIANKOVA *et al.*, 2004).

- 2) Modifikace antibiotika samotného. Jedná se o inaktivaci antibiotika fosforylací nebo nukleotidylací jeho hydroxylové skupiny v poloze 3, která byla detekována u některých druhů streptomycet (ARGOUDELIS *et al.*, 1977; MARSHALL *et al.*, 1989). Nukleotidyltransferasy linkosamidů, kódované *lnu* geny (dříve *lin*) byly popsány u grampozitivních i gramnegativních mikroorganismů (HEIR *et al.*, 2004; ACHARD *et al.*, 2005) a katalyzují adenylaci linkosamidů.
- 3) Aktivní eflux antibiotika. Jedná se o aktivní odstranění antibiotika z buňky, které zprostředkovávají proteiny příslušející k dvěma nadrodinám:

K nadrodině MFS (major facilitator superfamily) transportních proteinů, které pro export látek využívají protonový gradient, patří proteinový produkt genu *lmrA* (ZHANG *et al.*, 1992), který je součástí linkomycinového biosyntetického shluku producenta linkomycinu *S. lincolnensis*.

K nadrodině ABC (ATP binding cassette) transportérů, které získávají energii pro transport hydrolyzou ATP, je řazen proteinový produkt genu linkomycinového biosyntetického shluku *lmrC* (PESCHKE *et al.*, 1995). U klinických izolátů byly popsány i další členové rodiny ABC transportérů zprostředkovávající aktivní eflux linkosamidů. Jako příklad může sloužit *Vga<sub>ALC</sub>*, který zprostředkovává aktivní eflux streptograminu A a linkosamidů u *Staphylococcus haemolyticus* (NOVOTNA a JANATA, 2006).

### 2.3.5. Využití linkosamidových antibiotik v klinické praxi

První popsaný zástupce linkosamidů celesticetin, ačkoli je aktivní proti grampozitivním i gram-negativním bakteriím, není dostatečně účinný na to, aby byl zařazen mezi klinicky používaná antibiotika (WRIGHT, 1983). Vykazuje totiž jen 5% aktivity linkomycinu *in vivo*. Také linkomycin B je ve srovnání s linkomycinem méně účinný, vykazuje totiž jen 25% jeho aktivity (SPÍŽEK *et al.*, 2004).

Klinicky důležitými antibiotiky jsou jen dva zástupci skupiny linkosamidů, linkomycin a jeho semisyntetický derivát klindamycin. Významnější z nich je klindamycin, jehož celosvětová produkce jej dokonce řadí mezi 20 nejdůležitějších antibiotik.

Účinek linkomycinu a klindamycinu je v běžných dávkách bakteriostatický. V dávkách vyšších, než jsou dosažitelné *in vivo*, je účinek dokonce baktericidní (SPÍŽEK *et al.*, 2004). Mezi citlivé organizmy patří většina grampozitivních bakterií, zvláště pak rody *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Linkosamidy dále vykazují antibakteriální účinek vůči anaerobním bakteriím, některým mykoplasmám, prvokům a houbám (BLASI *et al.*, 2005; GUAY, 2007). Naopak aerobní gramnegativní bakterie jsou většinou k linkosamidům resistantní (SPÍŽEK *et al.*, 2004).

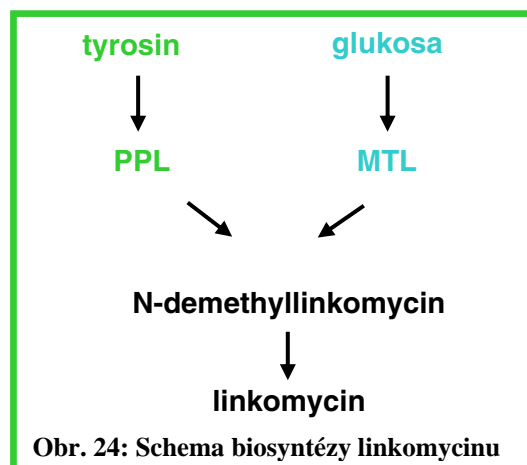
Hlavním terapeutickým využitím linkosamidů jsou případy, kdy lze předpokládat synergistické působení smíšené aerobní a anaerobní mikroflory (prevence intraabdominální infekce při chirurgických výkonech, infekce ve stomatologii, infekce kůže a měkkých tkání, ale zejména infekce kostí a kloubů). Linkosamidy jsou účinnou alternativou penicilinů v případech intolerance. Klindamycin, nikoli však linkomycin, je účinný při akutních formách toxoplazmozy a pneumocystozy u nemocných AIDS, zůstává dosud nejlepším lékem proti osteomyelitidě a v kombinaci s chininem vykazuje velmi dobré výsledky při léčení malárie, je-li příčinným agens *Plasmodium falciparum* a to i tehdy, je-li původce rezistentní k jiným léčivům, např. k chlorochinu (VACEK, 1991; KREMSNER *et al.*, 1993; KUCERS *et al.*, 1997; SPÍŽEK *et al.*, 2004).

Vedle terapeutického využití nachází linkosamidy své uplatnění i v základním výzkumu. Např. linkomycin je používán jako inhibitor proteosyntézy při studiu plastidů u rostlin (SULLIVAN a GRAY, 1999).

### 2.3.6. Biosyntéza linkomycinu

Biosyntetická dráha linkomycinu není podrobně známa. Byla však v hrubých rysech navržena na základě obohacovacích pokusů s následnou nejčastěji NMR či MS analýzou (Obr. 24) (ARGOUDELIS *et al.*, 1969b; WITZ *et al.*, 1971; BRAHME *et al.*, 1984a; BRAHME *et al.*, 1984b), které pomohly určit metabolický původ uhlíkových a dusíkových atomů v molekule linkomycinu (BRAHME *et al.*, 1984a; BRAHME *et al.*, 1984b; CHUNG *et al.*, 1997).

Podle uvedeného návrhu jsou nejprve syntetizovány dva základní prekurzory, propylprolin (PPL) a methylthiolinkosamid (MTL), které jsou kondenzovány na N-demethyllinkomycin (NDL), který se v posledním kroku methyluje na linkomycin.



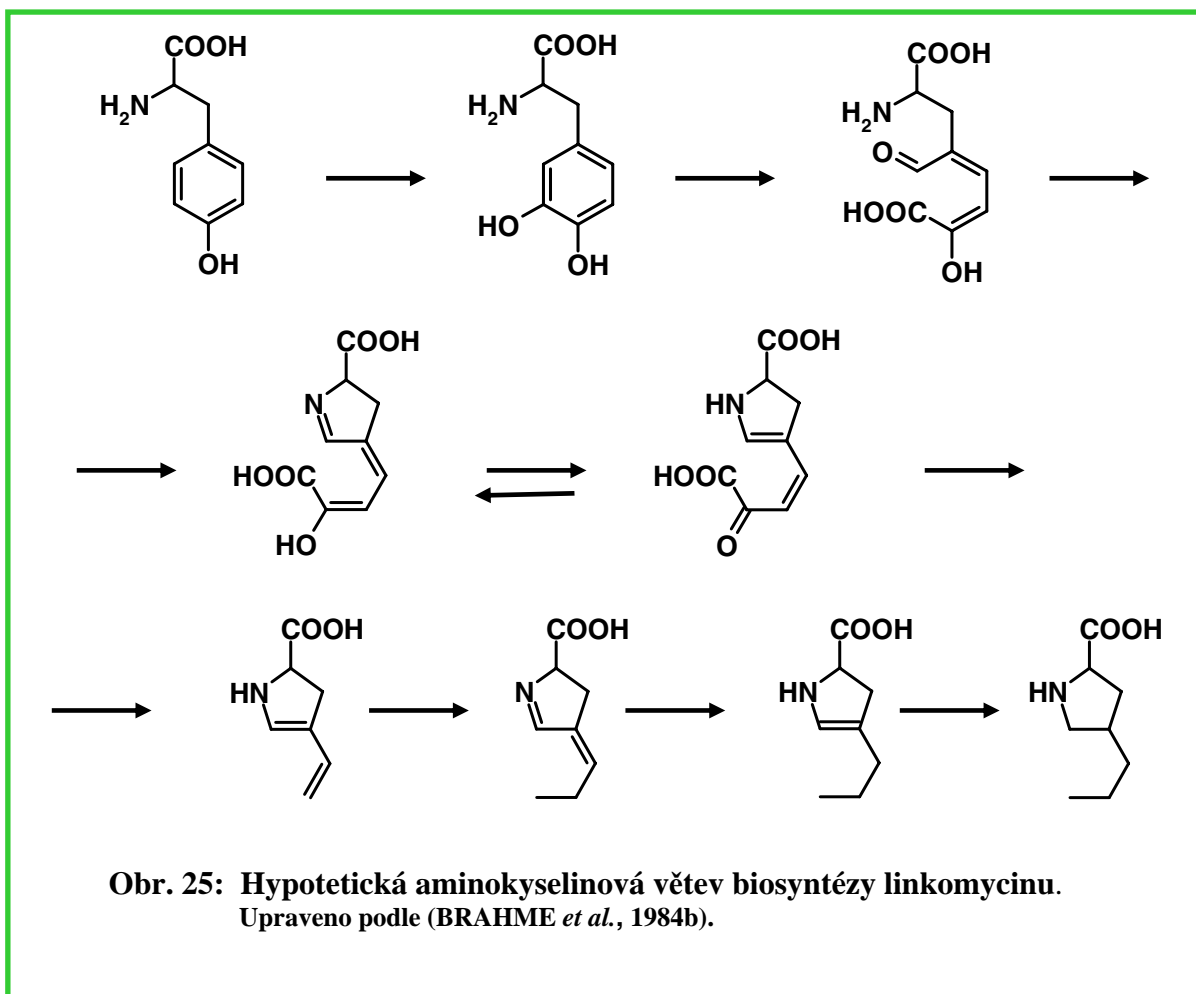
Obr. 24: Schema biosyntézy linkomycinu

#### 2.3.6.1. Biosyntéza aglykonu linkomycinu (aminokyselinová větev biosyntézy linkomycinu)

V molekule aglykonu linkomycinu, kyseliny propylhygrové (PHA), je obsaženo devět atomů uhlíku. Sedm z nich pochází z tyrozinu (WITZ *et al.*, 1971) a dva zbývající (uhlík N-methylu a terminální methylové skupiny postranního alifatického řetízku) z C1-donoru (nejspíše S-adenosylmethioninu) (ARGOUDELIS *et al.*, 1969b; BRAHME *et al.*, 1984b; CHUNG *et al.*, 1997)

Biosyntetické experimenty využívající značené prekursory naznačují, že tyrozin je odvozen z glukosy, která je v glykolýze přeměňována na fosfoenolpyruvát a erythrosa-4-fosfát vznikající v hexosomonofosfátové dráze, jež jsou pak šikimátovou dráhou převedeny na tyrosin, hydroxylovaný v dalším kroku na dihydroxyfenylalanin (DOPA). Dráha pak pravděpodobně pokračuje 2,3-extradiolovým štěpením aromatického kruhu DOPA, následovaným intramolekulární cyklizací produktu extradiolového štěpení za tvorby pyrolového kruhu (BRAHME *et al.*, 1984b). Dalšími několika kroky přeměny DOPA na propylprolin (PPL) je méně zřejmých, ale nejspíše zahrnují syntézu 1,2,3,6-tetrahydropropylprolinu, jediného dosud identifikovaného vnitřního intermediátu aminokyselinové větve biosyntézy linkomycinu (KUO *et al.*, 1992).

Schema biosyntézy aglykonu linkomycinu, navržené Brahmem a spolupracovníky (1984a,b) a modifikované Kuem a spolupracovníky (1992) ukazuje Obr. 25.



### 2.3.6.2. Biosyntéza cukerné složky linkomycinu (cukerná větev biosyntézy linkomycinu)

Počáteční pokusy o určení metabolického původu cukerné části linkomycinové molekuly vedly ke zjištění, že S-methylová skupina methylthiolinkosamidu je odvozena z C1-donoru (nejspíše S-adenosylmethioninu) (ARGOUDELIS *et al.*, 1969b; CHUNG *et al.*, 1997).

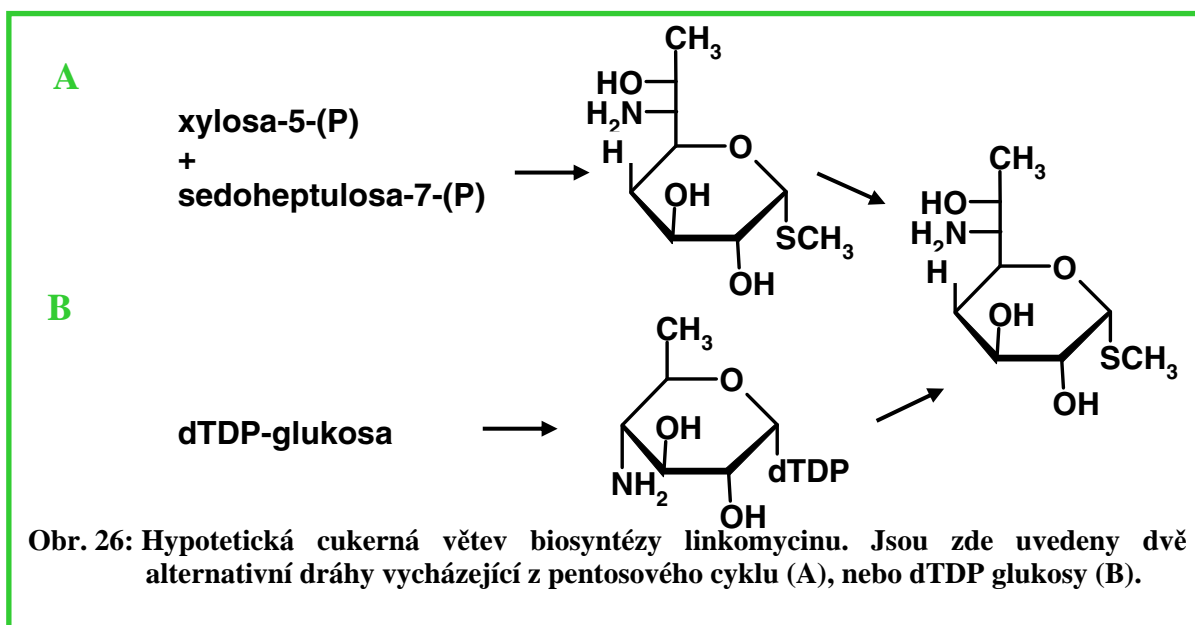
Celá pravděpodobná dráha vedoucí k syntéze MTL byla později navržena až Brahmem a spolupracovníky (BRAHME *et al.*, 1984a) (Obr. 26). Data získaná z jejich experimentů naznačují, že C8 uhlíkový skelet MTL vzniká kondenzací C3 a C5 jednotek.

C5 jednotka je odvozena buď od glukosy (přes hexosomonofosfátovou dráhu) jako celek, nebo vzniká kondenzací C3 jednotky (glyceraldehyd-3-fosfátu) s C2-donorovou jednotkou, jako je sedoheptulosa-7-fosfát přes transketolasovou reakci.

C3 jednotka, která se spojuje s C5 jednotkou při tvorbě MTL skeletu, pochází z vhodné donorové molekuly jako je sedoheptulosa-7-fosfát a je přidána pomocí transaldolasové reakce. V závislosti na původu C3 donorové molekuly, C3 jednotka sestává buď z intaktního C3 skeletu, nebo vznikla spojením C1 a C2 jednotek.

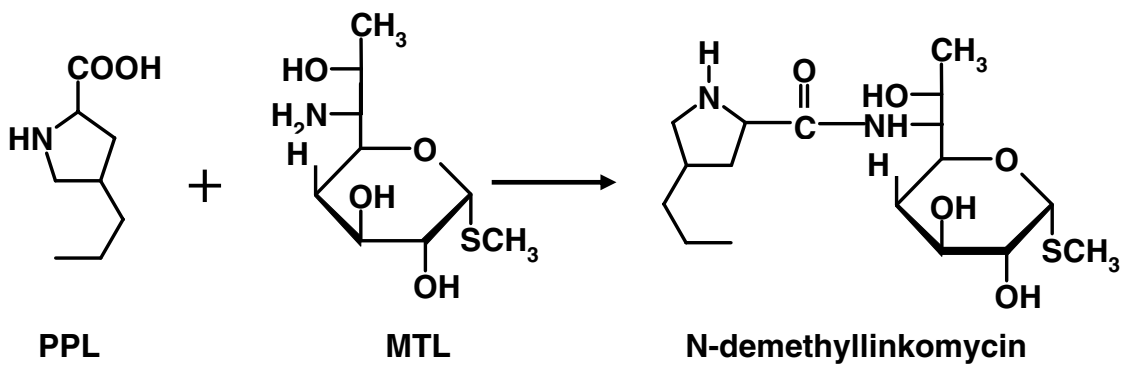
Jednotky C3 a C5 kondenzují za vzniku oktosity, která je pak přeměněna na MTL v sérii reakcí, o nichž je jen minimum informací. Předpokládá se, že přeměna zahrnuje izomerizaci oktosity na oktосу, defosforylaci a redukci uhlíku C8, transaminaci a thiomethylaci na C1.

Doposud nebyl identifikován ani jeden vnitřní intermediát cukerné větve biosyntézy linkomycinu, přesto byl základní návrh dráhy, vypracovaný Brahmem a spolupracovníky (BRAHME *et al.*, 1984a) modifikován. Sekvenační projekt linkomycinového biosyntetického shluku genů totiž odhalil totiž přítomnost tzv. cukerného shluku (subcluster), jež je součástí linkomycinového biosyntetického shluku genů (PESCHKE *et al.*, 1995) a jehož homology nalézáme i u jiných aktinomycet (PISSOWOTZKI *et al.*, 1991; STOCKMANN a PIEPERSBERG, 1992), kde je zahrnut v tvorbě sekundárních metabolitů. V cukerném shluku jsou sdruženy geny kódující enzymy, jejichž přítomnost vede k závěru, že biosyntéza MTL zahrnuje nukleotidylační aktivační krok a posloupnost modifikačních kroků probíhajících na nukleotidem (nejspíše dTDP) aktivovaném cukerném intermediátu. Tento alternativní návrh dráhy je založen na stojí na postulátu, že <sup>13</sup>C profil, publikovaný Brahme a spolupracovníky (BRAHME *et al.*, 1984a), by mohl podporovat glukosu jako výchozí jednotku za předpokladu, že dochází k rychlé rovnováze v hexosofosfátovém „poolu“ zprostředkované hexosomonofosfátovou dráhou během produkční fáze. Podobný typ přeuspořádání značení byl již popsán pro jiné látky (validamycin a neomycin) produkované streptomycetami a odvozené od glukosy (CHUNG *et al.*, 1997).



### 2.3.6.3. Kondenzace propylprolinu a methylthiolinkosamidu na N-demethyllinkomycin

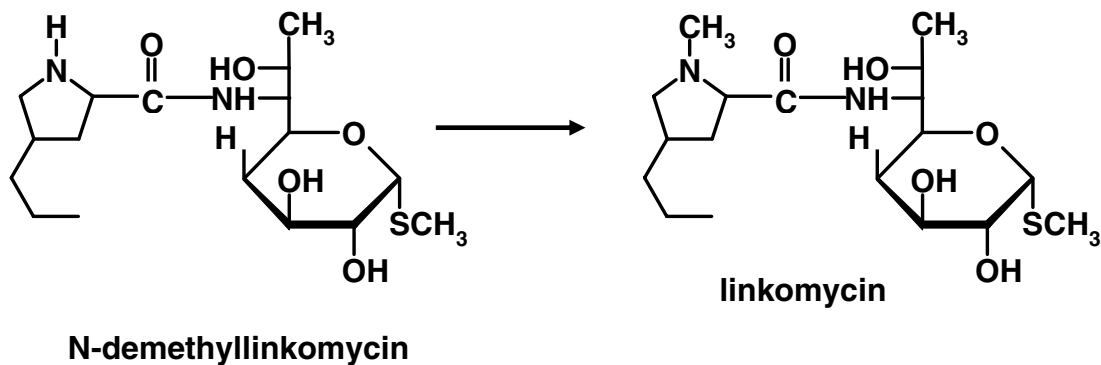
Předposledním krokem biosyntézy linkomycinu je tvorba amidové vazby mezi aminoskupinou cukerné (MTL) a karboxylovou skupinou aminokyselinové (PPL) podjednotky linkomycinu. Kondenzací podjednotek vzniká N-demethyllinkomycin (NDL) (Obr. 27). Pro existenci tohoto biosyntetického svědčí práce Argoudelise a spolupracovníků (ARGOUEDELIS *et al.*, 1965b), kteří popsali hromadění linkomycinu i N-demethyllinkomycinu v médiu producenta v médiu obohacovaném methylthiolinkosamidem (MTL). Existence syntetázové reakce byla dále potvrzena studii syntetázové aktivity producenta linkomycinu *in vivo* (HAUSKNECHT a WOLF, 1987) i *in vitro* (CHUNG *et al.*, 1997).



**Obr. 27: Kondenzace propylprolinu a methylthiolinkosamidu na N-demethyllinkomycin**

#### 2.3.6.4. Methylace N-demethyllinkomycinu, vznik linkomycinu

Závěrečnou reakcí biosyntézy linkomycinu je N-methylace N-demethyllinkomycinu za vzniku linkomycinové molekuly (Obr. 28). Existence tohoto biosyntetického kroku byla potvrzena experimenty *in vitro* (CHUNG *et al.*, 1997) i *in vivo* (KADLEC, 2000).



**Obr. 28: Methylace N-demethyllinkomycinu, vznik linkomycinu**



---

### 2.3.7. Biosyntéza antibiotik strukturálně příbuzných linkomycinu

Komparativní analýza genových shluků pro biosynteticky příbuzné sekundární metabolity je velmi účinným nástrojem pro přiřazování funkcí jednotlivým genům těchto shluků. Tento přístup byl úspěšně použit např. při analýze shluků pro biosyntézu aminokumarinových antibiotik (POJER *et al.*, 2002). Uvedený přístup vychází z předpokladu, že strukturálně podobné prvky v molekulách sekundárních metabolitů budou syntetizovány pomocí podobných metabolických drah.

Podle uvedeného předpokladu sdílejí linkomycinu strukturálně příbuzná antibiotika, (celesticetin a pyrolo[1,4]benzodiazepiny (Obr. 29)), s linkomycinem části svých biosyntetických drah.

#### 2.3.7.1. Biosyntéza celesticetinu

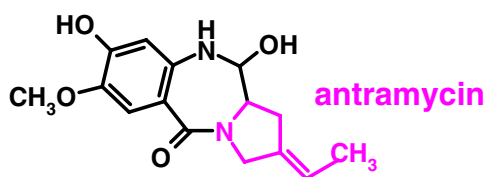
Mezi linkomycinu biosynteticky příbuzná antibiotika patří celesticetin, produkovaný kmenem *Streptomyces caelestis* (HOEKSEMA *et al.*, 1955; HOEKSEMA, 1968). Jak již bylo uvedeno výše, celesticetin je strukturálně rovněž člen linkosamidové rodiny antibiotik a s linkomycinem pravděpodobně sdílí velkou část biosyntetické dráhy, v níž je syntetizována cukerná složka jejich molekuly (obr. Xx). Biosyntéza celesticetinu nebyla dosud studována tak systematicky jako biosyntéza linkomycinu (přehled některých prací lze najít v přehledném článku (WRIGHT, 1983). Nicméně ví se např., že prolinová část celesticetinu není syntetizována touž cestou, jakou vzniká prolinový derivát v molekule linkomycinu (JELÍNKOVÁ *et al.*, 2004).

#### 2.3.7.2. Biosyntéza pyrolo[1,4]benzodiazepinových antibiotik

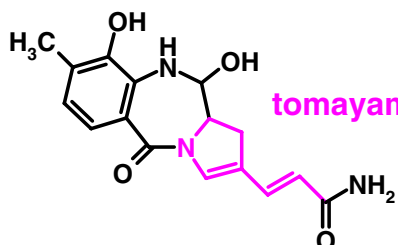
Mezi linkomycinu biosynteticky příbuzná antibiotika patří i pyrolo-[1,4]-benzodiazepiny, produkované např. kmeny *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* (anthramycin) (TENDLER a KORMAN, 1963), *Streptomyces achromogenes* var. *tomaymyceticus* (tomayamycin) (ARIMA *et al.*, 1972), *Streptosporangium sibiricum* (sibiromycin). Pyrolo-[1,4]-benzodiazepiny mají významnou protinádorovou aktivitu, jejich terapeutické použití však znemožňuje jejich kardiotoxicita (WRIGHT, 1983).

Strukturálně jsou pyrolo-[1,4]-benzodiazepiny tvořeny antranilátovou a prolinovou podjednotkou, spojenými peptidovou vazbou a následným, pravděpodobně spontánním uzavřením kruhu (HURLEY a ROKEM, 1983). Uvedené pyrolo-[1,4]-benzodiazepiny se liší substituenty na aromatickém kruhu, povahou postranního řetězce na prolinových podjednotkách a stupněm nenasycenosti prolinového kruhu (WRIGHT, 1983). Různé deriváty prolinu (Obr. 29), které jsou pravděpodobně syntetizovány biosyntetickými drahami, sdílejí některé kroky s aminokyselinovou větví biosyntézy linkomycinu. Tyto sdílené kroky byly navrženy (HURLEY, 1980).

Genový shluk pro biosyntézu anthramycinu byl osekvenován a byly v něm nalezeny homology *lmb* genů A, B1, B2, W, X a Y (HU *et al.*, 2007).

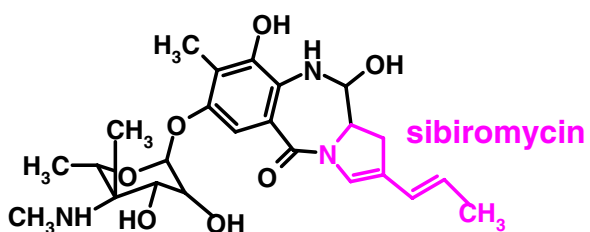


antramycin

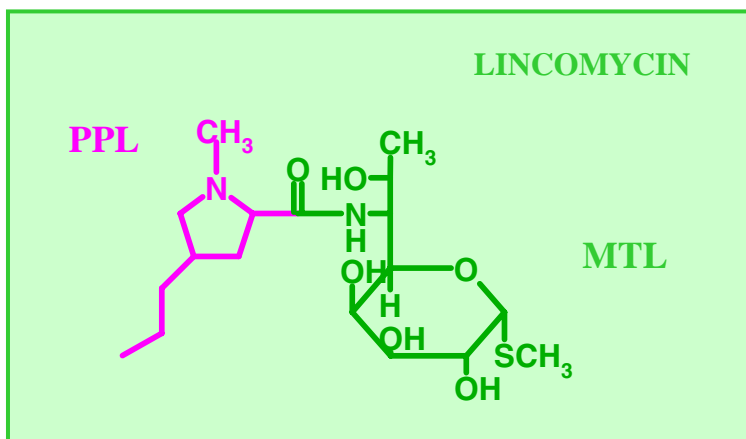


tomayamycin

pyrolobenzodiazepiny



sibiromycin

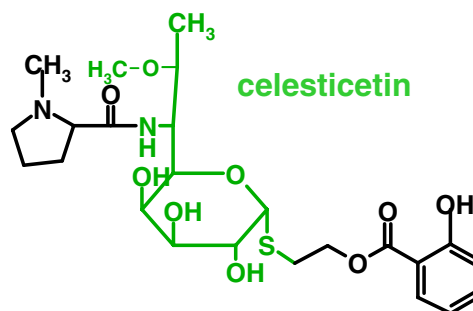


LINCOMYCIN

PPL

MTL

lincosamidy

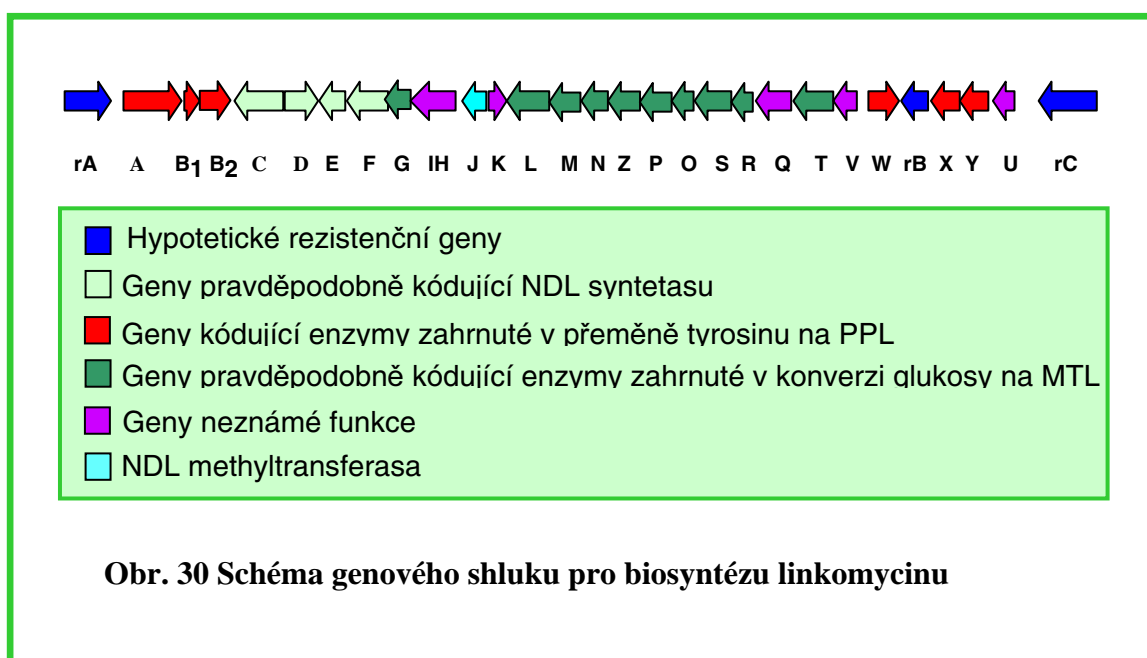


celesticetin

Obr. 29: Linkomycin a biosynteticky příbuzná antibiotika

### 2.3.8. Genetický základ biosyntézy linkomycinu

Podobně jako biosyntetické geny řady jiných antibiotik jsou geny řídící biosyntézu linkomycinu uspořádány ve shluku společně s geny rezistenčními. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu (dále jen linkomycinový shluk) je lokalizován chromozomálně, jeho délka je cca 35 kb a je v něm sdruženo 29 otevřených čtecích rámců (Obr. 30), jež jsou pravděpodobně organizovány v dvanácti transkripčních jednotkách (PESCHKE *et al.*, 1995; JANATA *et al.*, 2001).



Úplná sekvence linkomycinového shluku průmyslového nadprodukcčního kmene *S. lincolnensis* 78-11 je známa (PESCHKE *et al.*, 1995) již od roku 1995, funkce však byly experimentálně přiřazeny jen nemnohým čtecím rámcům; funkce ostatních jsou doposud pouze dedukovány na základě počítačové analýzy jejich sekvence (Tab.2).

V rámci shluku jsou sdruženy tři geny kódující rezistenci k linkomycinu (dále jen *lmr* geny). Gen *lmrA* kóduje pravděpodobně integrální membránový protein (protongradient-dependentní exportér) účastnící se transportu linkomycinu z buňky (ZHANG *et al.*, 1992; PESCHKE *et al.*, 1995). Gen *lmrB* vykazuje (na úrovni proteinového produktu) podobnost s 23S rRNA methyltransferasami a zajišťuje tedy rezistenci k linkomycinu nejspíše formou modifikace (methylace) zásahového místa (ZHANG *et al.*, 1992). Poslední z trojice rezistenčních genů, *lmrC*, vykazuje (na úrovni proteinového produktu) podobnost s ABC transportéry a pravděpodobně tedy kóduje další protein s transportní funkcí (PESCHKE *et al.*, 1995).

Kromě rezistenčních genů obsahuje shluk 26 dalších genů (dále jen *lmb* geny), u nichž je předpokládána funkce biosyntetická či regulační. Zvláštní postavení v rámci této skupiny genů zaujímají geny tvořící tzv. cukerný shluk. Jsou to geny označované jako *lmbQRSOPZNM* (PESCHKE *et al.*, 1995). Homology těchto genů lze nalézt v tzv. „cukerných shlucích“, které kódují enzymy biosyntézy deoxy(amino)cukrů, začleňovaných mikroorganismy do antibiotik. Typickými enzymovými aktivitami, které jsou kódovány geny sdruženými v takových „cukerných shlucích“, jsou dehydratasy, isomerasy, aminotransferasy, methyltransferasy a glykosyltransferasy (NEDAL a ZOTCHEV, 2004).

---

Z hlediska studia funkce genů linkomycinového biosyntetického shluku jsou nejzajímavější homology „cukerných genů“ sdružené v genovém shluku pro biosyntézu biosynteticky příbuzného antibiotika celesticetinu (*viz. výše*) (KOBĚRSKÁ *et al.*, 2005).

Formálně ucelenou skupinu představují i geny, jejichž homology byly nalezeny v genovém shluku pro biosyntézu antramycinu – geny *lmbA, B1, B2, W, X, Y* (HU *et al.*, 2007). Na základě výsledků srovnávací analýzy sekvencí linkomycinového a antramycinového shluku lze předpokládat, že se tyto geny účastní biosyntézy prolinových derivátů přítomných v jejich molekulách. V pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že protein LmbB1 přeměňuje DOPA na blíže neidentifikovanou látku žluté barvy a proteiny LmbB1 a LmbB2 přeměňují *in vivo* tyrosin na blíže neidentifikovanou látku žluté barvy (NEUSSER *et al.*, 1998). U inaktivanta *S. lincolnensis* v genu *lmbX* je produkce linkomycinu obnovitelná obohacením kultivačního média o PPL. Gen *lmbX* je tedy skutečně funkčním genem shluku a účastní se biosyntézy PPL (SMUTNÁ, 2007). Gen *lmbY* vykazuje (na úrovni proteinového produktu) podobnost s F420-dependentními oxidoreduktasami.

Gen *lmbC* je jedním z mála *lmb* genů jimž byla přiřazena funkce. Jeho proteinový produkt LmbC adenylací aktivuje PPL pro vstup do kondenzační reakce (KADLČÍK *et al.*, 2006, June 24-28).

Gen *lmbJ* je dalším genem, jehož funkce byla prokázána experimentálně *in vitro*. Gen kóduje S-adenosyl-dependentní methyltransferasu, katalyzující finální reakci biosyntézy linkomycinu, tedy metylaci N-demethyllinkomycinu (KADLEC, 2000).

Protein	Podobnost s konzervovanými doménami	Předpokládaná / prokázaná funkce
LmrA	Nadrodina MFS ( <u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily)	Efluxní typ rezistence k linkomycinu (exportér závislý na protonovém gradientu)
LmrB	rRNA adenin dimethylasy	Rezistence k linkomycinu modifikací (methylací) zásahového místa (23S rRNA methyltransferasami)
LmrC	ABC-transportéry	Efluxní typ rezistence k linkomycinu (ABC transporter)
LmbA	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidasy	?
LmbB1	glyoxalasa/ proteiny zajišťující resistenci k bleomycinu /dioxygenasy	DOPA extradiol dioxygenasa
LmbB2	-	tyrosin hydroxylasa
LmbC	Acyl-CoA syntetasy (AMP- vytvářející)/ ligasy spojující AMP a kyselinu	Aktivace PPL pro vstup do kondenzační reakce (KADLČÍK <i>et al.</i> , 2006)
LmbD	-	kondenzační enzym
LmbE	velká rodina homologů neznámé funkce	kondenzační enzym
LmbF	Aminotransferasy	kondenzační enzym
LmbG	methyltransferasy	
LmbIH	TldD (Zn-dependentní proteasy)	?
LmbJ	SAM-dependentní methyltransferasy	NDL-methyltransferasa (KADLEC, 2000)
LmbK	Hydrolasy Fosfatasy	biosyntéza aminocukru
LmbL	dehydrogenasy	biosyntéza aminocukru
LmbM	4,6-Dehydratasy	biosyntéza aminocukru
LmbN	ACP proteiny ( <u>a</u> cyll <u>c</u> arrier <u>p</u> roteins) Isomerasy cukrů	biosyntéza aminocukru
LmbO	nukleotidyltransferasy	biosyntéza aminocukru
LmbP	kinasy cukrů	biosyntéza aminocukru
LmbQ	TldD (Zn-dependentní proteasy)	?
LmbR	transaldolasy	biosyntéza aminocukru
LmbS	aminotransferasy	biosyntéza aminocukru
LmbT	glykosyltransferasy	biosyntéza aminocukru
LmbU	<i>cloE, novE, couE</i> (regulační ? geny)	?
LmbV	-	?
LmbW	methyltransferasy	biosyntéza PPL
LmbX	PhzC/PhzF (biosyntéza fenazinů)	biosyntéza PPL
LmbY	flavin-dependentní oxidoreduktasy	biosyntéza PPL
LmbZ	dehydrogenasy	?

Tab. 2 Sekvenční analýza a shrnutí informací o proteinových produktech genů linkomycinového biosyntetického shluku.

---

## **CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Derivatizační experimenty (MAGERLEIN, 1971) naznačují, že linkosamidová antibiotika představují potenciální zdroj nových látek s vyšší účinností, širším spektrem účinku, případně lepšími farmakologickými vlastnostmi, než přírodní linkomycin. Navíc, enzymy sekundárního metabolismu jsou obecně známy širší substrátovou specifitou a (alespoň některé) enzymy biosyntézy linkomycinu zřejmě nejsou v tomto směru výjimkou. Kromě linkomycinu je totiž přirozeně produkován i minoritní linkomycin B a kromě toho lze úpravou složení média získat i další linkomyciny.

Biosyntetická dráha linkomycinu je tedy potenciálním předmětem genetických manipulací s cílem získat hybridní antibiotika na bázi linkomycinu. Základním předpokladem pro úspěšné cílené manipulace biosyntetické dráhy jsou však podrobné znalosti sekvence jejích reakcí i samotných enzymových aktivit. V případě linkomycinu jsou navzdory dlouho známé sekvenci biosyntetického genového shluku informace o enzymech katalyzujících jednotlivé reakce kusé. Situace je navíc komplikována minimálními znalostmi o vnitřních intermediátech dráhy.

Cílem předkládané dizertační práce bylo připravit půdu pro cílené genetické manipulace rozšířením poznatků jednak o aminokyselinové větvi dráhy, zejména o jejích počátečních krocích, jednak o klíčovém enzymu dráhy, NDL-syntetase, která katalyzuje kondenzaci cukerné a aminokyselinové podjednotky linkomycinu a která by měla potenciálně rozpoznávat předkládané modifikované intermediáty linkomycinu odvozené od PPL.

---

### **III. VÝSLEDKY**

---

### **III. VÝSLEDKY**

#### **1. L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis**

---

**Cíle:** Cílem práce bylo přiřadit funkci proteinu LmbB1, blíže jej charakterizovat a potvrdit předpoklad, že 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu DOPA je skutečně reakcí v metabolické dráze vedoucí k syntéze linkomycinu.

**Metody:** Protein LmbB1, kódovaný genem linkomycinového genového shluku, byl nadprodukován v *E. coli BL21 (DE3)* pomocí vektoru pET28b. Zvýšený podíl rozpustné formy LmbB1 byl zajištěn kultivací ve snížené post-indukční teplotě. LmbB1 byl purifikován metaloafinitní chromatografií a kvalita preparátu byla ověřena SDS-elektroforézou. Molekulová hmotnost LmbB1 byla stanovena gelovou chromatografií. Pro testy a ověření byl reakční produkt LmbB1 nadprodukován pomocí purifikovaného LmbB1; pro preparaci proteinu pak pomocí buněk *E. coli BL21 (DE3)* nadprodukujícími LmbB1. LmbB1 reakční produkt byl charakterizován pomocí CE-MS.

**Výsledky:** Protein LmbB1 byl nadprodukován v *E. coli*, purifikován v aktivní formě a charakterizován jako dimer identických podjednotek. Stanovená molekulová hmotnost a fragmentační profil LmbB1 reakčního produktu byly v souladu s předpokládanou strukturou kyseliny 4-(karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo-2-karboxylové. LmbB1 je tedy dioxygenasa katalyzující 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu DOPA. Z bezprostředního produktu štěpení, 2,3-secoDOPA, vzniká LmbB1 reakční produkt kyselina 4-(karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo-2-karboxylová intramolekulární cyklizací a to nejpravděpodobněji za přispění LmbB1.