VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav biotechnologie

Laboratoř oboru Biotechnologie léčiv II

Ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace *Streptomyces coelicolor*

Vypracoval: Bc. Matouš Čihák
Vedoucí práce: prof. Ing. Jan Masák, CSc.
Konzultanti: RNDr. Jan Bobek, Ph.D.
Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D.

Studijní program: Syntéza a výroba léčiv
Studijní obor: Biotechnologie léčiv

Datum odevzdání: 1. 9. 2016

Podpis studenta:

OBSAH

1 LITERÁRNÍ ČÁST 3
1.1 STREPTOMYCETY 3
1.1.1 Výskyt 3
1.1.2 Genom 4
1.1.3 Životní cyklus a jeho regulace 5
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 14
2.1 MATERIÁL 14
2.1.1 Bakteriální kmen 14
2.1.2 Kultivační média 14
2.1.3 Enzymy 17
2.1.4 DNA oligonukleotidy a velikostní standardy 17
2.1.5 Roztoky a pufry 18
2.1.6 Použité chemikálie 20
2.2 METODIKA 23
2.2.1 Kultivační metody 23
2.2.2 Metody práce s RNA a DNA 25
2.2.3 Separační a analytické metody 30
3 VÝSLEDKY 34
3.1 POROVNÁNÍ EXTRAKČNÍCH METOD 34
3.2 ANALÝZA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ 35
3.2.1 Albaflavenon 35
3.2.2 Kalcium-dependentní antibiotikum (CDA) 37
3.2.3 Coelimycin P1 40
3.2.4 Desferrioxamin B 42
3.2.5 Desferrioxamin D1 43
3.2.6 Desferrioxamin E 44
3.2.7 Desferrioxamin G 46
3.2.8 Germicidin A 47
3.2.9 Germicidin B 49
3.2.10 Actinorhodin a jeho deriváty 50
3.2.11 Kalafungin 52
3.2.12 Undecylprodigiosin 53
3.2.13 Streptorubin B 54
3.3 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE 55
4 DISKUSE 56
5 POUŽITÁ LITERATURA 63

ÚVOD

Streptomycety zaujímají v hierarchii bakteriální říše vysoké postavení svou vyspělou morfologií a fyziologií (Fuchs, 2007). Jsou to vláknité mnohobuněčné bakterie schopné buněčné diferenciace, která připomíná životní cyklus eukaryotních hub (Seipke a kol., 2011). Příznačnou fyziologickou vlastností streptomycet je tvorba sekundárních metabolitů, z nichž mnohé jsou známé jako biologicky aktivní látky (Madigan a kol, 2010; Thakur a kol., 2007; van Keulen a Dyson, 2014).

Produkty sekundárního metabolismu nejsou esenciální, často však poskytují organismu konkurenční výhodu nebo schopnost přežití v nehostinných podmínkách (Fuchs, 2007; Karlovsky a kol., 2008; Madigan a kol., 2010). Příkladem těchto látek izolovaných z různých druhů streptomycet mohou být pigmenty (např. coelimycin P1; viz Gomez-Escribano a kol., 2012), obranné látky (např. tetracyklin; viz Darken a kol., 1960), autoregulační faktory (např. A-faktor; viz Hara a Beppu, 1982), signální molekuly (např. γ-butyrolakton; viz Takano a kol., 2001), či enzymy pro utilizaci neobvyklých substrátů (např. xylanasy, viz Kansoh a Nagieb, 2004). Uplatnění nacházejí především jako klinicky významná antibiotika, dále jako látky s antitumorovou, antifungální a imunosupresivní aktivitou (Brun a Shimkets, 2000; Karlovsky a kol., 2008). K nejvýznamnějším patří streptomycin, který byl izolován jako produkt bakterie *Streptomyces griseus* v roce 1946 a již o rok později se začal úspěšně aplikovat při léčbě tuberkulózy (Waksman a kol., 1946; McDermott a kol., 1947).

Díky svému bohatému sekundárnímu metabolismu jsou streptomycety využívány v mnoha odvětvích biotechnologického průmyslu a často bývají zmiňovány v souvislosti s hledáním nových druhů léčiv (Fuchs, 2007; Karlovsky a kol., 2008). Prvotním modelovým organismem se stal kmen *Streptomyces coelicolor* A3(2), který je tak v dnešní době nejlépe prostudován. V roce 2002, v souvislosti se zveřejněním jeho genetické informace, byl učiněn důležitý objev, že součástí genomu *S. coelicolor* jsou též shluky genů sloužících k syntéze sekundárních metabolitů, které se však v běžných laboratorních podmínkách neprodukují (Bentley a kol., 2002). Aktivací těchto genových klastrů (viz kapitola 1.1.3) lze navodit syntézu dosud neizolovaných látek (Ikeda a kol., 2003; Ohnishi a kol., 2008; Tanaka a kol., 2013).

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá studiem germinace streptomycet, jakožto modelu vývojového přechodu z dormantního stavu do metabolicky aktivní fáze růstu (Bobek a kol., 2014). Této vývojové fázi nebyla dosud věnována dostatečná pozornost, jelikož je považována za neprodukční (Seipke a kol., 2011). Z námi naměřených dat genové exprese při germinaci *S. coelicolor* (včetně analýzy vazeb sigma faktorů na promotory) ale vyplývá, že mezi aktivované geny patří i geny řídící syntézu sekundárních metabolitů, včetně kryptických (Bobek a kol., 2014; Strakova a kol., 2013a; Strakova a kol., 2014).

Cílem mé práce je ověřit přítomnost sekundárních metabolitů ve fázi germinace *S. coelicolor* M145. Sekundární metabolity produkované v průběhu germinace by organismu zřejmě poskytovaly nejen výhodu v silně konkurenčním půdním prostředí, ale mohly by být i germinačním signálem mezibuněčné komunikace quorum sensing (Rutherford a kol., 2012).

1 LITERÁRNÍ ČÁST

1.1 STREPTOMYCETY

Streptomycety (rod *Streptomyces*) jsou grampozitivní bakterie z třídy *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales* a čeledi *Streptomycetaceae* (Madigan a kol., 2010). S více než 576 popsanými druhy je rod *Streptomyces* nejpočetnějším rodem kmene aktinomycet (Labeda, 2011). Zahrnuje skupinu fylogeneticky příbuzných, vláknitých a obligátně aerobních mnohobuněčných bakterií (Madigan a kol., 2010). Vyskytují se mezi nimi mezofilní, psychrofilní, ale i termofilní zástupci, např. *Streptomyces thermodiastaticus* (Kim a kol., 1999).

1.1.1 Výskyt

Aktinomycety jsou součástí mikrobiálního života v pedosféře, přičemž 50 % z celkové populace aktinomycet v půdě náleží rodu *Streptomyces*. Streptomycety tedy představují významnou část půdního ekosystému (Thakur a kol., 2007). Upřednostňují alkalické až neutrální půdy, ve kterých díky svému vláknitému růstu kolonizují různé povrchy (Fuchs, 2007; Madigan a kol., 2010). Půdám dodávají charakteristický plísňový zápach zapříčiněný produkcí celé řady komplexních metabolitů, nejčastěji bicyklického alkoholu geosminu (Gerber a Lechevalier, 1965).

Výrazné zastoupení streptomycet v pedosféře souvisí s jejich růstovou nenáročností, jelikož dokáží využívat rozmanité zdroje uhlíku, a nevyžadují růstové faktory či vitamíny (Korn-Wendish a Kutzner, 1992). Streptomycety hrají významnou roli v rozkladu organických látek. Využívají řadu extracelulárních enzymů k degradaci složitých rostlinných i živočišných zbytků, včetně proteinů, polysacharidů (např. celulosy nebo chitinu) a aromatických látek (Kansoh a Nagieb, 2004). Účastní se tak koloběhu uhlíku v přírodě a tvorby humusu (Korn-Wendish a Kutzner, 1992, Madigan a kol., 2010).

Kromě půdy byl popsán výskyt některých druhů streptomycet i ve sladkých vodách a mořích (např. *Streptomyces nanhaiensis*). Zřejmě se zde ale nejedná o autochtonní mikroflóru (Korn-Wendish a Kutzner, 1992; Tian a kol., 2012). Izolace streptomycet z klinických materiálů je vzácná (Bednář a kol., 1999). Většina druhů bakterií rodu *Streptomyces* není součástí mikroflóry jiných organismů a je nepatogenních (Fuchs,

2007; Madigan a kol., 2010). Výjimku představují fytopatogenní druhy streptomycet. Patří k nim např. *Streptomyces scabei,* původce aktinobakteriální obecné strupovitosti bramborových hlíz (Lerat a kol., 2009).

1.1.2 Genom

Do ledna roku 2016 byl osekvenován kompletní genom nejméně 28 zástupců rodu *Streptomyces* (např. *Streptomyces lividans* TK24) a na mnoha dalších se intenzivně pracuje (Harrison a Studholme, 2014; Rueckert a kol., 2015; Wibberg a kol., 2016). První kompletně osekvenovaný genom streptomycet patří modelovému mikroorganismu *Streptomyces coelicolor* A3(2), který je také proto nejlépe anotovaný (Bentley a kol., 2002).

Genomy streptomycet bývají poměrně velké. Běžně se jejich velikost pohybuje mezi 8-10 Mbp, což je spolu s genomem myxobakterií největší známý genom v bakteriální říši (Madigan a kol., 2010; Schneiker a kol., 2007). V případě *S. coelicolor* jeho velikost činí 8,67 Mbp (Bentley a kol., 2002). Genom streptomycet je tvořen pro bakterie netypickým lineárním chromosomem, který se též vyskytuje např. u *Borrelia burgdorferi*, a je charakteristický vyšším obsahem G-C párů bází, jejichž zastoupení se pohybuje okolo 70 % (Bentley a kol., 2002, Harrison a Studholme, 2014). Modelový mikroorganismus *Streptomyces coelicolor* A3(2) má obsah G-C párů 72 % (Bentley a kol., 2002). Vysoké zastoupení G-C párů v genomu mají však i jiné aktinomycety, např. *Corynebacterium glutamicum* a *Mycobacterium tuberculosis* (Fuchs, 2007).

V lineárním chromosomu streptomycet jsou geny uspořádány do centrální oblasti a dvou nestejně dlouhých ramen (Bentley a kol., 2002). Centrální oblast je mezi různými druhy poměrně konzervovaná. Vyskytují se v ní převážně esenciální geny primárního metabolismu. Zhruba uprostřed centrální oblasti se nachází *oriC* (Choulet a kol., 2006; Ohnishi a kol., 2008). V mezidruhově variabilních ramenech jsou přítomné geny sekundárního metabolismu a adaptační geny (Choulet a kol., 2006). Dalšími nositeli genetické informace mohou být lineární nebo cirkulární plasmidy (Bentley a kol., 2002).

Enzymy pro syntézu sekundárních metabolitů (zejména antibiotik) bývají kódovány mnoha geny, což vysvětluje nezvykle rozsáhlé genomy streptomycet v porovnání s ostatními bakteriemi (Bentley a kol., 2002, Ohnishi a kol., 2008; Schneiker a kol., 2007). Geny pro biosyntézu konkrétního sekundárního metabolitu jsou u streptomycet

často přítomny ve shluku. V něm bývají vloženy i geny pro rezistenci, díky které je organismus chráněn před účinky produkované látky (Bentley a kol., 2002; Fuchs, 2007; Hopwood, 2007).

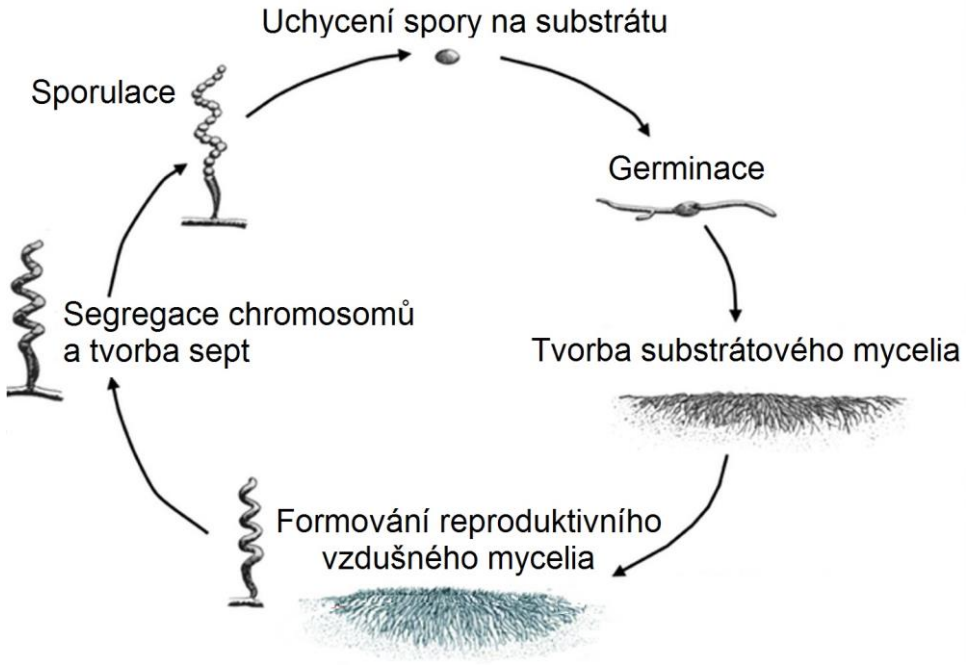
1.1.3 Životní cyklus a jeho regulace

Komplexní životní cyklus streptomycet (Obr. 1) má výrazné morfologicky a fyziologicky definované fáze (Seipke a kol., 2011). Jedná se o složitý proces, který řídí a kontroluje celá řada molekul vzájemně propojených do signálních drah a kaskád (Kelemen a Buttner, 1998). Signální molekuly produkované streptomycetami poskytují těmto organismům informace o vnějším i vnitřním prostředí. Na základě jejich vyhodnocení mohou vůči podmínkám prostředí přizpůsobovat další vývoj. Kompletní životní cyklus streptomycet proběhne tedy pouze za předpokladu splnění určitých metabolických, morfologických a stresových požadavků (Kelemen a Buttner, 1998; Claessen a kol., 2006).

Formování substrátového mycelia

Dlouhá a větvená mnohobuněčná vlákna streptomycet jsou analogická vegetativním hyfám eukaryotních hub. Shluk těchto vzájemně propletených vláken připomíná podhoubí, tzv. mycelium (Fuchs, 2007). Rozvětvená síť vegetativních hyf streptomycet formuje primární mycelium pronikající substrátem (Nodwell a Losick, 1998). Růst je zprostředkován rozšířením růstového vrcholu hyfy a započetím nového větvení (Buttner a Flärdh, 2009). Je známo, že syntéza buněčné stěny probíhá spíše u vrcholu hyfy, nikoliv podél bočních stěn (Buttner a Flärdh, 2009; Mazza a kol, 2006).

Klíčovou roli během prodlužování růstového vrcholu při větvení hyf hraje produkt genu *divIVA* (DivIVA). Jedná se o růstový marker zahajující vytváření nových míst pro růst buněčné stěny. Reguluje také přísun enzymů pro syntézu buněčné stěny (Scherr a Nguyen, 2009). DivIVA se akumuluje na boční stěně, v místě před viditelným výrůstkem. Nová větev se poté formuje z tohoto místa. Má-li být zahájen růst a tvorba nového hyfálního vrcholu, je nezbytná přítomnost enzymů zapojených do exportu a tvorby peptidoglykanu v místě s nahromaděným DivIVA. Hyfy rostou podle rozšíření vrcholu. Jejich větvením vzniká substrátové mycelium (Obr. 1), které svým růstem napříč substrátem i hluboko do něho podnítí vznik vegetativních kolonií (Flärdh, 2003; Buttner a Flärdh, 2009).

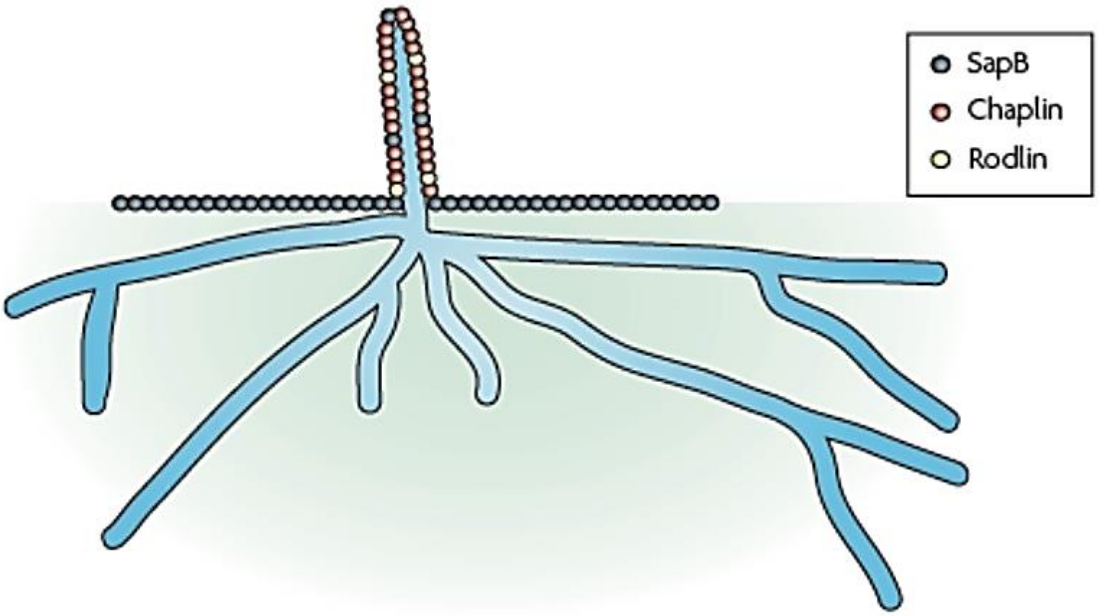


Obr. 1 Schéma životního cyklu streptomycet; převzato z Seipke a kol. (2011)

Formování vzdušného mycelia a sekundární metabolismus

V důsledku nedostatku živin nebo vlivem jiných stresových faktorů streptomycety formují nad povrchem substrátu sekundární (vzdušné) mycelium, viz Obr. 1 (Fuchs, 2007; Seipke a kol., 2011). Na prodlužování růstového vrcholu vzdušného mycelia se podílejí produkty genů *mreB* (Buttner a Flärdh, 2009). Hydrofobní peptid SapB, který tvoří povrch vzdušných hyf (Obr. 2), napomáhá jejich vzpřímení tím, že narušuje povrchové napětí mezi substrátem a vodným prostředím (Kelemen a Buttner, 1998).

Pro formování vzdušného mycelia existuje i dráha nezávislá na SapB, kterou zprostředkovávají proteiny hydrofobního pláště, tzv. chapliny a rodliny. Před tvorbou vzdušného mycelia je aktivována exprese osmi *chp* genů (chapliny). K expresi *rdl* genů (rodliny) dochází v rostoucích vzdušných hyfách. Dva homologní proteiny RdlA a RdlB se zapojují do formování tzv. rodletové vrstvy na povrchu vzdušných hyf *S. coelicolor* (Buttner a Flärdh, 2009). Delece genů pro tvorbu rodlinů nemá žádný vliv na vývoj vzdušných hyf. Netvoří se pouze typická rodletová vrstva. Naopak při deleci genů kódujících chapliny vzdušné mycelium nevzniká (Buttner a Flärdh, 2009; Cleassen a kol. 2002, Cleassen a kol. 2003).



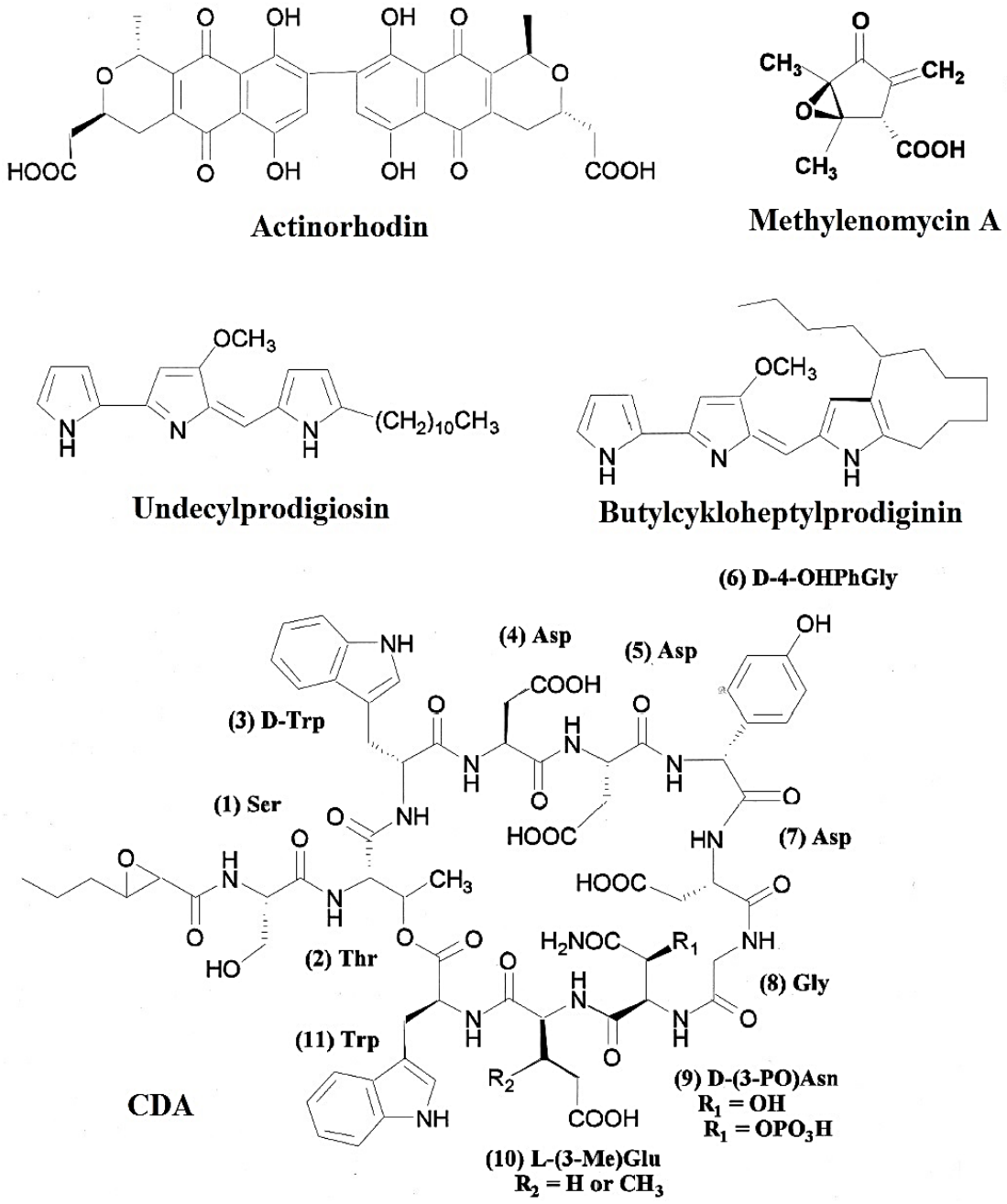
Obr. 2 Schéma tvorby vzdušného mycelia streptomycet s charakteristicky umístěnými hydrofobními proteiny; převzato z Buttner a Flärdh (2009)

Ve stádiu vzdušného mycelia, tedy při přechodu do stacionární fáze růstu, dochází obvykle k aktivaci sekundárního metabolismu streptomycet, zejména produkce antibiotik (Madigan a kol., 2010; Seipke a kol., 2011). Rod *Streptomyces* je vůbec nejvýznamnějším rodem aktinomycet z hlediska produkce biologicky účinných látek (Šilhánková, 2008). Za jejich producenty lze označit nejméně padesát procent všech izolovaných streptomycet. (jedná se minimálně o pět set prokázaných a odlišných antibiotik), přičemž v humánní a veterinární medicíně se používá více než šedesát antibiotik produkovaných těmito bakteriemi (Fuchs, 2007; Labeda, 2011; Madigan a kol., 2010).

Streptomycety mohou současně produkovat i několik antibiotik odlišného složení, či spektra účinku. Úroveň produkce se u jednotlivých kmenů streptomycet může výrazně lišit. Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů streptomycet jsou většinou na chromosomu sdruženy ve shlucích a jejich exprese bývá v rámci sekundárního metabolismu zahájena působením stresových faktorů (Bentley a kol., 2002; Tanaka a kol., 2013). Producentem několika chemicky odlišných antibiotik je i *S. coelicolor*, viz Obr. 3 (Kieser a kol., 2000; van Keulen a Dyson, 2014).

Historicky prvním popsaným antibiotikem *S. coelicolor* je actinorhodin (Brockmann a Hieronimus, 1955). Jedná se o polyketidové antibiotikum, které mění svou barvu v závislosti na pH. V kyselém prostředí má červené zbarvení, ale v zásaditém zmodrá.

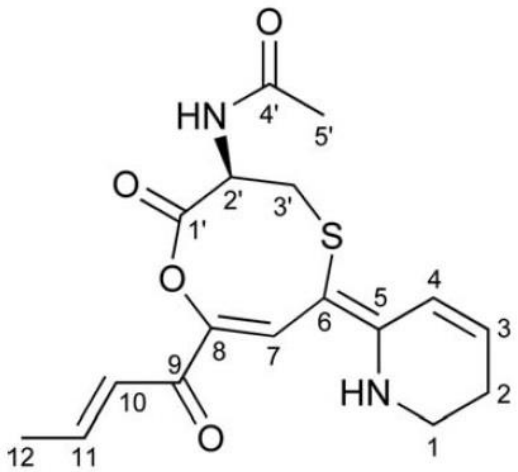
Vykazuje slabé antibiotické účinky, a proto se klinicky nevyužívá (Bystrykh a kol., 1996). Genový klastr zodpovědný za produkci actinorhodinu obsahuje kromě biosyntetických enzymů také geny zodpovědné za export antibiotika ven z buňky (Okamoto a kol., 2009).



Obr. 3 Antibiotika produkovaná *S. coelicolor*; převzato z Kieser a kol. (2000)

K dalším antibiotikům *S. coelicolor* (Obr. 3) patří undecylprodigiosin, methylenomycin a kalcium-dependentní antibiotikum označované zkratkou CDA (Kieser a kol. 2000). Undecylprodigiosin je často nazýván jako červený pigment *S. coelicolor* A3(2), přestože tento pigment představuje spíše směs undecylprodigiosinu s nejméně dalšími čtyřmi prodigininy a převládajícím zastoupením butylcykloheptylprodigininu (Tsao a kol., 1985). Methylenomycin patří mezi cyklopentanoidní látky a vyskytuje se ve formě A nebo B. Geny pro jeho syntézu jsou lokalizovány na plasmidu SCP1. Vykazuje antibakteriální účinnost vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím (Hobbs a kol., 1992). Kalcium-dependentní antibiotikum (CDA) je cyklický lipopeptid obsahující jedenáct aminokyselinových zbytků s připojeným šesti uhlíkatým řetězcem na N-konci peptidu (Kempter a kol., 1997).

Analýzou genetické informace bylo zjištěno, že streptomycety obsahují až dvacet různých genových shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů. Běžnou kultivací však v laboratorních podmínkách dochází k aktivaci pouze několika z nich (Bentley a kol., 2002; Ikeda a kol., 2003). Takové neexprimované genové shluky se nazývají „kryptické“ genové klastry (Bentley a kol., 2002; Ikeda a kol., 2003; Ohnishi a kol., 2008; Tanaka a kol., 2013). Aktivací exprese těchto kryptických klastrů často dochází k biosyntéze dosud neizolovaných látek. Příkladem může být polyketidový alkaloid coelimycin P1, tzv. žlutý pigment (Obr. 4), jenž je produktem *cpk* kryptického klastru *S. coelicolor* (Gomez-Escribano a kol., 2012).



Obr. 4 Struktura coelimycinu P1 (tzv žlutého pigmentu), metabolického produktu *cpk* kryptického klastru *S. coelicolor* A3(2); převzato z Gomez-Escribano a kol. (2012)

Aktivace kryptických klastrů a zvýšení produkce sekundárních metabolitů lze dosáhnout modifikacemi na různých úrovních biosyntézy těchto látek. Běžným a jednoduchým způsobem bývá kultivace streptomycet za nestandardních fyzikálních a nutričních podmínek, nebo ko-kultivace s jinými mikroorganismy (Rateb a kol., 2013). Využívá se rovněž klasických genetických manipulací v oblastech regulačních genů shluku (Gomez-Escribano a kol., 2012; Luo a kol., 2013). Další vhodnou metodou k aktivaci kryptických klastrů je pak jejich kompletní přenesení do heterologních producentů (Kalan a kol., 2013; Tanaka a kol., 2013).

Vzhledem k množství kryptických klastrů by studie zabývající se hledáním vhodných způsobů jejich aktivace mohly přispět k objevům nových látek. Streptomycety proto nadále skýtají obrovský potenciál i při hledání dosud neznámých substancí s využitelnými biologickými aktivitami (Ohnishi a kol., 2008; Tanaka a kol., 2013).

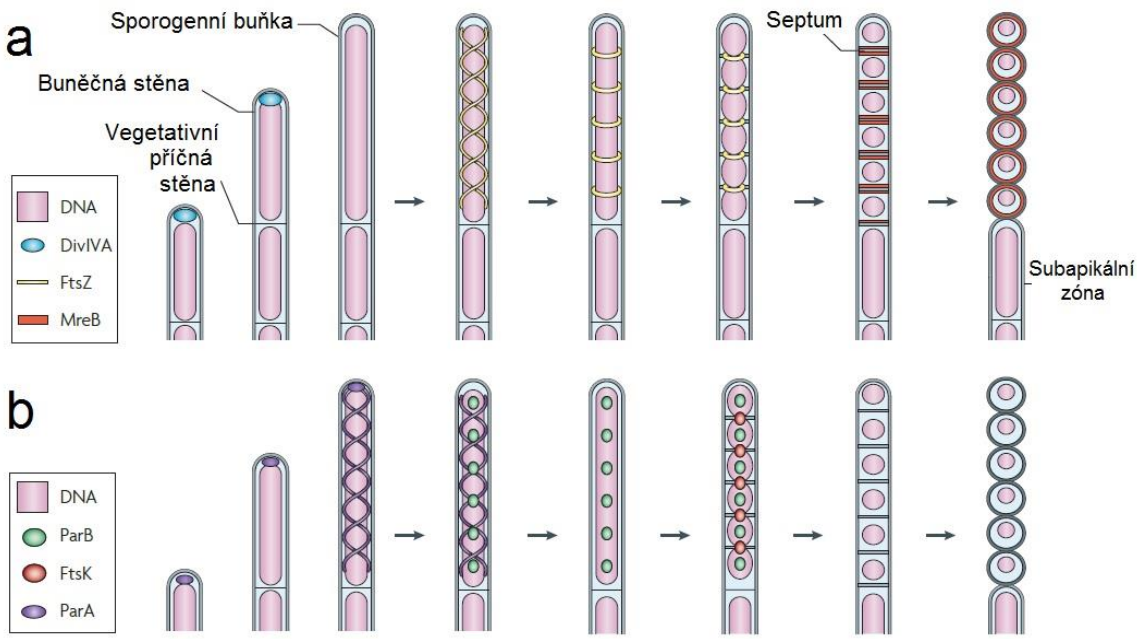
Sporulace

Spory slouží nejen k reprodukci organismu, ale i k jeho šíření a ochraně genetického materiálu (Seipke a kol., 2011; Šilhánková, 2008). Spory jsou součástí životního cyklu mnoha bakterií, rostlin, řas a hub (Stöcker a Dietrich, 1986). U mnohých organismů bývají adaptovány k přežití za déletrvajících nepříznivých podmínek (Hanson a kol., 1972). Lze je klasifikovat z hlediska místa vzniku, funkce či fáze životního cyklu, v níž vznikají. Proces tvorby spor se nazývá sporulace (Fuchs, 2007; Stöcker a Dietrich 1986).

U streptomycet vzniká spora vně mateřské buňky, a proto se označuje jako exospora (Madigan, 2010). Exospory se tvoří v řetízcích na koncích dlouhých větvených vláken vzdušného mycelia (Obr. 1). U některých druhů jsou tyto řetízky spirálovitě stočené. Vlákno, na němž se tvoří spory, se nazývá sporofor (Šilhánková, 2008). Sporofory tvoří chmýřovitou vrstvu na povrchu kolonie, která umožňuje rozptýlení zralých spor do okolí a kolonizaci nového území (Nodwell a Lossick, 1998).

Vrchol budoucího sporoforu nese apikální sestavy proteinů DivIVA (Obr. 5). Působením proteinu FtsZ, který se sestavuje do dvoušroubovicových vláken, a produktů genů *whiA* a *whiB* dochází k zastavení růstu, které je nezbytné pro tvorbu apikální tzv. sporogenní buňky. Peptidová vlákna se následně přeuspořádají do pravidelně rozmístěných *Z* prstenců řídících tvorbu sept. Výsledkem je diferenciace apikální buňky

do řetězce haploidních kulovitých až dlouze elipsoidních spor. Formování silné stěny spor se po dokončení septa účastní bakteriální „aktin“ MreB. Nejdříve se MreB vyskytuje v místě uzavření septa. Později je přítomný v okolí vznikajících spor (Buttner a Flärdh, 2009).



Obr. 5 Schéma reorganizace biologických procesů buňky během diferenciace vzdušných hyf do spor u streptomycet. **a | Diferenciace apikální sporogenní buňky do řetězce spor.** Vlákno vzdušné hyfy roste v prodloužení a ve vrcholu nese apikální sestavy proteinů DivIVA. Pro tvorbu apikální sporogenní buňky je nezbytné zastavení růstu zprostředkované proteinem FtsZ, který se sestavuje do dvoušroubovicových vláken. Vlákna se následně přeuspořádají do pravidelně rozmístěných Z prstenců řídících tvorbu sporových sept. Formování silné stěny spor se po dokončení septa účastní MreB. Nejdříve se MreB vyskytuje v místě uzavření septa. Později je přítomný v okolí vznikajících spor. **b | Segregace chromosomů.** ParA ATPasa se nalézá ve vrcholu raných vzdušných hyf a později vytváří helikální vlákna podél sporogenní buňky. ParB se zapojuje do nukleoproteinového komplexu v chromosomálních *oriC* oblastech. Distribuce těchto ParB-*oriC* komplexů podél sporogenní buňky vyžaduje regulaci prostřednictvím ParA. Vrůstáním septa se rozdělí původně celistvý jaderný materiál a FtsK DNA translokasa cíleně oddálí a napomůže uvolnění DNA ze vznikajícího septa; převzato z Buttner a Flärdh (2009)

Vnější obal spor je vytvářen přeskupením chaplinů a rodlinů (viz Formování vzdušného mycelia a sekundární metabolismus) do útvarů podobných amyloidním vláknům uvnitř peptidoglykanové buněčné stěny (Buttner a Flärdh, 2009). Na shlukování jednotlivých chaplinových fibril do dvojic společně působí rodlinové proteiny RdlA a RdlB. Chapliny mohou být uspořádány náhodně, nebo jsou prostřednictvím rodlinů sestaveny do rodletové vrstvy. Rodletová vrstva se vyznačuje charakteristickou strukturou a nepropustností pro vodu (Buttner a Flärdh, 2009, Mikulík a kol., 2002).

Vzhledem k nepravidelnému rozdělení genomu ve vláknech v ostatních vývojových fázích, jsou spory v podstatě jediným haploidním stádiem životního cyklu. K segregaci chromosomů do spor (Obr. 5) dochází nejdříve za účasti ParA ATPasy, která se nalézá ve vrcholu raných vzdušných hyf, a později vytváří helikální vlákna podél sporogenní buňky. ParB je protein vázající DNA a zapojuje se do nukleoproteinového komplexu v chromosomálních *oriC* oblastech (Buttner a Flärdh, 2009). Distribuce těchto ParB-*oriC* komplexů podél sporogenní buňky vyžaduje regulaci prostřednictvím ParA (Ditkowski a kol., 2013). Vrůstáním septa se rozdělí původně celistvý jaderný materiál. FtsK DNA translokasa cíleně oddálí a napomůže uvolnění DNA ze vznikajícího septa (Buttner a Flärdh, 2009).

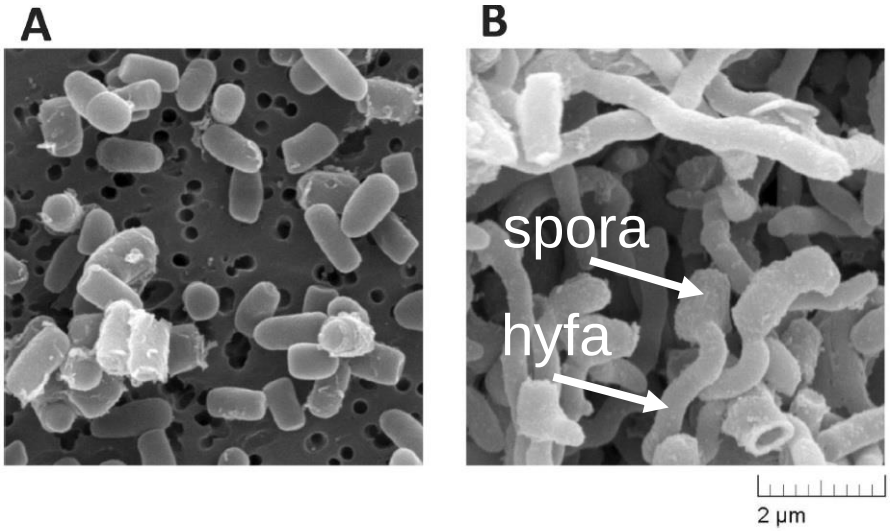
V porovnání s vegetativní buňkou je exospora odolnější (především proti vysychání). Není ale tak dobře adaptována k přežití za nepříznivých podmínek jako endospora bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*, která vzniká uvnitř mateřské buňky (Fuchs, 2007; Madigan, 2010). Exospory streptomycet neobsahují zřejmě kalcium dipikolinát, který chrání endospory před extrémními podmínkami (Hanson a kol., 1972; Scott a Ellar, 1978).

Germinace

Spora (exo- i endo-) představuje dormantní stádium organismu, tedy stav snížené aktivity metabolismu, nebo jeho stagnace (Fuchs, 2007; Stöcker a Dietrich 1986). Germinace spor (Obr. 1 a 4) je proces přechodu buňky z dormantního stádia do metabolicky aktivní vegetativní fáze růstu (Bobek a kol., 2014; Mikulik a kol. 1977). Reaktivace exospor streptomycet z dormantního stádia probíhá ve vodném prostředí, kde exospory ztrácejí svou hydrofobicitu (Buttner a Flärdh, 2009). Dochází k influxu vody a zvětšení objemu spory.

Germinace může být u streptomycet stimulována např. tepelným šokem (Stewart a kol., 1981), mechanickým rozrušením vnějšího obalu (Miguelez a kol., 1993; Mikulik a kol. 1977; Stastna, 1977), nebo přidáním A-faktoru do média (Gruzina a kol., 2003). Dormantní spory obsahují transkriptom, který je vzhledem k minimální metabolické aktivitě dormantních spor pozůstatkem sporulace (Mikulik a kol. 1977). Tato mRNA je zřejmě nezbytná pro počáteční fáze germinace. Germinace vyžaduje také opětovnou aktivaci transkripčního aparátu za spolupůsobení mnoha sigma faktorů, jejichž exprese probíhá již od samého počátku procesu (Bobek a kol., 2014; Strakova a kol., 2014).

U *S. coelicolor* při germinaci dochází nejdříve k degradaci peptidoglykanové buněčné stěny hydrolytickými enzymy RpfA a SwlA (Haiser a kol., 2009). Po šedesáti minutách dochází k úplné rehydrataci spor a k degradaci nepotřebné mRNA pocházející ze sporulace. Další transkripce je zpomalena a začíná odrážet nové růstové podmínky (Bobek a kol., 2014). K první replikaci DNA dochází zhruba po 120-150 min inkubace (hodnota se liší mezidruhově i v závislosti na podmínkách) a časově souvisí s reaktivací metabolických drah (Glauert a Hopwood, 1961; Hardisson a kol. 1978; Bobek a kol., 2014). Z dat genové exprese lze usuzovat, že po 150-180 min se aktivita většiny metabolických drah stabilizuje. Následuje mikroskopicky pozorovatelné klíčení spor (Obr. 6) vedoucí opět ke vzniku substrátového mycelia (Bobek a kol., 2014; Claessen a kol., 2006; Kelemen a Buttner, 1998; Ohnishi a kol., 2002).



Obr. 6 Spory *S. coelicolor* pozorované elektronovým mikroskopem (A) dormantní spory (B) naklíčené spory; převzato ze Strakova a kol. (2013b)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 MATERIÁL

2.1.1 Bakteriální kmen

Streptomyces coelicolor M145 (SCP1$^-$, SCP2$^-$); (Redenbach a kol., 1996)

Kmen poskytl: RNDr. Jan Bobek, Ph.D.

(Bakteriologická laboratoř; Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze)

Kmen *S. coelicolor* A3(2) postrádající lineární plasmid SCP1 (350 kb) a cirkulární plasmid SCP2 (31,4 kb). Nesyntetizuje methylenomycin, neboť jeho produkce je vázána na plasmid SCP1 (Hobbs a kol., 1992; Kiesser a kol., 2000). Kmen je uchováván ve formě sporových suspenzí (viz kap. 2.2.1).

2.1.2 Kultivační média

Není-li uvedeno jinak:

- jedná se o procenta vypočtená na základě poměru hmotnost/objem, tj. *w*/*v*
- pro přípravu médií byla použita destilovaná voda (dH_2O),
- pro úpravu pH byly použity 2M vodné roztoky HCl a NaOH
- média byla sterilována vlhkým teplem (121 °C, 23 min, 101,5 kPa)

Tekutá kultivační média

AM médium (Strakova a kol., 2013a)

450 ml směs aminokyselin (každá 2,21 mM)
+ fosfáty (20 mM Na_2HPO_4, 30 mM K_2HPO_4)

Po sterilaci přidat:

25 ml 40% glukosa (nebo 5 ml glycerolu na litr média)

12,5 ml 2% $MgCl_2$

0,5 ml 1M $CaCl_2$ (konečná koncentrace 1mM)

3,5 ml 1M KCl (konečná koncentrace 7mM)

11 ml směs bází 5× Base 0,457 mg/10 ml (konečná koncentrace 0,01 %)

Smíchat a upravit pH na hodnotu 7.

2xYT médium (Kiesser a kol., 2000)

16 g trypton

10 g kvasničný extrakt

5 g NaCl

Doplnit dH_2O do 1000 ml, upravit pH na 7,2 a sterilovat.

R3 médium (Gomez-Escribano a kol., 2012)

5 g mannitol (nebo 5 ml glycerolu na litr média)

5 g kvasničný extrakt

0,1 g kaseinový hydrolyzát

3 g L-prolin

0,2 g K_2SO_4

5,6 g TES

10 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

2 ml stopové prvky

Doplnit dH_2O do 1000 ml a upravit pH na 7,2.

stopové prvky

40 mg $ZnCl_2$

200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$

10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

Doplnit dH_2O do 1000 ml a skladovat v tmavé láhvi.

Po sterilaci přidat sterilní roztoky (na 100 ml R3 média):

1 ml 0,5% KH_2PO_4

0,4 ml 5M $CaCl_2$

1,5 ml 20% L-prolin

NMMP médium (Kiesser a kol., 2000)

2 g $(NH_4)_2SO_4$

5 g kaseinový hydrolyzát

50 g PEG 6000

0,6 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1 ml roztok minoritních prvků

Doplnit dH_2O do 800 ml, upravit pH na 7,2 a rozdělit po 80ml alikvotních podílech.

roztok minoritních prvků

1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$

1 g $CaCl_2$

Doplnit dH_2O do 1000 ml.

Před použitím přidat k 80 ml:

15 ml NaH_2PO_4/K_2HPO_4 pufr (0,1 M, pH 6,8)

2,5 ml 20% roztok mannitolu

2,5 ml pre-germinované sporové inokulum (inkubace 10 min při 50 °C)

Kultivační média s agarem

S1 sporulační médium

25 g bakteriologický agar

4 g glukosa

4 g kvasničný extrakt

10 g sladový extrakt

Doplnit dH_2O do 1000 ml a upravit pH na hodnotu 7.

SFM médium

20 g bakteriologický agar

20 g mannitol (rozpustit nejdříve)

20 g sójová mouka

Doplnit vodovodní vodou do 1000 ml.

2.1.3 Enzymy

DNasa I (Thermo Fisher Scientific)

DNase I (RNase-free), 2 U·µl^{-1}

Taq DNA polymerasa (Thermo Fisher Scientific)

DreamTaq DNA Polymerase, 5 U·µl^{-1}

M-MLV reverzní transkriptasa (Thermo Fisher Scientific)

M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U·µl^{-1}

Inhibitor RNas (Thermo Fisher Scientific)

RiboLock RNase Inhibitor, 40 U·µl^{-1}

2.1.4 DNA oligonukleotidy a velikostní standardy

DNA oligonukleotidy (Integrated DNA Technologies)

SCO3230-right (CDA peptid-synthetasa I)

5´- TCA CCG GGT AGT TCT GGA AG -3´

SCO3230-left (CDA peptid-synthetasa I)

5´- AAC TCG ACG CAG ACA CCA C -3´

SCO3234-right (CDA; fosfotransferasa)

5´- GGT ACA GCA GCA GCG TCA G -3´

SCO5314-left (šedý sporový pigment; *whiE* protein VII)

5´- GCG TGT ACC TGC ACC TCA T -3´

SCO5314-right (šedý sporový pigment; *whiE* protein VII)

5´- TCC CAG CGG TAG AAG CAG -3´

SCO5319-left (šedý sporový pigment; *whiE* protein II)

5´- CAG CAG GTA CGC ATC GTC T -3´

SCO6273-right (coelimycin P1; polyketid-synthasa typu I)

5´- GGG TTC GTG GTA GGT GAG TT -3´

SCO6275-right (coelimycin P1; polyketid-synthasa typu I)

5´- GAC TTC AAC GAG CCC AGG TA -3´

SCO6275-left (coelimycin P1; polyketid-synthasa typu I)

5´- GCC AAG GAA CTC ACC TAC CA -3´

DNA velikostní standard

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Ready-to-Use 100 to 3000 bp, Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Roztoky a pufry

Není-li uvedeno jinak:

- jedná se o procenta vypočtená na základě poměru hmotnost/objem, tj. *w*/*v*
- pro přípravu roztoků a pufrů byla použita destilovaná voda (dH_2O)
- roztoky byly dle potřeby sterilované vlhkým teplem (121 °C, 23 min, 101,5 kPa)

TE pufr

10mM Tris-HCl (pH 8,0)

1mM EDTA (pH 8,0)

EDTA

0,5M EDTA (pH 8,0)

Glycerol

20% roztok

Glykogen

Glycogen (5 $mg \cdot ml^{-1}$), Thermo Fisher Scientific

Octan sodný

3M octan sodný (pH 5,5)

NaH_2PO_4/K_2HPO_4 pufr

každý 0,1mM, pH 6,8

Mannitol

20% roztok

Ethanol

96% a 75% roztok (*v*/*v*)

Roztok nukleotidů dNTP

2,5mM dATP

2,5mM dCTP

2,5mM dGTP

2,5mM dTTP

Methanol

99,8% a 50% roztok (*v*/*v*)

Hydroxid amonný (aq)

1M roztok

Kyselina mravenčí

1M roztok

10× reakční pufr s $MgCl_2$ pro DNasu I (Thermo Fisher Scientific)

- složení: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$

10× PCR reakční pufr pro Taq DNA polymerasu (Thermo Fisher Scientific)

- složení: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl

10× reakční pufr pro M-MLV reverzní transkriptasu (Thermo Fisher Scientific)

- FirstChoice® RLM-RACE Kit

1% agarosa

0,5 g agarosa

50 ml 1× TBE

10× koncentrovaný TBE pufr

108 g Tris

55,6 g kyselina boritá

9,3 ml EDTA (pH 8,0)

Zředit do 1000 ml a upravit pH na hodnotu 8,3.

Barvící roztok GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in Water (Biotium)

Červený fluorescenční barvící roztok určený k vizualizaci dsDNA, ssDNA a RNA v agarosových nebo polyakrylamidových gelech. GelRed má absorbční maximum v UV spektru okolo 300 nm. Do agarosových gelů lze GelRed barvičku aplikovat přímo při jejich přípravě, anebo až po elektroforese přidáním do barvící lázně.

6× koncentrovaný nanášecí vzorkový pufr pro agarosovou elektroforesu

20 mg bromfenolová modř

20 mg xylene cyanol

3 ml glycerol

Doplnit vodou do 10 ml a promíchat.

2.1.6 Použité chemikálie

- **Aceton** (Aceton 99,9% Enviroscan Capillary GC Grade, Lach-Ner)
- **Acetonitril**
  (Acetonitrile HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR Chemicals)
- **Agarosa** (SeaKem® LE Agarose, Lonza)
- **Amoniak** – vodný roztok 25%
  (Amoniak - vodný roztok 25% p.a./1000 ml, Lach-Ner)
- **Bakteriologický agar** (Agar Bacteriological No. 1, Oxoid)
- **DEPC (diethylpyrokarbonát) voda**
  (DEPC-Treated Water, Thermo Fisher Scientific)
- **Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4**
  (Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner)
- **Dihydrogenfosforečnan sodný NaH_2PO_4**
  (Dihydrogenfosforečnan sodný p.a., Lach-Ner)

- **EDTA – dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny** (Chelaton 3 dihydrát p.a., Lach-Ner)
- **Ethanol** (Ethylalkohol 96% p.a., Lach-Ner)
- **Ethylacetát** (Ethylesterkyseliny octové p.a., Lach-Ner)
- **Fenol** (Fenol p.a., Lach-Ner)
- **Fenol/chloroform/isoamylalkohol** (25:24:1), pH 7,5-8,0 (Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Carl Roth)
- **Glukosa** (D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner)
- **Glycerol** (Glycerol for molecular biology, ≥99%, Sigma Aldrich)
- **Glycin** (Glycin p.a., Lach-Ner)
- **Hydroxid sodný NaOH** (Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner)
- **Hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4** (Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid draselný KCl** (Chlorid draselný p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid hořečnatý hexahydrát $MgCl_2 \cdot 6H_2O$** (Chlorid hořečnatý hexahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid manganatý tetrahydrát $MnCl_2 \cdot 4H_2O$** (Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid měďnatý dihydrát $CuCl_2 \cdot 2H_2O$** (Chlorid měďnatý dihydrát p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid sodný NaCl** (Chlorid sodný p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid vápenatý $CaCl_2$** (Chlorid vápenatý bezvodý p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid vápenatý dihydrát $CaCl_2 \cdot 2H_2O$** (Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid zinečnatý bezvodý $ZnCl_2$** (Chlorid zinečnatý bezvodý p.a., Lach-Ner)
- **Chlorid železitý hexahydrát $FeCl_3 \cdot 6H_2O$** (Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Chloroform** (Chloroform stabilizovaný p.a., Lach-Ner)
- **Isopropanol** (Isopropylalkohol, VERKON)
- **Kaseinový hydrolyzát** (Casein Hydrolysate, Sigma-Aldrich)
- **Kvasničný extrakt** (Yeast Extract, Oxoid)
- **Kyselina boritá** (Kyselina boritá p.a./500 gr, Lach-Ner)
- **Kyselina mravenčí**

(Formic acid 99% HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR Chemicals)

- **Kyselina methyl-2-amino-N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová N-Tris** (TES ≥99%, Sigma-Aldrich)
- **Kyselina octová** (Kyselina octová p.a., Lach-Ner)
- **L-prolin** (ReagentPlus® ≥99% (HPLC), Sigma-Aldrich)
- **Mannitol** (D-Mannit p.a., Lach-Ner)
- **Methanol** (Methanol hypergrade for LC-MS LiChrosolv®, Merck)
- **Molybdenan amonný tetrahydrát** $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ (p.a., Lach-Ner)
- **Octan sodný** (Octan sodný bezvodý p.a., Lach-Ner)
- **Polyethylenglykol – PEG 6000** (Poly(ethylene glycol) 1000, Sigma Aldrich)
- **Síran amonný $(NH_4)_2SO_4$** (Síran amonný p.a., Lach-Ner)
- **Síran draselný K_2SO_4** (Síran draselný p.a., Lach-Ner)
- **Síran hořečnatý heptahydrát $MgSO_4\cdot 7H_2O$**
  (Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Síran zinečnatý heptahydrát $ZnSO_4\cdot 7H_2O$**
  (Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Síran železnatý heptahydrát $FeSO_4\cdot 7H_2O$**
  (Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Sladový extrakt** (Malt Extract, Oxoid)
- **Směs nukleotidů dNTP** (Deoxynucleotide Mix, 10 mM, Sigma Aldrich)
- **Sójová mouka** (Sójová mouka odtučněná hladká, Ekoprodukt)
- **Tetraboritan sodný dekahydrát $Na_2B_4O_7\cdot 10H_2O$**
  (Tetraboritan sodný dekahydrát p.a., Lach-Ner)
- **Tris(hydroxymethyl)aminomethan** (čistý, Lach-Ner)
- **Tris-HCl** (Trizma® base, Sigma-Aldrich)
- **TRIzol** (TRIzol® Reagent, Thermo Fisher Scientific)
- **Trypton** (Tryptone, Oxoid)
- **Voda zbavená RNas** (RNase-Free Water, Qiagen)

2.2 METODIKA

2.2.1 Kultivační metody

Příprava sporové suspenze *Streptomyces coelicolor* M145

1. Pracujeme za aseptických podmínek. 10^8 spor *S. coelicolor* zaočkujeme do 80 ml tekutého média 2xYT v 200ml Erlenmayerově baňce. Kultivace trvá 48 h při teplotě 29 °C na rotační třepačce (200 rpm) za aerobních podmínek.
2. Na Petriho misce (průměr: 9 cm) zaočkujeme roztěrem 3 ml inokula na povrchu S1 média překrytého celofánovou folií. Inkubujeme 14 dní při 29 °C (nesmí se používat zavěšený agar).
3. Šedé hydrofobní spory sklízíme z povrchu celofánu nerezovou špachtlí do 15 ml sterilní destilované vody v 50ml centrifugační kyvetě.
4. Pro přípravu homogenní suspenze sklizené spory v kyvetě střídavě sonikujeme a vortexujeme 9 min.
5. Sterilní stříkačkou provedeme filtraci spor přes vatový filtr.
6. Centrifugujeme směs po dobu 7 min při teplotě 4 °C a 7000 × g (Hettich Universal 32R Refrigeration Centrifuge Model 1610-01). Supernatant odstraníme.
7. Spory resuspendujeme 2 ml 20% glycerolu.
8. Rozdělíme do mikrozkumavek po 100 µl a skladujeme při teplotě -20 °C.
9. Titrací vzorku sporové suspenze a následnou kultivací na pevném SFM médiu zjistíme dle počtu narostlých kolonií koncentraci životaschopných spor v suspenzi.

Kultivace *S. coelicolor* pro izolaci sekundárních metabolitů

1. Asepticky zaočkujeme 10^8 spor do 80 ml příslušného sterilního média (R3, AM, nebo NMMP) v 200ml Erlenmayerově baňce. Kultivujeme aerobně po dobu 48 h při teplotě 29 °C na rotační třepačce (200 rpm) za aerobních podmínek.
2. Inokulum (10^8 spor) aktivujeme pro germinaci inkubací 10 min při 50 °C. Následně zaočkujeme 30 ml příslušného sterilního média v 100ml Erlenmayerově baňce. Kultivace probíhá aerobně po dobu 6 h při teplotě 37 °C na rotační třepačce (200 rpm).
3. Po kultivaci provedeme izolaci sekundárních metabolitů (viz kap. 2.2.3).

2.2.2 **Metody práce s RNA a DNA** (experimenty v přípravě)

Izolace celkové RNA z buněk pomocí TRIzol® Reagent

1. Vegetativní buňky (příp. spory) sklidíme do 2ml mikrozkumavek se zirkonovým pískem, které jsou vhodné pro homogenizaci v přístroji Minilys Personal Homogenizer (Bertin).
2. Přidáme 750 µl TRIzolu na 250 µl vzorku (10^7 bakteriálních buněk).
3. Homogenizaci vzorku provádíme ihned po kultivaci. Vzorky chladíme na ledu nejlépe po každém cyklu homogenizace.
   1. cyklus: 1×240 s, nejnižší rychlost
   2. cyklus: 1×240 s, střední rychlost
4. Odstředíme 1 min při 14000 × g a pokojové teplotě (Mini Spin plus, Eppendorf). Směs nesmí ulpívat na stěnách mikrozkumavky.
5. Inkubujeme 7 min při 65 °C, poté chladíme na ledu.
6. Provedeme další homogenizaci:
   1. cyklus: 1×240 s, nejnižší rychlost
   2. cyklus: 1×240 s, střední rychlost
7. V této fázi můžeme zhomogenizované vzorky zamrazit (-80 °C), nebo pokračovat v izolaci RNA.
8. Suspenzi udržujeme na ledu a doplníme do 1 ml TRIzolem. Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
9. Provedeme homogenizaci:
   1. cyklus: 2×240 s, nejvyšší rychlost
   (2. cyklus pro izolaci RNA ze spor: 6×240 s, nejvyšší rychlost)
10. Odstředíme 2 min při 14000 × g a pokojové teplotě. Veškeré mycelium musí klesnout na dno mikrozkumavky.
11. Odebereme horní fázi (bez mycelia) do nové mikrozkumavky.
12. Přidáme 200 µl chloroformu, protřepeme, 2 min mícháme na vortexu a inkubujeme 3 min při pokojové teplotě.
13. Odstředíme 15 min při 11000 × g a teplotě 4 °C.
14. Po centrifugaci odebereme horní vodnou fázi do nové mikrozkumavky s 500 µl isopropanolu. Inkubujeme 10 min při pokojové teplotě.

15. Odstředíme 40 min při 11000 × g a teplotě 4 °C (pro lepší výtěžek RNA lze přidat 5-10 µg glykogenu).
16. Supernatant odstraníme a pelet promyjeme 1 ml 75% ethanolu (-20 °C).
17. Odstředíme 5 min při 11000 × g a teplotě 4 °C.
18. Peletu krátce vysušíme (nejdéle 5 min; hrozí riziko přesušení RNA, která již nelze rozpustit).
19. Peletu rozpustíme v 300 µl DEPC vody. Přidáme 5 µl RiboLock inhibitoru RNas.
20. V závěrečné fázi provedeme štěpení DNasou I s následnou fenol-chloroformovou extrakcí a srážením RNA ethanolem. Pro získání velmi čisté RNA můžeme nejprve provést fenol-chloroformovou extrakci, srážení RNA ethanolem, poté štěpení DNasou I a na konec opět fenol-chloroformovou-extrakci a přesrážení ethanolem. Výtěžek je v tomto případě nižší.

Štěpení DNasou I

	1×	5×
izolovaná RNA	10 µl	50 µl
10× DNasa I pufr	10 µl	50 µl
DNasa I	2 µl	10 µl
DEPC H_2O	78 µl	390 µl
Celkový objem:	100 µl	500 µl

Inkubace 37 °C, 30 min.

Fenol-chloroformová extrakce

1. K rozpuštěné RNA přidáme v poměru 1:1 fenol/chloroform/isoamylalkohol (25/24/1; pH 4,0).
2. Promícháme 30 s na vortexu.
3. Odstředíme 10 min při 4 °C a 14000 × g (Mini Spin plus, Eppendorf).
4. Odebereme horní fázi a opakujeme extrakci.
5. Odstředíme 10 min při 14000 × g a teplotě 4 °C.
6. Odebereme horní fázi a přidáme 3M octan sodný s pH 5,5 (1/10 objemu) a 96% ethanol (2,5 násobek objemu).
7. Srážíme 2 hodiny (nebo přes noc) při -20 °C.
8. Odstředíme 10 min při 14000 × g a 4 °C.

9. Peletu promyjeme 1 ml 75% ethanolu.
10. Odstředíme 5 min při 14000 × g a teplotě 4 °C.
11. Peletu vysušíme a rozpustíme v 10 µl (příp. 50 µl) DEPC vody.

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA

1. Měření bylo prováděno na přístroji Spektrofotometr DS-11 (DeNovix).
2. Po nastavení programu pro měření koncentrace a čistoty RNA změříme 1 µl DEPC vody jako slepý vzorek („blank“).
3. Poté změříme vzorky izolované RNA.
4. Na přístroji odečteme čistotu (hodnota A_{260}/A_{280}) a koncentraci RNA.

Návrh oligonukleotidů (primerů) a příprava zásobních roztoků

1. Vyhledáme sekvenci nukleotidů pro zvolený gen *S. coelicolor* M145 v databázi StrepDB (www.strepdb.streptomyces.org.uk, 2016, online).
2. Vložíme sekvenci do aplikace Primer3 Input (v. 0.4.0), která umožňuje navrhovat primery a hybridizační próby (Koressaar a Remm, 2007; Untergasser a kol., 2012).
3. Dále nastavíme vhodné parametry:
   - optimální délka primerů: 20-22 nt
   - rozdíl teplot tání obou primerů: do 5 °C
4. Z programem nabízených primerů zvolíme ty, které by současně neměly nasedat na templát blízko sebe a nejsou vzájemně komplementární, aby nedocházelo k tvorbě dimerů.
5. Funkčnost navržených oligonukleotidů teoreticky ověříme pomocí aplikace *In silico* PCR amplification (San Millán a kol., 2013).
6. Navržené sekvence oligonukleotidů objednáme u výrobce (IDT – Integrated DNA Technologies).
7. Dodané oligonukleotidy v lyofilizované formě rozpustíme v odpovídajícím množství sterilní vody, abychom připravili zásobní roztoky o koncentraci 100 µM (pro reverzní transkripci a PCR používáme roztok 100× zředěný).
8. Zásobní roztoky udržujeme při teplotě -20 °C.

Reverzní transkripce (RT)

izolovaná RNA	1 µl	2 µl
dNTP mix	2 µl	4 µl
(-) primer[1]	1 µl	2 µl
RT pufr (10×)	1 µl	2 µl
M-MLV reverzní transkriptasa	0,5 µl	1 µl
inhibitor RNas	0,5 µl	1 µl
DEPC H_2O	4 µl	10 µl
Celkový objem:	10 µl	20 µl

Reakční směs jemně promícháme a krátce odstředíme. Inkubujeme při 42 °C po dobu 1 h, poté při 48 °C po dobu 10 min. Reakci lze přerušit v -20 °C, nebo pokračovat následnou PCR. Negativní kontrola RT(-) pro každý vzorek byla provedena tak, že do identické reakční směsi jako pro vzorek nebyla přidána reverzní transkriptasa.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) po reverzní transkripci

reakční směs po reverzní transkripci	0,5 µl	1 µl
dNTP mix	2 µl	4 µl
(-) primer[2]	1 µl	2 µl
(+) primer[3]	1 µl	2 µl
PCR pufr (10×)	1 µl	2 µl
M-MLV reverzní transkriptasa	0,5 µl	1 µl
inhibitor RNas	0,5 µl	1 µl
DEPC H_2O	4 µl	10 µl
Celkový objem:	10 µl	20 µl

Reakční směs jemně promícháme a krátce odstředíme.

Následuje inkubace v termocykléru při teplotním režimu:

počet opakování	teplota	čas	
1×	94 °C	4 min	počáteční denaturace
30×	55 °C	30 s	hybridizace primeru
	72 °C	1 min	elongace řetězce
	94 °C	20 s	denaturace dsDNA

[1] primer ke specifickému úseku RNA kódující žádoucí gen (reverzně komplementární k 3´ konci mRNA)
[2] primer komplementární k 3´ konci genu
[3] primer komplementární k 5´ konci genu

Analýza DNA pomocí elektroforesy v agarosovém gelu

1. Elektroforetická aparatura (Mini Plus Horizontal Gel Electrophoresis, Thermo Fisher Scientific) připravíme podnos pro nalití agarosového gelu tak, aby vznikla těsnící nádoba.
2. Připravíme 1× TBE pufr naředěním 10× koncentrovaného zásobního roztoku destilovanou vodou v množství dostatečném pro přípravu gelu a použití jako elektrolyt při elektroforese.
3. Připravíme v Erlenmayerově baňce suspenzi obsahující 1 % (*w*/*v*) agarosy v TBE pufru.
4. Agarovou suspenzi přivedeme do krátkého varu (5-10 s) v mikrovlnné troubě. Krátké záhřevy k varu opakujeme po zamíchání obsahu baňky krouživým pohybem až do rozpuštění agaru.
5. Roztok agaru necháme zchladit na cca 60 °C a přidáme barvící roztok GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (3,5 µl na 35 ml roztoku agaru).
6. Nalijeme gel do utěsněného podnosu a ihned do agaru ponoříme hřeben ve vyznačeném místě. Ponecháme gel ztuhnout při pokojové teplotě.
7. Přelijeme gel správně umístěný ve vaně aparatury takovým množstvím elektroforetického pufru, aby byla jeho hladina nad povrchem gelu (cca 3-5 mm). Opatrně vyjmeme z gelu hřeben.
8. Do krajních jamek naneseme mikropipetou 5 µl markeru a do dalších vhodný objem (10-20 µl) vzorku v nanášecím pufru (5 µl nanášecího pufru na 50 ml 1% agarosy).
9. Uzavřeme aparaturu, připojíme ke zdroji stejnosměrného proudu (DNA putuje ke kladné elektrodě) a nastavíme napětí na hodnotu U = [3 V] × [vzdálenost mezi elektrodami v cm]. Zapneme proud. Elektroforesa trvá podle aplikovaného napětí a požadovaného rozdělení asi 20-60 min.
10. Po skončení elektroforesy vypneme zdroj napětí a gel přeneseme bezpečně na plochu transiluminátoru a vizualizujeme DNA v UV světle. Pořídíme fotografický záznam, který vyhodnotíme.

2.2.3 Separační a analytické metody

Univerzální metoda extrakce na pevnou fázi (SPE) pro izolaci sekundárních metabolitů streptomycet[4]

1. Kulturu po kultivaci odstředíme v kyvetě 7 min při 4 °C a 7000 × g (Hettich Universal 32R Refrigeration Centrifuge Model 1610-01).
2. Supernatant odebereme do nové kónické zkumavky a udržujeme na ledu.
3. Homogenizaci buněk a spor (Minilys Personal Homogenizer, Bertin) provádíme nejlépe ihned po kultivaci (příp. ihned po sklizení spor). Po odstředění pelet resuspendujeme v 1 ml odebraného supernatantu v mikrozkumavce. Přidáme zirkonový písek a skleněné kuličky. Vzorky chladíme na ledu nejlépe po každém cyklu homogenizace:
    1. cyklus: 1×240 s, nejnižší rychlost
    2. cyklus: 2×240 s, střední rychlost
    3. cyklus: 3×240 s, nejvyšší rychlost
4. Po homogenizaci odstředíme (4 °C, 10000 × g, 5 min) a supernatant odebereme do čisté 15ml kónické zkumavky. Můžeme doplnit do 3 ml kultivačním médiem získaným v prvním kroku, nebo extrahovat homogenizát a médium zvlášť.
5. Pro extrakci použijeme 3 ml připraveného vzorku. Upravíme pH dle potřeby pomocí 1M NH_4OH (aq), nebo 1M HCOOH.
6. SPE kolonku (Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge, 60 mg sorbentu, 30 µm velikost částic; Waltera) umístíme na manifold (Waters SPE manifold) spojený s vakuovou pumpou. Vakuum regulujeme, aby tok nepřekročil 2 $ml \cdot min^{-1}$ (kapalině o objemu 3 ml by měl průtok kolonkou trvat nejméně 1,5 min).
7. Provedeme kondicionaci kolonky 3 ml 99,8% methanolu.
8. Provedeme ekvilibraci kolonky 3 ml Milli-Q vody.
9. Naneseme 3 ml vzorku.
10. Promyjeme 3 ml sterilní Milli-Q vody.
11. Eluujeme 1,5 ml 99,8% methanolem do 2ml mikrozkumavky. Získáme 2× zakoncentrovaný vzorek.
12. Provedeme zakoncentrování na centrifugačním evaporátoru (37 °C).

[4] univerzální SPE metoda pro izolaci sekundárních metabolitů streptomycet není vhodná pro metabolity s nízkou molekulovou hmotností a pro velmi polární látky, např. aminoglykosidy, fosfomycin aj.

13. Rozpustíme residuum dle potřeby v 99,8% methanolu (např. 100 µl). Pro urychlení rozpouštění lze použít míchání na vortexu a sonikaci.
14. Zředíme v poměru 1:1 sterilní Milli-Q vodou a promícháme na vortexu.
15. Odstředíme na stolní centrifuze po dobu 5 min při pokojové teplotě a 14000 × g.
16. Odebereme 50 µl vzorku do vialky a provedeme analýzu UHPLC-DAD-ToF-MS.

Extrakce sekundárních metabolitů *S. coelicolor* ethylacetátem

1. Kulturu po kultivaci odstředíme (4 °C, 7000 × g, 7 min). Supernatant odebereme do nové kónické zkumavky a udržujeme na ledu.
2. Homogenizaci buněk a spor (Minilys Personal Homogenizer, Bertin) provádíme nejlépe ihned po kultivaci (příp. ihned po sklizení spor). Po odstředění pelet resuspendujeme v 1 ml odebraného supernatantu v mikrozkumavce. Přidáme zirkonový písek a skleněné kuličky. Vzorky chladíme na ledu nejlépe po každém cyklu homogenizace:
    1. cyklus: 1×240 s, nejnižší rychlost
    2. cyklus: 2×240 s, střední rychlost
    3. cyklus: 3×240 s, nejvyšší rychlost
3. Po homogenizaci odstředíme (4 °C, 10000 × g, 5 min) a supernatant odebereme do čisté 50ml kónické zkumavky. Doplníme do 5 ml kultivačním médiem získaným v prvním kroku. Upravíme pH dle potřeby.
4. Přidáme 25 ml ethylacetátu a intenzivně třepeme 1 min.
5. Odstředíme (4 °C, 7000 × g, 5 min). Odebereme horní organickou fázi (extrakt).
6. Extrakt zakoncentrujeme na vakuové odparce.
7. Residuum rozpustíme v 1 ml 99,8% methanolu. Pro rozpuštění usazenin použijeme míchání na vortexu a sonikaci.
8. Dle potřeby zředíme 50% methanolem, přefiltrujeme přes PVDF mikrofiltr o porozitě 0,2 µm a stočíme 5 min na stolní centrifuze. Odebereme 50 µl do vialky.
9. Provedeme analýzu UHPLC-DAD-ToF-MS.

Extrakce sekundárních metabolitů *S. coelicolor* metodou QuEChERS

1. Kulturu po kultivaci odstředíme (4 °C, 7000 × g, 7 min). Supernatant odebereme do nové kónické zkumavky a udržujeme na ledu.

2. Homogenizaci buněk a spor (Minilys Personal Homogenizer, Bertin) provádíme nejlépe ihned po kultivaci (příp. ihned po sklizení spor). Po odstředění pelet resuspendujeme v 1 ml destilované vody v mikrozkumavce. Přidáme zirkonový písek a skleněné kuličky. Vzorky chladíme na ledu nejlépe po každém cyklu homogenizace:
    1. cyklus: 1×240 s, nejnižší rychlost
    2. cyklus: 2×240 s, střední rychlost
    3. cyklus: 3×240 s, nejvyšší rychlost
3. Po homogenizaci odstředíme (4 °C, 10000 × g, 5 min) a supernatant odebereme do čisté 50ml kónické zkumavky. Doplníme do 5 ml kultivačním médiem získaným v prvním kroku. Upravíme pH dle potřeby.
4. Přidáme 25 ml acetonitrilu a intenzivně třepeme 1 min.
5. Přidáme 4 g $MgSO_4$ a 1 g NaCl. Intenzivně třepeme 1 min.
6. Odstředíme (4°C, 7000 × g, 5 min). Odebereme horní organickou fázi (extrakt).
7. Extrakt zakoncentrujeme na vakuové odparce.
8. Residuum rozpustíme v 1 ml 99,8% methanolu. Pro rozpuštění usazenin použijeme míchání na vortexu a sonikaci.
9. Dle potřeby zředíme 50% methanolem, přefiltrujeme přes PVDF mikrofiltr o porozitě 0,2 µm a odstředíme 5 min na stolní centrifuze. Odebereme 50 µl do vialky a provedeme analýzu UHPLC-DAD-ToF-MS.

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí diodového pole a hmotnostní detekcí doby letu (UHPLC-DAD-ToF-MS)

Extrakty ze streptomycetových kultur byly analyzovány pomocí UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography). Analyzátor Acquity UPLC System (Waters) je tvořen Acquity UPLC vysokotlakým čerpadlem, Acquity UPLC dávkovačem vzorků, Acquity UPLC kolonovým termostatem, Acquity UPLC DAD detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem LCT Premier XE (Waters) s elektrosprejem (ESI – Electrospray Ionization) a ortogonálně uspořádaným analyzátorem doby letu (ToF – Time of Flight, Waters MS). Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx™, verze 4.1 (Waters)

UHPLC slouží k separaci jednotlivých složek vzorku. Ty jsou poté analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, která dělí fragmenty látek na základě poměru

hmotnost ku náboji (*m*/*z*). Pomocí programu MassLynx™ je poté k získaným hodnotám navrženo elementární složení analyzovaných látek.

Podmínky měření:

UHPLC

- kolona Acquity UPLC BEH C18 (50×2,1 mm, velikost částic 1,7 µm; Waters)
- mobilní fáze: A – 0,1% kyselina mravenčí v dH_2O; B – 100% acetonitril
- rychlost průtoku: 0,4 $ml \cdot min^{-1}$
- gradientová eluce (min/%A): 0/90, 12/40, 15/20, 16/20, 18/0, 20/90
- teplota kolony: 25 °C; teplota vzorků: 10 °C
- objem nástřiku: 2-5 µl

MS

- pozitivní ionizace elektrosprejem (ESI+)
- napětí na vstupním kuželu: ±40 V; napětí na kapiláře: ±2500 V
- teplota bloku iontového zdroje: 120 °C; teplota desolvatačního plynu (N): 350 °C
- průtok desolvatačního plynu: 800 $l \cdot h^{-1}$; průtok plynu na vstupním kuželu: 50 $l \cdot h^{-1}$
- měřeno ve „W“ módu, čas skenu 0,1 s, prodleva mezi skeny 0,01 s
- specifické $[M+H]^+$ ionty byly extrahovány s hmotnostním oknem 0,08 Da

3 VÝSLEDKY

3.1 Porovnání extrakčních metod

Pro izolaci sekundárních metabolitů *S. coelicolor* byla vyzkoušena metoda QuEChERS, vytřepávání ethylacetátem a extrakce na pevnou fázi (SPE). Extrakce byly provedeny po 48 hodinách kultivace *S. coelicolor* na R3 médiu s glycerolem (viz kap. 2.2.1 a 2.2.3). Před extrakcí bylo upraveno pH supernatantu na hodnotu 3. Z extraktů byly připraveny vzorky pro analýzu sekundárních metabolitů pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS v pozitivním (ESI+) ionizačním módu (viz kap. 2.2.3). Nejširší spektrum sekundárních metabolitů (Tab. I) bylo detekováno (bez použití standardů) v případě extraktu získaného metodou SPE.

Tab. I: Porovnání extrakčních metod (SPE, QuEChERS a vytřepávání ethylacetátem) z hlediska detekovaných sekundárních metabolitů *S. coelicolor* M145 pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS. Nejvíce látek bylo nalezeno v extraktu připraveném metodou SPE.

sekundární metabolit	**SPE**	**QuEChERS**	**ethylacetát**
albaflavenon	ano	ne	ne
CDA 2b	ano*	ne	ne
CDA 3a	ano*	ne	ne
CDA 3b	ano*	ne	ne
CDA 4a	ano*	ne	ne
CDA 4b	ano*	ne	ne
coelimycin P1	ano	ano*	ne
desferrioxamin B	ano	ano*	ano*
desferrioxamin E	ano	ne	ne
γ-actinorhodin	ano*	ne	ne
undecylprodigiosin	ano	ano	ano
streptorubin B	ano	ano	ano
kalafungin	ano	ne	ne

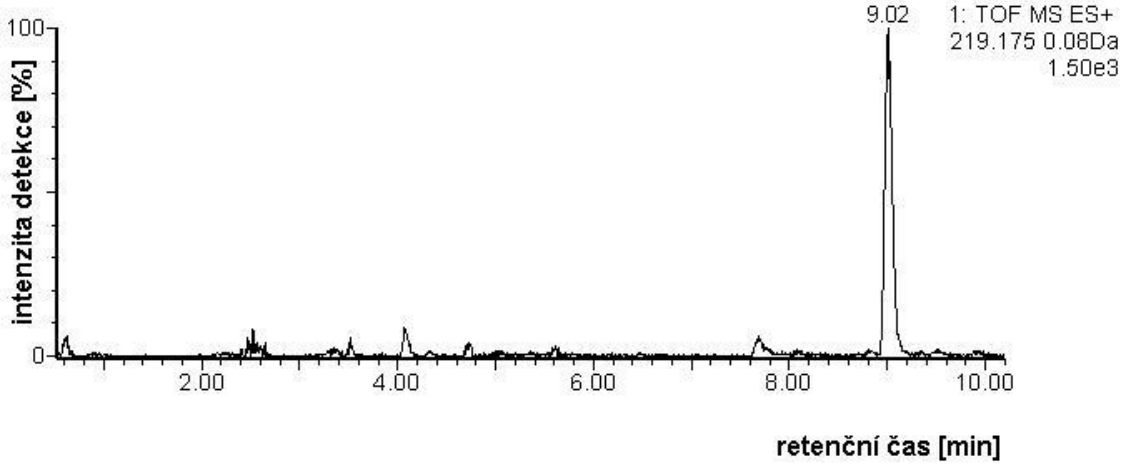
*stopová množství

3.2 Analýza sekundárních metabolitů

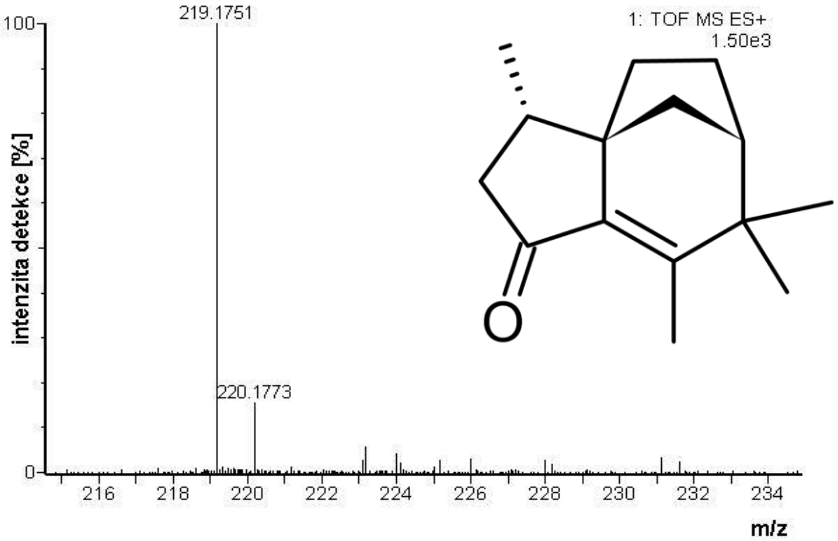
3.2.1 Albaflavenon

Albaflavenon ($C_{15}H_{22}O$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí

UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 7 a 8).



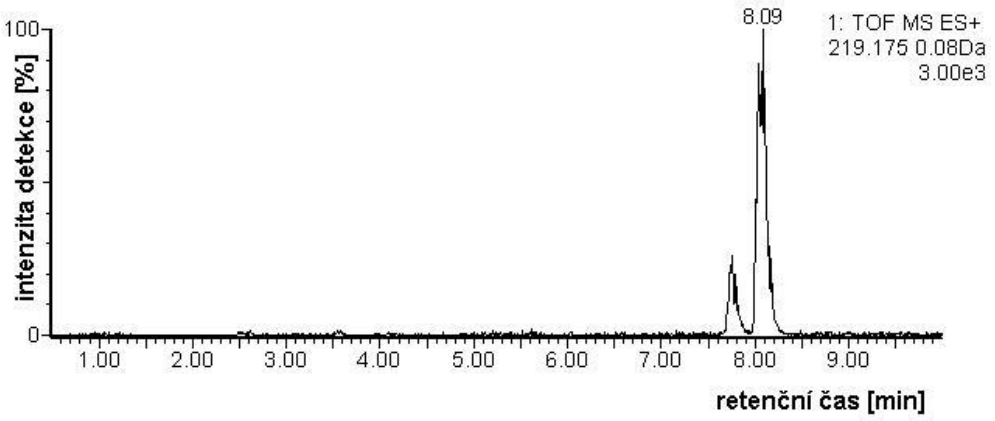
Obr. 7 Extrahovaný iontový chromatogram UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 218,1749 Da odpovídající albaflavenonu $C_{15}H_{22}O$ (pseudomolekulový iont $C_{15}H_{23}O^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 219,1749). V t_R = 9,02 min je patrný pík pro albaflavenon.



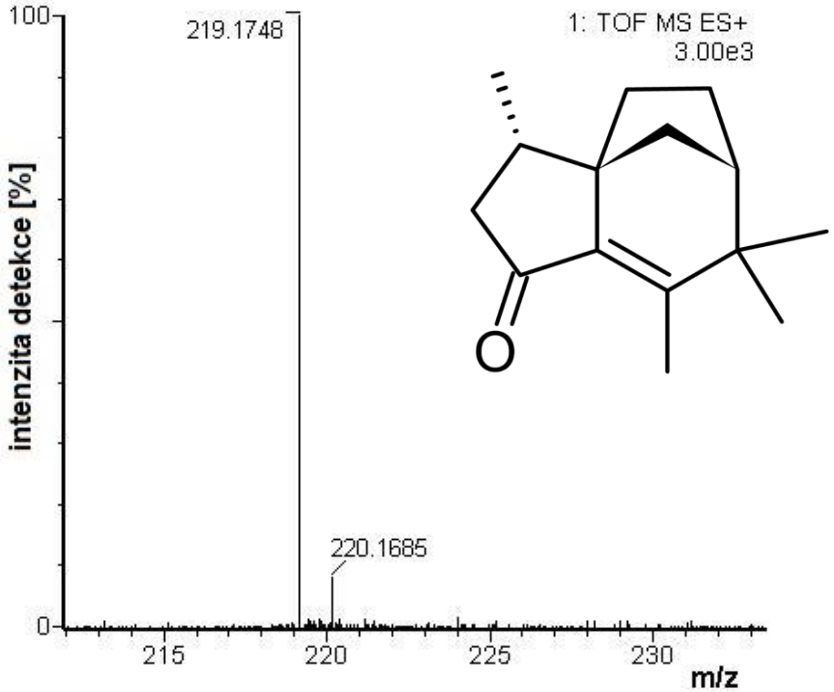
Obr. 8 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 9,02 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita (množství) těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{15}H_{23}O^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 219,1749; nalezená: 219,1751)

odpovídající albaflavenonu. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = 0,90 ppm.

Albaflavenon byl detekován také v průběhu germinace *S. coelicolor* M145, tedy po 6 h kultivace na AM médiu s glycerolem při 37 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 9 a 10).



Obr. 9 Extrahovaný iontový chromatogram UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 6 h kultivace na AM médiu s glycerolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 218,1749 Da odpovídající albaflavenonu $C_{15}H_{22}O$ (pseudomolekulový iont $C_{15}H_{23}O^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 219,1749). V t_R = 8,09 min je patrný pík pro albaflavenon.



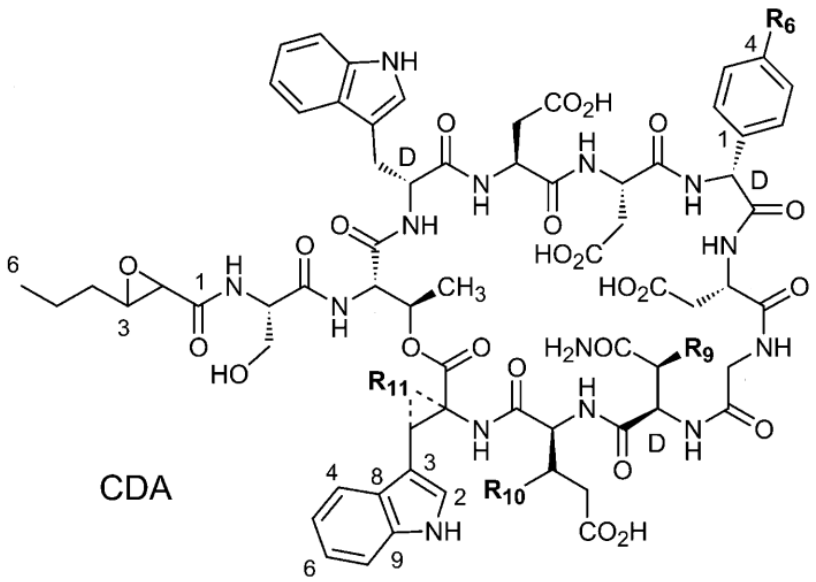
Obr. 10 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 8,09 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 6 h kultivace na AM médiu s glycerolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita (množství) těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont

$C_{15}H_{23}O^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 219,1749; nalezená: 219,1748) odpovídající albaflavenonu. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = -0,5 ppm.

Po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 při 29 °C na AM médiu, R3 médiu s mannitolem a NMMP médiu nebyl albaflavenon detekován. V extraktu ze spor určených pro germinaci se albaflavenon nevyskytoval. Ve vzorcích z germinace po 6 h kultivace *S. coelicolor* M145 při 37 °C na AM médiu s glukosou, R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) nebyl albaflavenon nalezen.

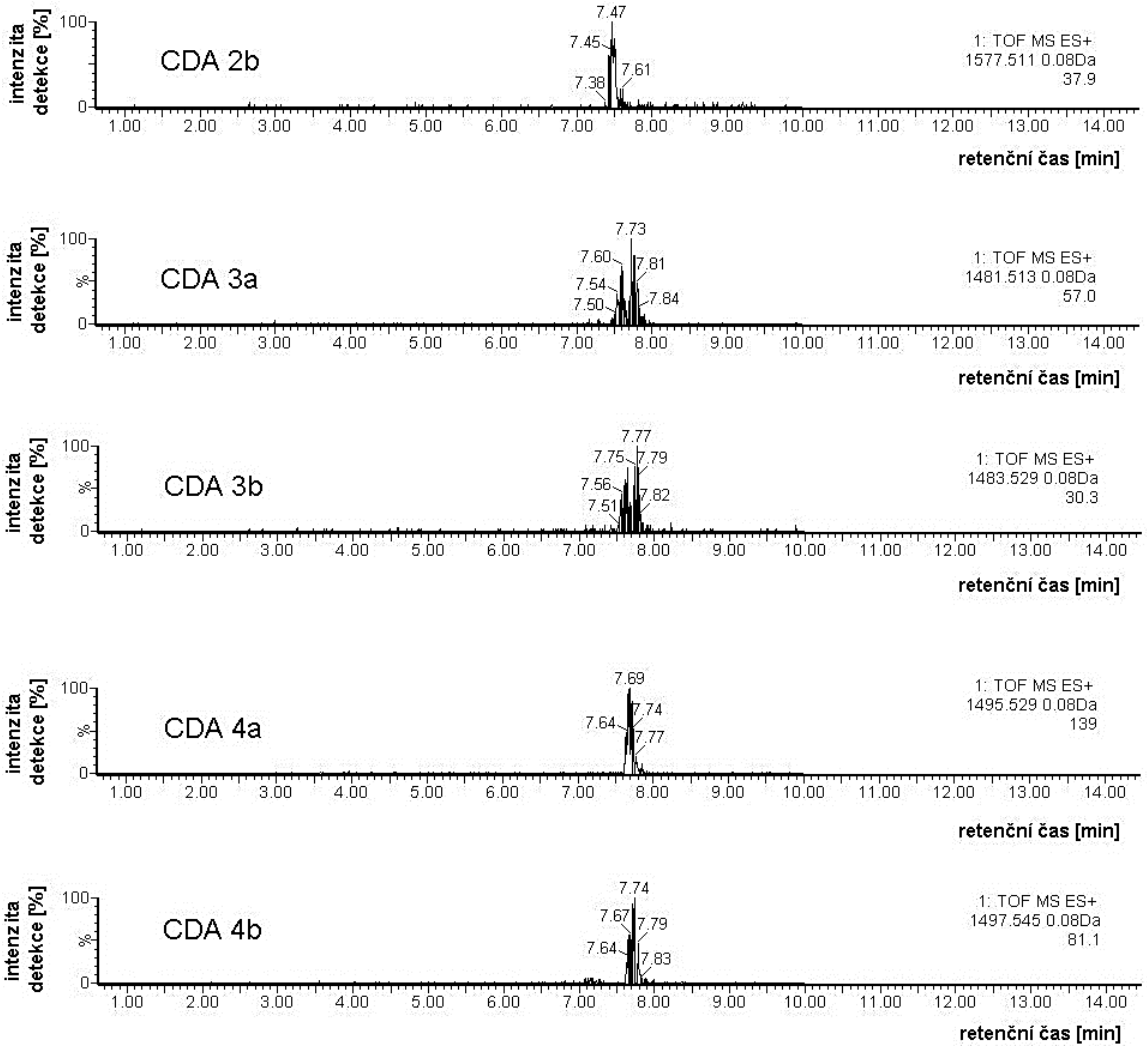
3.2.2 Kalcium-dependentní antibiotikum (CDA)

Kalcium-dependentní antibiotikum (typ 2b, 3a, 3b, 4a, 4b; viz Obr. 11) bylo ve stopovém množství detekováno po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem při 29 °C (Obr. 12 a 13). Extrakt byl získán metodou SPE. Pro UHPLC-DAD-ToF-MS analýzu byla provedena kalibrace přístroje pro měření látek s rozmezím monoisotopických hmot 1000-1800 Da. CDA nebylo detekováno po kultivaci 48 h na R3 médiu s mannitolem, NMMP a AM médiu.

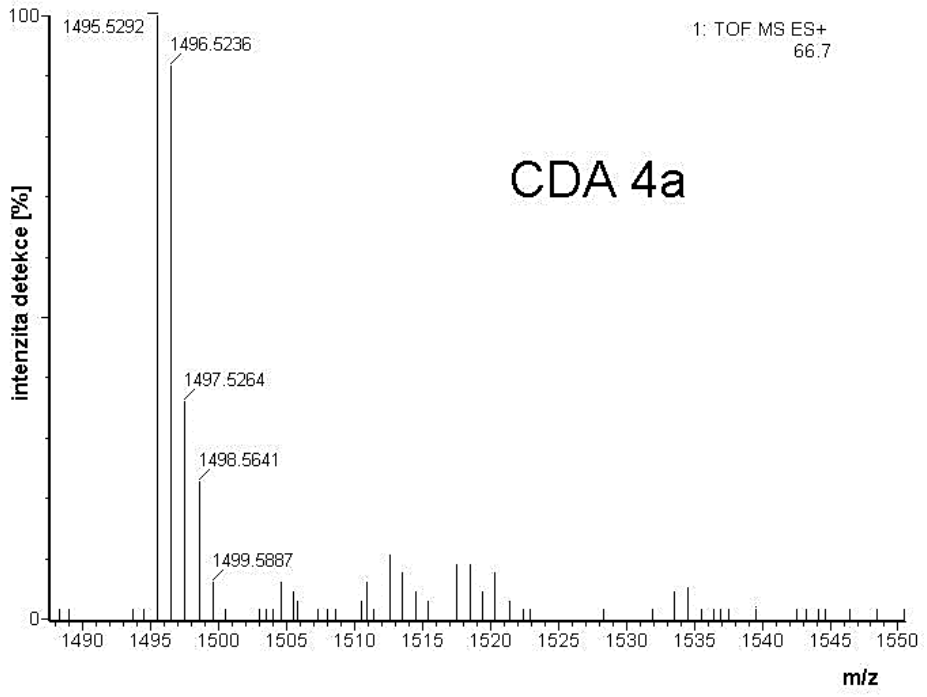


CDAx	R_6	R_9	R_{10}	R_{11}	M_r
CDA1b	OH	OPO_3H_2	H	H,H	1562
CDA2a	OH	OPO_3H_2	CH_3	π-vazba	1574
CDA2b	OH	OPO_3H_2	CH_3	H,H	1576
CDA3a	OH	OH	H	π-vazba	1480
CDA3b	OH	OH	H	H,H	1482
CDA4a	OH	OH	CH_3	π-vazba	1494
CDA4b	OH	OH	CH_3	H,H	1496

Obr. 11 Kalcium-dependentní antibiotika izolovaná ze *S. coelicolor*; převzato a upraveno z Hojati a kol. (2011)



Obr. 12 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látek s monoisotopickými hmotami odpovídajícími kalcium-dependentním antibiotikům: **CDA 2b** ($C_{67}H_{82}N_{14}O_{29}P^+$; *m*/*z* = 1577,5108; t_R = 7,47 min), **CDA 3a** ($C_{66}H_{77}N_{14}O_{26}^+$; *m*/*z* = 1481,5130; t_R = 7,73 min), **CDA 3b** ($C_{66}H_{79}N_{14}O_{26}^+$; *m*/*z* = 1483,5291; t_R = 7,77 min), **CDA 4a** ($C_{67}H_{79}N_{14}O_{26}^+$; *m*/*z* = 1495,5290; t_R = 7,69 min), **CDA 4b** ($C_{67}H_{81}N_{14}O_{26}^+$; *m*/*z* = 1497,5451; t_R = 7,74 min).

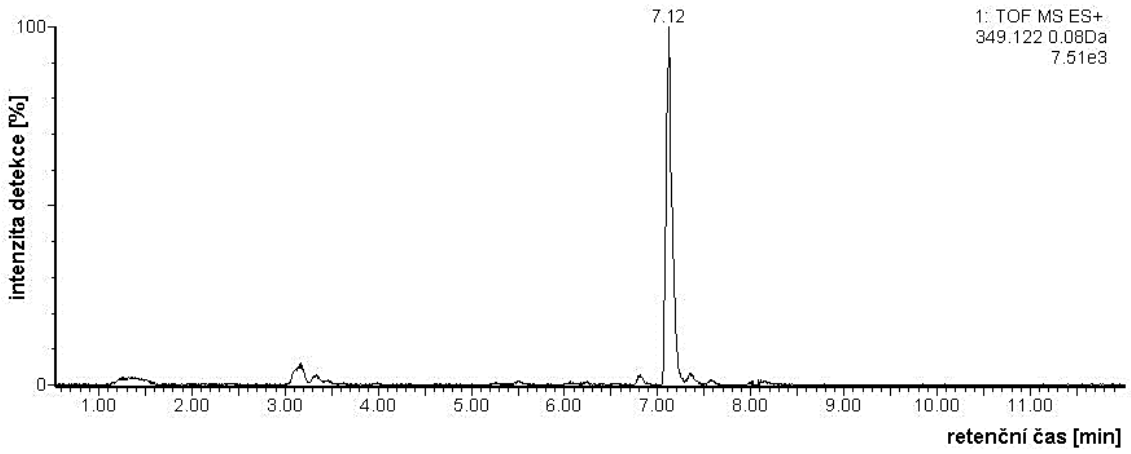


Obr. 13 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 7,64 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita (množství) těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{67}H_{79}N_{14}O_{26}^{+}$ (*m/z* hodnota vypočtená: 1495,5290; nalezená: 1495,5292) odpovídající CDA 4a. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = 0,10 ppm.

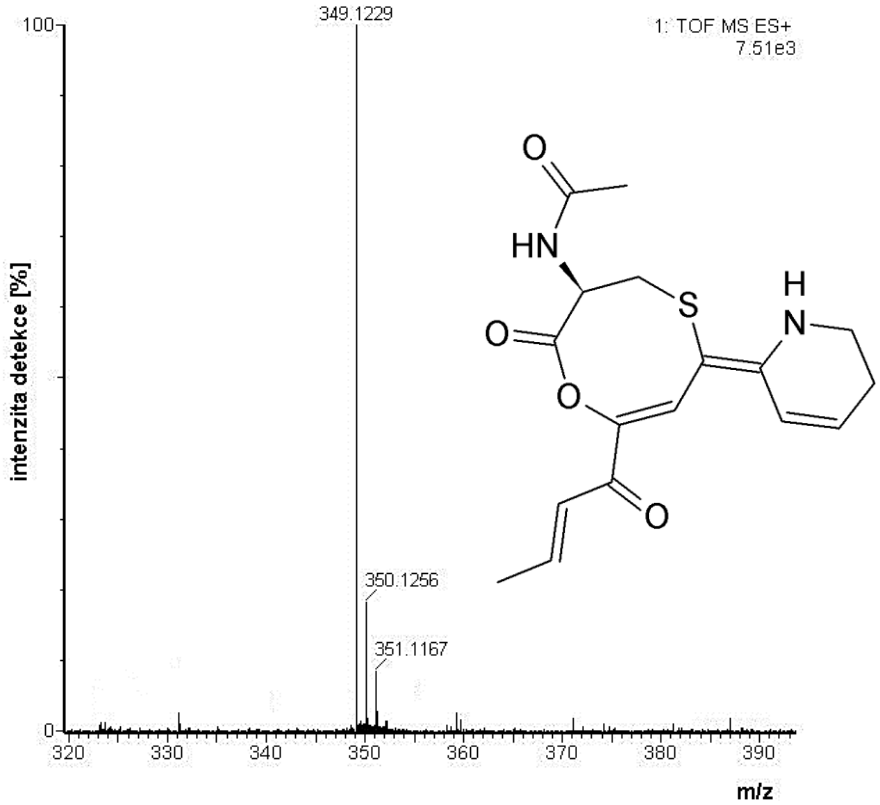
Pro ověření byla provedena také UV detekce při vlnové délce 350 nm absorpčního maxima CDA 4a (viz Hojati a kol., 2002). Po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 při 29 °C na AM médiu, R3 médiu s mannitolem a NMMP médiu nebylo CDA detekováno. V extraktu ze spor určených pro germinaci se CDA nevyskytovalo. Ve vzorcích z germinace po 6 h kultivace *S. coelicolor* M145 při 37 °C na AM a R3 médiu nebylo CDA nalezeno.

3.2.3 Coelimycin P1

Coelimycin P1 ($C_{17}H_{20}N_2O_4S$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 14 a 15). Po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na AM a NMMP médiu nebyl coelimycin P1 detekován. Ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl coelimycin P1 nalezen.



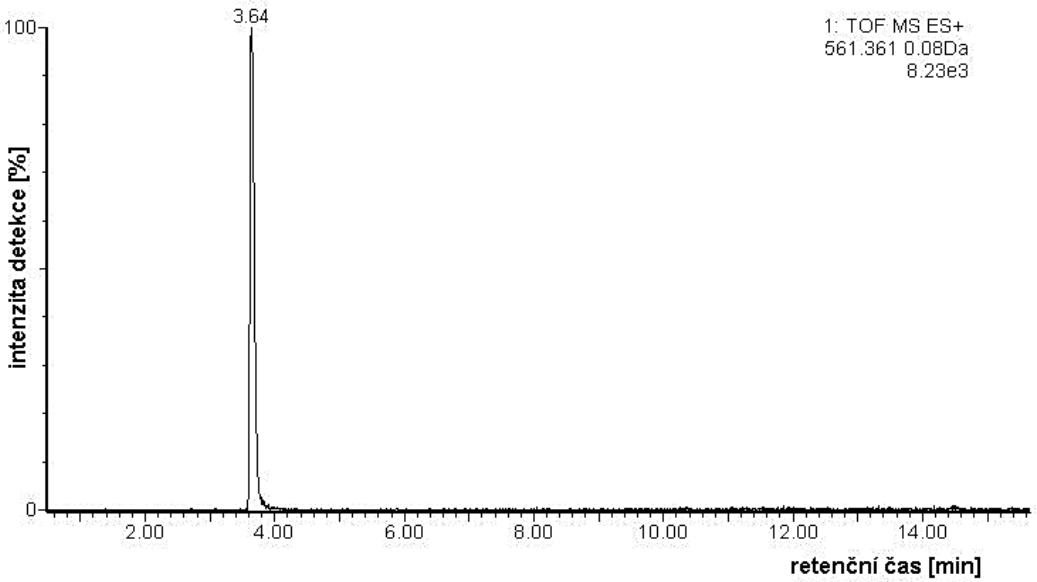
Obr. 14 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 348,1222 Da odpovídající coelimycinu P1 $C_{17}H_{20}N_2O_4S$ (pseudomolekulový iont $C_{17}H_{21}N_2O_4S^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 349.1222). V t_R = 7,12 min je patrný pík pro coelimycin P1.



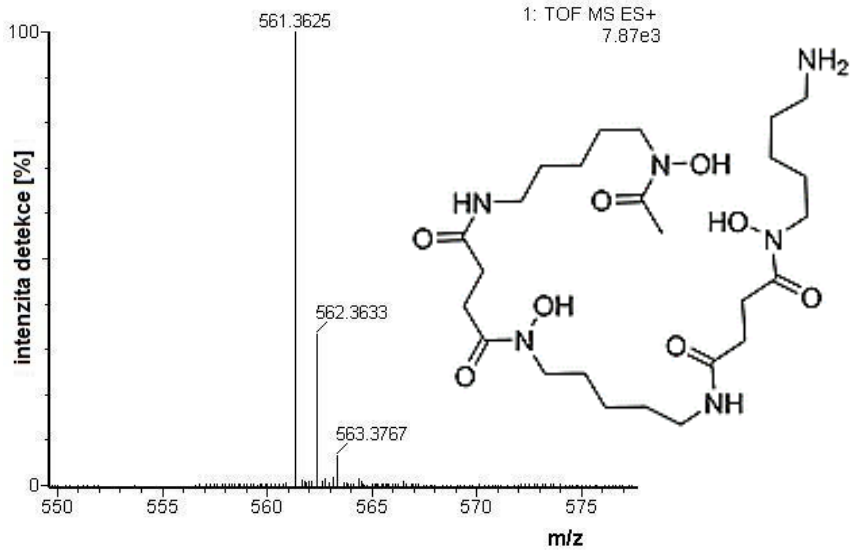
Obr. 15 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 7,12 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s glycerolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita (množství) těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{17}H_{21}N_2O_4S^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 349,1222; nalezená: 349,1229) odpovídající coelimycinu P1. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = 2,00 ppm.

3.2.4 Desferrioxamin B

Desferrioxamin B ($C_{25}H_{48}N_6O_8$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) a AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 16 a 17). Po kultivaci 48 h na NMMP médiu nebyl desferrioxamin B detekován. Ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl desferrioxamin B nalezen.



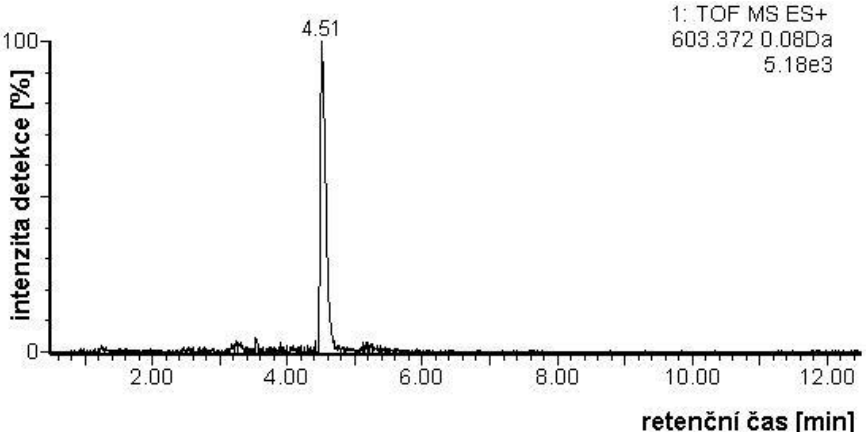
Obr. 16 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 560,3612 Da odpovídající desferrioxaminu B $C_{25}H_{48}N_6O_8$ (pseudomolekulový iont $C_{25}H_{49}N_6O_8^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 561,3612). V t_R = 3,64 min je patrný pík pro desferrioxamin B.



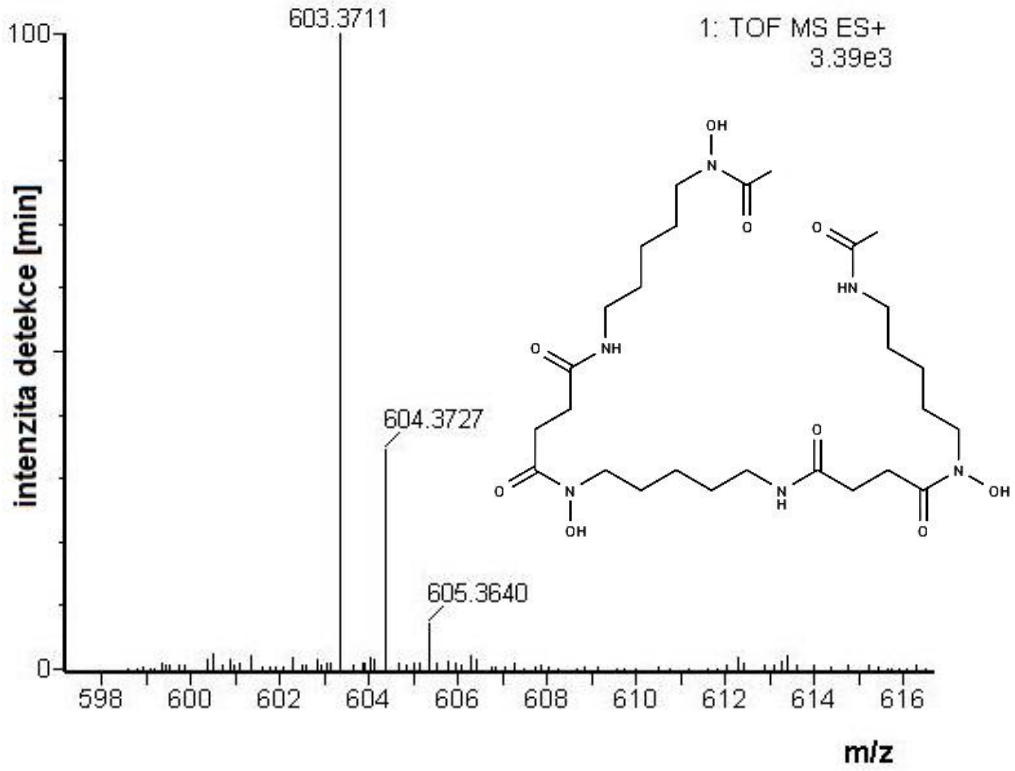
Obr. 17 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 3,64 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{25}H_{49}N_6O_8^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 561,3612; nalezená: 561,3625) odpovídající desferrioxaminu B. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = 2,30 ppm.

3.2.5 Desferrioxamin D1

Desferrioxamin D1 ($C_{27}H_{50}N_6O_9$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 18 a 19).



Obr. 18 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 602,3718 Da odpovídající desferrioxaminu D1 $C_{27}H_{50}N_6O_9$ (pseudomolekulový iont $C_{27}H_{51}N_6O_9^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 603,3718). V t_R = 4,51 min je patrný pík pro desferrioxamin D1.

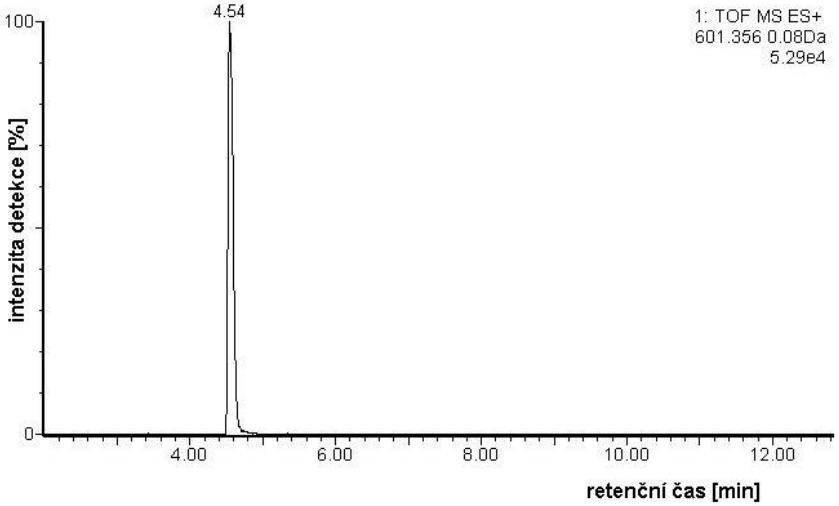


Obr. 19 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 4,49 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita (množství) těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{27}H_{51}N_6O_9^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 603,3718; nalezená: 603,3711) odpovídající desferrioxaminu D1. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = -1,20 ppm.

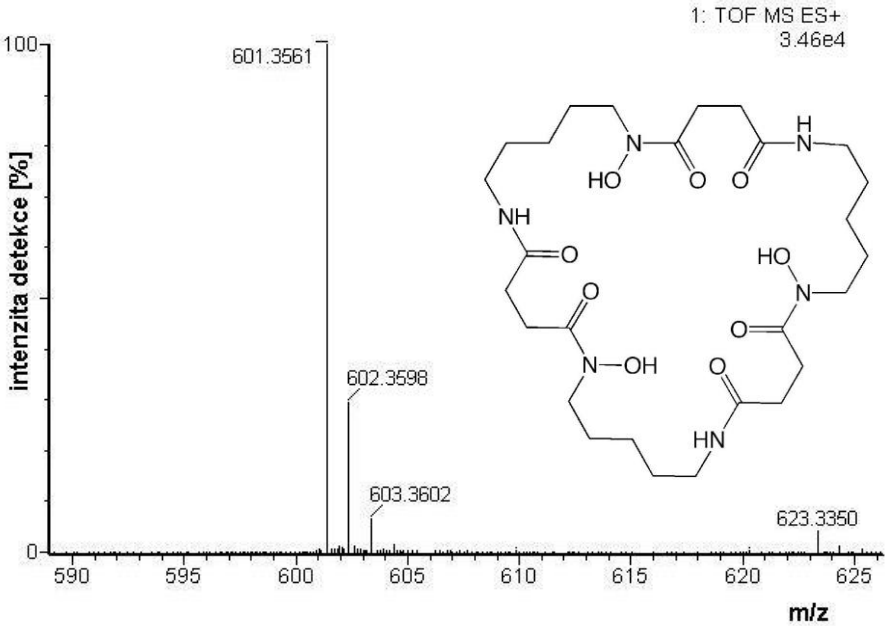
Po kultivaci 24 h na R3 a NMMP médiu nebyl desferrioxamin D1 detekován. Ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl desferrioxamin D1 nalezen.

3.2.6 Desferrioxamin E

Desferrioxamin E ($C_{27}H_{48}N_6O_9$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem), NMMP médiu a AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 20 a 21). Ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl desferrioxamin E nalezen.



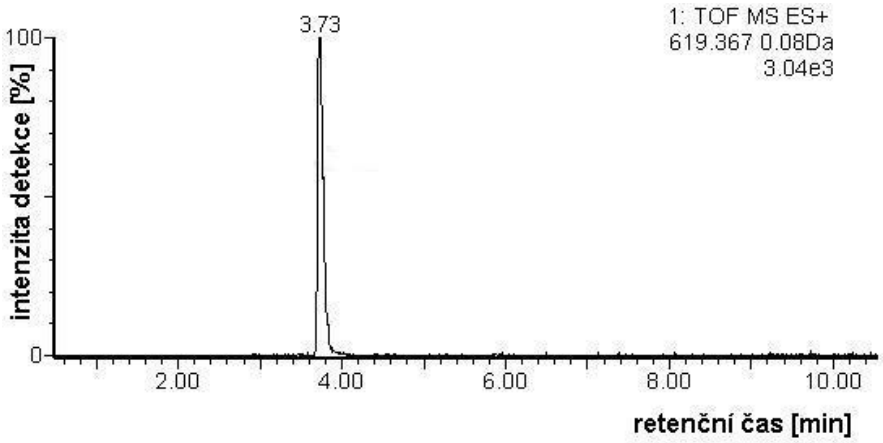
Obr. 20 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 600,3561 Da odpovídající desferrioxaminu E $C_{27}H_{48}N_6O_9$ (pseudomolekulový iont $C_{27}H_{49}N_6O_9^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 601,3561). V t_R = 4,54 min je patrný pík pro desferrioxamin E.



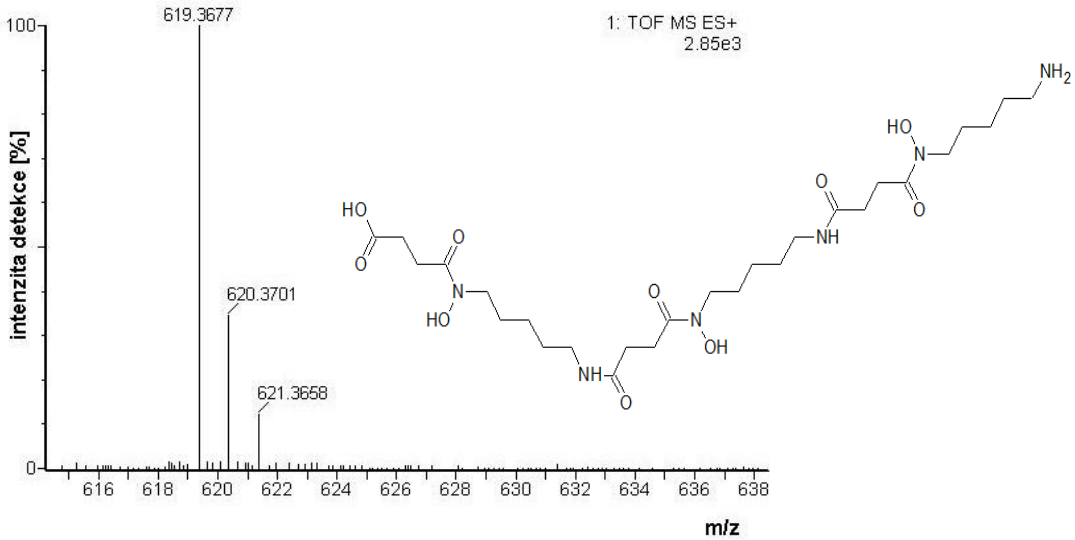
Obr. 21 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 4,52 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{27}H_{49}N_6O_9^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 601,3561; nalezená: 601,3561) odpovídající desferrioxaminu E. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = 0,0 ppm.

3.2.7 Desferrioxamin G

Desferrioxamin G ($C_{27}H_{50}N_6O_{10}$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 22 a 23). Desferrioxamin G nebyl detekován ve vzorcích z germinace, ve sporách ani po kultivaci 48 h na R3 a NMMP médiu.



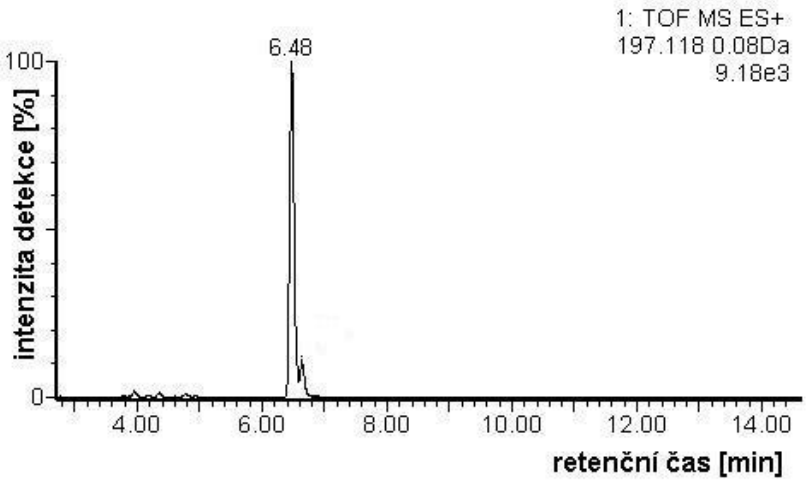
Obr. 22 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 618,3667 Da odpovídající desferrioxaminu G $C_{27}H_{50}N_6O_{10}$ (pseudomolekulový iont $C_{27}H_{51}N_6O_{10}^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 619,3667). V t_R = 3,73 min je patrný pík pro desferrioxamin G.



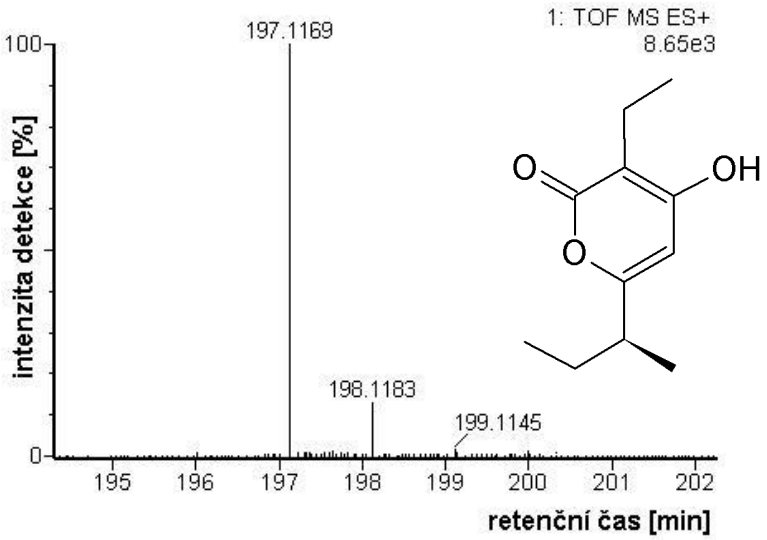
Obr. 23 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 3,73 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na AM médiu s glukosou. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{27}H_{51}N_6O_{10}^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 619,3667; nalezená: 619,3677) odpovídající desferrioxaminu E. Elementární složení analyzované látky bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = 1,60 ppm.

3.2.8 Germicidin A

Germicidin A ($C_{11}H_{16}O_3$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) a NMMP médiu při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 24 a 25).



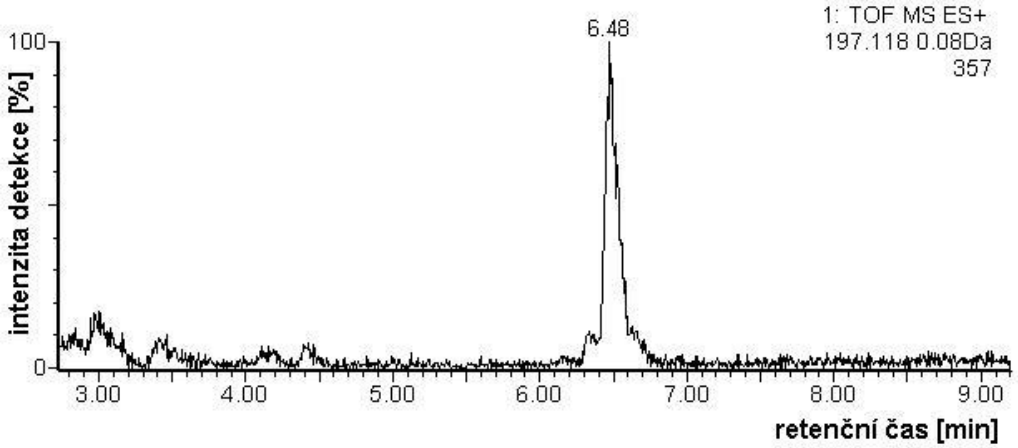
Obr. 24 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na NMMP médiu. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 196,1178 Da odpovídající germicidinu A $C_{11}H_{16}O_3$ (pseudomolekulový iont $C_{11}H_{17}O_3^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 197,1178). V t_R = 6,48 min je patrný pík pro germicidin A.



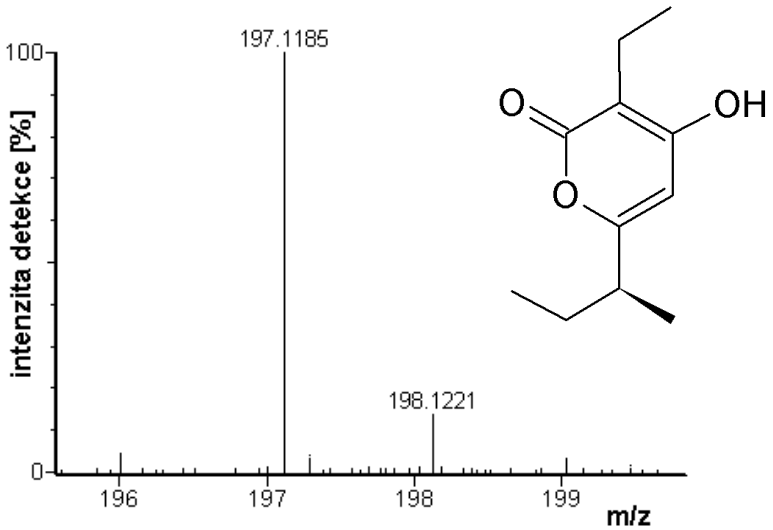
Obr. 25 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 6,47 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na NMMP médiu. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{11}H_{17}O_3^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 197,1178; nalezená: 197,1169) odpovídající germicidinu A. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení

hodnoty
m/z = -4,60 ppm.

Germicidin A byl detekován také v průběhu germinace *S. coelicolor* M145 po 6 h kultivace na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) a AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 37 °C (Obr. 26 a 27).



Obr. 26 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 196,1178 Da odpovídající germicidinu A $C_{11}H_{16}O_3$ (pseudomolekulový iont $C_{11}H_{17}O_3^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 196,1178). V t_R = 6,48 min je patrný pík pro germicidin A.

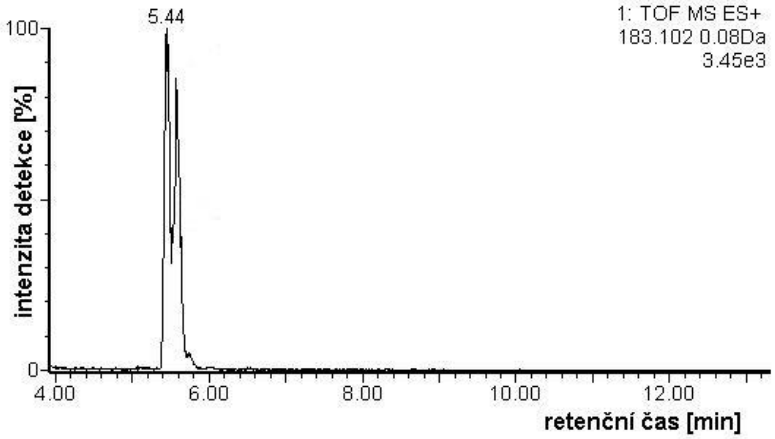


Obr. 27 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 6,47 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{11}H_{17}O_3^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 197,1178; nalezená: 197,1185) odpovídající germicidinu A. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m/z* = 3,6 ppm.

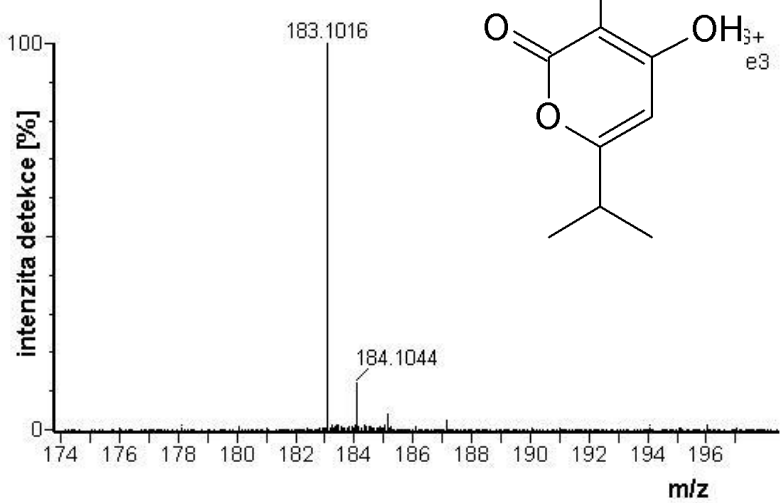
Po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na AM médiu při 29 °C nebyl germicidin A detekován. V extraktu ze spor určených pro germinaci se germicidin A nevyskytoval.

3.2.9 Germicidin B

Germicidin B ($C_{10}H_{14}O_3$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) a NMMP médiu při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 28 a 29).



Obr. 28 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na NMMP médiu. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 182,1021 Da odpovídající germicidinu B $C_{10}H_{14}O_3$ (pseudomolekulový iont $C_{10}H_{15}O_3^+$; *m/z* hodnota vypočtená: 183,1021). V t_R = 5,44 min je patrný pík pro germicic



Obr. 29 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 5,45 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na NMMP médiu. Na ose *x* je uvedena hodnota *m/z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{10}H_{15}O_3^+$ (*m/z* hodnota vypočtená: 183,1021; nalezená: 183,1016) odpovídající germicidinu B. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení

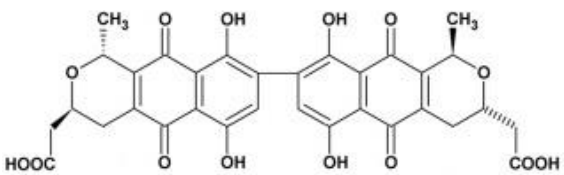
hodnoty
m/*z* = -2,73 ppm.

Po kultivaci 48 h na AM médiu nebyl germicidin B detekován. Ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl germicidin B nalezen.

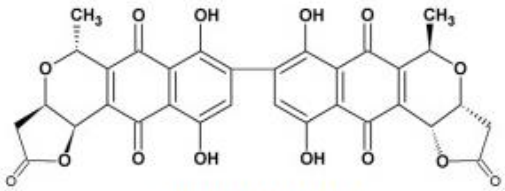
3.2.10 Actinorhodin a jeho deriváty

Po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu byla patrná produkce tmavě modrého pigmentu. Získaný supernatant měl hodnotu pH 8,49. Pro extrakci sekundárních metabolitů metodou SPE bylo pH vzorku upraveno na hodnoty 3 a 9. V zásaditém pH zůstal supernatant nadále tmavě modrý, ale při okyselení zčervenal, což svědčí o přítomnosti actinorhodinu. K barevné změně docházelo také u extraktu sekundárních metabolitů ze spor určených pro germinaci. Po 6 h kultivace na R3 médiu nebyla produkce pigmentů patrná. V případě kultivací na NMMP a AM médiu nedocházelo k modrému zabarvení (po 48 h kultivace na AM médiu byl supernatant růžový, ale při zásaditém pH, což svědčí spíše o přítomnosti undecylprodigiosinu, k jehož produkci skutečně docházelo; viz Undecylprodigiosin v kap. 3.2).

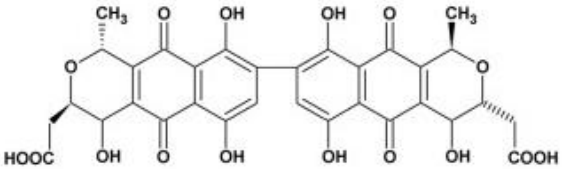
UHPLC-DAD-ToF-MS analýzou extraktů ze supernatantů a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu byly ve stopovém množství detekovány actinorhodinová kyselina a γ-actinorhodin (Obr. 30). Pro ověření byla provedena také UV detekce při vlnové délce 530 nm, tedy absorpčního maxima analyzovaných látek (viz Bystrykh a kol., 1996). Další actinorhodinové deriváty (α-,β- a ε-actinorhodin) nebyly detekovány. Ve vzorcích z germinace a extraktu ze spor nebyl actinorhodin a jeho deriváty nalezeny, stejně tak po kultivaci na AM a NMMP médiu.



actinorhodin



γ-actinorhodin

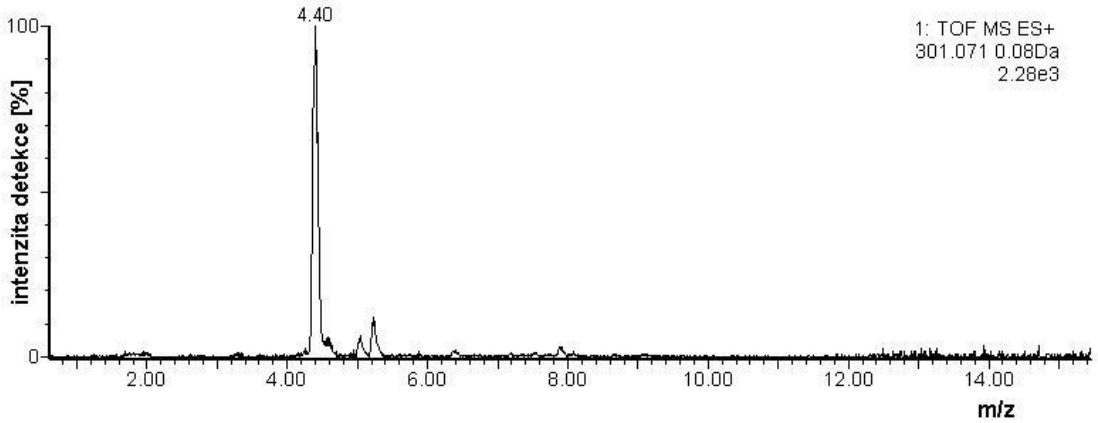


actinorhodinová kyselina

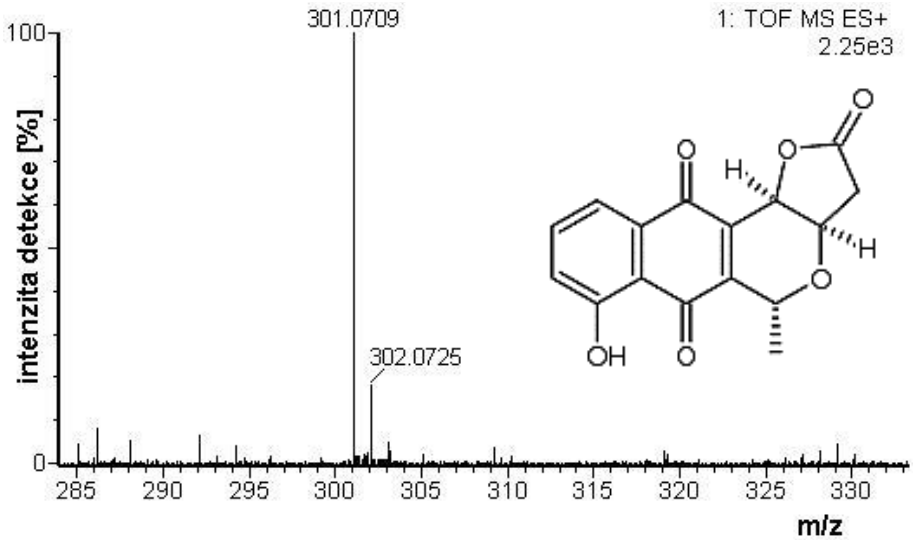
Obr. 30 Actinorhodin a jeho deriváty produkované *S. coelicolor*; převzato a upraveno z Bystrykh a kol. (1996)

3.2.11 Kalafungin

Kalafungin ($C_{16}H_{12}O_6$) byl detekován u *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 31 a 32). Po kultivaci 48 h na NMMP a AM médiu nebyl kalafungin detekován, stejně jako ve sporách a vzorcích z germinace.



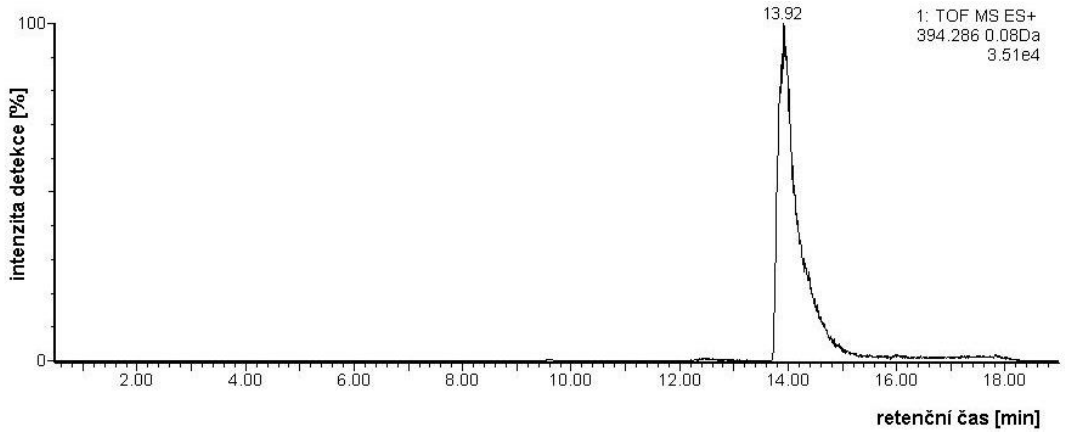
Obr. 31 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 300,0714 Da odpovídající kalafunginu $C_{16}H_{12}O_6$ (pseudomolekulový iont $C_{16}H_{13}O_3^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 301,0714). V t_R = 4,40 min je patrný pík pro kalafungin.



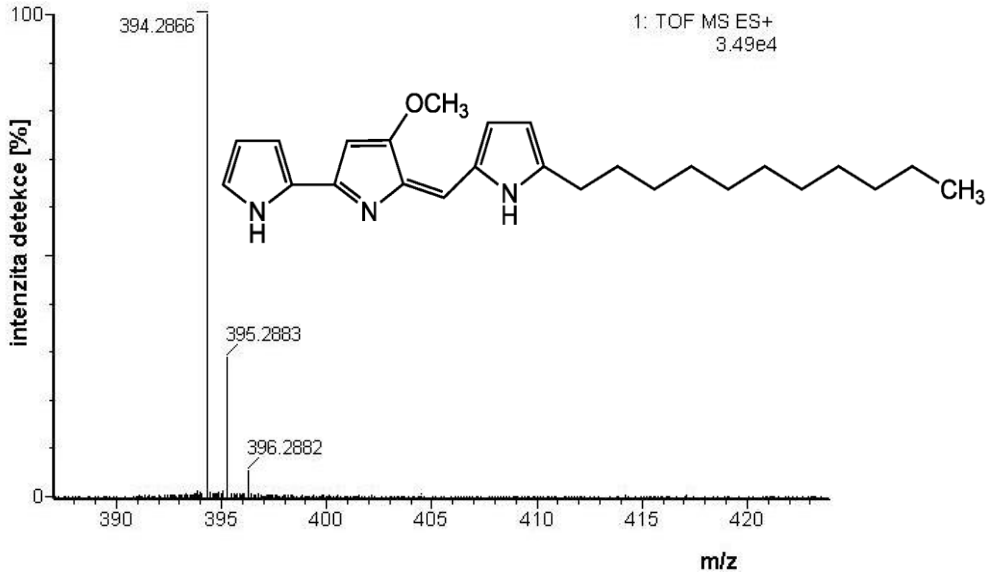
Obr. 32 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 4,41 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{16}H_{13}O_3^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 301,0714; nalezená: 301,0709) odpovídající kalafunginu. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = -1,00 ppm.

3.2.12 Undecylprodigiosin

Undecylprodigiosin ($C_{25}H_{35}N_3O$) byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s glycerolem (příp. mannitolem) a AM médiu s glukosou (příp. glycerolem) při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 33 a 34). Po kultivaci 48 h na NMMP médiu, ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl undecylprodigiosin nalezen.



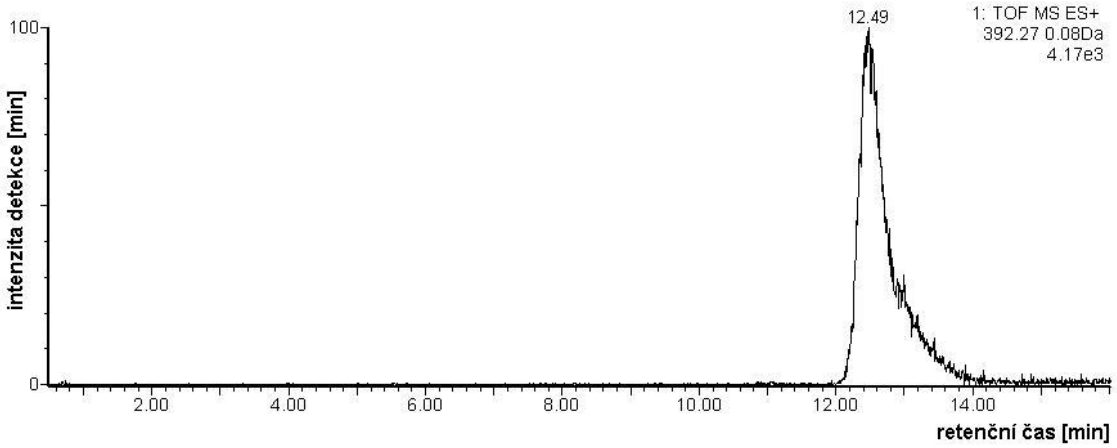
Obr. 33 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 393,2858 Da odpovídající undecylprodigiosinu $C_{25}H_{35}N_3O$ (pseudomolekulový iont $C_{25}H_{36}N_3O^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 394,2858). V t_R = 13,92 min je patrný pík pro undecylprodigiosin.



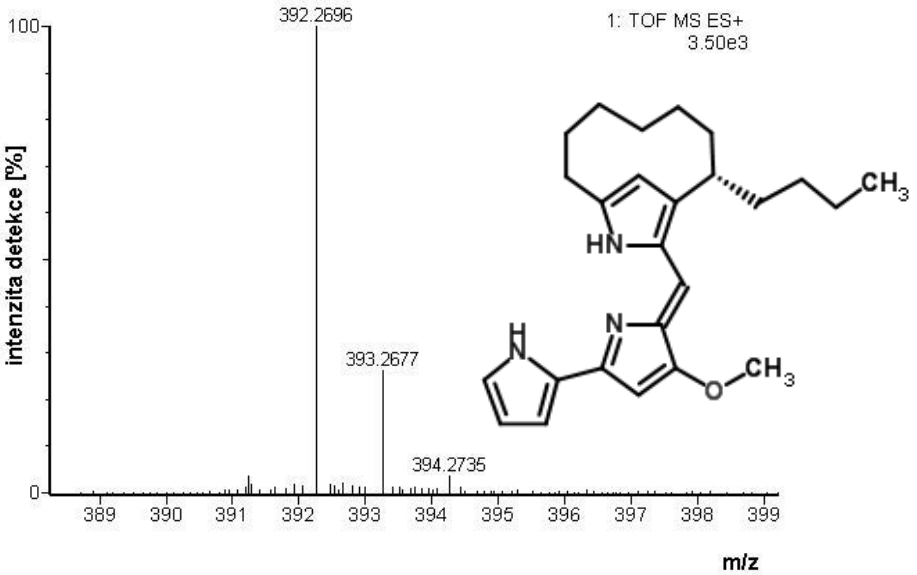
Obr. 34 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 13,90 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{25}H_{36}N_3O^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 394,2858; nalezená: 394,2866) odpovídající undecylprodigiosinu. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = 2,00 ppm.

3.2.13 Streptorubin B

Streptorubin B byl detekován po 48 h kultivace *S. coelicolor* M145 na R3 médiu s mannitolem při 29 °C. Extrakt byl získán metodou SPE a analyzován pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS (Obr. 35 a 36). Po kultivaci 48 h na NMMP a AM médiu, ve vzorcích z germinace ani ve sporách nebyl streptorubin B nalezen.



Obr. 35 Extrahovaný iontový chromatogram z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Osa *x* ukazuje retenční čas (t_R), osa *y* intenzitu detekce látky o monoisotopické hmotě 391,2702 Da odpovídající streptorubinu B $C_{25}H_{33}N_3O$ (pseudomolekulový iont $C_{25}H_{34}N_3O^+$; *m*/*z* hodnota vypočtená: 392,2702). V t_R = 12,49 min je patrný pík pro streptorubin B.



Obr. 36 Hmotnostní spektrum látky s t_R = 12,41 min z UHPLC-DAD-ToF-MS analýzy extraktu ze supernatantu a buněk *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace na R3 médiu s mannitolem. Na ose *x* je uvedena hodnota *m*/*z* iontů, na ose *y* intenzita těchto iontů. Ve spektru je patrný pseudomolekulový iont $C_{25}H_{34}N_3O^+$ (*m*/*z* hodnota vypočtená: 392,2702; nalezená: 392,2696) odpovídající streptorubinu B. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* = -1,50 ppm.

3.3 Analýza genové exprese

Izolace celkové RNA *S. coelicolor* M145

Ze spor *S. coelicolor* M145 určených pro germinaci a buněk po 6 h kultivace na R3 médiu s glycerolem (nebo mannitolem) byla vyizolována celková RNA (Tab II). Celkovou RNA se nepodařilo vyizolovat ze spor, ale pouze z buněk *S. coelicolor* M145 po 6 h kultivace na R3 médiu s glycerolem a R3 médiu s mannitolem. Čistota RNA byla nízká (v ideálním případě by čistota RNA pro RT-PCR měla být v rozmezí 1,8-2,0). Izolace RNA budu opakovat.

Tab. II: Hodnoty koncentrace a čistoty vyizolované celkové RNA *S. coelicolor* M145 ze spor určených pro germinaci a z buněk po 6 h kultivace na R3 médiu s glycerolem (nebo mannitolem).

	koncentrace [ng/µl]	čistota (A_{260}/A_{280})
slepý vzorek (DEPC voda)	0,00	0,00
S. coelicolor M145, spory	51,10	0,99
S. coelicolor M145, R3 glyc. (6 h)	775,40	1,46
S. coelicolor M145, R3 mannit. (6 h)	368,90	1,48

Analýza vyizolované RNA elektroforesou v agarosovém gelu

Počáteční analýza RNA elektroforesou v agarosovém gelu ukázala, že RNA je degradovaná. Horní proužek (23S) a dolní (16S) byly rozmazané, neostré, se zřetelnými kratšími fragmenty.

RT-PCR

Experiment v přípravě.

4 DISKUSE

Přestože už bylo izolováno a popsáno mnoho sekundárních metabolitů bakterií rodu *Streptomyces*, jednalo se nejčastěji o izolaci látek ze stacionární fáze růstu, tedy v souvislosti s tvorbou vzdušného mycelia (Kieser a kol., 2000; van Keulen a Dyson, 2014). Z naměřených dat genové exprese při germinaci *S. coelicolor* spolu s analýzou vazeb sigma faktorů na promotory ale vyplývá, že se v této fázi aktivují také geny (včetně kryptických) řídící biosyntézu sekundárních metabolitů (Bobek a kol., 2014; Strakova a kol., 2013a; Strakova a kol., 2014). Příkladem mohou být geny pro syntézu desferrioxaminů (*sco2782-2785*), šedého sporového pigmentu (*sco5314*, *sco5318*, *sco5320*), nebo žlutého pigmentu coelimycinu P1 (*sco6273-6275*, *sco6277-6287*), který je produktem *cpk* kryptického genového klastru *S. coelicolor* (Gomez-Escribano a kol., 2012; Lakey a kol., 1983; Strakova a kol., 2013a; Strakova a kol., 2014). Ve své práci jsem se proto zaměřil na ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace. Přítomnost těchto látek již v rané fázi vývoje mikroorganismu by jistě byla významná nejen z hlediska zajištění příznivých podmínek pro růst a způsobu ochrany před nepříznivými vlivy, ale i z hlediska dorozumívání v bakteriální populaci (tzv. quorum sensing).

Produkci sekundárních metabolitů jsme současně ověřili ve stacionární fázi růstu (48 h, 29 °C) a v germinaci (6 h, 37 °C). Pro kontrolu, že detekované sekundární metabolity se skutečně tvoří při germinaci a nepocházejí ze stádia sporulace, jsme navíc měřili i vzorek dormantních spor. Kultivace kmene probíhala na třech různých médiích (R3, NMMP a AM; viz kap. 2.1.2 a 2.2.1). R3 médium jsme zvolili z proto, že na něm *S. coelicolor* ve stacionární fázi růstu produkuje celou řadu strukturně odlišných sekundárních metabolitů, např. actinorhodin (Shima a kol., 1996) a coelimycin P1 (Gomez-Escribano a kol., 2012). Minimální tekuté médium NMMP jsme využili pro kultivace se specifickými zdroji uhlíku (Hodgson, 1982). Výběr AM média souvisel se skutečností, že v něm byla provedena germinace *S. coelicolor* M145 při měření dat genové exprese (Bobek a kol., 2014; Strakova a kol., 2013a; Strakova a kol., 2014). Jako vhodný zdroj uhlíku z hlediska produkce sekundárních metabolitů se nám u R3 osvědčil glycerol nebo mannitol (dle doporučení Kieser a kol., 2000), v případě NMMP mannitol a u AM média glukosa a glycerol.

Pro izolaci extracelulárních a intracelulárních sekundárních metabolitů se neosvědčilo prosté vytřepávání ethylacetátem ani metoda QuEChERS (kap. 3.1).

V extraktech ze stacionární fáze jsme detekovali pouze stopová množství desferrioxaminu B, coelimycinu P1, undecylprodigiosinu a streptorubinu B. Aplikovali jsme proto extrakci na pevnou fázi (Higgs a kol., 2001) s optimalizací pro sekundární metabolity streptomycet (kap. 2.2.3). Z extraktů byly následně připraveny vzorky pro analýzu pomocí UHPLC-DAD-ToF-MS v pozitivním (ESI+) módu ionizace (kap. 2.2.3). K identifikaci známých sekundárních metabolitů *S. coelicolor* nebyly použity standardy, ale srovnání vypočtené hodnoty *m*/*z* pseudomolekulového iontu sekundárního metabolitu s odpovídající hodnotou *m*/*z* nalezenou v hmotnostním spektru. Elementární složení iontu bylo stanoveno se správností určení hodnoty *m*/*z* do ±5 ppm. U látek s absorpčními maximy při určitých vlnových délkách následovala i UV/VIS detekce (např CDA, coelimycin P1, actinorhodin, undecylprodigiosin).

Ze skupiny terpenoidních látek produkovaných *S. coelicolor* jsme ve vzorku ze stacionární fáze (R3 s glycerolem) i z germinace (AM s glycerolem) detekovali **albaflavenon**. V extraktu z dormantních spor se nevyskytoval. Albaflavenon je tricyklické seskviterpenoidní antibiotikum. Vykazuje podobně zemitý odér jako geosmin, na který je lidský čich velmi citlivý (Gerber a Lechevalier, 1965; Gürtler a kol., 1994). Kromě některých bakterií rodu *Streptomyces* antibiotikum produkuje také houba *Phallus indusiatus*, jež je díky svým účinkům využívána v tradiční čínské medicíně (Huang a kol., 2011).

Biosyntéza albaflavenonu vyžaduje aktivitu dvou genů z klastru *sco5222-5223*. Výchozí látkou je farnesyl difosfát vznikající kondenzací dimethylallyl pyrofosfátu s dvěma molekulami isopentenyl pyrofosfátu (Zhao a kol., 2008). V prvním kroku seskviterpen cyklasa (Sco5222) katalyzuje cyklizaci farnesyl difosfátu na *epi*-isozizaen. Pro aktivitu enzymu je nezbytná přítomnost hořečnatých iontů. Produkt genu *sco5223* (cytochrom P450, resp. CYP170A1) následně provede oxidaci *epi*-isozizaenu nejprve na albaflavenol, a v konečné fázi na albaflavenon (Moody a kol. 2012).

Z již dříve naměřených dat genové exprese v průběhu germinace vyplývá, že dochází v této fázi k aktivaci genu *sco5223* (Strakova a kol., 2013a). Produkce albaflavenonu (viz Gürtler a kol., 1994 a Zhao a kol., 2008) byla doposud vždy popsána pouze ve stacionární fázi růstu *Streptomyces albidoflavus* (škrobové kvasničné médium, 5 dní, 30 °C) a *S. coelicolor* (médium s kvasničným a sladovým extraktem, 2-5 dní, 30 °C). Z námi naměřených dat je ale patrné, že by k produkci albaflavenonu mohlo docházet již v germinaci, tedy po pouhých šesti hodinách kultivace.

Albaflavenon by organismu zřejmě poskytoval výhodu v silně konkurenčním půdním prostředí, neboť má prokazatelný antibakteriální účinek vůči *Bacillus subtilis* (Gürtler a kol., 1994). Ten u terpenoidních látek (např. menthol, linalyl, thymol) není ničím neobvyklým. Řada z nich má nejen schopnost inkorporace do plasmatické membrány bakterií, čímž dochází k ovlivnění její permeability a unikání intracelulárního materiálu, ale rovněž mohou membránou pronikat a interagovat s nitrobuněčnými komponenty (Trombetta a kol., 2005).

Pokud by se albaflavenon začleňoval do hydrofobního obalu spor podobně jako monoterpenoidní látky do lipofilní vrstvy membrány, mohl by být germinačním signálem pro koordinovaný průběh germinace. Uvažujeme-li totiž, že tloušťka hydrofobního pláště spory není unifikovaná, potom influx vody do každé spory probíhá s odlišnou intenzitou a klíčení je tedy nesynchronní proces (způsob pro synchronizaci germinace viz Miguélez a kol., 1993). Dříve vyklíčené spory by albaflavenon produkovaly jako signál, že podmínky vnějšího prostředí jsou vhodné pro růst. Začlenění albaflavenonu do hydrofobního pláště nevyklíčených spor a ovlivnění propustnosti tohoto obalu by zřejmě vedlo k intenzivnějšímu influxu vody do spor, čímž by se germinace urychlila.

V souvislosti s albaflavenonem je zmiňována i možná signální role podobná poplašnému feromonu β-farnesenu, který produkují některé druhy rostlin (např. *Solanum berthaultii* Hawkes) jako přirozený repelent odpuzující mšice (Gibson a Pickett, 1983). Současně ale β-farnesen také láká predátory mšic (Avé a kol., 1987; Gibson a Pickett, 1983). *S. coelicolor* by se produkcí těchto látek mohl podílet na ochraně rostlin před škodlivým hmyzem. Zajímavé je, že albaflavenon a β-farnesen navíc pojí na úrovni biosyntézy právě cytochrom P450 (Moody a kol. 2012; van Keulen a Dyson, 2014). Ten v přítomnosti hořečnatých iontů katalyzuje přeměnu farnesyl difosfátu na β-farnesen. Zde se ovšem jedná o aktivitu cytochromu P450 ve smyslu farnesen synthasy, a nikoliv oxidace jako při biosyntéze albaflavenonu (Moody a kol. 2012).

Ze skupiny neribozomálních peptidů (resp. lipopeptidů) jsme ve vzorku ze stacionární fáze detekovali **kalcium-dependentní antibiotikum (CDA)** s příslušnými kongenery (typ 2b, 3a, 3b, 4a, 4b). Na rozdíl od albaflavenonu se však jednalo pouze o stopová množství. Biosyntéza CDA je řízena geny *sco3210-3249* z genového klastru *cda,* což je vůbec největší počet genů zapojených v biosyntéze některého z dosud objevených sekundárních metabolitů *S. coelicolor* (Hojati a kol., 2002; Micklefield J.,

2009). Bylo popsáno, že v germinaci dochází k expresi jednadvaceti genů tohoto klastru (Strakova a kol., 2013a), mj. také *sco3230-3232* (CDA peptid synthetasy I-III). Přesto ve vzorcích z germinace nebylo CDA detekovatelné, což může být zapříčiněno např. nevhodnými kultivačními podmínkami, metodou izolace, či nekompletní biosyntézou. Syntéza poměrně složitých struktur neribozomálních peptidů vyžaduje totiž kromě celé řady již vytvořených intermediátů i aktivitu velkého množství genů. K jejich aktivaci ale v průběhu germinace teprve dochází.

CDA se nevyskytovalo ani v dormantních sporách. Expresi genů *sco3230-3234* budeme ještě ověřovat metodou RT-PCR. Další neribozomální peptidy *S. coelicolor* (např. coelichelin, coelibactin) jsme ve vzorcích z germinace ani ze stacionární fáze nedetekovali. Vzhledem k výrazně vyšší molekulové hmotnosti těchto látek (v porovnání s ostatními sekundárními metabolity *S. coelicolor*) by pro další ověření bylo vhodné kultivaci, izolaci a analýzu UHPLC-MS optimalizovat právě pro identifikaci neribozomálních peptidů.

Ve vzorcích ze stacionární fáze (R3 a AM médium) jsme nalezli všechny doposud popsané lineární a cyklické **desferrioxaminy** *S. coelicolor*. Jedná se o siderofory hydroxamátového typu, které jsou schopné vázat ionty železa (Barona-Gomez a kol., 2004; Traxler a kol., 2012). Desferrioxaminy (B, D1, E a G) byly dobře detekovatelné především v supernatantech z kultivace na AM médiu bez zdroje železa. Ve vzorcích z germinace nebyla vzhledem k nízké intenzitě detekce přítomnost desferrioxaminů prokazatelná. Pro biosyntézu těchto látek jsou důležité produkty genů z klastru *desABCD* (*sco2782-2785*) a v průběhu germinace se exprimují právě geny *sco2783-2784* (Strakova a kol., 2013a, van Keulen a Dyson, 2014). Biosyntéza desferrioxaminů nicméně nemusí během germinace nastat, neboť exprese genů sekundárního metabolismu je pouze podmínkou biosyntézy, a nikoliv důkazem, že k ní skutečně dochází. Důvodem může být ale také fakt, že na počátku kultivace většinou limitace železem nenastává, a proto produkce desferrioxaminů není nutná.

Ze skupiny polyketidových látek byl ve stacionární fázi (R3 médium) detekovatelný tzv. žlutý pigment **coelimycin P1**; polyketidový alkaloid s inkorporovaným atomem síry (Gomez-Escribano a kol., 2012). Jde o metabolický produkt kryptického genového klastru *cpk* (*sco6273-6288*), k jehož produkci dochází na médiích bez glukosy (Pawlik a kol., 2010). Ve vzorcích z germinace se coelimycin P1 nevyskytoval, ačkoliv již dříve byla v průběhu germinace ověřena exprese genů *sco6273-6275* a *sco6277-6287*

z klastru *cpk* (Strakova a kol., 2013a). Zda se během germinace exprimují geny *sco6273-6275* (polyketid-synthasa typu I) ještě budeme ověřovat metodou RT-PCR.

Mezi polyketidy patří i **šedý sporový pigment**, jehož struktura není zcela objasněna. Jedná se o metabolický produkt genového klastru *whiE* (*sco5314-5320*), který je dle našich dat (*sco5314, sco5318, sco5320*) v germinaci exprimován (Strakova a kol., 2013a). Navrhovaná struktura pigmentu získaná heterologní expresí genového klastru *whiE* byla pojmenována jako Tw95a (Yu a kol., 1998). Ve vzorcích ze stacionární fáze a z germinace jsme ale tuto látku nedetekovali. Expresi genů *sco5314-5319* ještě ověříme metodou RT-PCR. Vzhledem ke skutečnosti, že neznáme strukturu šedého sporového pigmentu, bude detekce v germinaci nemožná.

Z dalších polyketidových látek jsme naopak ve stacionární fázi (R3 a NMMP médium) detekovali **germicidiny A** a **B**, které inhibují germinaci streptomycet, ale i jiných bakterií (Petersen a kol., 1993). Germicidin A zpomaluje dokonce růst hyf u streptomycet (Aoki a kol., 2011). Ve vysokých koncentracích také germicidiny inhibují klíčení semen rostliny *Lepidium sativum* a činnost prasečí Na^+/K^+ aktivované ATPasy. Dále bylo prokázáno, že účinek těchto látek mizí promytím spor vodou (Petersen a kol., 1993). Proto je zajímavé, že jsme nalezli germicidin A také ve vzorcích z germinace (R3 a AM médium).

Na biosyntéze těchto látek se podílí germicidin-synthasa Gcs (polyketid-synthasa III); produkt genu *sco7221* (Aoki a kol., 2011; Chemier a kol., 2012). Nicméně k expresi tohoto genu v germinaci nedochází (Strakova a kol., 2013a). Biosyntéza germicidinů není doposud zcela objasněna, ale mohla by souviset také s aktivitou genů *sco1206* (polyketid-synthasa typu III) a *sco7670-7671* (methyltransfera), jejichž exprese byla v germinaci potvrzena (Chemier a kol., 2012, Strakova a kol., 2013a).

Germicidin A produkovaný klíčícími sporami by mohl být signálem pro inhibici germinace ostatních spor. Zřejmě tedy reakcí organismu na nepříznivé podmínky vnějšího prostředí, nebo dokonce schopností *S. coelicolor* koordinovat průběh germinace ve vlastní populaci. Antibakteriální účinek germicidinů není znám. V dormantních sporách jsme germicidiny nedetekovali, přestože jejich přítomnost v dormantních sporách již byla prokázána (Aoki a kol., 2012). Nutno ale podotknout, že pro úspěšnou izolaci germicidinů ze spor *S. coelicolor* a detekci LC-ESI-MS bylo použito množství spor sklizené z padesáti Petriho misek, zatímco my pro izolaci používáme 1 ml sporové suspenze jako negativní kontrolu, zda sekundární metabolit není detekovatelný UHPLC-MS již v inokulu.

Ve stacionární fázi jsme rovněž nelezli deriváty antibiotika actinorhodinu (**actinorhodinová kyselina**, **γ-actinorhodin**) a **kalafungin**, což je intermediát biosyntézy actinorhodinu (Bystrykh a kol., 1996; Okamoto a kol., 2009; Strakova a kol., 2013a). Jedná se o cyklické polyketidy, které jsou metabolickými produkty genového klastru *act*, tedy genů *sco5071-5092* (Okamoto a kol., 2009), přičemž v germinaci byla naměřena exprese genů *sco5072-5086*, *sco5088* a *sco5090* (Strakova a kol., 2013a). Ve vzorcích z germinace se ale tyto metabolity nevyskytovaly. Naopak v dormantních sporách byla jejich přítomnost patrná (viz 3.2.10).

Polyketidové sekundární metabolity s poměrně komplikovanou strukturou (např. coelimycin P1, actinorhodin aj.) jsme v průběhu germinace nedetekovali zřejmě z několika důvodů. Podobně jako neribozomální syntéza CDA vyžaduje i polyketidová biosyntéza nejen mnoho intermediátů, ale i aktivaci vysokého počtu genů, aby proběhla kompletně (Strakova a kol., 2013a). K této aktivaci a syntéze intermediátů však v germinaci teprve dochází, a proto polyketid nemusí být nasyntetizován v dostatečném množství pro detekci, nebo biosyntéza probíhá až v pozdní fázi růstu.

Ke specifickým sekundárním metabolitům *S. coelicolor* patří červené a hnědé pigmenty s antibiotickými účinky. Ve stacionární fázi (R3 a AM médium) jsme z této skupiny identifikovali **undecylprodigiosin** a **streptorubin B**. V dormantních sporách se nevyskytovaly. Jedná se o metabolické produkty genového klastru *red*, tedy *sco5877-5898* (Cardeno a kol., 2001; Mo a kol., 2008; van Keulen a Dyson, 2014). V germinaci se exprimují geny *sco5877-5878*, *sco5881*, *sco5891-5894*, *sco5898* (Strakova a kol., 2013a). Undecylprodigiosin a streptorubin B jsme ale ve vzorcích z germinace nedetekovali, což může souviset se skutečností, že jejich komplexní biosyntéza vyžaduje enzymový aparát biosyntetických drah polyketidových látek, neribozomálních peptidů, mastných kyselin a α-oxoaminů (Cardeno a kol., 2001; Mo a kol., 2008). Tvorba undecylprodigiosinu a streptorubinu B v germinaci je proto méně pravděpodobná.

Ověření produkce sekundárních metabolitů, jejichž detekce v průběhu germinace nebyla zřejmá (např. desferrioaxaminy), provedeme ještě při současné analýze vzorků ze stacionární fáze a germinace pomocí metody UHPLC-DAD-ToF-MS. Na základě srovnání retenčních časů látek z fáze stacionární a stádia germinace budeme moci posoudit, zda i přes nízkou intenzitu detekce skutečně dochází k biosyntéze sekundárního metabolitu v germinaci. U prokázaných sekundárních metabolitů poté

aplikujeme UHPLC-MS analýzu za pomoci standardů a ověříme expresi příslušných genů jejich biosyntézy metodou RT-PCR.

Naše nejnovější data analýzy regulonu některých sigma faktorů *S. coelicolor* naznačují, že by v germinaci mohlo docházet také k produkci **ectoinu**. Jedná se o extremolyt, který má osmoprotektivní účinek a poskytuje bakteriím ochranu před náhlými výkyvy teplot, UV zářením a vysoušením (Graf a kol., 2008; Kol a kol., 2010). Díky svým vlastnostem se využívá v kosmetických a farmaceutických přípravcích (např. oční kapky Vividrin nebo Bioderma Photoderm Ski krém na opalování SPF 50+). U *S. coelicolor* biosyntézu tohoto metabolitu řídí geny z klastru *ectABCD* (*sco1864-1867*), nicméně exprese žádného z nich nebyla doposud v germinaci prokázána (Kol a kol., 2010; Strakova a kol., 2013a).

Jak jsme též zjistili z analýz genové exprese, jsou při germinaci aktivovány i jiné geny a metabolické dráhy odpovídající na osmotický stres, kterým ve své podstatě je fyziologická fáze rehydratace aktivovaných spor. Proto bychom rádi ověřili, zda se na tomto procesu podílí i tvorba ectoinu. Jeho produkci v průběhu germinace budeme měřit UHPLC-MS s využitím běžně dostupného standardu. Provedeme rovněž detailní analýzu exprese genů s*co1864-1867* metodou RT-PCR.

5 POUŽITÁ LITERATURA

Aoki Y., Matsumoto D., Kawaide H., Natsume M. (2011) Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Antibiotics, 64, str. 607-611.

Avé D. A., Gregory P., Tingey W. M. (1987) Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 44, str. 131-138.

Barona-Gomez F., Wong U., Giannakopulos A. E., Derrick P. J., Challis G. L. (2004) Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. Journal of the American Chemical Society, 126, str. 16282-16283.

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1999) Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha, 560 str.

Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby1 T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabbinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 417, str. 141-147.

Bobek J., Strakova E., Zikova A., Vohradsky J. (2014) Changes in activity of metabolic and regulatory pathways during germination of *S. coelicolor*. BMC Genomics, 15, str. 1173-1188.

Brockmann H., Hieronimus E. (1955) Über Actinomycetenfarbstoffe, V. Mitteil.: Zur Konstitution des Actinorhodins, III. Mitteil. Chemische Berichte, 88, str. 1379-1390.

Brun Y. V., Shimkets L. J. (2000) Prokaryotic development, ASM Press, Washington D. C., 492 str.

Buttner M. J., Flärdh K. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology, 7, str. 36-49.

Bystrykh L. V., Fernández-Moreno M. A., Herrema J. K., Malpartida F., Hopwood D. A., Dijkhuizen L. (1996) Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology, 178, str. 2238-2244.

Cerdeno A. M., Bibb M. J., Challis G. L. (2001) Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): New mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. Chemistry & Biology, 8, str. 817-829.

Choulet F., Aigle B., Gallois A., Mangenot S., Gerbaud C., Truong C., Francou F. X., Fourrier C., Guérineau M., Decaris B., Barbe V., Pernodet J. L., Leblond P. (2006) Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. Molecular Biology and Evolution, 23, str. 2361-2369.

Claessen D., Wosten H. A., van Keulen G., Faber O. G., Alves A. M., Meijer W. G., Dijkhuizen L. (2002) Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. Molecular Microbiology, 44, str. 1483-1492.

Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F. G., Dijkhuizen L., Wosten H. A. (2003): A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. Genes and Development, 17, str. 1714-1726.

Claessen D., de Jong W., Dijkhuizen L., Wosten H. A. (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! Trends in Microbiology, 14, str. 313-319.

Darken M. A., Berenson H., Shirk R. J., Sjolander N. (1960) Production of tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in synthetic media. Applied Microbiology, 8, str. 45-61.

Ditkowski B., Holmes N., Rydzak J., Donczew M., Bezulska M., Ginda K., Kędzierski P., Zakrzewska-Czerwińska J., Kelemen G. H., Jakimowicz D. (2013) Dynamic interplay of ParA with the polarity protein, Scy, coordinates the growth with chromosome segregation in *Streptomyces coelicolor*. Open Biology, 3, DOI 10.1098/rsob.130006.

Flärdh, K. (2003) Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Molecular Microbiology, 49, str. 1523-1536.

Fuchs G. (2007) Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 732 str.

Gerber N. N., Lechevalier H. A (1965) Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. Applied Microbiology, 13, str. 935-938.

Gibson R. W., Pickett J. A. (1983) Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. Nature, 302, 608-609.

Glauert A. M., Hopwood D. A. (1961) The fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (*S. coelicolor*) III. The walls of the mycelium and spores. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 10, str. 505-516.

Gomez-Escribano J. P., Song L., Fox D. J., Yeo V., Bibb M. J., Challis G. (2012) Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the cpk gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. Chemical Science, 3, str. 2716-2720.

Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H. (2008) The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. Clinics in Dermatology, 26, str. 326-333.

Gürtler H., Pedersen R., Anthoni U., Christophersen C., Nielsen P. H., Wellington E. M., Pedersen C., Bock K. (1994) Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. Journal of Antibiotics, 47, str. 434-439.

Haiser H. J., Yousef M. R., Elliot M. A. (2009) Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology, 191, str. 6501-6512.

Hanson R. S., Curry M. V., Garner J. V., Orin Halvorson H. (1972) Mutants of *Bacillus cereus* strain T that produce thermoresistant spores lacking dipicolinate and have low levels of calcium. Canadian Journal of Microbiology, 18, str. 1139-1143.

Hara O., Beppu T. (1982) Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* - the role of A-factor. Journal of Antibiotics (Tokyo), 35, str. 349-358.

Hardisson C., Manzanal M. B., Salas J. A., Suarez J. E. (1978) Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. Journal of General Microbiology, 105, str. 203-214.

Harrison J., Studholme D. J. (2014) Recently published *Streptomyces* genome sequences. Microbial Biotechnology, 7, str. 373-380.

Higgs R. E., Zahn J. A., Gygi J. D., Hilton M. D. (2001) Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. Applied and Environtmental Microbiology, 67, str. 371-376.

Hobbs G., Obanye A. I. C., Petty J., Mason J. C., Barratt E., Gardner D. C. J., Flett F., Smith C. P., Broda P., Oliver S. G. (1992) An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology, 174, str. 1487-1494.

Hodgson D. A. (1982) Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. Journal of General Microbiology, 128, str. 2417-2430.

Hojati Z., Milne C., Harvey B., Gordon L. Borg M., Flett F., Wilkinson B., Sidebottom P. J., Rudd B. A. M., Hayess M. A., Smith C. P., Micklefield J. (2002) Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. Chemistry & Biology, 9, str. 1175-1187.

Hopwood D. A. (2007) How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? Molecular Microbiology, 63, str. 937-940.

Hurst L. D., Merchant A. R. (2001) High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 268, str. 493-497.

Huang M., Chen X., Tian H., Sun B., Chen H. (2011) Isolation and identification of antibiotic albaflavenone from *Dictyophora indusiata (Vent:Pers.) Fischer*. Journal of Chemical Research, 35, str. 659-660.

Chemier J. A., Buchholz T. J., Geders T. W., Akey D. L., Rath C. M., Chlipala G. E., Smith J. L., Sherman D. H. (2012) Biochemical and structural characterization of germicidin synthase: analysis of a type III polyketide synthase that employs acyl-ACP as a starter unit donor. Journal of the American Chemical Society, 134, str. 7359-7366.

Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnology; 21, str. 526-531.

Kalan L., Gessner A., Thaker M. N., Waglechner N., Zhu X., Szawiola A., Bechthold A., Wright G. D., Zechel D. L. (2013) A cryptic polyene biosynthetic gene cluster in *Streptomyces calvus* is expressed upon complementation with a functional *bldA* gene. Chemistry & Biology, 20, str. 1199-1200.

Kansoh A. L., Nagieb Z. A. (2004) Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. Antonie van Leeuwenhoek, 85, str. 103-114.

Kelemen G. H., Buttner M. J (1998) Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. Current Opinion in Microbiology, 1, str. 656-662.

Kempter C., Kaiser D., Haag S., Nicholson G., Gnau V., Walk T., Gierling K. H., Decker H., Zahner H., Jung G., Metzger J. W. (1997) CDA:calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues. Angewandte Chemie International English Edition, 36, str. 498-501.

Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. (2000) Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, 613 stran.

Kim B., Sahin N., Minnikin D. E., J. Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M., Goodfellow M. (1999) Classification of thermophilic streptomycetes, including the

description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, str. 7-17.

Kim E. S., Song J. Y., Kim D. W., Chater K. F., Lee J. K. (2008) A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology, 190, str. 7559-7566.

Koressaar T., Remm M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics, 23, str. 1289-1291.

Korn-Wendisch F., Kutzner H. J. (1992): The family *Streptomycetaceae* (The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, str. 921-995.

Kol S., Merlo M. E., Scheltema R. A., de Vries M., Vonk R. J., Kikkert N. A., Dijkhuizen L., Breitling R., Takano E. (2010) Metabolomic characterization of the salt stress response in *Streptomyces coelicolor*. 76, str. 2574-2581.

Labeda D. P. (2011) Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, str. 2525-2531.

Lakey J. H., Lea E. J. A., Rudd B. A. M., Wright H. M., Hopwood D. A. (1983) A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. Journal of General Microbiology, 129, str. 3565-3573.

Lerat S., Simao-Beaunoir A. M., Beaulieu C. (2009) Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. Molecular Plant Pathology, 10, str. 579-585.

Luo Y., Huang H., Liang J., Wang M., Lu L., Shao Z., Cobb R. E., Zhao H. (2013) Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. Nature Communications, 4, str. 2894-2894.

Madigan M. T., Clark D. P., Stahl D., Martinko J. M. (2010) Brock biology of microorganisms, Benjamin Cummings, San Francisco, 1152 str.

Mazza P., Noens E. E., Schirner K., Grantcharova N., Mommaas A. M., Koerten H. K., Muth G., Flardh K., van Wezel G. P., Wohlleben W. (2006) MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. Molecular Microbiology, 60, str. 838-852.

McDermott W., Muschenheim C., F. A. C. P, Hadley S. J., Bunn P. A., Gorman R. V. (1947) Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans. Annals of Internal Medicine, 27, str. 769-822.

Micklefield J. (2009) Biosynthesis and biosynthetic engineering of calcium-dependent lipopeptide antibiotics. Pure and Applied Chemistry, 81, str. 1065-1074.

Miguelez E. M., Martin C., Hardisson C., Manzanal M. B. (1993) Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: tool for the analysis of hyphal growth in liquid cultures. FEMS Microbiology Letters,109, str. 123-129.

Mikulik K., Janda I., Maskova H., Stastna J., Jiranova A. (1977) Macromolecular synthesis accompanying the transition from spores to vegetative forms of *Streptomyces granaticolor*. Folia Microbiologica (Praha), 22, str. 252-261.

Mikulik K., Janda I., Weiser J., Stastna J., Jiranova A. (1984) RNA and ribosomal protein patterns during aerial spore germination in *Streptomyces granaticolor*. European Journal of Biochemistry, 145, str. 381-388.

Mikulik, K., Bobek, J., Bezouskova, S., Benada, O., Kofronova, O. (2002) Expression of proteins and protein kinase activity during germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 299, str. 335-342.

Mo S., Sydor P. K., Corre C., Alhamadsheh M. M., Stanley A. E., Haynes S. W., Song L., Reynolds K. A., Challis G. L. (2008) Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. Chemistry & Biology, 15, str. 137-148.

Moody S. C., Zhao B., Lei L., Nelson D. R., Mullins J. G. L., Waterman M. R., Kelly S. L., Lamb D. C. (2012) Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes. The FEBS Journal, 279, str. 1640-1649.

Mohan S., Dow C, Cole J. A. (1992) Prokaryotic Structure and Function: A New Perspective, Cambridge University Press, Cambridge, 452 stran.

Nodwell J. R., Losick R. (1998) Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology, 180, str. 1334-1337.

Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. Journal of Bacteriology, 190, str. 4050-4060.

Okamoto S., Taguchi T., Ochi K., Ichinose K. (2009) Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the *act* gene cluster. Chemistry & Biology, 16, str. 226-236.

Pawlik K., Kotowska M., Kolesiński P. (2010) *Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 19, str. 147-151.

Petersen F., Zahner H., Metzger J. W., Freund S., Hummel R. P. (1993) Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. Journal of Antibiotics, 46, str. 1126-1138.

Rateb M. E., Hallyburton I., Houssen W. E., Bull A. T., Goodfellow M., Santhanam R., Jaspars M., Ebel R. (2013) Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. Royal Society of Chemistry Advances, 3, str. 14444-14450.

Redenbach M., Kieser H. M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H., Hopwood D. A. (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Molecular Microbiology, 21, str. 77-96.

Rueckert C., Albersmeier A., Busche T., Jaenicke S., Winkler A., Friðjónsson O. H., Hreggviðsson G. Ó., Lambert C., Badcock D., Bernaerts K., Anne J., Economou A., Kalinowski J. (2015) Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24. Journal of Biotechnology, 199, str. 21-22.

Rutherford S. T., Bassler B. L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2, str. 1-25.

San Millán R. M., Martínez-Ballesteros I., Rementeria A., Garaizar J., Bikandi J. (2013) Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. BMC Research Notes, 6:513, str. 1-4.

Scott I. R., Ellar D. J. (1978) Study of calcium dipicolinate release during bacterial spore germination by using a new, sensitive assay for dipicolinate. Journal of Bacteriology, 135, str. 133-137.

Shima J., Hesketh A., Okamoto S., Kawamoto S., Ochi K. (1996) Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that

confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2), Journal of Bacteriology, 178, str. 7276-7284.

Scherr N., Nguyen L. (2009) *Mycobacterium* versus *Streptomyces*-we are different, we are the same. Current Opinion in Microbiology, 12, str. 699-707.

Schneiker S., Perlova P., Kaiser O., Gerth K., Alici1 A., Altmeyer M. O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E., Bode H. B., Bolten C. J., Choudhuri J. V., Doss S., Elnakady Y. A., Frank B., Gaigalat L., Goesmann A, Groeger C., Gross F., Jelsbak L., Jelsbak L., Kalinowski J., Kegler C., Knauber T., Konietzny S., Kopp M., Krause L., Krug D., Linke B., Mahmud T., Martinez-Arias R., McHardy A. C., Merai M., Meyer F., Mormann S., Muñoz-Dorado J., Perez J., Pradella S., Rachid S., Raddatz G., Rosenau F., Rückert C., Sasse F., Scharfe M., Schuster S. C., Suen G., Treuner-Lange A., Velicer G. J., Vorhölter F.-J., Weissman K. J., Welch R. D., Wenzel S. C., Whitworth D. E., Wilhelm S., Wittmann C., Blöcker H., Pühler A., Müller R. (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. Nature Biotechnology, 25, str. 1281-1289.

Seipke R. F., Kaltenpoth M., Hutchings M. (2011) *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? FEMS Microbiology Reviews, 36, str. 862-876.

Sello J. K., Buttner M. J. (2008) The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation. Journal of Bacteriology, 190, str. 4079-4083.

Stastna J. (1977) A. method of rapid wetting and synchronous germination of streptomycete spores. Folia Microbiologica (Praha), 22, str. 137-138.

Stewart G. S., Johnstone K., Hagelberg E., Ellar D. J. (1981) Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. Biochemical Journal, 198, str. 101-106.

Stöcker F. W., Dietrich G. (1986) Brockhaus abc – Biologie, A. Brockhaus Verlag, Leipzig, 836 str.

Strakova E., Bobek J., Zikova A., Rehulka P., Benada O., Rehulkova H., Kofronova O., Vohradsky J. (2013a) Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. PLoS ONE, 8, DOI 10.1371/journal.pone.0072842.

Strakova E., Bobek J., Zikova A., Rehulka P., Benada O., Rehulkova H., Kofronova O., Vohradsky J. (2013b) Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. Journal of Proteome Research, 12, str. 525-536.

Strakova E., Zikova A., Vohradsky J. (2014) Inference of sigma factor controlled networks by using numerical modeling applied to microarray time series data of the germinating prokaryote. Nucleic Acid Research, 42, str. 748-763.

Šilhánková L. (2008) Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Nakladatelství Academia, Praha, 364 str.

Takano E., Chakraburtty R., Nihira T., Yamada Y., Bibb M. J. (2001) A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Molecular Microbiology, 41, str. 1015-1028.

Tanaka Y., Kasahara K., Hirose Y., Murakami K., Kugimyia R., Ochi Kozo (2013) Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. Journal of Bacteriology, 195, str. 2959-2970.

Tian X. P., Long L. J., Wang F. Z., Xu Y., Li J., Zhang C. S., Zhang S., Li W. J. (2012) *Streptomyces nanhaiensis* sp. nov., a marine streptomycete isolated from a deep-sea sediment. 62, str. 864-868.

Traxler M. F., Seyedsayamdost M. R., Clardy J., Kolter R. (2012) Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. Molecular Microbiology, 86, str. 628-644.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, str. 2474-2478.

Tsao S.-W., Rudd B. A. M., He X.-G., Chang C.- J., Floss H. G. (1985) Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. Journal of Antibiotics, 38, str. 128-131.

van Keulen G., Dyson P. J. (2014) Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Advances in Applied Microbiology, 89, str. 217-266.

Waksman S. A., Reilly H. C., Johnstone (1946) Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. Journal of Bacteriology, 52, str. 393-397.

Wibberg D., Al-Dilaimi A., Busche T., Wedderhoff I., Schrempf H., Kalinowksi J., Ortiz de Orue L. D. (2016) Complete genome sequence of *Streptomyces reticuli* an efficient degrader of crystalline cellulose. Journal of Biotechnology, 222, str. 13-14.

Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research, 40, e115, str. 2-12.

Yu T. W., Shen Y. M., McDaniel R., Floss H. G., Khosla C., Hopwood D. A., Moore B. S. (1998) Engineered biosynthesis of novel polyketides from *Streptomyces* spore pigment polyketide synthases. Journal of the American Chemical Society, 120, str. 7749-7759.

Zhao B., Lin X., Lei L., Lamb D. C., Kelly S. L., Waterman M. R., Cane D. E. (2008) Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Biological Chemistry, 283, str. 8183-8189.

StrepDB – The *Streptomyces* Annotation Server [online]. Poslední aktualizace 31. 7. 2016 [7. 8. 2016]. Dostupné z: http://strepdb.streptomyces.org.uk.