

METAGENOM – BOHATÝ ZDROJ NOVÝCH BIOMOLEKUL

PAVEL KOTRBA^a, ONDŘEJ UHLÍK^a,
KATEŘINA JEČNÁ^a, MARTINA MACKOVÁ^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}

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

Došlo 4.8.08, přijato 19.8.08.

Klíčová slova: metagenomika, nekultivovatelné mikroorganismy, enzymy, antibiotika

Obsah

1. Úvod
2. Technologie metagenomiky
 - 2.1. Strategie izolace DNA
 - 2.2. Strategie přípravy knihoven metagenomů
 - 2.3. Strategie screeningu knihoven metagenomů
3. Užitečné enzymy a další biomolekuly nekultivovatelných mikroorganismů
 - 3.1. Amylasy, celulasy a další hydrolasy polysacharidů
 - 3.2. Nitrilasy, nitrilhydratasy a amidasy
 - 3.3. Glyceroldehydratasa
 - 3.4. Esterasy
 - 3.5. Oxidoreduktasy
 - 3.6. Biosyntéza vitaminů, antibiotik a léčiv
4. Závěr

1. Úvod

Impuls, který nastartoval zájem o mikrobiální svět, lze datovat rokem 1673, kdy Antonie van Leeuwenhoek zveřejnil pro širší publikum svá pozorování mikroflóry vlastní ústní dutiny, prováděných pomocí podomácku vyrobeného mikroskopu opatřeného jednou čočkou. Zároveň popsal „*wee animacules*“, jak mikroorganismy nazval, 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 mikroorganismu¹. Vývoj mikrobiologie se pak podřídil těmto postulátům, mikrobiologové 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 S. A. Waksman optimisticky prohlásil, že již bylo nashromážděno dostatečné množství informací, které umožňují vytvořit jasnou představu o půdní mikroflóře (v *orig.* ...a large body of information has accumulated that enables us to construct a clear picture ... of ... the microscopic population of the soil)². Toto přesvědčení však dostalo 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 počítáním³. 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 (cit.⁴). Z celkového počtu půdních bakterií je běžnými postupy kultivovatelných 0,1–1 % (cit.⁵). V současné době je počet prokaryot na Zemi odhadován na $4 \cdot 10^{30}$ – $6 \cdot 10^{30}$, a součet množství organického uhlíku v prokaryotech ze všech složek životního prostředí je souměřitelný s množstvím uhlíku deponovaným v rostlinné biomase⁶. 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 metod⁷, způsobily zásadní obrát směřem ke studiu nekultivovatelných mikroorganismů. Pozornost začíná být věnována jak fylogenetické příslušnosti nekultivovatelných, 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 (cit.⁸) a korelace mezi výskytem těchto bakterií, vznikem gastritidy a tvorbou vředů byla popsána v roce 1938 (cit.⁹), nebyla příčinná souvislost mezi *H. pylori* a gastritidou akceptována do doby, než byla tato bakterie s odpovídajícími důsledky „kultivována“ v gastrointestinálním traktu dobrovolníka^{10,11}.

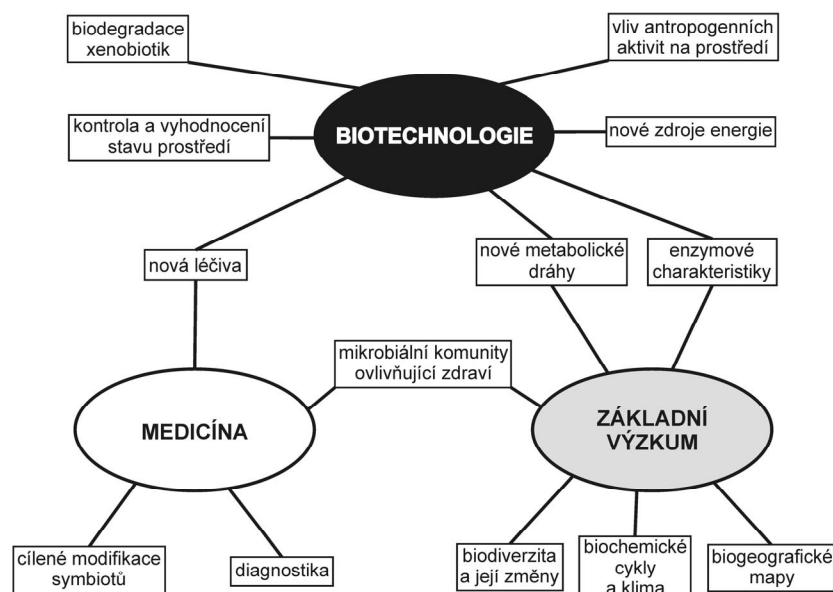
V roce 1985 rozšířily pokroky v molekulární genetice spektrum nástrojů pro studium mikroorganismů o analýzu

ribosomálních 5S a 16S rRNA izolovaných přímo z matrice environmentálních vzorků půdy nebo vody bez potřeby jejich kultivace^{12,13}. 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 zástupce¹⁴. 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*^{15,16}.

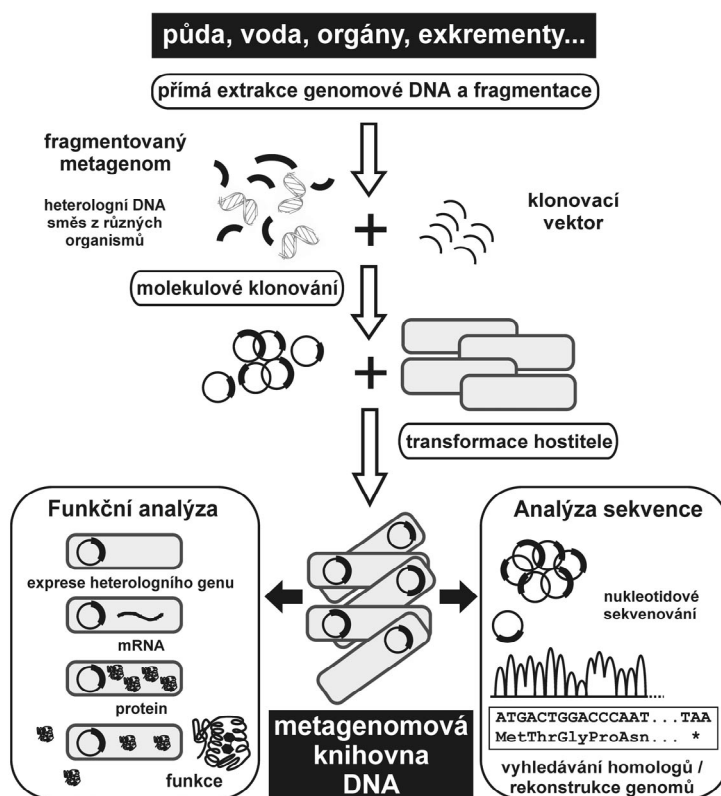
2. Technologie metagenomiky

Vedle teoretického studia mikrobiální diversity ekosystémů a katalogizace rRNA 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). Cílení metagenomické studie na vyhledání určité enzymové aktivity, biosyntetické dráhy nebo dráhy umožňujícího využití 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 diversity pomocí DDGE a TGGE (denaturační a teplotní gradientová gelová elektroforéza DNA), hybridizační metody, RFLP (restriction fragment length polymorphism; metoda využívající polymorfismu v délce fragmentů po restričním štěpení DNA z různých mikroorganismů) a nebo značení metabolicky aktivních mikroorganismů metodou SIP (stable isotope probing; metoda založená na inkorporaci exogenně přidaných stabilních izotopů do biomolekul me-



Obr. 1. Možné aplikace metagenomiky



Obr. 2. Konstrukce a screening knihoven metagenomů

tabolicky aktivních mikroorganismů), které byly v Chemických listech diskutovány dříve¹⁷.

2.1. 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. Ačkoliv je dostupná celá řada komerčních souprav pro izolaci celkové DNA z environmentálních matric (např. z půdy), řada laboratorů si vyvinula vlastní techniky izolace pro zajištění stejnoměrné lyze různých zástupců mikrobiální komunity^{18,19}. Při použití přístupů přímé extrakce DNA *in situ* z environmentální matrice nebo nepřímé extrakce, již předchází izolace mikroorganismů z matrice, se ukazuje, že oba poskytují celkovou DNA pokrývající stejné spektrum diverzity komunity, nicméně přímé metody poskytují běžně vyšší výtěžky²⁰. 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 kyselin²¹.

V určitých případech, při vyhledávání genetických determinant specifických schopností v komunitě, je výhodné zařadit před extrakcí DNA prekulivační krok za podmínek, které preferují zástupce disponující cílovou vlastností^{22,23}. Je-li takovou vlastností např. schopnost utištění určitých organických látek, pak lze využít strategie SIP a směsnou kulturu dotovat tímto substrátem obsahujícím těžší nuklid ¹³C a zaměřit extrakci DNA na izolaci „těžké“ DNA obsahující ¹³C inkorporovaný v důsledku utištění značeného substrátu proliferujícími zástupci komunity^{17,24,25}.

2.2. Strategie přípravy knihoven metagenomů

Při volbě mezi možnostmi vytvářet knihovny metagenomu z krátkých (tisíce párů bází) nebo dlouhých (desítky tisíc párů bází) fragmentů DNA je třeba zohlednit, zda je předmětem zájmu vyhledávání individuálních genů nebo celých operonů a biosyntetických drah. Často je i pro po-

souzení 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 kosmidů²⁰, umělých bakteriálních chromosomů (BAC; cit.²⁶) nebo fosmidů (vektory založené na F-plasmidu; cit.^{21,27}). Knihovny krátkých fragmentů jsou spíše než pro funkční analýzu genů vhodné jako zdroj informací o sekvenci DNA metagenomů^{28,29}.

2.3. Strategie screeningu knihoven metagenomů

Pro screening knihoven metagenomů existují dva přístupy: funkční analýza genů cílená na identifikaci určité vlastnosti nebo sekvenční 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 bakteri-orhodopsin (lokalizovaný v blízkosti genu pro 16S rRNA) a následně byla potvrzena jeho funkce jako fotoreceptoru, který byl do té doby znám jen u zástupců říše *Archaea*^{30,31}. Význam sekvenčního přístupu roste s dostupností vysokokapacitních metod sekvenování DNA jako je 454 technologie³².

Přístup funkční analýzy genů, spočívající v identifikaci hostitele nesoucího fragment (klon) metagenomu vykazující 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 genomů³³. Určité řešení nabízí použití alternativních hostitelů metagenomových knihoven půdních mikroorganismů. Používání jsou *Streptomyces lividans* a *Pseudomonas putida*³⁴, *Pseudomonas fluorescens*³⁵ a ukazuje se, že jako hostitele je možno využít i zástupce rodu *Rhizobium*^{36,37}.

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 gene-expression screening, tj. screening na substrátem indukovanou expresi [reportérového] genu; obr. 3a) využí-

vá pro rychlý screening klonů s indukovatelnými katabolickými geny tzv. operonovou past, jejíž podstatou je vytváření genetických fúzí fragmentů metagenomů s tzv. reportérovým genem *gfp* pro zelený fluoreskující protein³⁸. Klony metagenomu jsou pak inkubovány v přítomnosti cílového induktoru (substrátu) a pozitivní zástupci jsou identifikováni průtokovou cytometrií v uspořádání FACS (fluorescence activated cell sorting, tj. třídění buněk aktivované fluorescencí). Pro identifikaci klonů produkujících efektní mezibuněčné signalizace, jako je quorum sensing, byl v systému METREX (metabolite-regulated expression, tj. systém exprese [reportérového] genu) regulovaná metabolitem; obr. 3b) vyvinut hostitel nesoucí *gfp* pod kontrolou promotoru genů *lux* pro bakteriální luciferasu a produkující odpovídající transkripční regulátor LuxR, jehož aktivita je závislá na přítomnosti signálních molekul^{39,40}.

3. Užitečné enzymy a další biomolekuly nekultivovatelných mikroorganismů

Metagenomika poskytuje dříve nepostižitelnou výpočtovou ekologickou 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^{41,42}. 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.

3.1. Amylasy, celulasy a další hydrolasy polysacharidů

Ze 14 doposud identifikovaných amylolytických klonů⁴³ 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 prostředcích⁴⁴. 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 optimální aktivitu při pH 4,5 a teplotě 105 °C, bez nároku na přítomnost stabilizujících Ca^{2+} (cit.³⁵). 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 identifikova-

ných α -amylas byl získán chimerní gen pro amylasu BD5088, kterou lze, při zachování katalytických charakteristik enzymu BD5063, produkovat s vysokými výtěžky³⁵. Enzym BD5088 by tak v procesu sacharifikace kyselých extraktů kukuřičného škrobu mohl nahradit standardně používaný preparát α -amylasy z *Bacillus licheniformis* termostabilní pouze v oblastech blízkých neutrálnímu pH a v přítomnosti Ca^{2+} .

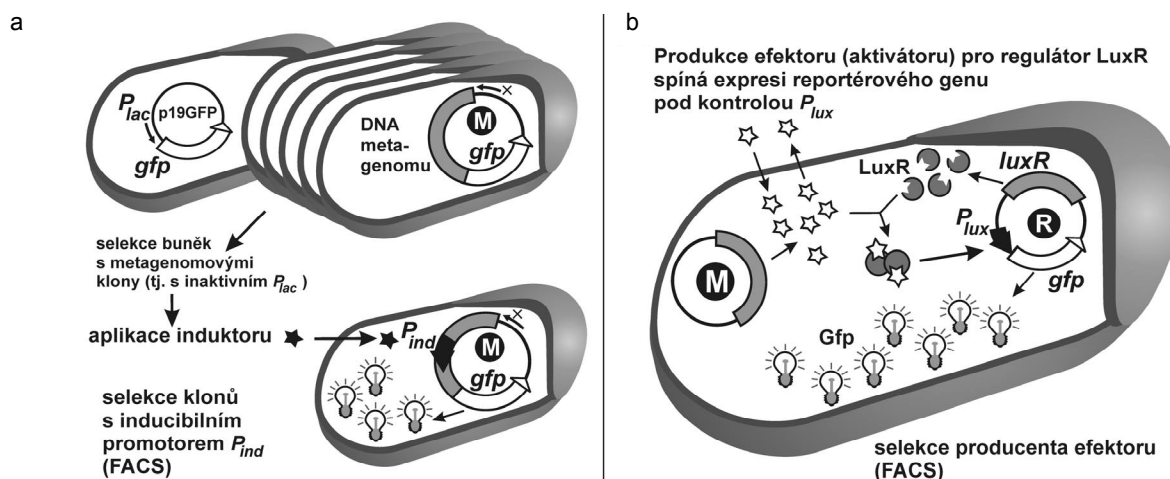
Ačkoliv se vyhledávání celulas v metagenomech zaměřuje především na celulas z termofilních nebo anaerobních mikroorganismů, často s krokem předkultivace na karboxymethylcelulose nebo lignocelulose^{45–47}, lze v aerobní mezofilní půdní mikroflóře nalézt enzymy tolerující extrémní podmínky. Voget a spol.⁴⁸ 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 xylanasy⁴³. Z metagenomů odpadní jímky byly izolovány xylanasa Xyn8, zajímavá svou aktivitou při nízkých teplotách⁴⁹ a z mikroflóry zažívacího traktu mýry a termita xylanasy XYL6805, 6806, 6807 a XYL6419, které nevýkazovaly významnou sekvenční homologii se známými xylanasami

a představují tak novou rodinu těchto enzymů⁵⁰. 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 mikroflóry⁵¹.

3.2. Nitrilasy, nitrilhydratasy a amidasy

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 zástupců⁴³. 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^{52–54}. Nitrilhydratasy konvertující nitrily na amidy karboxylových kyselin nalézají využití při syntézách nikotinamidu a akrylamidu a metagenomika odhalila 12 nových nitrildehydogenas z půdních mikroorganismů⁵⁵. Amidasy jsou využívány při syntézách β -laktamových antibiotik a z nekultivovatelné půdní bakterie byla získána penicilinacylasa, využitelná při produkci semisyntetických penicilinů⁵⁶.



Obr. 3. Molekulárně-genetické přístupy při funkční analýze knihoven metagenomů; (a) Operonová past v plasmidu p19GFP (metoda SIGEX; cit.³⁸). V hostiteli nesoucím samotný plasmid p19GFP je transkripce genu *gfp* kódujícího zelený fluoreskující protein GFP kontrolována *lac* promotorem, což umožňuje eliminaci hostitele bez heterologního fragmentu DNA. Fúzi *gfp* s fragmentem DNA metagenomu obsahujícím indukovatelné katabolické geny pod kontrolou promotoru *P_{ind}* je v plasmidu M vytvořen operon, jehož exprese je spínána v přítomnosti odpovídajícího exogenního induktoru (*P_{lac}* je neaktivní:×). (b) Buněčný sensor pro identifikaci genů biosyntézy efektorů mezibuněčné komunikace (systém METREX; cit.^{39,40}). 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 laktón), lze jej využít i pro identifikaci negativních efektorů LuxR. Klony produkujících GFP jsou jako selektovány pomocí průtokové cytometrie FACS (fluorescence activated cell sorting).

3.3. Glyceroldehydratasa

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* BI21/pAK5.1 produkující glyceroldehydratasu, která se vyznačovala významnou rezistencí k inhibici aktivity glycerolem a konečným metabolitem 1,3-propandiolem (cit.⁵⁷).

3.4. Esterasy

Doposud bylo v metagenomech identifikováno okolo 80 esteraz⁴³, z nichž však jen několik bylo biochemicky charakterizováno. Z podmorské solné lokality byla izolována řada enantioselektivních esteraz aktivních v oblasti alkalického pH a za vysokých tlaků, mezi nimi jedna z doposud největších popsaných esteraz, esterasa O.16, homotrimer o 325 kDa (cit.⁵⁸). 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.²³).

3.5. 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 předpokládané primární struktuře enzymu a méně než 35% identitou se známými proteiny³⁷. NAD(P)H-dependentní alkoholdehydrogenasy (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 mikrobiální říčních sedimentů a půdy bylo izolováno 48 klonů schopných konvertovat C2 až C4 polyoly na odpovídající karbonylové sloučeniny^{59,60}, zatím bez charakterizované selektivity. Žádná z 11 identifikovaných alkoholdehydrogenas nevykazuje sekvenční homologii ke známým zástupcům⁶¹ NAD(P)H-dependentních ADH a jedná se tak o zcela nové enzymy^{59,60}. Významnou enantioselektivitu vykazuje monooxygenasa SmoA, jejíž gen byl izolován z půdního metagenomu⁶² a která konvertuje styren a jeho chlorované deriváty na odpovídající (S)-epoxydy s výtěžky >99 %.

3.6. Biosyntéza vitaminů, antibiotik a léčiv

Metagenomický přístup byl aplikován při vyhledávání biosyntetických drah biotinu a vitamínu C. Z metagenomové knihovny půdní mikrobioty testované v *E. coli* s auxotrofií na biotin bylo identifikováno 7 klonů s operony kódujícími biosyntetickou dráhu biotinu⁶³. Z nekultivovatelných půdních bakterií byly izolovány geny kódující dvě 2,5-diketo-D-glukonát reduktasy, C a D, jež jsou součástí biosyntetické dráhy vitamínu 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 terragín A (hostitel *S. lividans*; cit.⁶⁵) a 11 klonů produkujících antibiotika N-acetyltyrosinové řady (hostitel *E. coli*; cit.⁶⁶). Pomocí inhibičního testu s *Bacillus subtilis* byl z půdního metagenomu selektován klon produkující zcela nové antibiotikum, indol derivatizovaný isokyanidovou skupinou na C3 (hostitel *E. coli*, cit.⁶⁷), pro jehož biosyntézu se využívá jako prekurzor tyrosin a ribulosa-5-fosfát⁶⁸. Antibakteriální účinky na *Bacillus* sp. má i sekundární amid kyseliny palmitové, palmytoylputrescin, produkovaný klonem metagenomu symbiotů tropických rostlin čeledi *Bromeliaceae* s *E. coli* jako hostitelem⁶⁹. Identifikovaná palmytoylputrescinsyntetasa 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.⁷⁰) a violacein (cit.⁷¹). V půdních metagenomech byly identifikovány i biosyntetické dráhy indirubinu (cit.⁷²), který je používán při terapiích u pacientů trpících leukémií.

4. 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). Sekvenční 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 sekvenční přístup přestane být, díky stálému zdokonalování vysokokapacitních metod, nukleotidové sekvenování limitujícím faktorem. Rozlišení a složení individuálních genomů bude záviset na vývoji softwaro-

vých nástrojů bioinformatiky⁷³ a dostupnosti DNA čipů, které navíc umožní rozlišit klony exprimující informaci metagenomu od klonů obsahujících neaktivní pseudogeny⁷⁴. 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), 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 spojáním různých částí genů z celých metagenomů⁷⁵.

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 uplatnění⁴³. Je vysoce pravděpodobné, že díky extenzivnímu přístupu, jímž je současná metagenomika charakteristická, obsahují již stávající knihovny metagenomů geny kódující nové enzymové aktivity a metabolické funkce. 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 spoluprací 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. Paustian T., Roberts G.: *The Microbial World - Through The Microscope: A Look At All Things Small*. On-line verze na <http://www.microbiologytext.com/> (staženo 9.5. 2008).
2. Waksman S. A., Starkey R. L.: *The Soil And The Microbe*. John Wiley, New York 1931.
3. Staley J. T., Konopka A.: *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321 (1985).
4. Grimes D. J., Atwell R. W., Brayton P. R., Palmer L. M., Rollins D. M., Roszak D. B., Singleton F. L., Tamplin M. L., Colwell R. R.: *Microbiol. Sci.* 3, 324 (1986).
5. Torsvik V., Ovreas L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240 (2002).
6. Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6478 (1998).
7. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782 (1990).
8. Buckley M. J. M., O'Morain C. A.: *Br. Med. Bull.* 54, 7 (1998).
9. Doenges J. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38, 536 (1938).
10. Marshall B. J., Armstrong J. A., McGeachie D. B., Glancy R. J.: *Med. J. Aust.* 142, 436 (1985).
11. Marshall B. J., McGeachie D. B., Rogers P. A., Glancy R. J.: *Med. J. Aust.* 142, 439 (1985).
12. Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J.: *Adv. Microb. Ecol.* 9, 1 (1986).
13. Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1379 (1985).
14. informace N. Pace, <http://pacelab.colorado.edu/coursesnew.html> (staženo 9.5. 2008).
15. DeLong E. F., Wickham G. S., Pace N. R.: *Science* 243, 1360 (1989).
16. Giovannoni S. J., DeLong E. F., Olsen G. J., Pace N. R.: *J. Bacteriol.* 170, 720 (1988).
17. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Leigh M.B., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 102, 474 (2008).
18. Frostegard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409 (1999).
19. Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715 (1999).
20. Courtois S., Cappellano C. M., Ball M., Francou F. X., Normand P., Helynek G., Martinez A., Kolvek S. J., Hopke J., Osburne M. S., August P. R., Nalin R., Guérineau M., Jeannin P., Simonet P., Pernodet J. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 49 (2003).
21. Quaiser A., Ochsenreiter T., Klenk H. P., Kletzin A., Treusch A. H., Meurer G., Eck J., Sensen C. W., Schleper C.: *Environ. Microbiol.* 4, 603 (2002).
22. Daniel R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470 (2005).
23. Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J. D., Steele H. L., Raymond J. L., Jaeger K. E., Streit W. R.: *Appl Environ Microbiol* 72, 3637 (2006).
24. Radajewski S., McDonald I. R., Murrell J. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 296 (2003).
25. Uhlík O., Jecna K., Leigh M. B., Mackova M., Macek T.: *Sci. Total. Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2008.05.012, v tisku (2008).
26. Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541 (2000).
27. Treusch A. H., Kletzin A., Raddatz G., Ochsenreiter T., Quaiser A., Meurer G., Schuster S. C., Schleper C.: *Environ. Microbiol.* 6, 970 (2004).
28. Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A., Wu D., Paulsen I., Nelson K. E., Nelson W., Fouts D. E., Levy S., Knap A. H., Lomas M. W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y. H., Smith H. O.: *Science* 304, 66

- (2004).
29. Banfield J. F., Verberkmoes N. C., Hettich R. L., Thelen M. P.: *Omics* 9, 301 (2005).
 30. Beja O., Aravind L., Koonin E. V., Suzuki M. T., Hadd A., Nguyen L. P., Jovanovich S. B., Gates C. M., Feldman R. A., Spudich J. L., Spudich E. N., DeLong E. F.: *Science* 289, 1902 (2000).
 31. Beja O., Spudich E. N., Spudich J. L., Leclerc M., DeLong E. F.: *Nature* 411, 786 (2001).
 32. <http://www.454.com/enabling-technology/index.asp> (staženo 9.5. 2008).
 33. Gabor E. M., Alkema W. B. L., Janssen D. B.: *Environ. Microbiol.* 6, 879 (2004).
 34. Martinez A., Kolvek S. J., Yip C. L., Hopke J., Brown K. A., MacNeil I. A., Osburne M. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2452 (2004).
 35. Richardson T. H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., LamD., Macomber J., Short J. M., Robertson D. E., Miller C.: *J. Biol. Chem.* 277, 26501 (2002).
 36. Li Y., Wexler M., Richardson D. J., Bond P. L., Johnston A. W.: *Environ. Microbiol.* 7, 1927 (2005).
 37. Wang. C., Meek D. J., Panchal P., Boruvka N., Archibald F. S., Driscoll B. T., Charles T. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 384 (2006).
 38. Uchiyama T., Abe T., Ikemura T., Watanabe K.: *Nat. Biotechnol.* 23, 88 (2005).
 39. Andersen J. B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B. B., Molin S., Givskov M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 575 (2001).
 40. Williamson L. L., Borlee B. R., Schloss P. D., Guan C., Allen H. K., Handelsman J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6335 (2005).
 41. Hondelsman J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 58, 669 (2004).
 42. Frank D. N., Pace N. R.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 4 (2008).
 43. Schmeisser C., Steele H., Streit W. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 955 (2007).
 44. Yun J., Kang S., Park S., Yoon H., Kim M. J., Heu S., Ryu S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7229 (2004).
 45. Rhee J. K., Ahn D. G., Kim Y. G., Oh J. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 817 (2005).
 46. Grant S., Sorokin D. Y., Grant W. D., Jones B. E., Heaphy S.: *Extremophiles* 8, 421 (2004).
 47. Healy F. G., Ray R. M., Aldrich H. C., Wilkie A. C., Ingram L. O., Shanmugam K. T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 667 (1995).
 48. Voget S., Steele H. L., Streit W. R.: *J. Biotechnol.* 126, 26 (2006).
 49. Lee C. C., Kibblewhite-Accinelli R. E., Wagschal K., Robertson G. H., Wong D. W.: *Extremophiles* 10, 295 (2006).
 50. Brennan Y., Callen W. N., Christoffersen L., Dupree P., Goubet F., Healey S., Hernández M., Keller M., Li K., Palackal N., Sittenfeld A., Tamayo G., Wells S., Hazlewood G. P., Mathur E. J., Short J. M., Robertson D. E., Steer B. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3609 (2004).
 51. Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K. E., Streit W. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6235 (2003).
 52. DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W. A., Wong K., Chaplin J., Hanson S. R., Farwell B., Nicholson L. W., Rand C. L., Weiner D. P., Robertson D. E., Burk M. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9024 (2002).
 53. Robertson D. E., Chaplin J. A., DeSantis G., Podar M., Madden M., Chi E., Richardson T., Milan A., Miller M., Weiner D. P., Wong K., McQuaid J., Farwell B., Preston L. A., Tan X., Snead M. A., Keller M., Mathur E., Kretz P. L., Burk M. J., Short J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2429 (2004).
 54. Podar M., Eads J. R., Richardson T. H.: *BMC Evol. Biol.* 5, 42 (2005).
 55. Liebeton K., Eck J.: *Eng. Life. Sci.* 4, 557 (2004).
 56. Gabor E. M., de Vries E. J., Janssen D. B.: *Environ. Microbiol.* 6, 948 (2004).
 57. Knietsch A., Bowien S., Whited G., Gottschalk G., Daniel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3048 (2003).
 58. Ferrer M., Golyshina O. V., Chernikova T. N., Khachane A. N., Martins Dos Santos V. A., Yakimov M. M., Timmis K. N., Golyshin P. N.: *Chem. Biol.* 12, 895 (2005).
 59. Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1408 (2003).
 60. Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5, 46 (2003).
 61. Kotrbova-Kozak A., Sajdok J., Kotrba P.: *Chem. Listy* 101, 372 (2007).
 62. van Hellemond E. W., Janssen D. B., Fraaije M. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5832 (2007).
 63. Entcheva P., Liebl W., Johann A., Hartsch T., Streit W. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 89 (2001).
 64. Eschenfeldt W. H., Stols L., Rosenbaum H., Khambatta Z. S., Quate-Randall E., Wu S., Kilgore D. C., Trent J. D., Donnelly M. I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4206 (2001).
 65. Wang G. Y., Graziani E., Waters B., Pan W., Li X., McDermott J., Meurer G., Saxena G., Andersen R. J., Davies J.: *Org. Lett.* 2, 2401 (2000).
 66. Brady S. F., Clardy J.: *Org. Lett.* 5, 121 (2003).
 67. Brady S. F., Clardy J.: *Abgrew. Chem. Int. Ed.* 44, 7063 (2005).
 68. Brady S. F., Clardy J.: *Abgrew. Chem. Int. Ed.* 44, 7045 (2005).
 69. Brady S. F., Clardy J.: *J. Nat. Prod.* 67, 1283 (2004).
 70. Gillespie D. E., Brady S. F., Bettermann A. D., Cianciotto N. P., Liles M. R., Rondon M. R., Clardy J., Goodman R. M., Handelsman J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4301 (2002).
 71. Brady S. F., Chao C. J., Handelsman J., Clardy J.: *Org. Lett.* 3, 1981 (2001).
 72. Lim H. K., Chung E. J., Kim J. C., Choi G. J., Jang K. S., Chung Y. R., Cho K. Y., Lee S. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7768 (2005).
 73. Foerstner K. U., von Mering C., Bork P.: *Philos.*

- Trans. R. Soc. London, Ser. B 361, 519 (2006).
74. Sebat J. L., Colwell F. S., Crawford R. L.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 4927 (2003).
75. Boubakri H., Beuf M., Simonet P., Vogel T. M.: Gene 375, 87 (2007).

P. Kotrba^a, O. Uhlík^a, K. Ječná^a, M. Macková^a, and T. Macek^{a,b} (^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague; ^b Department of Natural Products, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic): **Metagenome – a Rich Source of Novel Biomolecules**

The finding that a vast majority of microbial species cannot be readily grown in a pure culture or has not yet been cultivated and their genetic and metabolic potentials remain unknown, caused a revolution in the microbiolo-

gists' view of microbial world. The methodology of studying microbes has experienced a significant transformation. Metagenomics, developed over the past decade, involves isolation of DNA covering genomes of a microbial community (metagenome) directly from environmental matrices, construction of the library of metagenome fragments and sequence-based or functional screening of metagenomic clones. This allows to elucidate genomes of uncultured microorganisms, to illuminate their genetic diversity, to understand their ecological significance and to provide novel useful enzymes and biomolecules. A brief view of recent advances in metagenomic strategies is provided and examples of novel enzymes and biomolecules of potential biotechnological significance are given. In spite of a large amount of information provided by metagenomics, only a limited number of genes and enzymes are currently used in biotechnological processes. The identification of novel biocatalysts and their implementation in viable production processes is a future challenge.

VŠCHT Praha přijme pracovníka na pozici technika-laboranta/laborantky pro Ústav analytické chemie.

Požadavky: středoškolské vzdělání, praxe v oboru

Nástup: 1.12.2008 nebo 1.1.2009

Velikost úvazku: 40 hodin týdně

Příhlášku včetně životopisu s přehledem dosavadní pracovní činnosti zašlete do 30. 11. 2008 na adresu: pavla.vlckova@vscht.cz

Kontakt: prof. RNDr. Štěpán Urban, CSc., tel. 220 444 267, Stepan.Urban@vscht.cz
