

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta, Katedra biologie ekosystémů



BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

Změny celulárních mastných kyselin půdních aktinobakterií
produkcujících antibiotika

Ivana Lipenská 2010

Vedoucí práce: RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.

České Budějovice, 2010

LIPENSKÁ, I., 2010, Změny celulárních mastných kyslinn půdních aktinobakterií produkujících antibiotika [Changes of cellular fatty acids of soil Actinobacteria producing antibiotics, Bc. Thesis, In Czech], Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotation

Changes of cellular fatty acids in membrane of Actinobacteria. Changes of fatty acids are significant biomarkers of changing conditions of surroundings. This can also indicate production of antibiotics along with production of atypical fatty acids.

Klíčová slova: Cytoplazmatická membrána, Fosfolipidické mastné kyseliny, Streptomyces, Polyketidová antibiotika

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30. dubna 2010

.....

Poděkování

Děkuji především vedoucí své práce Dr. Daně Elhottové za odborné vedení, přínosné rady a trpělivost při řešení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za veškerou podporu během studia.

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Cytoplazmatická membrána.....	2
3. Mastné kyseliny.....	4
3.1 Mastné kyseliny - taxonomické markery	7
3.2 Mastné kyseliny - ekofyziologické markery	7
4. Buněčný růst a sekundární metabolismus.....	8
4.1 Actinobacteria – producenti antibiotik.....	9
4.2 Polyketidová antibiotika.....	10
5. Závěr.....	12
6. Použitá literatura.....	13

Seznam zkratk

CPM – cytoplasmatická membrána

MK – mastná kyselina

FAME – fatty acid methyl ester

MS – mass spectrum

U/S MK– unsaturated/saturated (nenasycené/nasycené mastné kyseliny)

GC – gas chromatography

SLB – signature lipid biomarkers

CHC – cyklohexanokarboxylová kyselina

PKSs – polyketidová syntáza

CHC-CoA – Aktivovaný KoenzymA CHC

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

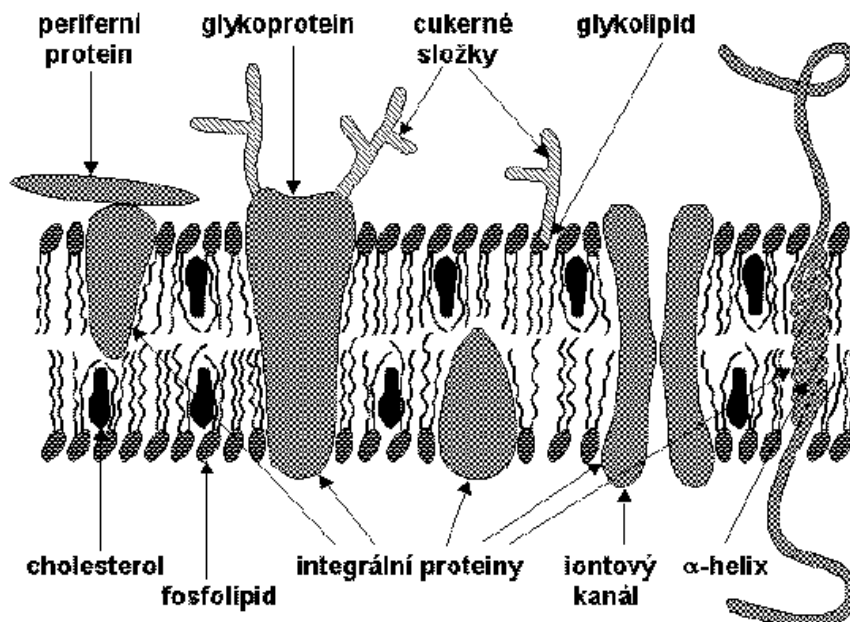
FASII – Syntháza MK typ II

1. Úvod

Je obecně známým faktem, že bakteriální buňka reaguje na okolní prostředí a podmínky v něm změnami růstových charakteristik. K významným strukturním a funkčním změnám dochází také v cytoplazmatické membráně. Membránové mastné kyseliny jsou považovány za významný buněčný marker fyziologických změn buňky a citlivý bioindikátor změn prostředí. Poměrně málo prostudované jsou změny mastných kyselin ve vazbě na schopnost bakteriální buňky produkovat látky s antibiotickou aktivitou. Mastné kyseliny hrají významnou úlohu při syntéze tzv. polyketidových antibiotik, jejichž významnými producenty jsou půdní aktinobakterie r. *Streptomyces*. Tato práce přináší přehled o roli membránových mastných kyselin v buňce, využití membránových mastných kyselin jako významného taxonomického markeru i markeru vhodného pro sledování fyziologických změn buňky s aplikačním využitím v biotechnologii a environmentální mikrobiologii. Tato práce je úvodem ke studii sledující změny mastných kyselin u typového produkční kmene *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*, produkujícího antibiotikum asukamycin, v závislosti na růstové fázi a produkci antibiotika. Zmíněná studie je řešena v rámci samostatného projektu autorky, podporovaného z projektů MŠMT (Centra environmentální mikrobiologie LC06066 a Identifikace a izolace nových sekundárních metabolitů aktinomycet s protizánětlivými a anti-apoptotickými účinky, reg. č. 2B06154) a bude odevzdána samostatně.

2. Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána (CPM) je klíčová struktura buňky, která umožňuje vytvářet stálé vnitřní prostředí nezbytné pro její přežití. CPM plní tři hlavní funkce – (i) permeabilní bariéra, (ii) proteinová kotva, tzn. že váže bílkoviny schopné transportovat ionty, živiny a produkty metabolismu nebo bílkoviny zajišťující komunikaci buňky s okolím a (iii) energetická zásobárna. Zásobou energie je zde „nabitost membrány“, nazývá se protonmotivní síla (PMF) a je zodpovědná za řízení mnoha procesů v buňce. CPM zajišťuje selektivní propustnost pro různé typy procházejících látek a částic. Zabraňuje prosakování částic cytoplazmy ven z buňky, umožňuje průchod živin dovnitř a ven z buňky a akumulaci potřebných látek uvnitř buňky. V případě jednobuněčných organismů jako jsou bakterie nabývá její funkce bariéry mezi vnitřním a vnějším prostředím na významu. Bakteriální CPM flexibilně reaguje na změny vnějšího prostředí svým složením tak, aby byla zajištěna její stabilní pevnost a výše zmíněné funkce. Funkční vlastnosti CPM jsou dány jejím strukturním uspořádáním (Obr 1). Základem každé membrány je fosfolipidová dvojvrstva (Obr. 2), v níž jsou zakotveny proteiny. Na lipidy se na vnější straně membrány váží sacharidy ve formě glykolipidů nebo se váží na proteiny ve formě glykoproteinů a proteoglykanů (Klouda, 2005).



Obr. 1 Složení a struktura membrány (Shinitzky, 1984)

Proteiny se podle umístění v membráně dělí na integrální, periferní a transmembránové. Tyto proteiny mají různé funkce – strukturní, transportní, enzymovou a receptorovou. U některých bakterií bylo prokázáno, že některé membránové proteiny se chovají jako enzymy, které na místě syntetizují membránové lipidy. Na lipidy se na vnější straně membrány váží sacharidy ve formě glykolipidů nebo se váží na proteiny ve formě glykoproteinů a proteoglykanů (Klouda, 2005). **Celá tato pohyblivá, multifunkční struktura je nazývána „Model tekuté mozaiky“ (Singer a Nicolson, 1972)**

Fosfolipidy

Fosfolipidy patří do skupiny látek nerozpustných ve vodě (Madigan a Martinko 2006). Lipidy se dvěma uhlíkovými řetězci (fosfoacylglyceroly a sfingolipidy) vytvářejí dvojnou vrstvu namířené hydrofobními řetězci proti sobě (Obr. 2) (Klouda, 2005).

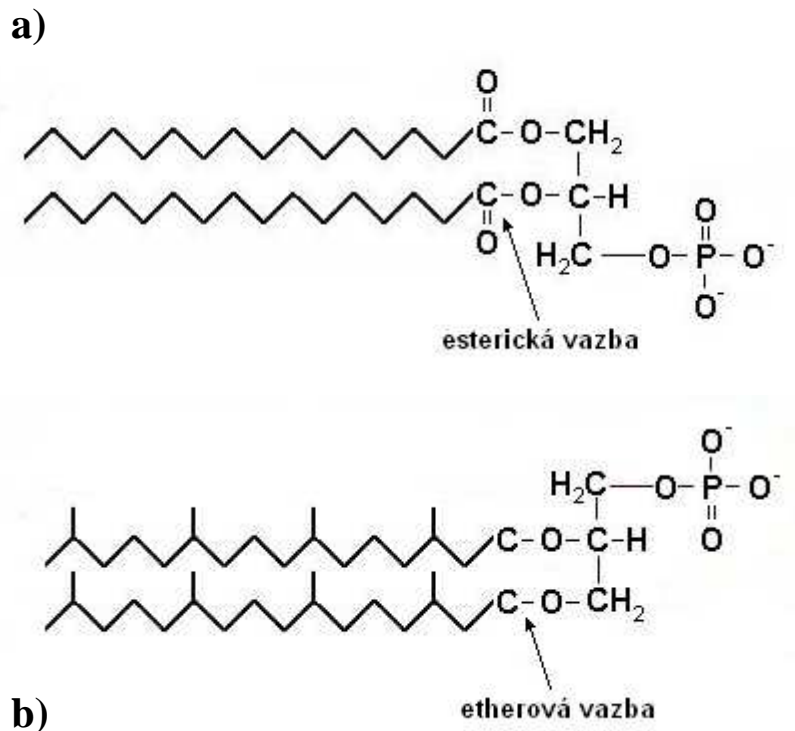


Obr. 2 Fosfolipidová dvojvrstva (Science Aid, 2009)

Hydrofilní konce fosfolipidových řetězců směřují ven a interagují s prostředím a s buněčnou cytoplazmou a uvnitř membrány jsou naopak hydrofobní konce řetězců. Celá struktura je velmi pevná. Přispívají k tomu i vodíkové vazby a hydrofobní interakce uvnitř celé struktury. I některé kationty (Mg^{2+} , Ca^{2+}) pomáhají stabilizovat membránu.

Hydrofobní část fosfolipidu nazýváme „ocas“ a tvoří ji uhlíkové řetězce mastných kyselin (MK) nebo tzv. izoprenoidní jednotky navázané na glycerol, popřípadě sfingozin. Na glycerol jsou tyto uhlíkaté řetězce vázány buď estericky, jako je tomu u většiny organismů nebo pomocí etherové vazby, v případě archeí (Obr. 3) (Madigan a Martinko 2006). Etherovou vazbou mohou být mastné kyseliny vázány v molekule sfingolipidů, popřípadě plasmalogenů, které jsou důležitou složkou membrán extrémofilních a anaerobních mikroorganismů (Zelles, 1999). Hydrofilní konce fosfolipidových řetězců směřují ven a interagují s prostředím a s buněčnou cytoplazmou. Tato hydrofilní část neboli „hlava“ se skládá z kyseliny fosforečné. Fosfolipidy mají tedy tzv. amfipatický charakter (Prescott et al., 1998). Fosfolipidy jsou v membráně k sobě vázány hlavně hydrofobickým efektem a Van der Waalsovými silami, takže jednotlivé části tohoto komplexu jsou více či méně vůči sobě pohyblivé. V membránách archeí se na rozdíl od zbytku prokaryot nevyskytují hopanoidy, které by membránu zpevňovaly. Přesto membrána archeí patří mezi nejodolnější bariéry chránící buňku. Jak již bylo zmíněno, namísto mastných kyselin jsou boční řetězce sestaveny z opakujících se jednotek pěti uhlíkatého uhlovodíkového isoprenu. Isopreny jsou větvené a stabilnější za vyšších teplot. Také etherová vazba, kterou jsou vázány ke glycerolu, je odolnější než vazba esterová. Odolnost membrány může být dále zesílena uspořádáním

glycerolových etherů do tzv. tetraetherů, tvořících jednu fosfolipidovou vrstvu narušují od klasického uspořádání do fosfolipidové dvojvrstvy. Stablnější struktura membrány pomáhá archeím přežít extrémní podmínky prostředí jako je vysoká teplota nebo extrémní hodnoty pH (Madigan a Martinko 2006).



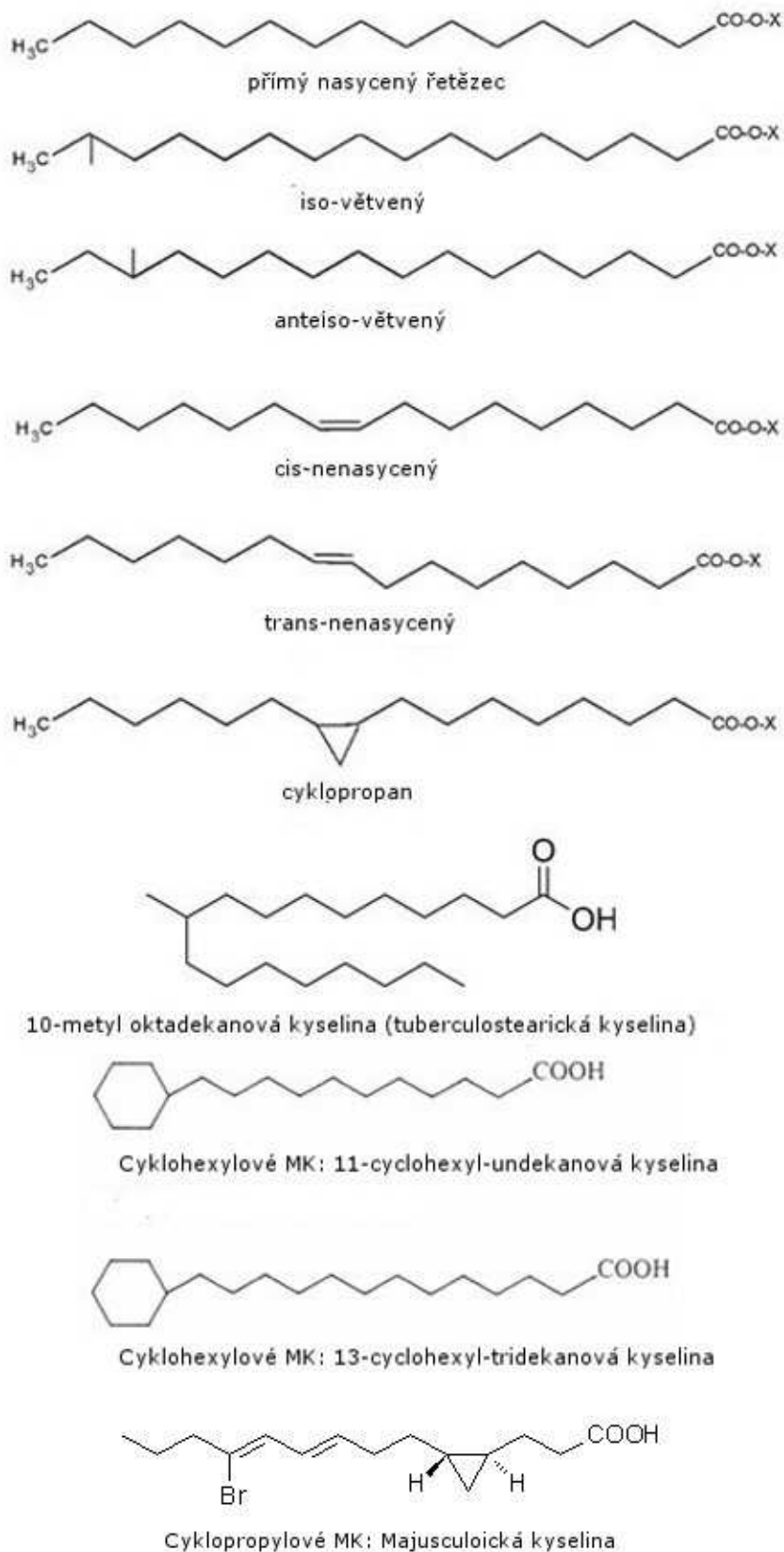
Obr. 3 Struktura fosfolipidu – esterová (většina organismů) a etherová vazba (*Archeae*) (Madigan a Martinko, 2006)

a) Obecný membránový fosfolipid bakterií a eukaryot; **b)** Obecný membránový etherlipid archeí, označena je etherová vazba mezi izoprenoidními řetězci a L-glycerolem; šipkou je označena esterická vazba mezi postranními řetězci mastných kyselin a D-glycerolem

3. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) popř. izoprenoidní řetězce membránových lipidů jsou esenciální součástí každé buňky. Kvantitativní zastoupení a kvalitativní skladba jednotlivých mastných kyselin v různých organizmech je charakteristická pro každý druh a rod (Madigan a Martinko 2006; Řezanka a Sigler, 2009). Vysoká strukturní diverzita MK a jejich charakteristika spočívá (i) v délce uhlíkatého řetězce, která se pohybuje nejčastěji v rozmezí 12-22 uhlíkových atomů C, s minimem 8 C; (ii) Počet a pozice dvojných vazeb patří k další významné charakteristice MK. Nasycené mastné kyseliny neobsahují žádnou dvojnou vazbu.

Mononenasyčené mastné kyseliny obsahují ve svém řetězci jednu dvojnou vazbu, a mohou mít konfiguraci cis nebo trans (Obr. 4), běžnější je výskyt cis konfigurace MK (Gustone, 2007). Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) mají ve svém řetězci víc než jednu dvojnou vazbu. Počet a pozice dvojných vazeb je druhově specifická. PUFA jsou typické pro eukaryotní organizmy; (iii) Dalším charakteristickým znakem je větvení MK. Větvené mastné kyseliny se vyskytují hlavně u bakterií (Koolman a Roehm, 2005). Existují ale i případy, kdy jsou tyto kyseliny nalezeny u rostlin a zvířat. Poprvé byly větvené mastné kyseliny objeveny jako hlavní konstituent v bakterii *Bacillus subtilis* (Kaneda, 1963). Je známo několik typů větvení. Iso větvení znamená, že metylová skupina je na předposledním uhlíkovém atomu (Obr. 4). U anteiso větvených kyselin je metylová skupina na třetím atomu uhlíku od konce (Obr. 4). Dalším typem je větvení 10-metyl, kdy je metylová skupina na desátém atomu uhlíku. (Obr. 4) 10-metyl oktadekanová (tuberkulostearická kyselina) a 10-metyl nonadekanová kyselina (phytomonická kyselina) se vyskytuje hlavně u bakterií rodu *Mycobacterium*. U multimetylového větvení se objevuje hned několik metylových skupin a to vždy na sudém atomu uhlíku od konce. Toto větvení bylo nalezeno například u rodu *Bacillus* (Carballeira et al., 2001). Řetězce mastných kyselin mohou obsahovat i další funkční skupiny jako epoxy-, hydroxy- a keto skupiny nebo dokonce i cyklické struktury (cyclopropan, cyclopropen, cyclopenten, furan a cyclohexyl). Cyklopropylové větvení (Obr. 4) je velmi běžné jak pro gram-negativní, tak některé anaerobní gram-pozitivních bakterie. Cyklohexylové skupiny jsou typické pro MK termofilních bakterií, ale hrají významnou roli i u producentů některých polyketidových antibiotik (Hu a Floss, 2006). Nejběžnější cyklohexylové kyseliny jsou 11-cyclohexyl-undekanová kyselina a 13-cyclohexyl-tridekanová kyselina (Kawaguchi et al., 1986) (Obr. 4).



Obr. 4 Základní strukturální typy mastných kyselin. (MacMillan a Molinski, 2005; Kawaguchi, 1986; Denich, 2003)

3.1 Mastné kyseliny – taxonomické biomarkery

Za optimálních podmínek má každý mikrobiální druh specifické a unikátní složení MK, čehož se využívá v taxonomii kultivovatelných mikroorganismů. Popis každého nově popsaného mikrobiálního druhu musí obsahovat i charakteristický profil MK (Zelles, 1999).

Profily MK proto mohou být základem pro identifikaci neznámých mikrobiálních izolátů, k čemuž se používá metoda MIS Sherlock System (MIDI-Inc., USA). Podmínkou pro druhovou identifikaci je, aby kultura byla v optimální fázi růstu, protože v závislosti na fázi růstu mění skladbu a poměr membránových MK (Saser, 2001).

MK specifické pro určitou skupinu mikroorganismů mohou být použity jako buněčný marker pro detekci dané skupiny mikroorganismů v prostředí bez nutnosti danou skupinu mikroorganismů z prostředí izolovat (Zelles, 1999a). Pro aktinomycety jsou charakteristické 10-methyl větvené MK, 10Me16:0; 10Me17:0 a 10Me18:0 (Brennan, 1998; Kroppenstedt, 1985).

3.2 Mastné kyseliny – ekofyziologické biomarkery

Struktura MK je významná také pro funkčnost CPM. Kvalitativní a kvantitativní zastoupení MK významně ovlivňuje vlastnosti CPM, jako je její fluidita. Je žádoucí, aby si membrána zachovala stabilní (funkční) fluiditu i při měnících se vnitřních (např. stáří buňky) a vnějších podmínkách (např. teplota, dostupnost vody, živin, tlak, pH, toxické látky) (Madigan a Martinko 2006). Buňka dokáže upravovat složení mastných kyselin v závislosti na změnách podmínek prostředí a regulovat tak fluiditu membrány v procesu tzv. homeoviskózní adaptace (Gustone, 2007).

Mezi nejvíce prostudované změny membránových MK v závislosti na změně prostředí je adaptace na změnu okolní teploty (Piotrowska-Seget a Mrozek, 2003). U bakterií k tomuto adaptačním mechanismu přispívá hlavně změna v zastoupení iso a anteiso větvených mastných kyselin (Konings, 2006; Horikoshi a Grant, 1998). Pokusy na *Bacillus subtilis* (modelová gram-pozitivní bakterie) ukázaly dva mechanismy přizpůsobení membrány vnějším podmínkám za prvé tím, že se s nárůstem teploty zvýšil podíl anteiso větvených mastných kyselin (hlavně anteiso 15:0 a anteiso 17:0) a za druhé se řetězce mastných kyselin ve velké míře desaturovaly (Konopásek et al., 2000). Zvýšený podíl nenasycených kyselin nebo také kyselin s kratším postranním řetězcem je typickým mechanismem, jak eukaryotní buňky zvyšují tekutost CPM. V membráně psychrofilních bakterií najdeme větší podíl nenasycených mastných kyselin, což činí jejich membrány v nižších teplotách tekutější a tím pádem stále funkční a u termofilních naopak více nasycených kyselin, což jim zajišťuje větší

pevnost (Konopásek et al., 2000). U bakterie *Listeria monocytogenes* například dochází k adaptaci na nízkou teplotu. Dochází zde ke zkrácení délky řetězce mastných kyselin a změně větvení z iso na anteiso (především na anteiso 15:0) (Annous et al., 1997). *Streptococcus thermophilus* se dokáže adaptovat na nízkou teplotu tím, že změní podíl nenasycených/nasycených mastných kyselin tím, že se hromadí množství vaccenické kyseliny (nenasycená MK) a zvyšuje se množství cyklických derivátů (Beal et al., 2001).

Dalším vnějším faktorem, na který reaguje buňka změnou MK je okolní tlak. Bylo zjištěno, že pod velkým tlakem hluboko v oceánech roste v membráně gram negativní bakterie rodu *Moritella* podíl nenasycených mastných kyselin (Madigan a Martinko 2006) *Rodococcus rodochrous* mění zastoupení nenasycených MK (n:1), když se v okolí zvýší teplota a salinita (Pucci a Pucci, 2004). *Listeria monocytogenes* se například zase adaptuje na kyselé prostředí zvýšením podílu nasycených MK s přímými 14ti a 16ti uhlíkovými řetězci a naopak dochází k redukci množství 18:0 (Cotter et al., 2003). U bakterie *Arthrobacter globiformis* dochází vlivem hladovění ke změně délky řetězců, indikované poměrem a15:0/a17:0 a 16:0/18:0 (Kieft, 1997).

Kvalitativní i kvantitativní změny MK v CPM mohou poskytnout informace o míře a druhu stresu, na který buňka reaguje. Této skutečnosti lze využít při fyziologických i environmentálních studiích.

4. Buněčný růst a sekundární metabolismus

Jelikož jsou mastné kyseliny nezbytnou součástí každé buňky, dochází ke změnám jejich složení a poměru v průběhu života buňky i ve fázích bakteriální populace.

Při statické kultivaci bakteriální populace, kdy dochází k postupnému vyčerpání živin, se rozlišují fáze klidová (Lag), exponenciální (Log, Exponential), stacionární (Stationary) a fáze odumírání (Death). Klidová fáze je fáze enzymatické přípravy na růst, syntézy enzymů, RNA a dalších molekul. Při exponenciální fázi se bakterie intenzivně, exponenciálně množí až do vyčerpání živin. Stacionární fáze znamená zpomalení rychlosti množení až do bodu rovnováhy, akumulaci toxických produktů a vyčerpání živného media. Při fázi odumírání je více odumřelých než nových buněk a tvoří se klidová stadia (Rosypal, 2003). Zároveň s tím se vyvíjí i jednotlivé bakterie.

V životním cyklu buňky v populaci rozlišujeme 4 fáze: fázi G1 neboli primární růstovou fázi, kdy se rozbíhají intenzivní syntetické procesy, S-fázi, kdy probíhá DNA replikace, G2 fázi, při níž kondenzují chromosomy a dochází k replikaci buněčných organel a

poslední fázi před úplným rozdělením buňky a to M-fázi. Při této fázi probíhá mitóza (rozdělení jader). Poté se buňka rozdělí a vzniknou dceřiné buňky (Mitchison, 1971). V každé fázi, jak v celé populaci, tak i v životě jedné bakterie dochází ke změně vnitřního složení látek. Čím je buňka starší, tím je její CPM pevnější (Nagy, 1979) a dochází také ke změně MK (Saser, 2001).

Na konci primární růstové fáze (G1 fáze) a ve stacionární fázi vznikají jako metabolický exkret sekundární metabolity bakterií. Tyto metabolity se nazývají sekundární, protože nejsou nezbytné pro exponenciální růst populace (Martin a Demain, 1980). Mezi jedny z nejvýznamnějších sekundárních metabolitů patří antibiotika. Antibiotika nejsou nezbytná pro růst a reprodukci bakterie, ale dokáží inhibovat či zabít ostatní organismy. Tvoří tak velkou výhodu v boji proti konkurenčním organismům s nimiž soutěží o zdroje. Velmi často je přijímán zjednodušený názor, že se vytvářejí při jednorázové kultivaci až po ukončení růstové fáze. Přesněji se vytvářejí už v tzv. růstové fázi (trofofáze), kde probíhá především primární metabolismus (organické kyseliny, etanol, aminokyseliny atd.). Poté se tvoří v produkční fázi (idiofáze) z intermediátů či koncových produktů primárního metabolismu (Buřlock et al, 1975). Vznikají v mnohem menší variabilitě než produkty primárního metabolismu, neboť nepotřebují být tolik specifické a případné chyby přímo neohrozí život samotné buňky (Martin a Demain, 1980). U mikroorganismů s rozvinutým sekundárním metabolismem jako je rod *Streptomyces*, je diferenciací a tvorba sekundárních metabolitů řízena tzv. A-faktorem (C13 –butyrolakton), který má roli podobnou hormonu (Horinouchi a Beppu, 1994). Sekvenování genomu *S. coelicolor*, jednoho z nejvýznamnějších producentů antibiotik, ukázalo, že do tvorby antibiotik zasahuje řada regulačních genů, které jsou pravděpodobně zapojeny i ve stresových a adaptačních reakcích včetně adaptace fluidity membrány skrze MK (Bentley et al., 2002).

4.1 Actinobacteria - producenti antibiotik

Vedle významných houbových producentů (*Penicilium* či *Aspergillus*) antibiotika produkují především bakterie. Nejvýznamnější z bakteriálních producentů patří do řádu *Actinomycetales* (kmen *Actinobacteria*).

Aktinobakterie jsou známy pro tvorbu sekundárních metabolitů. Mnoho kmenů produkuje jedno nebo více antibiotik. V roce 1940 objevil Selman Waksman a jeho spolupracovník H. B. Woodruff *aktinomycin* – první antibiotikum mající protirakovinné účinky (Waksman a Woodruff, 1940).

Až 2/3 antibiotik, které se používají ve farmacii, produkuje druh *Streptomyces*. Jsou to aerobní bakterie tvořící velmi rozvětvené substrátové mycelium, které se jen zřídka rozpadá. Jsou hojně rozšířeny na suchozemských lokalitách (stanovištích), především v půdě. Pouze několik druhů je pro živočichy (včetně člověka) a rostliny patogenní. *Streptomyces* jsou největší skupinou z čeledi *Streptomycetaceae*, zároveň mají i největší farmakologický potenciál. (Watve et al., 2001)

Streptomycety mají unikátní buněčnou morfologii, buněčný cyklus a vyrábí širokou škálu antibiotik (Watve et al., 2001). V roce 1943 byl z toho druhu bakterií například objeven *streptomycin*, antibiotikum izolované ze *Streptomyces griseus*. Na tomto kmeni intenzivně pracoval Selman Waksman a jeho skupina a právě za tento objev byl oceněn Nobelovou cenou, neboť *streptomycin* byla první účinná látka v boji proti tuberkulóze (Nobel Web AB, 2010; Schatz, 1994; D'Arcy Hart, 1999).

Bohužel ale tento rod není ani zdaleka dostatečně prozkoumán i přesto, že se jím vědci zabývají již více než 60 let. Po intenzivním screeningu vzniklo nepřehledné množství samostatných druhů a dnešní taxonomie je velmi složitá (Trejo, 1970).

Skladba mastných kyselin r. *Streptomyces* je typická tak jako většina gram pozitivních bakterií větvenými mastnými kyselinami, její MK profily však neobsahují mastné kyseliny s větvením uprostřed řetězce, které je charakteristické pro většinu aktinomycét (Hofheinz a Grisebac, 1965; Lechevalier, 1977, Saddler et al., 1986; Saddler et al., 1987).

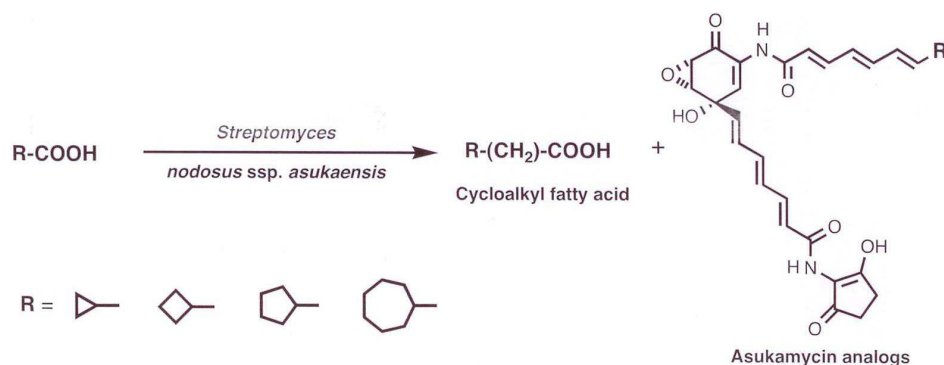
Skladba mastných kyselin hraje významnou roli u těchto bakterií také v souvislosti s jejich schopnostmi produkovat antibiotika. Porovnání MK kmenů *S. hygroscopicus* s různou produkcí antibiotik ukázalo zvýšené množství terminálně větvených a zvláště anteiso větvených MK u vysoce produkčních kmenů. Podle dalších studií toto složení ovlivňuje propustnost membrány a také tvorbu antibiotik, navíc zvýšené množství anteiso-větvených MK může určit převládající tvorbu antibiotika (Arima et al., 1973; Vančura et al., 1987.). Zvláště významnou roli hrají mastné kyseliny u producentů polyketidových antibiotik (Hu a Floss, 2006).

4.2 Polyketidová antibiotika

Polyketidy jsou sekundární metabolity, včetně látek s antibiotickými účinky vyskytující se v bakteriích, houbách, rostlinách i živočiších (Hertweck et al., 2007). Významnými producenty polyketidových antibiotik jsou půdní aktinomycéty a především rod *Streptomyces* (O'Hagen;1993; Hopwood a Sherman, 1990). Polyketidová antibiotika zahrnují široké spektrum antifungicidních, antibakteriálních, antikancerogenních, antivirálních,

antitumorových látek (O'Hagen, 1993). Mezi nejznámější polyketidová antibiotika patří například tetracyklin, erytromycin A, neomycin, streptomycin, daunorubicin, dexorubicin a asukamycin. (Obr.5) (Stutzman-Engwall a Hutchinson, 1989; Hu a Floss, 2006). Zároveň se jedná o skupinu s vysokým potenciálem pro objevení nových účinných látek.

Polyketidy jsou syntetizovány pomocí polyketidové syntázy (PKSs) dekarboxylativní kondenzací malonylových jednotek s následnou cyklizací. Metabolické dráhy syntézy MK a zvláště aromatických polyketidů (anthracyklinů) totiž mají mnoho společného. Požívají totiž stejné domény a podobný mechanismus k syntéze sekundárních metabolitů. Polyketidové syntázy se také nazývají PKSs typu II právě díky své podobnosti se syntázou MK typu II (FASII). Tento typ syntázy MK se nachází ve většině bakterií. Klíčovým prvkem je zde protein ACP, který přenáší hydrofobní zbytky MK od jednoho enzymu k druhému. (O'Hagen, 1993; Smith a Sherman, 2008; Shen, 2000; , Hertweck, 2007; Moore a Hertweck, 2002; Marrakchi, 2002). Mezi základní stavební kameny polyketidových antibiotik patří cyklické MK (Obr.5), například deriváty kyseliny cyklohexanokarboxylové (CHC). Streptomycety používají CHC-CoA jako výchozí látku pro výrobu ω -cyklohexylových MK (Cropp et al., 2000; , Stutzman-Engwall a Hutchinson, 1989; Hu a Floss, 2006). Tyto ω -cyklohexylové MK jsou zároveň součástí membránových lipidů producentské buňky.



Obr. 5 Využití cyklických mastných kyselin jako stavební jednotky asukamycinového antibiotika (Hu a Floss, 2006)

Právě analýza MK zaměřená na detekci MK se specifickým cyklickým větvením může indikovat, jestli zkoumaná kultura má polyketidovou biosyntetickou cestu (Moore, 1993).

5. Závěr

Jelikož analýza MK je relativně jednoduchá metoda běžně používaná k identifikaci neznámých izolátů z prostředí, je velmi perspektivní při vyhledávání producentů nových antibiotik v prostředí, zejména v půdě. Je velmi důležité vyhledávat nové producenty a rozvíjet metody k jejich rozpoznávání. V současné době narůstá potřeba se poohlížet po nových látkách s antibiotickými účinky.

S tím, jak se začala antibiotika hojně používat nejen v lékařství, ale běžně i v zemědělství, zejména chovu hospodářských zvířat, vzrostla rapidně sekundární rezistence dosud citlivých škodlivých bakterií. Významným faktorem je zde selekční tlak v prostředí způsobený nadměrným používáním antimikrobiálních látek. To by mohlo v budoucnu způsobit nejen nekontrolovatelně se šířící epidemie mezi hospodářskými zvířaty a tím i značný negativní dopad na ekonomiku, ale je to také hrozba pro zdravotní stav celé lidské populace. Zároveň to ohrožuje vývoj moderní medicíny (Kolář et al., 2002; WHO, 2000; Commission of the European Communities, 2001).

V 80. letech minulého století došlo k výraznému nárůstu rezistence díky propagaci antibiotik (ATB) jakožto neúčinnější zbraně proti infekcím. Zároveň s tím ale bylo pátrání po nových ATB velmi omezeno (Nouza a Nouza, 1999).

Alarmující nárůst patogenních multirezistentních mikroorganismů v posledním desetiletí vedl k řadě významných opatření. V zemích Evropské unie, včetně České republiky bylo přidávání antibiotik do krmiv za účelem stimulace růstu zvířat od 1.1. 2006 zakázáno. Spotřeba antibiotik v EU se každoročně sleduje (Marková, 2007).

Je potřeba důsledně předcházet problémům spojených s rezistencí bakterií, ale ATB stále budou nedílnou součástí léčebných postupů a rezistence bakterií bude problémem i nadále a je proto vhodné se zaměřit nejen na jejich správné používání, ale i na jejich další vývoj, vyhledávání nových producentů a rozvíjení metod k jejich rozpoznávání.

6. Použitá literatura

- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J. 1997. Critical Role of Anteiso-C15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3887–3894.
- Arima, K. Okazaki, H., Hono, H., Jamada, K. and Beppu, T. 1973. Effect of exogenous fatty acids on the cellular fatty acid composition and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 2313–2317.
- Beal, C., Fonseca, F., Corrieu, G. 2001. Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* Is Related to Membrane Fatty Acid Composition, *Am. Dairy Sci. Assoc.*, 84: 2347-2356.
- Bentley, S.D., Chater, K. F., Cerden˜ o-Ta´ rraga, 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. C. Chen W. §, Collins, M. Cronin, A. Fraser, A. Goble, A. Hidalgo, J. Hornsby, T. Howarth, S. Huang §, C.-H. Kieser T., . Larke L, Murphy, L. Oliver, K. O’Neil S., Rabinowitsch, 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: 141-147.
- Brennan, P.J. 1998. Mycobacterium and other actinomycetes. In: Ratledge C., Wilkinson S.G. (eds) *Microbial lipids*. London: *Academic Press*, 1: 204–298.
- Bu´Lock, J.D., Hamilton, D., Hulme, M.A., Powell, A.J., Smalley, H.M., Shepherd, D., Smith, G.N. 1965. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. *Can. J. Microbiol.*, 11: 765-778.
- Carballeira, N.M., Miranda, C., Lozano, C.M., Nechev, J.T., Ivanova, A., Stefanov, K., Ilieva, M., Tzvetkova, I. 2001. Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. *J. Nat. Prod.*, 64: 256-259.

- Communication from the Commission on a community strategy against antimicrobial resistance. 20.6.2001. Commission of the European Communities. Brussels.
- Cotter, P. D., Hill, C., 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH, *Microbiol. Molec. Rev.*, 67: 429-453.
- Cropp, T.A., Wilson, D.J., Reynolds, K.A. 2000. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA bioynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat. Biotechnol.*, 18: 980-983.
- D'Arcy Hart P. 1999. A change in scientific approach: from alternation to randomised allocation in clinical trials in the 1940s. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 319: 572–3.
- Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Meth.*, 52: 149-182. (Obrázek dodatečně upraven).
- Gustone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. 2007. *The Lipid Handbook*, 3rd ed. Chapman & Hall, New York, 1472 p.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A. 2007. Type II polyketide synthases: Gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 162–190.
- Hofheinz, W., Grisebach, H. 1965. Die Fettsäuren von *Streptomyces erythreus* and *Streptomyces halstedii*. *Z. Naturforsch.*, 20B: 43.
- Hopwood, D.A., Sherman, D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 37-66.
- Horikoshi, K., Grant, W.D. 1998. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. Wiley-Liss Inc. New York, 322p.

- Horinouchi, S., Beppu, T. 1994. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.*, 12: 859–864.
- Hu, Y. D., Floss, H. G. 2006. Starter unit specificity of the asukamycin "upper" chain polyketide synthase and the branched-chain fatty acid synthase of *Streptomyces nodosus* subsp *asukaensis*. *Heterocycles*, 69: 133-149.
- Kaneda, T. 1963. Biosynthesis of Branched Chain Fatty Acids: I. Isolation and Identification of Fatty Acids from *Bacillus Subtilis* (ATCC 7059) . *J. Biol. Chem.*, 238: 1222-1228.
- Kawaguchi, A., Uemura, N., Okuda, S. 1986. Characterization of the Fatty Acid Synthetase System of *Curtobacterium pusillum*. *J. Biochem.*, 99: 1735-1742. (Obrázek dodatečně upraven.)
- Kieft, T.K., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., White, D.C. Apr 1997. Survival and Phospholipid Fatty Acid Profiles of Surface and Subsurface Bacteria in Natural Sediment Microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1531-1542.
- Kolář, M, Látal, T, Čermák, P. 2002. *Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby*. Trios, Praha, 110p.
- Konings, WN. 2006. Microbial transport: Adaptation to natural environments. Antonie, van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 90: 325-342.
- Konopásek, I., Strzalka, K., Svobodová, J. 2000. Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1464: 18-26.
- Koolman, J., Roehm, K.H. 2005. Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition. Thieme, Stuttgart, 467p.
- Klouda, P. 2005. Základy biochemie. Pavel Klouda, Ostrava, 143p.

- Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow M, Minnikin DE (eds) *Chemical methods in bacterial systematics*. London: *Academic Press*, pp 173-199.
- Lechevalier, M. P., 1977. Lipids in bacterial taxonomy: a taxonomist's view. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 5: 109– 210.
- MacMillan, J.B. Molinski. T.F. 2005. Majusculoic Acid, a Brominated Cyclopropyl Fatty Acid from a Marine Cyanobacterial Mat Assemblage. *J. Nat. Prod.*, 68: 604–606.
(Obrázek dodatečně upraveno).
- Madigan, M.T., Martinko, J.N. 2006. *Brock biology of Microorganisms*. Upper Saddle River: Pearson Education, Prentice Hall 992. 64 p. (Obrázek dodatečně upraven).
- Marrakchi, H., Zhang, I. M., Rock, C.O. 2002. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 30: 1050-1055.
- Marková J. říjen 2007. Imunomodulační účinky antibiotik a chemoterapeutik, XXIV.sjezd SSAKI a ČSAKI, Trnava, *Alergie*, 4: 336-340.
- Martin, J.F., Demain, A.L. June 1980. Control of Antibiotic Biosynthesis, *Microbiol. rev.*, 44: 230-251.
- MIDI, Oficiální stránky společnosti MIDI. Dostupné na : [www. midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)
- Mitchison, J. M. 1971. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, Cambridge. 313p..
- Moore, B.S., Poralla, K., Floss, H.G. 1993. Biosynthesis of the cyclohexanecarboxylic acid starter unit of w-cyclohexyl fatty acids in *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 115: 5267–5274.
- Moore, B. S., Hertweck, C. 2002. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 70–99.

- Nagy, I.Z. 1979. The role of membrane structure and function in cellular aging: A review, *Mech. Ageing Dev.*, 9: 237-246.
- Nobel Web AB. 2010. *The Official Web Site of the Nobel Foundation*. Dostupné z: : http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/index.html
- Nouza, K., Nouza, M. 1999. Antibiotika-hrozí konec éry? *Medicína, Imunologie dnes*, 3/VI. Dostupné z http://www.zdravarodina.cz/med/med399/med399_42.html
- O'Hagen, D., 1993. *The Polyketide Metabolites*. Ellis Horwood, Chichester, U.K. 176p.
- Piotrowska-Seget Z., Mroziak A. 2003. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms, *Pol. J. Environ. Stud.*, 12: 669-675.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 1998. *Microbiology, Second Edition*. McGraw-Hill Education, ISE Editions. 1999p.
- Pucci, GN, Pucci, H. Jun 2004. Variation in the composition of *Rhodococcus ruber* GNP-OHP-38r cell membrane fatty acids in response to temperature and salinity. *CEIMA, Rev. Argent. Microbiol.*, 36: 57-62.
- Rosypal, S. 2003. *Nový přehled biologie*. [s.l.]. Scientia, Praha, 797p.
- Řezanka, T., Sigler, K. 2009. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Prog. Lipid Res.*, 48: 206-238.
- Saddler, G. S., M. Goodfellow, D. E. Minnikin, A. G. O'Donnell, 1986. Influence of the growth cycle on the fatty acid and menaquinone composition of *Streptomyces cyaneus* NCIB 9616. *J. Appl. Bacteriol.*, 60: 51– 56.

- Saddler, G. S., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. 1987. SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids. *J. Gen. Microbiol.*, 133:1137–1147.
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman. 1994. S. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotik activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 55: 66-69.
- Science Aid. 2009. Dostupné z <http://scienceaid.co.uk/biology/index.html>. (Obrázek dodatečně upraven).
- Smith, J. L., Sherman, D. H. 2008. Biochemistry. An enzyme assembly line. *Science.*, 321: 1304–1305.
- Saser, M. 2001. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Technical Note #101*.
Dostupné na [www: http://www.microbialid.com/PDF/TechNote_101.pdf](http://www.microbialid.com/PDF/TechNote_101.pdf)
- Shen, B. 2000. Biosynthesis of aromatic polyketides. *Top. Curr. Chem.*, 209: 1–51.
- Shinitzky M. 1984. Membrane fluidity and receptor function. In: Membrane Fluidity, M. Kates, L.A. Manson, eds., *Plenum Publ. Corp.*, pp. 585-601. (Obrázek dodatečně upraven.)
- Singer, S.J., Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720–31.
- Stutzman-Engwall, K.J., Hutchinson, C.R. 1989. Multigene families for anthracycline production in *Streptomyces peucetius*. USA: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 3135.
- Trejo, W. H. 1970. An evaluation of some concepts and criteria used in the speciation of streptomycetes. *Trans. NY Acad. Sci. Ser. II*, 32: 989–997.

- Vančura, A., Řezanka, T., Maršalek, J., Kristan, V. and Basařova, G. 1987. Fatty acids and production of tylosin-like compounds in *Streptomyces fradiae*. *J. Basic Microbiol.*, 27: 167–171.
- Waksman, S.A., Woodruff, H.B. 1940. Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes. *Proc. Soc. Exper. Biol.*, 45: 609–614.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., and B. D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176: 386–390.
- WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. 2000. *World Health Organization*. Geneva.
- Zelles, L. 1999a. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere* 39: 665-682.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29: 111–129.