ROČNÍK 36 (2008), ČÍSLO 2

Bulletin

ČESKÁ SPOLEČNOST PRO
BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

2

ISSN 1211-2526

BULLETIN
ČESKÉ SPOLEČNOSTI PRO BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

http://CSBMB.vscht.cz

PAVEL RAUCH - VÝKONNÝ REDAKTOR

Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 166 28 Praha 6, Technická 5
<pavel.rauch@vscht.cz>

IRENA KRUMLOVÁ - ZÁSTUPCE VÝKONNÉHO REDAKTORA

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Kladenská 48,
160 00 Praha 6, tel. 220 445 166

nebo Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 166 28 Praha 6, Technická 5
tel.: 220 445 166, fax: 220 445 167, e-mail <irena.krumlova@vscht.cz>

REDAKČNÍ RADA

P. Rauch, I. Krumlová

Příspěvky na disketě 3,5", zpracované v textovém procesoru Word, zasílejte, spolu s vytištěným textem, kterémukoli z redaktorů nebo do sekretariátu společnosti. Prosíme, abyste do textu nemontovali ani obrázky, ani tabulky. Připojte je v originále, případně na disketě ve zvláštních souborech, v textu označte, prosím, jen jejich umístění.

Adresa ČSBMB: Kladenská 48, 160 00 Praha 6
tel.: 235 360 057

ISSN 1211-2526

http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz

Od 1. 1. 2009

http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz
http://www.csbmb.cz

OBSAH

Zprávy společnosti

XXI. biochemický sjezd z pohledu účastníka 32
XII. setkání biochemiků a molekulárních biologů v Brně 34

Odborné články

P. Kotrba, O. Uhlík, K. Ječná, M. Macková, T. Macek:
Metagenom – bohatý zdroj nových enzymů. 37

XXI. BIOCHEMICKÝ SJEZD Z POHLEDU ÚČASTNÍKA

Rád jsem přijal pozvání na XXI. biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenskej spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu, který se již podruhé konal v prostorách Jihočeské univerzity a Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích ve dnech 14. – 17. září 2008. Chtěl bych poděkovat organizačnímu výboru , zejména jeho předsedovi prof. MUDr. Radimu Černému, CSc. z Ústavu biochemie LF UK v Plzni, ale také děkanovi Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi a Ing. Ireně Krumlové, tajemnici ČSBMB, na nichž spočívala hlavní tíha pořádání sjezdu, za opravdu vzornou organizační práci a přátelskou a tvůrčí atmosféru sjezdových jednání, kterým dominovala zejména přítomnost prof. Antonína Holého z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR a jeho belgického spolupracovníka prof. Erika De Clercqa z Lovaně.

Sjezd byl zahájen projevy čestných hostů, mezi nimiž nechyběli představitelé Jihočeského kraje, statutárního města České Budějovice a Jihočeské univerzity. Po projevech předsedů obou Společností V. Pačesa a J. Turni následovalo Vyhlášení cen J.V. Koštíře a A. Beckmana, Zpráva o přípravě kongresu FEBS v Praze (T. Zima) a Úvahy o reformě vědy v ČR (V. Pačes). Nakonec byly uděleny diplomy novým čestným členům ČSBMB prof. MUDr. Jiřímu Duchoňovi, DrSc. a prof. RNDr. Arnoštu Kotykovi, DrSc.

Pak následoval Společenský večer v areálu Jihočeské univerzity s virtuozním hudebním programem Swing tria AVALON a pohoštěním, které štědře sponzorovaly vystavující firmy.

Program sjezdu obsahoval čtyři plenární přednášky, přednesené postupně v jednotlivých sjezdových dnech:

Václav Hořejší (Ústav molekulární gentiky AV ČR, v.v.i., Praha): Membránové mikrodomény a imunoreceptorová signalizace.

Antonín Holý a Petr Jansa (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha): Acyklické nukleosidfosfonáty po dvaceti letech – perspektivy v roce 2008.

Erik De Clercq (Rega Institute for Medical Research, K.U.Leuven, Belgium): Antiviral activity of acyclic and cyclic nucleoside phosphonates.

Gabriela Bukovská (Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava): The analysis of bacteriophage BFK20 genome.

Jednání v sekcích probíhalo ve čtyřech sálech Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity, a to 128 přednáškami a 225 postery. Své přednášky přednesli v sekcích i vítězové udělených cen.

Vítěz Ceny J.V.Koštíře Zbyněk Prokop se spolupracovníky (Loschmidovy laboratoře, Přírodovědecká fakulta MU Brno) přednášel na téma:
Inženýrství stereoselektivity enzymů pro aplikace biokatylýzy.

Za vítěze Ceny Arnolda Beckmana Martina Hřebíčka a spol. přednesl S. Kmoch (Ústav dědičných metabolických poruch a Centrum aplikované genomiky, UK – 1 lékařská fakulta, Praha) přednášku:
Mutations in TMEM76 are associated with acetyl coenzyme A:a-glucosaminide N- acetyltransferase deficiency in mucopolysaccharidosis type III C (Sanfilippo C) patients.

Za vítězku Ceny Arnolda Beckmana Lubicu Dráberovou přednesl P. Dráber

(Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. Praha) práci s názvem:
Komplexnost aktivačních dějů na plasmatické membráně.

Krom toho bylo jako součást sekce pathobiochemie uspořádáno prof. Pavlem Martáskem (Klinika dětského a dorostového lékařství UK- 1. LF v Praze) symposium věnované nedožitým 85. narozeninám prof. MUDr. Milana Jirsy, DrSc. z 1.interní kliniky 1. LF UK v Praze, význačného českého lékaře a klinického biochemika, který proslul zejména svými objevitelskými pracemi o metabolismu bilirubinu, porfyrinů a jaterní chromoexkreci, publikovanými čtyřikrát v časopise Nature. Úvodní slovo a osobní vzpomínku na profesora Milana Jirsu přednesl prof. Jiří Kraml z Ústavu lékařské biochemie UK – 1. LF v Praze.

Z názvů přednáškových sekcí uvádím jejich názvy tak, jak byly časově řazeny v programu:
Molekulární imunologie. Xenobiochemie. Rostlinná biochemie a molekulární biologie. Molekulární a buněčná biologie. Proteiny a peptidy. Biochemie nádorů. Viry, bakterie, paraziti: struktura a funkce jejich molekul. Bioenergetika. Proteinové inženýrství a biotechnologie. Volné radikály v biochemii. Biochemie lipidů a membrán. Glykobiochemie. Pathobiochemie. Bioinformatika. Proteomika. Bioanalytické metody.

Významným počinem bylo uspořádání přednáškové a posterové sekce Biochemie a středoškolská odborná činnost.

Nedílnou součástí sjezdu byly i tentokrát výstavy firem, které sjezd podpořily i ekonomicky, začež jim patří upřímný dík. Organizační sekretariát sjezdu bezporuchově zajišťovala Congress Business Travel, s.r.o. (CBT).

Redaktorem sjezdového sborníku a hlavním organizátorem vědeckého programu byl prof. MUDr. Radim Černý, CSc.

Ke společenskému programu patřilo i divadelní představení v Kulturním domě, realizované znamenitými výkony několika pražských herců, zejména Petra Nárožného a Květy Fialové, kteří nás svými komickými výstupy odpozorovanými ze života opravdu rozesmáli. Vydatný déšť znemožnil plánované výlety na Kleť a návštěvu Selského baroka v Holašovicicíh, ale prohlídka pivovaru Budějovický Budvar a historická procházka Českými Budějovicemi s odborným výkladem účastníky plně uspokojila.

Sjezd byl dobrou průpravou na nadcházející kongres FEBS v Praze v r. 2009. Kéž se našim organizátorům dílo vydaří i napřesrok.

Jiří Kraml,
čestný člen ČSBMB

XII. SETKÁNÍ BIOCHEMIKŮ A MOLEKULÁRNÍCH BIOLOGŮ V BRNĚ

Ve dnech 6. – 7. února 2008 proběhlo pod hlavičkou **Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně** a **České společnosti pro biochemii a molekulární biologii** další ***Setkání biochemiků a molekulárních biologů,*** na kterém měli účastníci možnost informovat ostatní kolegy o výsledcích a směrech svých výzkumů. Setkání bylo *in memoriam* věnováno Prof. RNDr. Vladimíru Mikešovi, CSc., dlouholetému vedoucímu katedry biochemie PřF MU v Brně, který nás opustil po těžké nemoci a který se aktivně podílel na zdařilém průběhu předešlých Setkání.

Letošního Setkání se zúčastnilo přes 150 vědeckých a akademických pracovníků a studentů převážně z českých institucí, nechybělo však i tradiční zastoupení Slovenska. V průběhu konference bylo možno vyslechnout velmi zajímavé přednášky z různých oblastí moderní vědy, od pokroků v instrumentálních technikách až po závažná témata týkajících se porozumění buněčným pochodům. Z prezentovaných témat lze jen obtížně vybrat několik klíčových, konference ukázala široký záběr a multidisciplinaritu účastníků, takže si každý mohl v průběhu konference nalézt to, co ho zajímá. Již tradičně zazněla aktuální témata týkající se xenobiochemických přeměn cizorodých látek pomocí cytochromů P450, nádorového supresoru p53 a protinádorových terapeutik, významu glykosylace či mechanismů kontroly kvality jaderné RNA. Významně byly zastoupeny taktéž problematiky studia genové exprese, využití molekulárně biologických metod při typizaci bakterií či mapování genomů až po využití moderních metod využívaných při strukturně-funkčním studiu proteinů a jejich interakci s okolím. Tento výčet není samozřejmě kompletní a proto případné zájemce odkazujeme na webové stránky konference (http://orion.chemi.muni.cz/setkani/index.htm, kde je možné nalézt program i sborník v elektronické podobě.

Jako každoročně, v rámci konference probíhala tzv. „**Sekce mladých**“, v rámci které studenti prezentovali svoje příspěvky v jazyce anglickém a měli možnost si o nejlepší prezentaci zasoutěžit. I letošní ročník prokázal, že úroveň studentských prezentací je mnohdy na velmi vysoké úrovni a hodnotící komise měly nelehký úkol vybrat ze své Sekce jen tři nejlepší. V obou sekcích se našlo mnoho vyrovnaných příspěvků, takže v obou komisích došlo na závěr k vícenásobnému rozdělení čelních příček. V komisích letos zasedli: Prof. RNDr. **Zdeněk Glatz**, CSc., Prof. RNDr. **Marie Stiborová**, DrSc., Prof. RNDr. **Karel Bezouška**, DSc., Prof. Mgr. **Marek Šebela**, Ph.D., Priv Doc. **Štěpánka Vaňáčová**, Ph.D., Doc. RNDr. **Petr Zbořil**, CSc., RNDr. **Helena Ryšlavá**, CSc., Doc. RNDr. **Petr Hodek**, CSc., Doc. RNDr. **Lenka Luhová**, CSc. a Mgr. **Lukáš Žídek**, Ph.D.

V sekci mladých probíhající v Aule se o první místo podělili RNDr. **Vojtěch Adam** z Katedry chemie a biochemie, MZLU v Brně s příspěvkem *„Association of formation and progression of a tumour disease and level of metallothioneins“* a Bc. **Peter Holub** z Národního centra pro výzkum biomolekul, PřF MU v Brně s příspěvkem *„Protein engineering of haloalkane dehalogenases: towards the change of reaction mechanism“*. Na druhém místě se umístila Mgr. **Lenka Malinovská** (NCBR, PřF MU Brno) s příspěvkem *„Structure and specificity of lectin from bacterium Burkholderia cenocepacia: role of sugar-binding proteins in bacterial infection“* a třetí místo obsadil Mgr. **Peter Both** (Chemický Ústav SAV, Bratislava) s přednáškou *„Structure-functi-*

on study of core 1,3-fucosyltransferase A from Arabidopsis thaliana".

Komise rozhodující sekci v Salonku po dlouhém zvažování nakonec rozhodla o následujícím pořadí studentů: První místo bylo opěr rozděleno mezi dva studenty, a to Mgr. **Josefa Housera** s přednáškou „*FIFA for RHC – first functional analysis of Acidithiobacillus ferrooxidans rhodanese-like protein*" a Bc. **Pavla Dvořáka** s přednáškou „*Semi-rational engineering of haloalkane dehalogenase DhaA towards improved activity with 1,2-dichloroethane*", oba z Národního centra pro výzkum biomolekul, PřF MU v Brně. Na společném druhém místě se umístili Ing. **Zuzana Chrastilová** (Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha) s příspěvkem „*Different approaches to high-level production of human peptide hormone in bacteria Escherichia coli*" a Mgr. **Jan Brezovský** (NCBR PřF MU Brno) s přednáškou „*Quantitative comparison of binding sites within protein family of haloalkane dehalogenases*". Třetí místo obsadila Mgr. **Mária Šmehilová** (Katedra biochemie PřF UPOL, Olomouc) s přednáškou „*Biochemical and structural comparison of two differentially targeted cytokinin dehydrogenase enzymes*".

Na programu Setkání byla i dvě moderovaná zhlédnutí části příspěvků ve formě plakátových sdělení a diskuse s autory. Účastníci konference hlasovali o nejhezčí/nejlépe prezentovaný poster konference a nejvíce kladných hlasů obdržely Bc. **Lenka Brůnová** a Bc**. Eva Dejmková**, spoluprezentující poster „*Engineering of high-affinity fucose- and mannose-binding lectin cv-IIL from Chromobacterium violaceum*". Druhé místo obsadila Bc. **Dana Svobodová** s příspěvkem „*Using of different expression systems*

in recombinant mycobacterial glycosyltransferases preparation" (všechny Ústav biochemie a NCBR, PřF MU Brno). Třetí místo patří Mgr. **Veře Kotrbové** z Katedry Biochemie, PřF UK Praha za poster *„Participation of cytochromes P450 and peroxidases in activation metabolism of the anticancer drug ellipticine in mice in vivo"*.

Výherci byli oceněni Českou společností pro biochemii a molekulární biologii a pořádajícím Ústavem biochemie PřF MU v Brně. A na závěr trochu statistiky – na letošním Setkání zaznělo **62 přednášek**, z toho **44** v **Sekci mladých**, prezentováno bylo celkem **62 posterových sdělení**. Letošní ročník Setkání byl bohužel poslední konaný v Aule na Vinařské a přilehlých prostorách ÚSKM. Díky rekonstrukci předsálí již nebude možné konferenci pořádat na tomto místě z důvodů nedostatečných prostor. Účastníkům konference byly proto rozdány dotazníky mapující význam různých parametrů ovlivňující další pořádání konference (poplatky, termín a doba konference, ..), včetně námětů na změny či připomínky k současné organizaci. Výsledkem bylo pro nás příjemné zjištění, že má smysl konferenci nadále pořádat a snažit se najít adekvátní prostředí, kde bude možné dostatečně skloubit přednášecí prostory s dostatečným zázemím pro posterovou sekci a prezentaci firem.

Jelikož již nebudeme vázáni na zkouškové období, rozhodli jsme se posunout dobu pořádání konference na konec dubna. Potenciální zájemci o zařazení do informační databáze pro rozesílání informací ohledně nadcházejícího XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů se mohou registrovat elektronicky na adrese **setkani@chemi.muni.cz**.

Nezbývá než poděkovat všem účastníkům za jejich zajímavé příspěvky i příjemnou atmosféru, která setkání provázela, a hodnotícím komisím za jejich obětavou a záslužnou práci.

Chtěli bychom poděkovat taktéž firmám, které nám umožňují tuto dnes již relativně rozsáhlou konferenci pořádat a bez nichž by akce v takovém rozsahu nebyla realizovatelná.

Těšíme se opět na viděnou v roce 2009!

Za organizátory Setkání
Michaela Wimmerová

Kontaktní informace:
Doc. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.,
Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2,
611 37 Brno
tel.: +420-549498166, fax: +420-549492560;
e-mail: michaw@chemi.muni.cz.

Detailní informace včetně obrazové dokumentace je možno nalézt na internetové adrese http://orion.chemi.muni.cz/setkani/index.htm.

METAGENOM – BOHATÝ ZDROJ NOVÝCH ENZYMŮ

Pavel Kotrba[1], Ondřej Uhlík[1], Kateřina Ječná[1], Martina Macková[1] a Tomáš Macek[1,2]

[1] Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6 – Dejvice;
[2] Oddělení přírodních látek, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6 – Dejvice
pavel.kotrba@vscht.cz

Výsledky pozorování mikroflóry ústní dutiny, prováděných pomocí podomácku vyrobeného mikroskopu opatřeného jednou čočkou, které širšímu publiku zpřístupnil Antonie van Leeuwenhoek v roce 1673, nastartovaly zájem badatelů o mikrobiální svět. „*Wee animacules*“, jak van Leeuwenhoek mikroorganismy nazval, popisoval jako živé, schopné aktivního pohybu. Dalším významným datem v historii mikrobiologie byl rok 1861, kdy Louis Pasteur vyvrátil teorii spontánního vzniku mikroorganismů z organické hmoty a zařadil tak mikroorganismy mezi buněčné formy života v souladu se závěrem Rudolfa Virchowa z roku 1858, totiž, že každá buňka vzniká z buňky již existující („*Omnia cellula e cellula*“). O 20 let později formuloval Robert Koch své 4 postuláty, jejichž podstatou bylo paradigma čisté mikrobiální kultury jedině umožňující charakterizaci (v jeho případě potvrzení patogenity) konkrétního mikroorganismu. Vývoj mikrobiologie se pak podřídil těmto postulátům, mikrobiology přitahovala exaktnost studia mikroorganismů v čistých kulturách a v roce 1923 Bergeyův trust vydávající *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* kategoricky vyhlásil, že klasifikovat lze pouze bakterie, které je možno kultivovat a získat v čisté kultuře. V roce 1931 Selman A. Waksman optimisticky prohlásil, že ...a large body of information has accumulated that enables us to construct a clear picture ... of ... the microscopic population of the soil. Toto přesvědčení však dostálo povážlivých trhlin především v polovině 80. let minulého století.

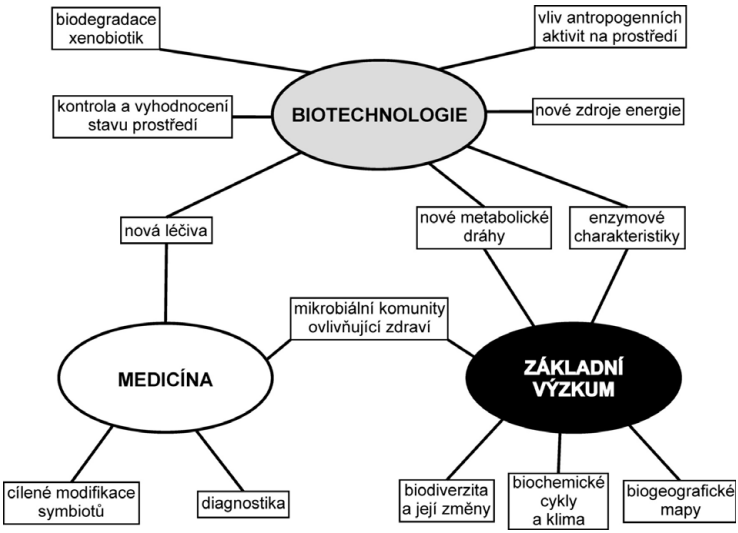
Pochyby iniciovala zjištění zásadních rozdílů mezi počty jedinců mikrobiální populace v půdě a povrchových vodách stanovených kultivačními metodami a vyjadřovaných jako „jednotky tvořící kolonie“ a počty určenými přímým mikroskopickým počítáním. Rozdíl je obzvláště dramatický v některých vodních ekosystémech, kde četnost bakteriální populace zjištěná kultivačně a počítáním živých buněk barvených akridinovou oranží dosahuje rozdílu až 6 řádů. Z celkového počtu půdních bakterií je běžnými postupy kultivovatelných 0,1 – 1 %. V současné době je počet prokaryot na Zemi odhadován na $4.10^{30} – 6.10^{30}$, a součet množství organického uhlíku v prokaryotech ze všech složek životního prostředí je souměřitelný s množstvím uhlíku deponovaným v rostlinné biomase. Vědomí kritického významu mikroorganismů v biogeochemických cyklech spolu s poznatky mezigenomových DNA-DNA hybridizačních studií, které ukázaly, že fylogenetická diverzita půdních bakterií je minimálně 100× vyšší, než jaká se předpokládala na základě tradičních kultivačních metod, způsobily zásadní obrat směrem ke studiu nekultivovatelných mikroorganismů. Pozornost začíná být věnována jak fylogenetické příslušnosti nekultivovatel-

ných, tak jejich předpokládané metabolické diverzitě. Dalším poznatkem, který významně ovlivnil názor na tradiční dogmata mikrobiologie, byl důkaz, že po dlouhou dobu nekultivovatelný *Helicobacter pylori* způsobuje žaludeční vředy. Ačkoliv byl mikroskopicky zjištěn výskyt spirálových bakterií v gastrointestinálním traktu psů již v roce 1893 a u člověka v roce 1906 a korelace mezi výskytem těchto bakterií, vznikem gastritidy a tvorbou vředů byla popsána v roce 1938, nebyla příčinná souvislost mezi *H. pylori* a gastritidou akceptována do doby, než byla tato bakterie s odpovídajícími důsledky v roce 1985 „kultivována" v gastrointestinálním traktu dobrovolníka.

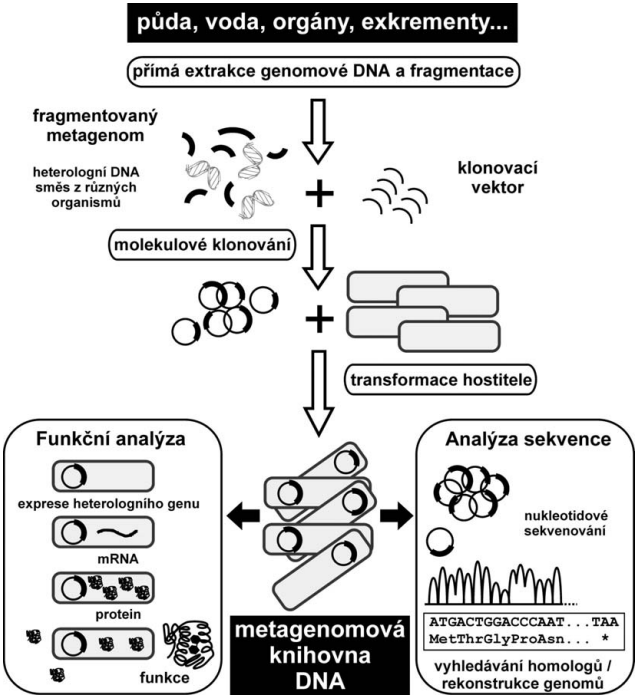
V roce 1985 rozšířily pokroky v molekulární genetice spektrum nástrojů pro studium mikroorganismů o analýzu ribosomálních 5S a 16S rRNA izolovaných přímo z matrice environmentálních vzorků půdy nebo vody bez potřeby jejich kultivace. Porovnání nukleotidových sekvencí rRNA z různých taxonomických skupin (rRNA různých taxonů v průběhu evoluce akumulovaly ve variabilních částech specifické mutace, které lze použít jako molekulární fylogenetické znaky) umožnilo rozlišit i fylogenetickou příslušnost nekultivovatelných mikroorganismů a zviditelnit rozsáhlou diverzitu mikrobiálních komunit. Technologie PCR s primery umožňujícími amplifikovat takřka kompletní geny 16S rRNA pak vedla od poloviny 90. let k expanzi molekulárně genetické klasifikace mikroorganismů. Dodnes bylo takto popsáno např. okolo 100 základních bakteriálních taxonomických jednotek (kmenů, *phylum*, dle linnéovské klasifikace), z nichž pouze třetina má v současné době kultivovatelné zástupce. Dostupnost sekvencí rRNA specifických pro určitou taxonomickou jednotku navíc znovu přivedla pozornost k mikroskopické analýze a využití fluorescenčně značených nukleotidových sond se ve spojení s fluorescenční mikroskopií stalo významným diagnostickým nástrojem pro studium mikrobiální diversity *in situ*.

Metagenomika

Vedle teoretického studia mikrobiální diverzity ekosystémů a katalogizace rRNA



Obr. 1. **Možné aplikace metagenomiky**



Obr. 2. **Konstrukce knihoven metagenomů a jejich screening**

motivují zájem o „neviditelnou většinu“ mikroorganismů i čistě praktické důvody a poznatky o fyziologii a genetice nekultivovatelných mikroorganismů mají významný potenciál uplatnění v oblastech medicíny, ekologie a biotechnologií (Obr. 1). Termín nekultivovatelný mikroorganismus je zde užíván pro označení mikroorganismů, pro které zatím nebyly identifikovány fyzikální nebo biologické faktory umožňující jejich laboratorní kultivaci, ale i ty, o jejichž kultivaci zatím ani nebyl učiněn pokus. Mezi metodami navrženými ke studiu fyziologie a genetiky nekultivovatelných mikroorganismů si získal vedoucí pozici nový technologický přístup, metagenomika (syn. genomika populací, environmentální genomika), zahrnující extrakci celkové DNA určité populace (směs genomů), jejich fragmentaci, molekulové klonování fragmentů DNA (tvorbu knihovny tzv. metagenomu), stanovení a interpretaci jejich nukleotidové sekvence poskytující informace o genetickém potenciálu i diverzitě populace nebo funkční analýzu genů vedoucí k cílené identifikaci aktivit jejich produktů (Obr. 2). Směrování metagenomické studie na vyhledání určité enzymové aktivity, biosyntetické dráhy nebo dráhy umožňující utilizaci toxických látek ovlivňuje volbu prostředí (půda, voda, sedimenty, odpadní vody a kaly, prostředí s extrémními teplotními podmínkami, vysokou salinitou nebo kontaminované xenobiotiky), z něhož je metagenom izolován. V případě studií zaměřených na globální analýzu populací bývá metagenomická linie doplněna tradičnějšími molekulárně biologickými metodami umožňujícími analýzu diverzity pomocí DDGE a TGGE (denaturační a teplotní gradientová gelová elektroforéza

DNA), hybridizační metody, RFLP (restriction fragment length polymorphism) a nebo značení metabolicky aktivních mikroorganismů metodou SIP (stable isotope probing; metoda založená na inkorporaci exogenně přidaných stabilních isotopů do biomolekul metabolicky aktivních mikroorganismů).

Technologie metagenomiky

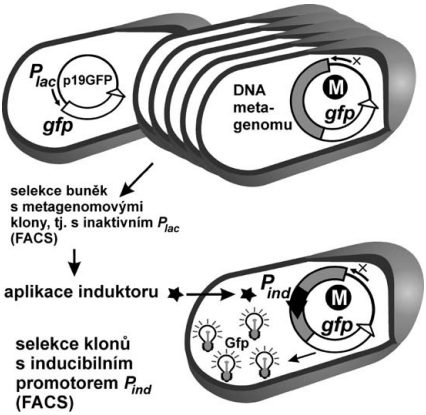
Strategie izolace DNA. Mikrobiální komunity se sestávají ze směsi archebakterií, bakterií a eukaryot s rozdílnými charakteristikami buněčných stěn, jež výrazně ovlivňuje jejich náchylnost k lyzi, která představuje první krok izolace DNA. Výtěžky DNA navíc ovlivňuje i skutečnost, že mikroorganismy v prostředí jsou často ve stavu hladovění, jsou fyzicky menší a obtížně lyzovatelné. Při použití přístupů přímé extrakce DNA *in situ* z environmentální matrice nebo nepřímé extrakce, jíž předchází izolace mikroorganismů z matrice, se ukazuje, že oba poskytují celkovou DNA pokrývající stejné spektrum diverzity komunity, nicméně přímé metody poskytují běžně vyšší výtěžky. Nevýhodou přímých metod je koextrakce látek (např. huminových kyselin), které mohou působit inhibičně při následném molekulovém klonování. Vedle tradičních metod gelové filtrace byla pro odstranění huminových látek nově zavedena technika pulzní elektroforézy využívající dvoufázový agarosový gel, kde jedna fáze obsahuje polyvinylpyrrolidon, inertní a netoxický polymer s vynikající schopností vázat fenolové látky, včetně huminových kyselin.

V určitých případech, při vyhledávaní genetických determinant specifických schopností v komunitě, je výhodné zařadit před extrakci DNA prekultivační krok za podmínek, které preferují zástupce disponující cílovou vlastností. Je-li takovou vlastností např. schopnost utilizace určitých organických látek, pak lze využít strategie SIP a směsnou kulturu dotovat tímto substrátem obsahujícím těžší isotop ^{13}C a změřit extrakci DNA na izolaci „těžké“ DNA obsahující ^{13}C inkorporovaný v důsledku utilizace značeného substrátu proliferujícími zástupci komunity.

Strategie přípravy knihoven metagenomů. Při volbě mezi možností vytvářet knihovny metagenomu z krátkých (tisíce párů bazí) nebo dlouhých (desítky tisíc párů bazí) fragmentů DNA je třeba zohlednit, zda je předmětem zájmu vyhledávání individuálních genů nebo celých operonů a biosyntetických drah. Často je i pro posouzení velikosti a diverzity komunit třeba vytvářet knihovny z rozsáhlejších fragmentů DNA, což usnadňuje i fylogenetickou klasifikaci fragmentu v případě, že obsahuje nebo je mu možno přiřadit fylogenetický marker (gen rRNA, *recA* a podobně). Takové knihovny velkých fragmentů metagenomů jsou vytvářeny s použitím kosmidů, umělých bakteriálních chromosomů (BAC) nebo fosmidů (vektory založené na F-plasmidu). Knihovny krátkých fragmentů jsou spíše než pro funkční analýzu genů vhodné jako zdroj informací o sekvenci DNA metagenomů.

Strategie screeningu knihoven metagenomů. Pro screening knihoven metagenomů existují dva přístupy: funkční analýza genů cílená na identifikaci určité vlastnosti a nebo sekvenační přístup, tj. určení nukleotidové sekvence ideálně celého metagenomu a následná identifikace pravděpodobných genů, primárně *in silico* (Obr. 2). Určitou limitací druhého přístupu je skutečnost, že identifikace genů je založena na porovnávání se sekvencemi genů nebo jejich produktů o známé funkci v databázích a nelze tak identifikovat skutečně „nové“ geny. Na druhou stranu poskytuje významnou informaci o genetické diverzitě a metabolickém potenciálu celé komunity a může přinést i řadu překvapivých zjištění. V mořské γ-proteobakterii byl tak například identifikován gen kódující bakteriorhodopsin (lokalizovaný v blízkosti genu pro 16S rRNA) a následně byla potvr-

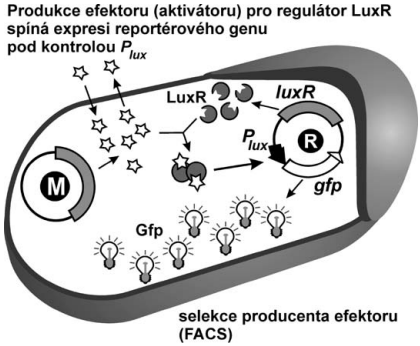
zena jeho funkce jako fotoreceptoru, který byl do té doby znám jen u zástupců říše *Archaea*. Význam sekvenačního přístupu roste s dostupností vysokokapacitních metod sekvenování DNA jako je 454 technologie.



Obr. 3. **Metoda SIGEX pro funkční analýzu knihovny metagenomu** (operonová past vplasmidu p19GFP; T. Uchiyama a kol., *Nat. Biotechnol.* **23**, 88 [2005]). Vhostiteli nesoucím samotný plasmid p19GFP je transkripce genu *gfp* kódujícího zelený fluoreskující protein GFP kontrolována *lac* promotorem, což umožňuje eliminaci hostitele bez heterologního fragmentu DNA. Fúzí *gfp* s fragmentem DNA metagenomu obsahujícím indukovatelné katabolické geny pod kontrolou promotoru P_{ind} je vplasmidu M vytvořen operon, jehož exprese je spínána vpřítomnosti odpovídajícího exogenního induktoru (P_{lac} je neaktivní:). Klony produkujících GFP jsou jako selektovány pomocí průtokové cytometrie vuspořádání FACS.

Přístup funkční analýzy genů, spočívající v identifikaci hostitele nesoucího fragment (klon) metagenomu vykazujících určitou vlastnost, je nejčastěji využíván ve studiích cílených na biotechnologickou aplikaci („zkratkou“ klon je v následujícím označován i hostitel nesoucí fragment metagenomu). Zásadním omezením funkčních analýz je, že „exotické“ geny metagenomu musí být exprimovány ve zvoleném hostiteli. Tím je nejčastěji *Escherichia coli*, přičemž bylo ukázáno, že na genetickém pozadí *E. coli* může být exprimováno jen 40 % genů z 32 testovaných genomů. Určité řešení nabízí použití alternativních hostitelů metagenomových knihoven půdních mikroorganismů. Používáni jsou *Streptomyces lividans* a *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* a ukazuje se, že jako hostitele je možno využít i zástupce rodu *Rhizobium*.

Úspěch funkční analýzy závisí i na dostupnosti metody umožňující identifikaci hledané vlastnosti ve velkém množství klonů. Vedle klasických metod využívajících např. selekčního tlaku nebo komplementace defektu hostitele v dané vlastnosti roste význam molekulárně-genetických přístupů. Metoda SIGEX (substrate-induced [reporter] gene-expression screening; Obr. 3) využívá pro rychlý screening klonů



Obr. 4. **Metoda METREX pro funkční analýzu knihovny metagenomu** (celobuněčný sensor pro identifikaci genů biosyntézy efektorů mezibuněčné komunikace; L. L. Williamson a kol., *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6335 [2005]). V hostiteli klonu fragmentu metagenomu (M) transformovaném reportérovým plasmidem R, který nese *gfp* pod kontrolou promotoru genů *lux* (P_{lux}) pro luciferasu a konstitutivní gen *luxR* pro odpovídající transkripční regulátor LuxR z *Vibrio fischeri*, bude exprese *gfp* spínána v případě, že klon produkuje aktivátor LuxR. Pokud je hostitel vystaven stimulu exogenního aktivátoru (*N*-acyl homoserin lakton), lze jej využít i pro identifikaci negativních efektorů LuxR. Klony produkujících GFP jsou jako selektovány pomocí průtokové cytometrie v uspořádání FACS.

s indukovatelnými katabolickými geny tzv. operonovou past, jejíž podstatou je vytváření genetických fúzí fragmentů metagenomů s tzv. reportérovým genem *gfp* pro zelený fluoreskující protein. Klony metagenomu jsou pak inkubovány v přítomnosti cílového induktoru (substrátu) a pozitivní zástupci jsou identifikováni průtokovou cytometrií v uspořádání FACS (fluorescence activated cell sorting). Pro identifikaci klonů produkujících efektory mezibuněčné signalizace, jako je quorum sensing, byl v systému METREX (metabolite-regulated expression [of a reporter gene]; Obr. 4) vyvinut hostitel nesoucí *gfp* pod kontrolou promotoru *lux* genů pro bakteriální luciferasu a produkující odpovídající transkripční regulátor LuxR, jehož aktivita je závislá na přítomnosti signálních molekul.

Užitečné enzymy a biologicky aktivní látky nekultivovatelných mikroorganismů

Metagenomika poskytuje dříve nepostižitelnou výpověď o ekologickém významu specifických mikroorganismů v rámci složitých komunit, tím, že umožňuje přiřadit potenciální funkce určitému mikroorganismu, osvětlit mechanismy katabolismu xenobiotik a nebo dešifrovat roli nekultivovatelných symbiotů, parazitů nebo patogenů v těle hostitele. Neméně významným výstupem metagenomických studií je identifikace nových enzymů s výhodnými vlastnostmi nebo drah biosyntézy nových antibiotik. Metagenom se stává také zdrojem materiálu pro konstrukci zcela nových genů postupem tzv. metagenomického mísení genů (angl. metagenomic DNA shuffling), jehož podstatou je kombinování vhodných částí kódujících sekvencí různého původu, za vzniku umělých genů kódujících protein požadovaných vlastností. Genetické modifikace produkčních mikroorganismů pak umožňují využít potenciálu metagenomiky v biotechnologické praxi.

Oxidoreduktasy. Možnosti využití bakteriálních polyhydroxyalkanoátů (PHA) jako suroviny pro výrobu odbouratelných plastů i náhrad fosilních paliv iniciovala i zájem o metabolismus těchto látek v nekultivovatelných mikroorganismech. Screening knihovny metagenomu půdních mikroorganismů cílený na D-3-hydroxybutyrát dehydrogenasovou aktivitu přinesl 34 pozitivních klonů s vysokou diverzitou v předpovězené primární struktuře enzymu a méně než 35% identitou se známými proteiny[1]. NAD(P)H-dependentní alkohol dehydrogenasy (ADH) nalézají díky své enantioselektivitě uplatnění při syntézách řady karbonylových sloučenin, hydroxykyselin, aminokyselin a chirálních alkoholů, které není možné připravit chemickou cestou. Z metagenomových knihoven mikroflóry říčních sedimentů a půdy bylo izolováno 48 klonů schopných konvertovat C2 až C4 polyoly na odpovídající karbonylové sloučeniny[2,3], zatím bez charakterizované selektivity. Žádná z 11 identifikovaných alkohol dehydrogenas nevykazuje sekvenční homologii ke známým zástupcům NAD(P)H-dependentních ADH a jedná se tak o zcela nové enzymy[2,3]. Významnou enantioselektivitu vykazuje monooxigenasa SmoA, jejíž gen byl izolován z půdního metagenomu[4] a která konvertuje styren a jeho chlorované deriváty na odpovídající *(S)*-epoxidy s výtěžky >99 %.

Hydrolasy polysacharidů. Ze 14 doposud identifikovaných amylolytických klonů jsou z biotechnologického hlediska nejvýznamnější 4, z nichž první, získaný z půdní bakterie, produkuje amylasu AmyM s teplotním optimem 42 °C, stabilní v alkalickém prostředí s pH optimem 9, tedy vlastností požadovanou pro použití v pracích prostředcích[5]. Rozsáhlý screening 2000 metagenomových knihoven z podmořských biotopů umožnil firmě Diversa Co. (San Diego, CA, USA) identifikovat tři klony produkující termostabilní kyselé amylasy BD5031, BD5064 a BD5063, z nichž poslední vykazovala opti-

mální aktivitu při pH 4,5 a teplotě 105 °C, bez nároku na přítomnost stabilizujících Ca^{2+} (cit.[6]). Tento enzym však byl v aktivní formě v hostiteli produkován s nízkou účinností. Řešení poskytla technologie metagenomického mísení genů a ze sekundární knihovny připravené rekombinací krátkých fragmentů kódujících oblastí tří identifikovaných -amylas byl získán chimerní gen pro amylasu BD5088, kterou lze, při zachování katalytických charakteristik enzymu BD5063, produkovat s vysokými výtěžky[6]. Enzym BD5088 by tak v procesu sacharifikace kyselých extraktů kukuřičného škrobu mohl nahradit standardně používaný preparát -amylasy z *Bacillus licheniformis* termostabilní pouze v oblastech blízkých neutrálnímu pH a v přítomnosti Ca^{2+}.

Ačkoliv se vyhledávání celulas v metagenomech zaměřuje především na celulasy z termofilních nebo anaerobních mikroorganismů, často s krokem předkultivace na karboxymethylcelulose nebo lignocelulose, lze v aerobní mezofilní půdní mikroflóře nalézt enzymy tolerující extrémní podmínky. Voget a spol.[7] izolovali celulasu CelE5A zachovávající si minimálně 60 % aktivity v širokém rozsahu pH 5,5 až 9,0, dlouhodobě stabilní při 40 °C a aktivní i v přítomnosti 3 M NaCl. Díky těmto vlastnostem může CelE5A nalézt uplatnění v biotechnologickém zpracování lignocelulosových materiálů.

Kompletní enzymová hydrolýza lignocelulosové biomasy vyžaduje hydrolýzu hemicelulos, jejíž součástí jsou i xylany a hledány jsou proto i vhodné xylanasy. Z metagenomů odpadní jímky byly izolovány xylanasa Xyn8, zajímavá svou aktivitou při nízkých teplotách[8] a z mikroflóry zažívacího traktu můry a termita xylanasy XYL6805, 6806, 6807 a XYL6419, které nevykazovaly významnou sekvenční homologii se známými xylanasami a představují tak novou rodinu těchto ezymů[9]. Ačkoliv se po dlouhou dobu zdálo, že agarasy, schopné hydrolyzovat agar, jsou charakteristické jen pro mořskou mikroflóru, byla tato aktivita reprezentovaná 12 metagenomovými klony potvrzena i u zástupců suchozemské půdní mikroflóry[10].

Esterasy. Doposud bylo v metagenomech identifikováno okolo 80 esteras, z nichž však jen několik bylo biochemicky charakterizováno. Z podmořské solné lokality byla izolována řada enantioselektivních esteras aktivních v oblasti alkalického pH a za vysokých tlaků, mezi nimi jedna z doposud největších popsaných esteras, esterasa O.16 homotrimer o 325 kDa (cit.[11]). Podobnou molekulovou hmotnost má i homooktamerní esterasa EstA3 o 336 kDa izolovaná z biofilmu pod hladinou pitné vody, která je jako jediný známý enzym schopna hydrolyzovat jinak nereaktivní sekundární ester 7-[3-oktylkarboxy-(3-hydroxy-3-methyl-butyloxy)]-kumarin (cit.[12]).

Nitrilasy, amidasy a nitrilhydratasy. Chemická hydrolýza nitrilů na odpovídající karboxylové kyseliny a jejich amidy vyžaduje přítomnost silné kyseliny a vysoké teploty a běžně poskytuje nízké výtěžky. Nitrilasy jsou v bakteriálních genomech kódovány poměrně vzácně a do zavedení metagenomiky bylo známo jen asi 20 zástupců. V rozsáhlém projektu firmy Diversa Co. (San Diego, CA, USA) testujícím metagenomy ze stovek biotopů bylo identifikováno 337 genů kódujících nitrilasy, z nich charakterizované vykazují stereoselektivitu, která může nalézt uplatnění při syntéze specifických enantiomerů hydroxykarboxylových kyselin[13-15]. Nitrilhydratasy konvertující nitrily na amidy karboxylových kyselin nalézají využití při syntézách nikotinamidu a akrylamidu a metagenomika odhalila 12 nových nitrildehydrogenas z půdních mikroorganismů[16]. Amidasy jsou využívány při syntézách -laktamových antibiotik a z nekultivovatelné půdní bakterie byla získána penicilin acylasa, využitelná při produkci semisyntetických penicilinů[17].

Glycerolhydratasa. V biotechnologiích využívajících fermentaci glukosy na 1,3-propandiol, který je surovinou např. pro výrobu polyesteru nebo polyuretanu, je limitujícím krokem přeměna glycerolu na 3-hydroxypropanal, katalyzovaná glycerol dehydratasou. Screening metagenomových knihoven z několika biotopů umožnil identifikovat klon *E. coli* Bl21/pAK5.1 produkující glyceroldehydratasu, která se vyznačovala významnou rezistencí k inhibici aktivity glycerolem a konečným metabolitem 1,3-propandiolem (cit.[18]).

Biosyntéza vitaminů, antibiotik a léčiv. Metagenomický přístup byl aplikován při vyhledávání biosyntetických drah biotinu a vitaminu C. Z metagenomové knihovny půdní mikroflóry testované v *E. coli* s auxotrofií na biotin bylo identifikováno 7 kosmidů s operony kódujícími biosyntetickou dráhu biotinu[19]. Z nekultivovatelných půdních bakterií byly izolovány geny kódující dvě 2,5-diketo-D-glukonát reduktasy, C a D, jež jsou součástí biosyntetické dráhy vitaminu C. Tyto enzymy se vyznačují vysokou katalytickou účinností a enzym D i termostabilitou s maximem aktivity zachovaným při 45 °C (cit.[64]).

Standardní inhibiční test s *Mycobacterium* sp. umožnil mezi klony půdních metagenomů identifikovat zástupce produkujícího antibiotikum terragin A (hostitel *S. lividans*; cit.[21]) a 11 klonů produkujících antibiotika *N*-acyltyrosinové řady (hostitel *E. coli*; cit.[22]). Pomocí inhibičního testu s *Bacillus subtilis* byl z půdního metagenomu selektován klon produkující z prekurzorů tyrosinu a ribulosa-5-fosfátu zcela nové antibiotikum, indol derivatizovaný isokyanidovou skupinou na C3 (hostitel *E. coli*, cit.[23,24]). Antibakteriální účinky na *Bacillus* sp. má i sekundární amid kyseliny palmitové, palmytoylputrescin, produkovaný klonem metagenomu symbiotů tropických rostlin čeledi *Bromeliaceae* s *E. coli* jako hostitelem[25]. Identifikovaná palmytoylputrescin sythetasa Pps s vysokou substrátovou specifitou pak představuje zcela nový enzym, který nevykazuje příbuznost k žádným ze známých *N*-acetyltransferas. Charakteristické zbarvení umožnilo identifikovat klony produkující turbomyciny A a B (cit.[26]) a violacein (cit.[27]). V půdních metagenomech byly identifikovány i biosyntetické dráhy indirubinu (cit.[28]), který je používán při terapiích u pacientů trpících leukémií.

Závěr

Metagenomika nejen poněkud pozměnila pohled na koncept genomu, ale především umožňuje překonat bariéru, která mikrobiologům nedovolovala komplexní poznání struktury a funkčního potenciálu komunit z exotických i běžných prostředí a vede k řešení medicínských, ekologických a biotechnologických problémů (Obr. 1). Sekvenační přístup analýzy metagenomů přináší rychlým tempem množství informací o nových genech, funkční analýzy umožnily identifikovat řadu nových enzymů, antibiotik a jiných biomolekul pocházejících z nejrůznějších biotopů (obr. 2). Využití potenciálu, který technologie metagenomiky nabízí, kriticky závisí na analýze metagenomových knihoven. Pro sekvenační přístup přestane být, díky stálému zdokonalování vysokokapacitních metod, nukleotidové sekvenování limitujícím faktorem. Rozlišení a složení individuálních genomů bude záviset na vývoji softwarových nástrojů bioinformatiky a dostupnosti DNA čipů, které navíc umožní rozlišit klony exprimující informaci matagenomu od klonů obsahujících neaktivní pseudogeny. Lze očekávat, že pro předpověď funkce genového produktu bude využito pokroků ve stanovení homologií proteinů, které bude stále více založeno na porovnávání modelovaných terciárních struktur a analýzy přestanou být omezeny na (často málo průkazné) homologie v primárních strukturách proteinů. Funkční analýzy budou vyžadovat řadu dalších inovací

v oblasti vysokokapacitního screeningu knihoven metagenomů (Obr. 3 a 4), ale hlavní limitací zůstávají vhodní hostitelé s genetickým pozadím umožňujícím expresi často exotických heterologních genů. Významným příslibem pro funkční analýzy a cílenou přípravu genů a proteinů „na míru" je přístup metagenomického mísení genů na úrovni sekundárních knihoven připravených spojováním různých částí genů z celých metagenomů.

Při pohledu na obrovský potenciál metagenomiky a jeho současné využití v biotechnologické praxi je zarážející, že jen zlomek výsledků je kryt patenty a jen velmi malé množství nově objevených enzymů nebo biosyntetických drah nalezlo reálné uplatnění. Určitým dluhem metagenomiky s ohledem na biotechnologické aplikace tedy zůstává zvýšení podílu skutečných a prakticky zajímavých novinek ze světa nekultivovaných mikroorganismů. To předpokládá vhodně položenou otázku (a selekční metodu) vycházející z „poptávky" po určité biomolekule, tj. enzymu výhodných vlastností nebo biosyntetické dráhy cenné látky, a tedy úzkou spolupráci mezi výzkumem a průmyslem nebo klinickou praxí.

Tento referát vznikl za podpory grantů NPV II č. 2B0 8031 a MŠMT ČR č. MSM 6046137305.

Literatura

1. C. Wang, D. J. Meek, P. Panchal, N. Boruvka, F. S. Archibald, B. T. Driscoll, T. C. Charles, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 384 (2006).
2. A. Knietsch, T. Waschkowitz, S. Bowien, A. Henne, R. Daniel, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1408 (2003).
3. A. Knietsch, T. Waschkowitz, S. Bowien, A. Henne, R. Daniel, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 46 (2003).
4. E. W. van Hellemond, D. B. Janssen, M. W. Fraaije, *Appl. Environ. Mixcrobiol.* **73**, 5832 (2007).
5. J. Yun, S. Kang, S. Park, H. Yoon., M. J. Kim, S. Heu, S. Ryu, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7229 (2004).
6. T. H. Richardson, X. Tan, G. Frey, W. Callen, M. Cabell, D. Lam, J. Macomber, J. M. Short, D. E. Robertson, C. Miller, *J. Biol. Chem.* **277**, 26501 (2002).
7. S. Voget, H. L. Steele, W. R. Streit, *J. Biotechnol.* **126**, 26 (2006).
8. C. C. Lee, R. E. Kibblewhite-Accinelli, K. Wagschal, G. H. Robertson, D. W. Wong, *Extremophiles* **10**, 295 (2006).
9. Y. Brennan, W. N. Callen, L. Cristoffersen, P. Dupree, F. Goubet, S. Healey, M. Hernández, M. Keller, K. Li, N. Palackal, A. Sittenfeld, G. Tamayo., S. Wells, G. P. Hazlewood, E. J. Mathur, J. M. Short, D. E. Robertson, B. A. Steer, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3609 (2004).
10. S. Voget, C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, W. R. Streit, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6235 (2003).
11. M. Ferrer, O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, V. A. Martins Dos Santos, M. 1. M. Yakimov, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, *Chem. Biol.* **12**, 895 (2005).
12. C. Elend, C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carballeira, H. L. Steele, J. L. Reymond, K. E. Jaeger, W. R. Streit, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3637 (2006).
13. G. DeSantis, Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9024 (2002).

14. D. E. Robertson, J. A. Chaplin, G. DeSantis, M. Podar, M. Madden, E. Chi., T. Richardson, A. Milan, M. Miller, D. P. Weiner, K. Wong, J. McQuaid, B. Farwell, L. A. Preston, X. Tan, M. A. Snead, M. Keller, E. Mathur, P. L. Kretz, M. J. Burk, J. M. Short, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2429 (2004).
15. M. Podar, J. R. Eads, T. H. Richardson, *BMC Evol. Biol.* **5**, 42 (2005).
16. K. Liebeton, J. Eck , *Eng. Life. Sci.* **4**, 557 (2004).
17. E. M. Gabor, E. J. de Vries, D. B. Janssen, *Environ. Microbiol.* **6**, 948 (2004).
18. A. Knietsch, S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk, R. Daniel, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3048 (2003).
19. P. Entcheva, W. Liebl, A. Johann, T. Hartsch, W. R. Streit, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 89 (2001).
20. W. H. Eschenfeldt, L. Stols, H. Rosenbaum, Z. S. Khambatta, E. Quaite-Randall, S. Wu, D. C. Kilgore, J. D. Trent, M. I. Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4206 (2001).
21. G. Y. Wang, E. Graziani, B. Waters, W. Pan, X. Li, J. McDermott, G. Meurer, G. Saxena, R. J. Andersen, J. Davies, *Org. Lett.* **2**, 2401 (2000).
22. S. F. Brady, J. Clardy, Org. Lett. *5*, 121 (2003).
23. S. F. Brady, J. Clardy, *Abgrew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7063 (2005).
24. S. F. Brady, J. Clardy, *Abgrew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7045 (2005).
25. S. F. Brady, J. Clardy, *J. Nat. Prod.* **67**, 1283 (2004).
26. D. E. Gillespie, S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, J. Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4301 (2002).
27. S. F. Brady, C. J. Chao, J. Handelsman, J. Clardy, *Org.. Lett.* **3**, 1981 (2001).
28. H. K. Lim, E. J. Chung, J. C. Kim, G. J. Choi, K. S. Jang, Y. R. Chung, K. Y. Cho, S. W. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7768 (2005).

Článek je upravenou verzí referátu Chemické Listy 102 (2008) a je zde publikován se svolením redakce časopisu Chemické listy.

Pro další info o FEBS 2009 sledujte web

www.febs2009.org

Od 1. 1. 2009

nová internetová adresa ČSBMB

http://www.csbmb.cz

Určeno pro vnitřní potřebu ČSBMB
Výkonný redaktor: Pavel Rauch, VŠCHT
tel.: 220 183 268
Vychází 3 x ročně
Sazba a tisk: grafické studio Venice Praha s.r.o.
Bulletin č. 2/2008 ze dne 24. 10. 2008
Evid. číslo: MK ČR E 10260
Toto číslo je hrazeno
RVS AV ČR
ISSN 1211-2526

EMBL: http://www.embl-heidelberg.de/
EMBO: http://www.embo.org/
FEBS: http://www.febs.org/
ČSBMB: http://CSBMB.vscht.cz/